

UNIVERSIDADE DE LISBOA

INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS BIOMARCADORES DE TOXICIDADE DOS FÁRMACOS CARBAMAZEPINA E OXCARBAZEPINA

Inês Sofia Lança Martins

Orientador: Doutora Alexandra Maria Moita Antunes **Co-Orientador:** Doutora Maria Matilde Soares Duarte Marques

Tese aprovada em provas públicas para a obtenção do grau de Doutor em Química Quantificação atribuída pelo Júri: Aprovada com distinção



UNIVERSIDADE DE LISBOA

INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS BIOMARCADORES DE TOXICIDADE DOS FÁRMACOS CARBAMAZEPINA E OXCARBAZEPINA

Inês Sofia Lança Martins

Orientador: Doutora Alexandra Maria Moita Antunes

Co-Orientador: Doutora Maria Matilde Soares Duarte Marques

Tese aprovada em provas públicas para a obtenção do grau de Doutor em Química Quantificação atribuída pelo Júri: Aprovada com distinção

Júri

Presidente:

Doutora Maria Teresa Nogueira Leal da Silva Duarte - Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa -

Vogais:

Doutora Alexandra Maria Moita Antunes - Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa -Doutora Maria Emília da Silva Pereira de Sousa - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto -Doutora Paula Cristina de Sério Branco - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa -Doutora Maria da Conceição Monteiro André de Oliveira - Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa -Doutora Maria Manuel Duque Vieira Marques dos Santos - Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa -

Instituição Financiadora

Fundação para a Ciência e Tecnologia - SFRH/BD/75426/2010

Esta tese não segue as normas do novo Acordo Ortográfico

À memória da minha querida avó Nazaré

Resumo

A epilepsia é uma doença neurológica crónica que afecta cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar do seu uso generalizado, os fármacos antiepilépticos (AEDs) estão associados a reacções idiossincráticas severas (IDRs) e potencialmente fatais. A carbamazepina (CBZ), um dos fármacos antiepilépticos mais utilizados mundialmente, e o seu derivado estrutural, oxcarbazepina (OXCBZ), são dois AEDs associados a reacções de hipersensibilidade graves e potenciais agentes carcinogénicos. Deste modo, a administração crónica destes fármacos potencialmente (geno)tóxicos, em especial a crianças, levanta questões quanto à sua relação risco/benefício.

Muito embora os mecanismos envolvidos nas reacções adversas induzidas por estes dois AEDs não estejam totalmente esclarecidos, existem evidências que sugerem o envolvimento da bioactivação a metabolitos reactivos, capazes de reagir com biomacromoléculas formando adutos covalentes. Desta forma, a identificação e caracterização total dos adutos de excreção, como os mercapturatos ou conjugados com a glutationa, ou ainda dos adutos formados com biomacromoléculas modelo, como as proteínas do sangue, é de máxima importância dado que poderão ser utilizados como biomarcadores de exposição e/ou toxicidade da CBZ e OXCBZ.

O trabalho desenvolvido envolveu várias abordagens *in vitro*, tendo como objectivos principais a síntese e a caracterização dos adutos covalentes padrão, formados entre bionucleófilos e estes AEDs (ou dos seus potenciais metabolitos reactivos), e o desenvolvimento das metodologias analíticas, baseadas na técnica de espectrometria de massa (MS), para os detectar em níveis expectáveis *in vivo*.

Os metabolitos reactivos foram preparados por metodologias de síntese clássica ou gerados *in situ*, utilizando catalisadores biomiméticos ou sistemas metabolicamente competentes. A reactividade dos fármacos e dos seus metabolitos potencialmente tóxicos foi inicialmente avaliada na presença de aminoácidos modelo (ex. valinato de etilo ou N^a-acetilcisteína) e 2'-desoxinucleósidos. Foram identificados vários adutos covalentes, caracterizados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa por ionização de electrospray (LC-ESI-MS) e, sempre que possível, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR). A reactividade destes metabolitos com biomacromoléculas (ex. DNA, albumina e hemoglobina humana) foi também avaliada. A utilização de técnicas baseadas na análise por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) permitiu identificar alguns adutos com proteínas do sangue.

As metodologias utilizadas permitiram não só confirmar a probabilidade de envolvimento de alguns dos metabolitos na indução das reacções adversas associadas a estes fármacos como também abrir novos horizontes para mecanismos de toxicidade alternativos, até agora nunca explorados. Efectivamente foi demonstrada, pela primeira vez, a ocorrência de reacção directa, sem necessidade de bioactivação, da CBZ ou da OXCBZ com bionucleófilos. A identificação e caracterização dos adutos covalentes resultantes destas vias são de uma importância crucial, uma vez que sugere que estes AEDs podem estar directamente envolvidos em mecanismos de toxicidade. No caso particular da reacção da CBZ com bionucleófilo de enxofre, os estudos mecanísticos desenvolvidos sugerem que estados de oxigenação intensa (hiperóxia) e de *stress* oxidativo poderão constituir condições de risco. De salientar que, nestas condições, a reactividade da CBZ com bionucleófilos é superior à reactividade do seu metabolito maioritário, que por ser electrófilo era até aqui considerado como um dos principais responsáveis pela toxicidade induzida por este AED.

Este trabalho contribuiu não só para a preparação de novos adutos padrão mas também para o desenvolvimento de metodologias analíticas que poderão ser agora utilizados para monitorizar a formação destes adutos *in vivo* em doentes sob terapêutica com estes dois AEDs. Esta monitorização permitirá a determinação de potenciais relações entre a ocorrência (ou concentração) de adutos covalentes e a identificação de eventos tóxicos nestes doentes. Passa deste modo a estar disponível uma ferramenta potencialmente útil na identificação de factores de risco e na aplicação do conceito de medicina personalizada, contribuindo assim para a minimização dos efeitos adversos induzidos pelos dois AEDs estudados neste trabalho.

Palavras-chave: Epilepsia, carbamazepina, oxcarbazepina, biomarcadores, bioactivação.

Summary

Epilepsy is a chronic neurological disease that affects about 50 million people worldwide. Despite their widespread use, antiepileptic drugs (AEDs) are associated with severe and potentially fatal idiosyncratic reactions (IDRs). Carbamazepine (CBZ), one of the most used AEDs worldwide, and its structural derivative oxcarbazepine (OXCBZ), are two AEDs associated with serious hypersensitivity skin reactions and potential carcinogenic agents. Thus, chronic administration of these potentially (geno)toxic drugs, in particular to children, raises questions about the concomitant risk/benefit relationships.

The mechanisms involved in the adverse reactions induced by these two AEDs are not fully understood. However, the involvement of bioactivation to reactive metabolites, capable of reacting with biomacromolecules and yield covalent adducts, has been consistently suggested. Thus, the identification and characterization of excretion adducts, such as mercapturates or glutathione conjugates, or of adducts formed with model biomacromolecules, such as blood proteins, is of the utmost importance since they can be used as biomarkers of exposure and/or toxicity to these AEDs.

The work developed in this dissertation involved several *in vitro* approaches, whose main objectives were the synthesis and characterization of covalent adduct standards formed between bionucleophiles and these AEDs (or their potential reactive metabolites), and the development of analytical methodologies, based on mass spectrometry (MS), for their detection at levels expected *in vivo*.

Reactive metabolites were prepared by classical synthetic methodologies or generated *in situ* using biomimetic catalysts or metabolically competent systems. The reactivity of the drugs and their potentially toxic metabolites was initially evaluated with model amino acids (*eg.* ethyl valinate or *N*^a-acetyl-cysteine) and 2'-deoxynucleosides. Several covalent adducts were identified and characterized by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) and, when possible, by nuclear magnetic resonance (NMR). The reactivity of these AEDs (and their reactive metabolites) with biomacromolecules (*eg.* human DNA, albumin and hemoglobin) was also evaluated. Moreover, the use of methodologies based on high resolution mass spectrometry (HRMS) allowed the identification of several adducts formed with blood proteins.

The methodologies used in this work not only confirmed the probable involvement of some of the reactive metabolites in the onset of the adverse reactions associated to these drugs but also highlighted alternative toxicity mechanisms. Indeed, the direct reaction, with no need for bioactivation, of CBZ or OXCBZ with bionucleophiles has been demonstrated here for the first time. The identification and characterization of covalent adducts resulting from these pathways is of crucial importance since it suggests that these AEDs may be

directly involved in toxicity mechanisms. In the particular case of the CBZ reaction with sulfur-based bionucleophile, the mechanistic studies performed suggest that states of intense oxygenation (hyperoxia) and oxidative stress may constitute risk factors. It should be noted that, under these conditions, CBZ reacts more efficiently with thiol-based bionucleophiles than its major metabolite, which has been consistently suggested as one of the metabolites involved in the CBZ-toxicity.

This work has contributed not only to the preparation of new adduct standards but also to the development of analytical methodologies which can now be used to monitor the formation of these adducts *in vivo*, in patients on therapy with these two AEDs. This will allow the determination of potential relationships between adduct formation (or concentration) and the occurrence of toxic events in these patients. These methodologies may become useful tools to identify risk factors and apply the personalized medicine concept in AED therapy, thereby contributing to the minimization of the adverse effects induced by CBZ and OXCBZ.

Keywords: Epilepsy, carbamazepine, oxcarbazepine, biomarkers, bioactivation.

Agradecimentos

No momento de agradecer a todos os que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho, começo naturalmente por dirigir os meus agradecimentos à Doutora Alexandra Antunes e à Professora Doutora Maria Matilde Marques pela orientação científica deste trabalho, e sem as quais a realização desta dissertação, não teria sido possível. À Doutora Alexandra Antunes, orientadora científica desta dissertação, agradeço os valiosos conhecimentos transmitidos, a partilha e todas as preciosas contribuições para a realização deste trabalho mas também a sua amizade e apoio constante, nos momentos mais difíceis, e que foram muito para além da porta do laboratório. À Professora Doutora Maria Matilde Marques, co-orientadora desta dissertação, agradeço a partilha de conhecimento e as valiosas sugestões. Pela sua disponibilidade e compreensão, o meu sincero obrigada.

Ao Nó do Instituto Superior Técnico (IST) da Rede Nacional de Espectrometria de Massa, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), agradeço o acesso aos equipamentos de espectrometria de massa sem os quais este trabalho nunca poderia ter sido efectuado. Agradeço à Doutora Cristina Jacob e à Mestre Ana Dias pela disponibilidade total para a análise de todas as minhas amostras. Um agradecimento especial à Doutora Conceição Oliveira pela disponibilidade, as preciosas sugestões e partilha de conhecimentos mas principalmente pela simpatia e amizade.

Ao Nó do IST da Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, financiado pela FCT, agradeço o acesso aos espectrómetros de ressonância magnética nuclear. Agradeço também à Doutora Maria João Ferreira pela disponibilidade e sugestões práticas na aquisição dos meus espectros.

Ao Doutor Gonçalo Campos Justino, agradeço os cálculos computacionais realizados.

À FCT agradeço o financiamento disponibilizado (SFRH/BD/75426/2010, RECI/QEQ-MED/0330/2012, UID/QUI/00100/2013, IF/01091/2013/CP1163/CT0001) e que me permitiu fazer ciência nestes últimos 5 anos.

Agradeço também ao Centro de Química Estrutural (CQE) pelo acesso aos laboratórios, indispensáveis à realização de todo o trabalho experimental. Ao pessoal administrativo, Amália Soares e Sara Berguete, agradeço a sua simpatia e disponibilidade.

Queria também agradecer a todos os colegas dos Laboratórios 401 e 403 do Complexo Interdisciplinar e do Laboratório de Química Orgânica do Pavilhão de Química, que me acompanharam nestes 5 anos. Em especial, à Catarina Sousa, Tiago Fernandes, Pedro Florindo, Sara Sousa, Ivânia Cabrita e Joana Bernardo pelo companheirismo, simpatia e a boa disposição que sempre reina por lá. Aos meus colegas de grupo, Ana Godinho, Catarina Charneira, Gonçalo Justino, João Nunes, Pedro Pinheiro, Riccardo Wanke, Shrika Harjivan e os "pupilos" Catarina Pereira, David Farinha e Lara Fidalgo, o meu ENORME obrigada. Sem o vosso apoio, companheirismo e disponibilidade não seria possível. A vossa boa disposição, em conjunto com o espírito de equipa que criámos, tornou sempre tudo mais fácil e, muitas vezes, o impossível em possível. Um agradecimento especial aos meus queridos Catarina Charneira e Pedro Pinheiro, por saberem como lidar com o meu mau feitio, conseguindo sempre arrancar-me uma gargalhada. Foi sem dúvida a vossa animação e entusiasmo mas principalmente a vossa genuína amizade (e os inesquecíveis momentos de karaoke a cantar Hakuna Matata) que me permitiram aguentar os dias menos bons e voltar no dia seguinte.

Aos meus amigos de sempre, o meu maior e mais sincero obrigada. Vou ter de vos mencionar a todos porque sem dúvida a vossa amizade foi e será sempre o meu eixo. São eles: Ana Jordão, Carla Sarrouy, Joana Rodriguez, Helena Rodrigues, Rute Carvalho, Maria Ventura, Alexandra Faustino, Sheiliza Carmali, Marisa Camarão, Mónica Rodrigues, Marta Torrão, Carlos Batista, Bruno Esteves, Carlos Alfaiate, Hugo Silva e Gonçalo Neto. Sou claramente a mais sortuda e sem dúvida mais rica por vos ter a todos na minha vida. Obrigada por estarem sempre disponíveis, entenderem o porquê das minhas ausências e ainda assim fazerem-me sentir uma "rockstar" por ser cientista. Não posso deixar de destacar a Sheiliza Carmali que mesmo com um oceano entre nós sempre esteve perto, a ouvir-me e a aconselhar-me, todos os dias, e ainda à Marta Torrão, Carlos Batista e Gonçalo Neto pelo apoio "logístico" nesta recta final. Mil obrigadas, meus amores!

Finalmente, agradeço a toda a minha família mas principalmente ao meu "núcleo" e aos quais qualquer agradecimento nunca será suficiente: tio Pedro, madrinha Celeste, prima Bruna, avó Zé, avô Dino, e os meus queridos pais, Clara e Vitor. Obrigada pelo amor, compreensão e apoio incondicionais. Sempre! Aos meus pais principalmente, pela educação que me proporcionaram e por me incentivarem sempre a ir mais além. Ao meu "núcleo" agradeço porque mesmo sem entenderam nada da minha ciência, caminharam ao meu lado festejando todos os bons resultados e partilhando todas as frustrações, e por isso, esta dissertação é tanto minha como vossa.

Índice

RESUMO	I
SUMMARY	III
AGRADECIMENTOS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XIX
ÍNDICE DE TABELAS	XXIII
SIMBOLOGIAS E NOTAÇÕES	XXIX
CAPÍTULO I • INTRODUÇÃO	1
	0
I.1. Reacções idiossincraticas de fármacos.	
I.1.1. Papel da bioactivação de farmacos na indução de reacções idiossincraticas	
1.1.1.1. Metodologias <i>in vitro</i> para o estudo da bioactivação de farmacos	
I.1.2. Biomarcadores	
I.1.2.1. Metabolitos de excreção urinaria, mercapturatos e conjugados com a glutatio	na 23
I.1.2.1.1. Lechicas de analise e detecção dos metabolitos de excreção	urinaria,
mercapturatos e conjugados com a glutationa	
I.1.2.2. Adutos covalentes formados entre fármacos e biomacromoléculas	
I.1.3. Lecnicas de analise, detecção, caracterização e quantificação de adutos co	valentes
com proteínas e DNA	
I.1.3.1. Técnicas de isolamento e destacamento de adutos com biomacromoléculas	
I.1.3.1.A. Destacamento da valina <i>N</i> -terminal da hemoglobina	
I.1.3.1.B. Digestão enzimática de proteínas a péptidos ou aminoácidos	
I.2. Epilepsia e fármacos antiepilépticos (AEDs)	45
I.2.1. Fármacos antiepilépticos aromáticos (AAEDs)	49
I.2.1.1. Carbamazepina	51
Farmacocinética e Farmacodinâmica	51
Toxicidade	57
Bioactivação	58
I.2.1.2. Oxcarbazepina	64
Farmacocinética e Farmacodinâmica	65
Toxicidade	66
Bioactivação	67
I.3. Conclusão	68

CAPÍTULO II	•	DISCUSSÃO DE RESULTADOS	71
II.1.	Cons	siderações prévias	72

II.2. Estudo da reactividade da carbamazepina (62) e dos seus metabolitos reactivos com
aminoácidos e glutationa75
II.2.1. Hipóteses de trabalho: possíveis mecanismos de bioactivação da carbamazepina (62)
II.2.1.1. Metabolitos reactivos da carbamazepina (62) formados a partir da sua oxidação o
com um catalisador biomimético de Fe (II): formação de adutos com aminiácidos 80
II.2.1.2. Reactividade da epoxi-carbamazepina (79) com bionucleófilos
II.2.1.3. Reactividade da carbamazepina (62) com bionucleófilos
II.2.1.4. Reactividade da 2-hidroxi-carbamazepina (82) com aminoácidos
II.2.1.5. Reactividade do 9-acridina-carboxaldeído (88) com aminoácidos156
II.3. Estudo reactividade da oxcarbazepina (63) e dos seus metabolitos reactivos com
aminoácidos
II.3.1. Hipóteses de trabalho: possíveis mecanismos de bioactivação da oxcarbazepina (63)
404
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos
 II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos163II.3.1.2. Reactividade do derivado da oxcarbazepina (63), 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5H- dibenzo[b,f]azepina-5-carboxamida, MHD-SO3 ⁻ (108) com aminoácidos172II.3.1.3. Formação de metabolitos reactivos da oxcarbazepina (63) num sistema metabolicamente competente178II.4. Estudo da reactividade da carbamazepina (62), oxcarbazepina (63) e dos respectivos
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos 163 II.3.1.2. Reactividade do derivado da oxcarbazepina (63), 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b</i> , <i>f</i>]azepina-5-carboxamida, MHD-SO ₃ -(108) com aminoácidos 172 II.3.1.3. Formação de metabolitos reactivos da oxcarbazepina (63) num sistema metabolicamente competente 178 II.4. Estudo da reactividade da carbamazepina (62), oxcarbazepina (63) e dos respectivos metabolitos reactivos com proteínas e DNA 184
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos 163 II.3.1.2. Reactividade do derivado da oxcarbazepina (63), 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b</i> , <i>f</i>]azepina-5-carboxamida, MHD-SO ₃ ⁻ (108) com aminoácidos 172 II.3.1.3. Formação de metabolitos reactivos da oxcarbazepina (63) num sistema metabolicamente competente 178 II.4. Estudo da reactividade da carbamazepina (62), oxcarbazepina (63) e dos respectivos metabolitos reactivos com proteínas e DNA 184 II.4.1. Reactividade com a hemoglobina 184 II.4.2. Reactividade com a albumina do soro humano 192
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos 163 II.3.1.2. Reactividade do derivado da oxcarbazepina (63), 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b</i> , <i>f</i>]azepina-5-carboxamida, MHD-SO ₃ ⁻ (108) com aminoácidos 172 II.3.1.3. Formação de metabolitos reactivos da oxcarbazepina (63) num sistema metabolicamente competente 178 II.4. Estudo da reactividade da carbamazepina (62), oxcarbazepina (63) e dos respectivos metabolitos reactivos com proteínas e DNA 184 II.4.2. Reactividade com a hemoglobina 184 II.4.2. Reactividade com a albumina do soro humano 192 II.5. Estudo da reactividade da carbamazepina (62), oxcarbazepina (63) e os respectivos
II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos 163 II.3.1.2. Reactividade do derivado da oxcarbazepina (63), 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b</i> , <i>f</i>]azepina-5-carboxamida, MHD-SO ₃ ⁻ (108) com aminoácidos 172 II.3.1.3. Formação de metabolitos reactivos da oxcarbazepina (63) num sistema metabolicamente competente 178 II.4. Estudo da reactividade da carbamazepina (62), oxcarbazepina (63) e dos respectivos metabolitos reactivos com proteínas e DNA 184 II.4.2. Reactividade com a hemoglobina 184 II.4.5. Estudo da reactividade da carbamazepina (62), oxcarbazepina (63) e os respectivos metabolitos reactivos com proteínas e DNA 192 II.5. Estudo da reactividade com a albumina do soro humano. 192 II.5. Estudo da reactividade com DNA 204

CAPÍTULO III • PARTE EXPERIMENTAL	215
III.1. Considerações prévias	216
III.1.1. Reagentes, Solventes e Materiais	
III.1.2. Equipamento	
III.1.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	
III.1.2.2. Ressonância Magnética Nuclear (NMR)	
III.1.2.3. Espectrometria de massa (MS)	
III.1.2.4. Busca em Base de Dados	
III.2. Preparação de materiais de partida para as reacções com bionucleófilo	s 221
III.2.1. Preparação de electrófilos derivados da 5H-dibenzo[b,f] azepina-	5- carboxamida,
carbamazepina (62)	221
III.2.1.1. Por oxidação directa da carbamazepina (62)	

III.2.1.2. Síntese de 1a,10b-di-hidro-6 <i>H</i> -dibenzo[<i>b</i> , <i>f</i>] oxireno[<i>d</i>]azepina-6-carboxamida,
epoxi-carbamazepina (79) 222
III.2.1.2.1. Por reacção do ácido peroxiacético na presença de permanganato de potássio
III.2.1.2.2. Por reacção com o ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzóico
II.2.1.3. Preparação de derivados aromáticos hidroxilados
III.2.1.3.1. Síntese de 2-hidroxi-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b</i> , <i>f</i>]azepina, 2-hidroxi-iminoestilbeno (85) 223
A. Preparação da dibenzo[b,f]azepina-2-ona (102)
B. Preparação do 2-hidroxi-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b</i> , <i>f</i>]azepina, 2-hidroxi-iminoestilbeno (85)
III.2.1.3.2. Síntese da 2-hidroxi-5H-dibenzo[b,f]oxireno[d]azepina-6-carboxamida, 2-hidroxi-
carbamazepina (2-OHCBZ, 82)
A. Preparação de 2-(<i>terc</i> -butildimetilsililoxi)-5 <i>H</i> -dibenzo [<i>b</i> , <i>f</i>] azepina (144) 225
B. Preparação da de 2-(<i>tert</i> -butildimetilsililoxi)-5 <i>H</i> -dibenzo [<i>b</i> , <i>f</i>] azepina-6-carboxamida (152)
C. Preparação de 2-hidroxi-carbamazepina (82) 226
III.2.1.4. Síntese de dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído (9-AL, 88)
III.2.2. Preparação da 10,11-Dihydro-5-aminocarbonil-dibenzo[b,f]azepina-10-one,
oxcarbazepina (OXCBZ, 63) e dos seus derivados electrófilos 227
III.2.2.1. Síntese da oxcarbazepina (63)
A. Preparação N-(4-toluenossulfonilo)-2'-amino-acetofenona (159) 228
B. Preparação da 2-(2-bromofenilo)-1-[2-N-(4-metilbenzeno sulfonamido) fenil] etanona
(160)
C. Preparação da 1-(2-aminofenil)-2-(2-bromofenil) etanona (161) 229
D. Preparação da 10,11-di-hidro-5 <i>H</i> -dibenzo [<i>b</i> , <i>f</i>]azepina-10-ona (162) 229
E. Preparação da oxcarbazepina (63) 230
III.2.2.2. Síntese de 10-hidroxi-10,11-di-hidro-5 <i>H</i> -dibenzo [<i>b,f</i>]azepina-5-carboxamida,
metabolito proveniente da redução da oxcarbazepinas (MHD, 105)
III.2.2.3. Tentativas de síntese do 10,11-di-hidro-10-sulfoximetil-5H-dibenzo [b,f] azepina-5-
carboxamida (10-Ms-MHD, 176)231
III.2.2.3.1. Reacção do MHD (105) com cloreto de metanossulfonilo (MsCl)
III.2.2.4. Síntese de 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5H-dibenzo [b,f] azepina-5-carboxamida (10-
SO3 ⁻ MHD, 110)
III.2.2.4.1. Reacção do MHD (102) com o complexo de trióxido de enxofre e piridina
(Py.SO ₃)
A.Ensaios para a optimização das condições reaccionais da reacção do MHD (105) com
trióxido de enxofre e piridina
B. Preparação do metabolito 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5H-dibenzo [b,f] azepina-5-
carboxamida (110)
III.3. Ensaios para a formação de adutos com aminoácidos livres e glutationa
III.3.1. A partir da carbamazepina (62) e seus derivados electrófilos

III.3.1.1. A partir de produtos obtidos por oxidação da carbamazepina (62) com o complexo
[Fe ^{II} (bpmen)(Otf) ₂] (111)
III.3.1.1.1. Reacção com NAC
III.3.1.1.2. Reacção com valinato de etilo
III.3.1.1.2.1. Preparação do aduto de Edman padrão a partir da carbamazepina (62)
modificada com ValOEt
III.3.1.2. Por reacção directa com a carbamazepina (62)
III.3.1.2.1. Reacção com NAC
A. Preparação do aduto 10-(Na-acetil-cisteína-S-il)-11-hidroxi-5H-di-benzo-[b,f]-azepina-5-
carboxamida (NAC-CBZ, 134)
III.3.1.2.2. Reacção com NAL
III.3.1.2.3. Reacção com ValOEt
III.3.1.2.4. Reacção com GSH
III.3.2. A partir de uma mistura de carbamazepina (62) e epoxi-carbamazepina (79) 239
III.3.2.1. Reacção com NAC
III.3.2.2. Reacção com valinato de etilo
A. Preparação do aduto 10-(valinato de etilo- <i>N</i> ^α -il)-10,11-di-hidro-5 <i>H</i> -di-benzo-[<i>b</i> , <i>f</i>]-azepina-
5-carboxamida (124)
B. Ensaios para a preparação do aduto de Edman padrão
III.3.3. A partir da epoxi-carbamazepina (79) comercial
III.3.3.1. Reacção com NAC
III.3.3.2. Reacção com NAL
III.3.3.3. Reacção com ValOEt
III.3.3.4. Reacção com GSH
III.3.4. A partir da 2-hidroxi-carbazepina (82)
III.3.4.1. Reacção com NAC
III.3.5. A partir da dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído (88)
III.3.5.1. Reacção com ValOEt 244
A. Ensaios para a optimização das condições reaccionais da reacção com valinato de etilo
B. Preparação dos adutos 152-1 e 152-2 245
C. Preparação do aduto de Edman padrão
III.3.6. A partir da oxcarbazepina (63) e os seus derivados electrófilos
III.3.6.1. Por reacção directa com a oxcarbazepina (63)
III.3.6.1.1. Reacção com ValOEt
A. Ensaios para a optimização das condições reaccionais da reacção com valinato de etilo
A. Ensaios para a preparação do aduto de Edman padrão
III.3.6.1.2. Reacção com NAL

III.3.6.2. A partir de 10,11-di-hidro-10-sulfoximetil-5H-dibenzo [b,f] azepina-5-carboxamida
(10OMs-MHD, 168) gerada in situ
III.3.6.2.1. Reacção com NAC
III.3.6.3. A partir 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5H-dibenzo [b,f]azepina-5-carboxamida (110)
gerada in situ
III.3.6.3.1. Reacção com NAC
III.3.6.4. A partir 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5 <i>H</i> -dibenzo [<i>b</i> , <i>f</i>]azepina-5-carboxamida (110) . 252
III.3.6.4.1. Reacção com NAC
III.3.6.4.2. Reacção com NAL
III.3.6.4.3. Reacção com ValOEt
III.4. Avaliação da reactividade da carbamazepina (62) vs. epoxi-carbamazepina (79) com
bionucleófilos
III.4.1. Ensaios realizados para a avaliação da reactividade da carbamazepina (62) com
bionucleófilos e controlo da atmosfera do meio reaccional
III.4.2. Ensaios realizados para a avaliação da reactividade da carbamazepina (62) com
bionucleófilos em água marcada isotópicamente com ¹⁸ O 254
III.4.3. Ensaios realizados para a avaliação da reactividade da epoxi-carbamazepina (79)
com bionuclófilos
III.5. Ensaios para a formação de aductos com o péptido LQQCPF 256
III.5.1. Por reacção com a carbamazepina (62)
III.5.2. Por reacção com epoxi-carbamazepina (79)
III.5.3. Por reacção com a IAA 256
III.6. Ensaios para a formação de adutos com 2'-desoxinucleósidos
III.6.1. A partir da oxcarbazepina (63)257
III.6.1.1. Reacção com a 2'-desoxiguanosina (48)
III.6.1.2. Reacção com a 2'-desoxiadenina (49)
III.6.2. A partir do 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5 <i>H</i> -dibenzo [<i>b</i> , <i>f</i>]azepina-5-carboxamida (110) 257
III.6.2.1. Reacção com a 2'-desoxiguanosina (48)
III.6.2.2. Reacção com a 2'-desoxiadenina (49)
III.7. Modificação de proteinas do sangue
III.7.1. Modificação da hemoglobina humana (Hb)
III.7.1.1. Reacção com epoxi-carbamazepina (79) 258
III.7.1.2. Reacção com dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído (88)
III.7.1.3. Reacção com oxcarbazepina (63)
III.7.2 Modificação da albumina do soro humano (HSA)
III.7.2.1. Reacção com carbamazepina (62)
III.7.2.2. Reacção com epoxi-carbamazepina (79) 260
III.7.2.3. Reacção dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído (88)
III.7.2.4. Reacção com 2-hidroxi-carbamazepina (82)
III.7.2.5. Reacção com oxcarbazepina (63)

III.7.1.6 Reacção com 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5H-dibenzo [b,f]azepina-5-carboxamida
(110)
III.8. Ensaios para a formação de adutos com ácido desoxirribonucleico
III.8.1. A partir da epoxi-carbamazepina (79)
III.8.2. A partir da oxcarbazepina (63)
III.8.3. A partir da 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5 <i>H</i> -dibenzo [<i>b</i> , <i>f</i>]azepina-5-carboxamida (110) 263
III.9. Hidrólise de proteínas e DNA modificados com electrófilos reactivos da carbamazepina
(62) e oxcarbamazepina (63)
III.9.1. Hidrólise da hemoglobina humana (Hb) modificada
III.9.1.1. Método de degradação de Edman
III.9.1.1.1. Hemoglobina modificada com epoxi-carbazepina (79)
A. Preparação do aduto de Edman a partir da hemoglobina modificada
III.9.1.1.2. Hemoglobina modificada com dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído (88)
A. Preparação do aduto de Edman a partir da hemoglobina modificada
III.9.1.1.4. Hemoglobina modificada com oxcarbazepina (63)
B. Preparação do aduto de Edman a partir da hemoglobina modificada
III.9.2. Digestão da albumina de soro humano (HSA) modificada
III.9.2.1. Albumina do soro humana modificada com carbamazepina (62)
III.9.2.2. Albumina do soro humano modificada com epoxi-carbamazepina (79) 270
III.9.2.3. Albumina do soro humano modificada 2-hidroxi-carbamazepina (82)
III.9.2.4. Albumina do soro humano modificada com dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído
(88)
III.9.2.5. Albumina do soro humano modificada oxcarbazepina (63)
III.9.2.6. Albumina do soro humano modificada 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5H-dibenzo
[<i>b</i> , <i>f</i>]azepina-5-carboxamida (110)
III.9.3. Hidrólise do DNA modificado com oxcarbazepina (63) e electrófilos derivados da
carbamazepina (62) e oxcarbazepina (63)
III.9.1.1. Hidrólise térmica
III.9.1.1.1. DNA modificado com EPCBZ (79)
III.9.1.1.2. DNA modificado com OXCBZ (63)
III.9.1.1.3. DNA modificado com 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5H-dibenzo [b,f]azepina-5-
carboxamida (108)
III.9.1.2. Hidrólise enzimática
III.9.1.2.1. DNA modificado com EPCBZ (79)
III.9.1.2.2. DNA modificado com OXCBZ (63)
III.9.1.2.3. DNA modificado com 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5H-dibenzo [b,f]azepina-5-
carboxamida (110)
III.10. Incubações in vitro com a fracção sub-celular S9 de fígado de Humano e Rato 276

CAPÍTULO IV	•	BIBLIOGRAFIA	27	9
-------------	---	--------------	----	---

Índice de Figuras

 Figura I.1. Paper da blactivação na toxitotade induzida plot ratinatos. Adaptado de [15]	Figure I.1. Denel de biogetiveção no tovicidade induzida por fórmaços. Adentado de [15]
 Figura 1.2. Esquema representativo da centralização do metadolismo de farmaços, poluentes ambientais e outros xenobióticos, no fígado. Os metabolitos e espécies reactivas formadas podem posteriormente seguir, através do sistema circulatório, para outros pontos do organismo. Adaptado de [54]	
ambientais e outros xenobioticos, no tigado. Os metabolitos e especies reactivas tormadas podem posteriormente seguir, através do sistema circulatório, para outros pontos do organismo. Adaptado de [54]	Figura I.2. Esquema representativo da centralização do metabolismo de farmacos, poluentes
podem posteriormente seguir, através do sistema circulatorio, para outros pontos do organismo. Adaptado de [54]. 17 Figura I.3. Modelos <i>in vitro e in vivo</i> utilizados no estudo de bioactivação de fármacos por ordem de semelhança com sistemas <i>in vivo</i> . Adaptado de [55]. 19 Figura I.4. Representação esquemática da formação de produtos de reacção entre os centros nucleófilos (N, O e S) de uma biomacromolécula e as espécies reactivas electrófilas resultantes da bioactivação de um péptido-modelo (46) contendo os resíduos de aminoácidos na sua forma predominante, a pH fisiológico e as bases de DNA, dG (47) e dA (48). Os átomos que estão na forma livre e que apresentam características nuceófilas estão representados a negrito. 29 Figura I.6. Análise de massa intacta de (A) HSA não modificada com um derivado mesilado da NVP (3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das respectivas proteínas. Adaptado de [36]. 37 Figura I.7. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>middle-down</i> . Adaptado de [95]. 38 Figura I.8. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>botom-up</i> . Adaptado de [95]. 39 Figura I.1.1. Identificação dos resíduos modificados com ABC (10), <i>in vivo</i> . 40 Figura I.1.2. Metodologia utilizada para a avaliação da exposição ao metabolito reactivo do PARA (2), <i>in vivo</i> . 44 Figura I.1.3. Mecanismos de acção propostos para alguns fármacos antiepliépticos (AEDs) (na caixa a cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (lado direito) e inibitórios (lado esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxa	ambientais e outros xenobioticos, no figado. Os metabolitos e especies reactivas formadas
Adaptado de [54]. 17 Figura 1.3. Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> utilizados no estudo de bioactivação de fármacos por ordem de semelhança com sistemas <i>in vivo</i> . Adaptado de [55]. 19 Figura 1.4. Representação esquemática da formação de produtos de reacção entre os centros nucleófilos (N, O e S) de uma biomacromolécula e as espécies reactivas electrófilas resultantes da bioactivação de um fármaco. Adaptado de [19]. 28 Figura 1.5. Exemplo de um péptido-modelo (46) contendo os resíduos de aminoácidos na sua forma predominante, a pH fisiológico e as bases de DNA, dG (47) e dA (48). Os átomos que estão na forma livre e que apresentam características nuceófilas estão representados a negrito. 29 Figura 1.6. Análise de massa intacta de (A) HSA não modificada com um derivado mesilado de NVP (3) e (B) Hb não modificada e modificada com um derivado mesilado de NVP (3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das respectivas proteínas. Adaptado de [36]. 37 Figura 1.7. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>middle-down</i> . Adaptado de [95]. 39 Figura 1.9. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>bottom-up</i> . Adaptado de [95]. 39 Figura 1.10. Processo virtual levado a cabo pelos motores de busca na identificação e caracterização de proteínas. 40 Figura 1.11. Identificação dos resíduos modificados com ABC (10), <i>in vivo</i> . 43 Figura 1.12. Metodologia utilizada para a avaliação da exposição ao metabolito reactivo do PARA (2), <i>in vivo</i> . 44 Figura 1.13. Mecanismos de acção p	podem posteriormente seguir, através do sistema circulatório, para outros pontos do organismo.
 Figura 1.3. Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> utilizados no estudo de bioactivação de fármacos por ordem de semelhança com sistemas <i>in vivo</i>. Adaptado de [55]	Adaptado de [54] 17
 semelhança com sistemas <i>in vivo</i>. Adaptado de [55]. Figura 1.4. Representação esquemática da formação de produtos de reacção entre os centros nucleófilos (N, O e S) de uma biomacromolécula e as espécies reactivas electrófilas resultantes da bioactivação de um fármaco. Adaptado de [19]. 28 Figura 1.5. Exemplo de um péptido-modelo (46) contendo os residuos de aminoácidos na sua forma predominante, a pH fisiológico e as bases de DNA, dG (47) e dA (48). Os átomos que estão na forma livre e que apresentam características nuceófilas estão representados a negrito. 29 Figura 1.6. Análise de massa intacta de (A) HSA não modificada com um derivado mesilado de NVP (3) e (B) Hb não modificada e modificada com um derivado mesilado de NVP (3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das respectivas proteinas. Adaptado de [36]. Figura 1.7. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>top-down</i>. Adaptado de [95]. 38 Figura 1.8. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>bottom-up</i>. Adaptado de [95]. 39 Figura 1.10. Processo virtual levado a cabo pelos motores de busca na identificação e caracterização de proteínas. 40 Figura 1.1. Identificação dos resíduos modificados com ABC (10), <i>in vivo</i>. 44 Figura 1.13. Mecanismos de açção propostos para alguns fármacos antiepilépticos (AEDs) (na caixa a cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (lado direito) e inibitórios (lado esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D-Aspartato; GABAa, ácido γ-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123]. Figura 1.14. Estrutura da CBZ (62). Figura 1.15. Adutos covalentes (par de diastereómeros) detectados <i>in vitro</i> em incubações de HLMs com CBZ (62) na presençã de GSH, por comparação dos adutos padrão formados por reacção 	Figura I.3. Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> utilizados no estudo de bioactivação de fármacos por ordem de
 Figura I.4. Representação esquemática da formação de produtos de reacção entre os centros nucleófilos (N, O e S) de uma biomacromolécula e as espécies reactivas electrófilas resultantes da bioactivação de um fármaco. Adaptado de [19]	semelhança com sistemas in vivo. Adaptado de [55] 19
 nucleófilos (N, O e S) de uma biomacromolécula e as espécies reactivas electrófilas resultantes da bioactivação de um fármaco. Adaptado de [19]	Figura I.4. Representação esquemática da formação de produtos de reacção entre os centros
 da bioactivação de um fármaco. Adaptado de [19]	nucleófilos (N, O e S) de uma biomacromolécula e as espécies reactivas electrófilas resultantes
 Figura I.5. Exemplo de um péptido-modelo (46) contendo os resíduos de aminoácidos na sua forma predominante, a pH fisiológico e as bases de DNA, dG (47) e dA (48). Os átomos que estão na forma livre e que apresentam características nuceófilas estão representados a negrito. 29 Figura I.6. Análise de massa intacta de (A) HSA não modificada e modificada com um derivado mesilado de NVP (3) e (B) Hb não modificada e modificada com um derivado mesilado de NVP (3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das respectivas proteínas. Adaptado de [36]. 77 Figura I.7. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>top-down</i>. Adaptado de [95]. 38 Figura I.8. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>bottom-up</i>. Adaptado de [95]. 39 Figura I.10. Processo virtual levado a cabo pelos motores de busca na identificação e caracterização de proteínas. 40 Figura I.11. Identificação dos resíduos modificados com ABC (10), <i>in vivo</i>. 43 Figura I.12. Metodologia utilizada para a avaliação da exposição ao metabolito reactivo do PARA (2), <i>in vivo</i>. 44 Figura I.13. Mecanismos de acção propostos para alguns fármacos antiepilépticos (AEDs) (na caixa a cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (lado direito) e inibitórios (lado esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D-Aspartato; GABA_A, ácido γ-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123]. Figura I.14. Estrutura da CBZ (62). 51 Figura I.15. Adutos covalentes (par de diastereómeros) detectados <i>in vitro</i> em incubações de HLMs com CBZ (62) na presença de GSH, por comparação dos adutos padrão formados por reacção 	da bioactivação de um fármaco. Adaptado de [19]28
predominante, a pH fisiológico e as bases de DNA, dG (47) e dA (48). Os átomos que estão na forma livre e que apresentam características nuceófilas estão representados a negrito	Figura I.5. Exemplo de um péptido-modelo (46) contendo os resíduos de aminoácidos na sua forma
 forma livre e que apresentam características nuceófilas estão representados a negrito. Pigura I.6. Análise de massa intacta de (A) HSA não modificada e modificada com um derivado mesilado de NVP (3) e (B) Hb não modificada e modificada com um derivado mesilado da NVP (3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das respectivas proteínas. Adaptado de [36]. Figura I.7. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>top-down</i>. Adaptado de [95]. 8 Figura I.8. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>middle-down</i>. Adaptado de [95]. 9 Figura I.9. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>bottom-up</i>. Adaptado de [95]. 9 Figura I.9. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>bottom-up</i>. Adaptado de [95]. 9 Figura I.10. Processo virtual levado a cabo pelos motores de busca na identificação e caracterização de proteínas. 40 Figura I.11. Identificação dos resíduos modificados com ABC (10), <i>in vivo</i>. 43 Figura I.12. Metodologia utilizada para a avaliação da exposição ao metabolito reactivo do PARA (2), <i>in vivo</i>. 44 Figura I.13. Mecanismos de acção propostos para alguns fármacos antiepilépticos (AEDs) (na caixa a cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (lado direito) e inibitórios (lado esquerdo). AMPA, ácido q-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D-Aspartato; GABAA, ácido q-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123]. Figura I.14. Estrutura da CBZ (62). 51 Figura I.15. Adutos covalentes (par de diastereómeros) detectados <i>in vitro</i> em incubações de HLMs com CBZ (62) na presença de GSH, por comparação dos adutos padrão formados por reacção 	predominante, a pH fisiológico e as bases de DNA, dG (47) e dA (48). Os átomos que estão na
 Figura I.6. Análise de massa intacta de (A) HSA não modificada e modificada com um derivado mesilado de NVP (3) e (B) Hb não modificada e modificada com um derivado mesilado da NVP (3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das respectivas proteínas. Adaptado de [36]	forma livre e que apresentam características nuceófilas estão representados a negrito
 mesilado de NVP (3) e (B) Hb não modificada e modificada com um derivado mesilado da NVP (3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das respectivas proteínas. Adaptado de [36]	Figura I.6. Análise de massa intacta de (A) HSA não modificada e modificada com um derivado
 (3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das respectivas proteínas. Adaptado de [36]	mesilado de NVP (3) e (B) Hb não modificada e modificada com um derivado mesilado da NVP
 respectivas proteínas. Adaptado de [36]	(3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das
 Figura I.7. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>top-down</i>. Adaptado de [95]	respectivas proteínas. Adaptado de [36]
 Figura I.8. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>middle-down</i>. Adaptado de [95]	Figura I.7. Esquema sequencial descritivo da abordagem top-down. Adaptado de [95]
 Figura I.9. Esquema sequencial descritivo da abordagem <i>bottom-up</i>. Adaptado de [95]	Figura I.8. Esquema sequencial descritivo da abordagem middle-down. Adaptado de [95]
 Figura I.10. Processo virtual levado a cabo pelos motores de busca na identificação e caracterização de proteínas	Figura I.9. Esquema sequencial descritivo da abordagem bottom-up. Adaptado de [95]
de proteínas.40Figura I.11. Identificação dos resíduos modificados com ABC (10), <i>in vivo</i> .43Figura I.12. Metodologia utilizada para a avaliação da exposição ao metabolito reactivo do PARA (2), <i>in vivo</i> .44Figura I.13. Mecanismos de acção propostos para alguns fármacos antiepilépticos (AEDs) (na caixa a cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (lado direito) e inibitórios (lado esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D- Aspartato; GABAA, ácido γ-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123].49Figura I.14. Estrutura da CBZ (62).51Figura I.15. Adutos covalentes (par de diastereómeros) detectados <i>in vitro</i> em incubações de HLMs com CBZ (62) na presença de GSH, por comparação dos adutos padrão formados por reacção	Figura I.10. Processo virtual levado a cabo pelos motores de busca na identificação e caracterização
 Figura I.11. Identificação dos resíduos modificados com ABC (10), <i>in vivo</i>. 43 Figura I.12. Metodologia utilizada para a avaliação da exposição ao metabolito reactivo do PARA (2), <i>in vivo</i>. 44 Figura I.13. Mecanismos de acção propostos para alguns fármacos antiepilépticos (AEDs) (na caixa a cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (Iado direito) e inibitórios (Iado esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D-Aspartato; GABA_A, ácido γ-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123]. Figura I.14. Estrutura da CBZ (62). Figura I.15. Adutos covalentes (par de diastereómeros) detectados <i>in vitro</i> em incubações de HLMs com CBZ (62) na presença de GSH, por comparação dos adutos padrão formados por reacção 	de proteínas
 Figura I.12. Metodologia utilizada para a avaliação da exposição ao metabolito reactivo do PARA (2), <i>in vivo</i>	Figura I.11. Identificação dos resíduos modificados com ABC (10), in vivo
 <i>in vivo.</i>	Figura I.12. Metodologia utilizada para a avaliação da exposição ao metabolito reactivo do PARA (2),
 Figura I.13. Mecanismos de acção propostos para alguns fármacos antiepilépticos (AEDs) (na caixa a cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (lado direito) e inibitórios (lado esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D-Aspartato; GABA_A, ácido γ-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123]	in vivo
 cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (lado direito) e inibitórios (lado esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D-Aspartato; GABA_A, ácido γ-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123]	Figura I.13. Mecanismos de acção propostos para alguns fármacos antiepilépticos (AEDs) (na caixa a
esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D- Aspartato; GABA _A , ácido γ-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123]	cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (lado direito) e inibitórios (lado
Aspartato; GABA _A , ácido γ-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123]	esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D-
Figura I.14. Estrutura da CBZ (62)	Aspartato; GABAA, ácido y-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123].
Figura I.15. Adutos covalentes (par de diastereómeros) detectados <i>in vitro</i> em incubações de HLMs com CBZ (62) na presença de GSH, por comparação dos adutos padrão formados por reacção	Figura I.14. Estrutura da CBZ (62)
com CBZ (62) na presença de GSH, por comparação dos adutos padrão formados por reacção	Figura I.15. Adutos covalentes (par de diastereómeros) detectados <i>in vitro</i> em incubações de HLMs
	com CBZ (62) na presenca de GSH, por comparação dos adutos padrão formados por reacção
do EPCBZ (79) com a GSH	do EPCBZ (79) com a GSH
Figura I.16. Derivado glucuronidado do metabolito 4-metiltio-2-hidroximinostilbeno (103) detectado na	Figura I.16. Derivado glucuronidado do metabolito 4-metiltio-2-hidroximinostilbeno (103) detectado na
urina de doentes em terapia com CBZ (62).	urina de doentes em terapia com CBZ (62).
Figura L 17 Estrutura da OXCBZ (63) 64	Figura L 17 Estrutura da OXCBZ (63) 64
Figura II 1 Caracterização estrutural total do aduto GSH-FPCBZ (94) efectuada por Ru e seus	Figura II 1 Caracterização estrutural total do aduto GSH-FPCBZ (94) efectuada por Ru e seus
colaboradores [214]. A: Fragmentação obtida para o jão a <i>m</i> /z 560 correspondente ao aduto	colaboradores [214]. A: Fragmentação obtida para o jão a <i>m</i> /z 560 correspondente ao aduto
GSH-EPCBZ (94) obtido por reaccão do EPCBZ (79) com a GSH ou incubação da CBZ (62) em	GSH-EPCBZ (94) obtido por reaccão do EPCBZ (79) com a GSH ou incubação da CBZ (62) em

- Figura II.2. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de oxidação da CBZ (62) com o sistema H₂O₂/catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂](111) (A) e os extractos iónicos a *m/z* 253 (A1), *m/z* 271 (A2), *m/z* 267 (A3) e *m/z* 269 (A4) com os respectivos espectros de MS/MS bem como as estruturas esperadas e as respectivas fragmentações (evidenciadas a laranja). As estruturas correspondentes aos compostos 2-OHCBZ (82), 2,3-OHCBZ (87), o-quinona (101) e diol 117 são representativas das espécies oxidadas nas várias posições aromáticas possíveis.

Figura II.8. Desvios químicos de ¹H-RMN observados para derivados do adamanteno, 122 e 123.... 96

Figura II.9. Cargas parciais de Mulliken determinadas *in silico* para o aduto NAC-OHCBZ (118)...... 97 Figura II.10. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de oxidação

- da CBZ (62) com o sistema H₂O₂/catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111) na presença de ValOEt (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 398 (A1) e m/z 396 (A2), correspondentes às moléculas protonadas [M+H]⁺ dos adutos ValOEt-EPCBZ (124) e ValOEt-OHCBZ (125), respectivamente, com os seus espectros MS/MS e as fragmentações propostas (a laranja)... 100
- Figura II.11. Cromatograma obtido por HPLC-DAD da mistura reaccional correspondente à tentativa de síntese do EPCBZ (79) pelo método de Learmonth [247] (A). Estão também representados os espectros de massa dos produtos maioritários aos tempos *t*_R ~ 12, 19 e 23min., obtidos por LC-

- Figura II.16. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD obtidos para a reacção efectuada entre uma mistura de CBZ (62) e EPCBZ (79) e o aminoácido NAC, aos tempos de 1 h e 72 h...... 114

- Figura II.20. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre a mistura de CBZ (62) e a GSH (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a *m/z* 237 (A1), *m/z* 560 (A2) e *m/z* 558 (A3) com os espectros de MS/MS (obtidos por LS-ESI(+)) para os adutos GSH-CBZ (94) e GSH-CBZ (128).

- Figura II.23. Consumo da CBZ (62) na presença dos vários nucleófilos, em atmosfera de O₂ (cinzento escuro) ou N₂ (cinzento claro) e a formação dos adutos GSH-EPCBZ (94), NAC-EPCBz (119),

- (62) e a GSH em MeCN/H₂O, na presença de O₂ (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 253.0972 (A1) e *m/z* 255.1128 (A2) com os espectros de MS/MS obtidos por HRMS-ESI(+). Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre a CBZ (62) e a GSH em MeCN/H₂¹⁸O, na presença de O₂ (B) e o cromatograma iónico extraído a *m/z* 253.0972 (B1) com o espectro de MS/MS obtido por HRMS-ESI(+).
- Figura II.26. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre a mistura de CBZ (62) e a NAC, na presença de O₂ e um padrão interno (A) com os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 237 (A1) e *m/z* 253 (A2), com os respectivos espectros de MS/MS obtidos por LC-ESI(+). A comparação com os padrões comerciais de OXCBZ (63), EPCBZ (79) e 2-OHCBZ (82) está também representada, com os respectivos espectros MS/MS também obtidos por LC-ESI(+).
- Figura II.28. Cromatograma HPLC-DAD da mistura reaccional correspondente reacção do 9-AL (88) com o ValOEt, na presença de redutor aos tempos de 1h (a preto) e 24h (a cinzento). O cromatograma HPLC-DAD do padrão, 9-AL (88) encontra-se também representado (a laranja).
- Figura II.30. Comparação dos espectros de ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) da mistura reaccional entre o 9-AL(88) e o ValOEt (A) e os adutos ValOEt-9AL-1 (152) (B1, 500 MHz, acetona-*d*₆) e ValOEt-9AL-2 (153) (B2, 500 MHz, CDCl₃). Os espectros de HMBC para cada uma das formas ValOEt-

- Figura II.37. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à incubação da fracção S9 de fígado de rato na presença de OXCBZ (63) e cofactores de Fase I e II (24 h) (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 253 (A1), m/z 255 (A2), *m/z* 271 (A3) e *m/z* 331 (-) (A4) com os espectros de MS/MS (obtidos por LC-ESI(+)) correspondentes à OXCBZ (63), os metabolitos de Fase I, MHD (105), diol-CBZ (80) e 108 e ainda o metabolito de Fase II, O-Sulfonado (107), respectivamente.
- Figura II.39. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção dos produtos obtidos na oxidação da CBZ (62) com o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111) na presença de

- Figura II.40. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de incubação do metabolito 9-AL (88) com a Hb, seguida do tratamento da mistura com o método II do procedimento de Edman (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 235 (A1) e *m/z* 426 (A2) com os espectros de MS/MS (obtidos por LC-ESI(+)), correspondentes à hidantoína (55) e ao aduto de Edman ValOEt-9-AL-Ed1 (173), respectivamente. A comparação do aduto 173 obtido por reacção do 9-AL (88) com a Hb com o aduto padrão está também representada.... 191
- Figura II.41. Representação da fragmentação de um péptido quando analisado por MS/MS, evidenciando a fragmentação na ligação peptídica dando origem aos iões fragmento b₂ e y₃.. 192
- Figura II.43. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de incubação do metabolito EPCBZ (79) com o péptido ³¹LQQCPF³⁶ (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 987.4392 (A1) e *m/z* 734.3416 (A2) com os espectros de MS e MS/MS obtidos por HRMS-ESI(+), correspondentes ao péptido ³¹LQQC^{EPCBZ}PF³⁶ e ³¹LQQCPF³⁶, respectivamente. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de incubação do metabolito EPCBZ (79) e a HSA (B), após digestão com tripsina/quimotripsina, e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 987.4392 (B1) com o espectro de MS e *m/z* 792.3732 (B2) com os espectros de MS e MS/MS,ambos obtidos por HRMS-ESI(+), correspondentes ao péptido ³¹LQQC^{EPCBZ}PF³⁶, respectivamente. 198
- Figura II.45. Modificação-tipo (correspondente ao incremento 193.0886 u) encontrada nos péptidos obtidos após digestão tríptica da mistura reaccional da incubação entre a HSA e o aldeído 88.

Índice de Esquemas

Esquema I.1. Via metabólica/bioactivação proposta para o PARA (2)10
Esquema I.2. Via metabólica/bioactivação proposta para o ABC (10) 12
Esquema I.3. Via metabólica/bioactivação proposta para a NVP (3)
Esquema I.4. Requisitos de um bom biomarcador. Adaptado de [65]20
Esquema I.5. Classificação dos marcadores biológicos. CYPs: Enzimas do CYP450; EPH: Epóxido
hidrolase; GSTs: Glutationa-S-transferases; NATs: N-acetil-transferases. Adaptado de [65] 22
Esquema I.6. Formação dos conjugados de GSH e os seus produtos de catabolismo. RX: espécie
electrófila reactiva; GGT: γ-glutamil-transpeptidase; DP: cisteinilaglicina dipeptidase; NAT: N-
acetil-transferase
Esquema I.7. Mecanismo de bioactivação proposto para a formação dos mercapturatos, 3-NACNVP
(32) e 12-NACNVP (33)
Esquema I.8. Mecanismo de bioactivação proposto para o DCF (37)
Esquema I.9. Activação metabólica do benzo[a]pireno (49) e a formação dos adutos covalentes com
macromoléculas 51 (HSA) e 52 (DNA)
Esquema I.10. Princípio geral associado à metodologia da degradação de Edman. RX: espécie
electrófila correspondente ao metabolito reactivo/fármaco; PITC: isotiocianato de fenilo; FITC:
isotiocianato de fluoresceína
Esquema I.11. Adutos de Edman obtidos pelo destacamento selectivo da valina N-terminal da Hb
modificada com os fármacos anti-HIV, NVP (3) e ABC (10), nos estudos efectuados [30, 41] 36
Esquema I.12. Metabolismo proposto para a CBZ (62). As duas vias metabólicas mais significativas
encontram-se representadas por cores distintas, preto e azul. A via minoritária está representada
pela cor verde
Esquema I.13. Representação esquemática da bioactivação dos xenobióticos, BaP (49) e AFB1 (95) e
da reacção dos respectivos metabolitos/intermediários reactivos com macromoléculas dando
origem aos adutos covalentes 51 e 97. A formação do intermediário 7β ,8 α -di-hidroxi-9 α ,10 α -
epoxi-7,8,9,10-tetra-hidrobenzeno[a]pireno (50), a partir do BaP (49) é considerado o passo
promotor da sua toxicidade [88]; o mesmo se verifica no caso da AFB1 (95) com a formação do
metabolito reactivo aflatoxina-exo-8,9-epóxido (96) [219]61
Esquema I.14. Representação esquemática dos ciclos redox e alquilação de espécies quinóides que
promovem a formação de espécies ROS e adutos covalentes, com a capacidade de induzir
toxicidade. Adaptado de [153]62
Esquema I.15. Mecanismo proposto para a bioactivação da FNT (60) [222]62
Esquema I.16. Bioactivação do fármaco anti-HIV, ABC (10)64
Esquema I.17. Metabolismo proposto para a OXCBZ (63) em Humanos
Esquema I.18. Possíveis mecanismos de toxicidade da OXCBZ (63) que envolvem a reacção direta
de bionucleófilos ao fármaco, com formação de uma base de Schiff, ou a bioactivação do
metabolito 105 ao derivado electrófilo MHD-SO3 ⁻ (110)68

- Esquema II.4. Comparação dos mecanismos de oxidação de xenobióticos (na figura representado por um anel aromático com um substituinte R) a partir de: 1: acção do CYP450 [Substrato liga-se ao grupo heme resultando numa transferência de um *e* (A), permitindo a ligação do O₂ (B); um segundo *e* é transferido (C) gerando espécies intermediárias de alta valencia (D e E) que permitem a inserção do átomo de oxigénio no substrato (F). O substrato oxidado dissocia-se da enzima na forma de óxido de areno dando origem subsequentemente aos metabolitos fenólicos] e 2: o catalizador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111) [A H₂O₂ e o ácido acético ligam-se ao centro metálico de Fe (A e B) dando origem ao intermediário hidroperoxoférrico (III)(114); A quebra da ligação O-O (C) promove a perda de H₂O e a consequente formação de espécies de alta valência Fe^V(O)(OAc) e Fe^{IV}(O)⁺(OAc)(115); A inserção do oxigénio no substrato ocorre (D), promovendo a formação do óxido de areno e da espécie Fe^{III}(OAc) (116)].......82

Esquema II.13. Representação esquemática dos produtos obtidos a partir da CBZ (62) e do seu metabolito EPCBZ (79) por reacção com a NAC.
Esquema II.14. Mecanismos de fragmentação propostos para o aduto NAC-CBZ (127), resultante da reacção CBZ (62) e a NAC, quando analisado por LC-ESI(+)-MS/MS

Esquema II.15. Equilíbrio ceto-enólico proposto para o aduto NAC-CBZ (127) 122
Esquema II.16. Mecanismos de fragmentação propostos para o aduto GSH-CBZ (128) (m/z 558),
quando analisado por LC-ESI(+)-MS/MS 126
Esquema II.17. Hipótese mecanística para a formação dos adutos GSH-EPCBZ (94), NAC-EPCBZ
(119), NAC-CBZ (127) e GSH-CBZ (128) e que envolve a formação do radical ti-ilo, RS ⁻ e a sua
adição à CBZ (62). A formação de produtos laterais por processos de dismutação e TOCO está
também representada. RS representa genericamente os dois nucleófilos de enxofre estudados,
NAC e GSH
Esquema II.18. Processo de TOCO desenvolvido por Kharash e seus colaboradores [281] para a
formação de sulfóxidos hidroxilados (138) a partir de olefinas
Esquema II.19. Hipótese mecanística para a formação produtos laterais por processos de dismutação
e TOCO
Esquema II.20. Proposta mecanística para a intervenção da água na formação dos adutos GSH-
EPCBZ (94), NAC-EPCBZ (119), NAC-CBZ (127) e GSH-CBZ (128) e os respectivos adutos
marcados com ¹⁸ O, 94- ¹⁸ O, 119- ¹⁸ O, 127- ¹⁸ O, 128- ¹⁸ O, quando a reacção é efectuada em H ₂ ¹⁸ O.
A formação do radical hidroxilo marcado (¹⁸ OH) e não marcado (OH) promove: (1) a reacção
com a CBZ (62) levando à formação dos produtos laterais resultantes da dismutação; (2) a
reacção com o intermediário 129 (resultante da adição do radical ti-ilo à ligação dupla de 62)
promovendo a formação dos adutos 94, 94-18O, 119 e 119-18O e subsequentemente 127, 127-
¹⁸ O, 128 e 128- ¹⁸ O; e (3) adição ao anel aromático da CBZ (62) dando origem a compostos
fenólicos142
Esquema II.21. Produtos possiveis de obter pela reacção de oxidação da CBZ (62), exibindo todos
um valor de molécula protonada [M+H] ⁺ a <i>m/z</i> 253145
Esquema II.22. Mecanismo proposto para a formação do aduto bromado, GSH/Br-CBZ (142) 148
Esquema II.23. Estratégia de síntese adoptada para a formação do metabolito de Fase I da CBZ (62),
2-OHCBZ (82): a) Sal de Frémy (tampão fosfato 100 mM, pH 7.4), acetona, 16 h (93%); b)
Solução aq. sat. Na ₂ S ₂ O ₄ , CHCl ₃ , 10 min. (90%); c) TDBMS-Cl, Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ , 48 h (66%); d) 1.
CH ₂ Cl ₂ seco, CISO ₂ NCO,16 h; 2. H ₂ O, 24 h (43%); e) TBAF, THF, 2h (15%)
Esquema II.24. Esquema reaccional das condições utilizadas para a reacção de oxidação do 2-
OHCBZ (82), com sal de Frémy151
Esquema II.25. Produtos formados pela oxidação de 2-OHCBZ (82) pelo Sal de Frémy, na presença
de NAC
Esquema II.26. Condições de oxidação do IM (86) utilizadas para a formação do metabolito da CBZ
(62), 9-AL (88) e o produto lateral O-9-AL (151)
Esquema II.27. Hipótese mecanística proposta para a formação dos vários adutos, entre o aldeído 88
e o ValOEt
Esquema II.28. Metabolismo proposto para a OXCBZ (63) 162
Esquema II.29. Mecanismo de bioactivação proposto para a OXCBZ (63)
Esquema II.30. Preparação dos precursores e síntese da OXCBZ (63); Reagentes e condições: a)
TsCl, py, CH ₂ Cl ₂ ,16h (47%); b) 1,2-dibromobenzeno (158), Pd (OAc) ₂ , Xantphos, Cs ₂ CO ₃ ,

tolueno/H₂O, refluxo, 72h (71%); c) H₂SO₄ conc., 16h (89%); d) Pd (OAc)₂, BINAP, K₃PO₄, tolueno/H₂O, refluxo, refluxo, 24h (85%); e) 1. CISO₂NCO, CH₂Cl₂ seco, 16h; 2. H₂O, rt, 24h Esquema II.32. Mecanismo proposto para a formação do aduto ValOEt-CBZ (164)...... 168 Esquema II.33. Formação do produto de eliminação (maioritário) correspondente à CBZ (62), a partir da reacção de mesilação do MHD (102). 173 Esquema II.34. Resumo dos resultados obtidos por incubação da OXCBZ (63) na fracção S9 do fígado humano ou de rato: Formação do metabolito de Fase II, 107, a partir do produto enólico, resultante do equilíbrio ceto-enólico da OXCBZ (63). O metabolito resultante da sulfonação do MHD, 110, o aduto 169, resultante da reacção da GSH com MHD-SO3- (110), bem como a CBZ Esquema II.35. Destacamento do aduto com a valina N-terminal da Hb (53) através da degradação de Edman, com recurso ao agente derivatizante isotiocianato (54). O Electrófilo está representado Esquema III.1. Preparação de precursores e síntese do 20HIM (85); Reagentes e condições: a) Sal de Frëmy, tampão fosfato 100 mM, pH 7.4, 16h b) Solução aq. sat. Na₂S₂O₄, CHCl₃...... 223 Esquema III.2. Preparação dos precursores e síntese da 2-OHCBZ (82); Reagentes e condições: a) TDBMS-CI, Et₃N, CH₂Cl₂, 48h b) 1. CH₂Cl₂ seco, CISO₂NCO,16 h; 2. H₂O, 24h c) TBAF, THF, 2 Esquema III.3. Estatégia sintética utilizada para a preparação da OXCBZ (63); Reagentes e

condições: a) TsCl, piridina, CH₂Cl₂,16h b) 1,2-dibromobenzeno (158), Pd (OAc)₂, xantphos, Cs₂CO₃, tolueno/H₂O, refluxo, 72 h c) H₂SO₄ conc., 16 h d) Pd (OAc)₂, BINAP, K₃PO₄, tolueno/H₂O, refluxo, refluxo, 24 h e) 1. CISO₂NCO, CH₂Cl₂ seco,16 h; 2. H₂O, rt, 24 h....... 227

Tabela I.1. Tipos de Reacções Adversas induzidas por Fármacos (ADRs)[7-9]
Tabela I.2. Exemplos de reacções de Fase I e Fase II envolvidas no metabolismo de xenobióticos.
Adaptado de [16]8
Tabela I.3. Exemplos de grupos funcionais que quando presentes em fármacos ou metabolitos de
fármacos podem estar envolvidos na formação de adutos covalentes com macromoléculas (M).
Adaptado de [19]9
Tabela I.4. Mecanismos propostos para explicar as respostas imunológicas mediadas por
xenobióticos. A representação esquemática é adaptada de [10]
Tabela I.5. Resumo dos principais sistemas-modelo in vitro usados na avaliação da hepatoxicidade
induzida por fármacos [55, 58, 59] 18
Tabela I.6. Biomacromoléculas cujos adutos são usados como biomarcadores e a respectiva
disponibilidade e tempo de meia-vida, <i>in vivo</i> . Adaptado de [19]
Tabela I.7. Enzimas mais usadas na degradação proteolítica e os respectivos locais de clivagem 41
Tabela I.8. Péptidos trípticos obtidos por modificação da HSA com ABC-AL (15), in vitro. O resíduo
modificado encontra-se evidenciado com (*) e a negrito
Tabela I.9. Exemplos de fármacos antiepilépticos (AEDs). 47
Tabela II.1. Condições experimentais utilizadas nos ensaios efectuados para a oxidação da CBZ (62),
com o sistema H2O2/catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)2](111) na presença de um aminoácido, como
agente armadilhante. No caso particular do ValOEt foi também testada a reacção na presença
de NaBH ₃ CN como agente redutor
Tabela II.2. Caracterização estrutural por NMR e MS dos adutos obtidos por reacção da CBZ (62)
com o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)2] (111) na presença de H2O2 e NAC (a azul)
Tabela II.3. Análise por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(+)-HRMSdos adutos obtidos por oxidação da CBZ
(62) com H ₂ O ₂ na presença do catalisador 111 e posterior reacção com ValOEt (a azul) 101
Tabela II.4. Caracterização estrutural efectuada por NMR e MS do metabolito EPCBZ (79) 108
Tabela II.5. Condições experimentais utilizadas na reacção do EPCBZ (79) e ValOEt 109
Tabela II.6. Caracterização estrutural efectuada por MS-ESI(+) do aduto NAL-EPCBZ (126) 112
Tabela II.7. Condições experimentais utilizadas na reacção entre o EPCBZ (79) e a NAC 112
Tabela II.8. Caracterização estrutural obtida por NMR e MS para o aduto NAC-CBZ (127) 123
Tabela II.9. Condições experimentais utilizadas nos ensaios efectuados para testar a reactividade da
CBZ (62) na presença de nucleófilos de azoto e enxofre 123
Tabela II.10. Comparação da reactividade da CBZ (62) e o seu metabolito EPCBZ (79) na presença
de nucleófilos de azoto e enxofre; 🗸 indica a formação de aduto, ª Formação de dois adutos
distintos, ^b Formação de um aduto apenas127
Tabela II.11. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de reactividade da CBZ (62) com a
GSH, na presença de H218O. ª Para este ensaio, o MeCN utilizado foi previamente seco 128
Tabela II.12. Abundâncias relativas (%) dos iões correspondentes à molécula protonada [M+H]+ dos
adutos GSH-EPCBZ (94) e GSH-CBZ (128), obtidas na análise por LC-ESI(+)-HRMSnos ensaios

efectuados para a reacção entre CBZ (62) e a GSH (representada a azul), com H₂¹⁸O e controlo da atmosfera do meio reaccional. (*) valores teóricos de [M+H]+ para produtos marcados com Tabela II.13. Caracterização estrutural efectuada por MS-ESI(+) e LC-ESI(+)-HRMSdos produtos lateriais obstidos por reacção da CBZ (62) com os nucleófilos de enxofre (RS), NAC (a) e GSH Tabela II.14. Caracterização por LC-ESI(+)-HRMSdos produtos obtidos por dismutação da reacção da CBZ (62) com o radical hidroxilo (H¹⁸ O[•] /HO[•]).....144 Tabela II.15. Caracterização por LC-ESI(+)-HRMSdo produto GSH/Br-CBZ (142), resultante da reacção entre a CBZ (62) e a GSH. 147 Tabela II.16. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre 9-AL (88) e ValOEt, na Tabela II.17. Caracterização estrutural obtida por NMR e MS para a OXCBZ (63) sintetizada...... 166 Tabela II.18. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre a OXCBZ (63) e os aminoácidos ValOEt ou NAL, na presença ou ausência de redutor (NaBH₃CN). 167 Tabela II.19. Caracterização estrutural obtida por LC- ESI(+)-MS dos adutos resultantes da reacção entre a OXCBZ (63) e os nucleófilos de azoto, valinato de etilo e N^{α} -acetil-lisina (representados a azul, como ValOEt ou NAL, respectivamente). 171 Tabela II.20. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre a OXCBZ (63) e MsCI para a tentativa de formação do modelo sintético electrófilo mesilado 10OMs-MHD (168)...... 172 Tabela II.23. Condições reaccionais usadas para a formação dos adutos de Edman padrão.......... 185 Tabela II.24. Caracterização estrutural dos adutos de Edman padrão obtidos. *Os adutos foram gerados por reacção inicial do ValOEt com espécies reactivas geradas por oxidação da CBZ (62) com H₂O₂, na presença do catalisador de [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111) e posteriormente submetidos às condições de degradação: **Apenas o aduto 171 foi obtido a partir do material de Tabela II.25. Condições reaccionais usadas no destacamento da valina N-terminal Hb do adutos de Edman formados formados após modificação desta proteína com vários electrófilos...... 189 Tabela II.26. Condições reaccionais usadas para a incubação dos vários electrófilo com a HSA. ... 194 Tabela II.27. Identificação do péptido modificado com EPCBZ (79) (incremento 252.0893 u) e o respectivo péptido não modificado por busca automática com o software GMP Fury, após a digestão da mistura reaccional com as proteases tripsina/quimotripsina. O local de modificação está assinalado a negrito com o respectivo incremento em superescrito. Tabela II.28. Comparação do péptido ³¹LQQCPF³⁶ modificado com EPCBZ (79) ou IAA obtido por busca manual do extracto hidrolisado resultante de digestão da mistura reaccional da HSA e 79, com as proteases tripsina/quimotripsina. O local de modificação está assinalado a negrito com o respectivo incremento (252.0893 u) em superescrito. A carbamidometilação das cisteínas está representada com C (57. 0214 u)..... 197 Tabela II.29. Identificação dos péptidos modificados com EPCBZ (79) e os respectivos péptidos não modificados, por busca automática com o software GMP Fury, após a digestão da mistura

reaccional com a protease tripsina. O local de modificação está assinalado a negrito com o respectivo incremento (252. 0893 u) em superscrito. A carbamidometilação das cisteínas está representada com C (57. 0214 u)...... 200 Tabela II.30. Identificação dos péptidos modificados com 9-AL (88) e os respectivos péptidos não modificados, por busca automática com o software GMP Fury, após a digestão da mistura reaccional com a protease tripsina. O local de modificação está assinalado a negrito com o respectivo incremento (193.0886 u) em superscrito. A carbamidometilação das cisteínas está Tabela II.31. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção de 2'-dG (48) e 2'-dA (49) e os electrófilos EPCBZ (79), OXCBZ (63) e MHD-SO₃- (110). No caso particular da reacção com a OXCBZ (63), os ensaios foram efectuados na presença ou ausência de redutor (NaBH₃CN). 206 Tabela III.1. Condições experimentais utilizadas para a oxidação da CBZ (62) com [Fe^{II} (bpmen)(Otf)₂] Tabela III.2. Condições experimentais usadas nos ensaios para a tentativa de formação do derivado electrófilo 168 por reacção do MHD (105) e MsCl. 232 Tabela III.3. Condições experimentais usadas nos ensaios para a tantativa de formação do derivado Tabela III.4. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da rea cção entre derivados oxidados Tabela III.5. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de preparação dos adutos de Edman, a Tabela III.6. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre CBZ (62) e NAC. 237 Tabela III.7. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre CBZ (62) e a GSH..... 238 Tabela III.8. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre EPCBZ (62) e o ValOEt. Tabela III.9. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de preparação dos adutos de Edman, a Tabela III.10. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre o EPCBZ (79) e NAC. Tabela III.11. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre EPCBZ (79) e a GSH. Tabela III.12. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre o 9-AL (88) e o ValOEt Tabela III.13. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre OXCBZ (63) e ValOEt Tabela III.14. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de preparação do aduto de Edman, a Tabela III.15. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre OXCBZ (63) e NAL presença ou na ausência de redutor (NaBH₃CN). 250

Tabela III.16. Condições experimentais usadas nos ensaios para a tantativa de formação do aduto
entre a N ^α -acetil-cisteína e o derivado electrófilo, 10,11-di-hidro-10-sulfoximetil-5H-dibenzo [<i>b,f</i>]
azepina-5-carboxamida (168) gerado <i>in situ</i> a partir de MHD (102)
Tabela III.17. Condições experimentais usadas nos ensaios para a formação de adutos entre
diferentes nucleófilos e a CBZ (62)
Tabela III.18. Condições experimentais usadas no estudo da reactividade da CBZ (62) e a GSH com
controlo de solvente. ^a Neste ensaio foi usado acetonitrilo previamente seco
Tabela III.19. Condições experimentais usadas nos ensaios de reactividade do EPCBZ (79) com
diferentes nucleófilos. ^a Neste ensaio não foi adicionado electrófilo; ^b Neste ensaio não foi
adicionado nucleófilo
Tabela III.20. Condições experimentais utilizadas nos ensaios para a modificação da Hb com 9-AL
(88), na presença ou ausência de redutor 259
Tabela III.21. Condições experimentais utilizadas nos ensaios para a modificação da Hb com OXCBZ
(63), na presença ou ausência de redutor
Tabela III.22. Condições experimentais utilizadas para a tentativa de formação dos adutos entre o
HSA e CBZ (62)
Tabela III.23. Condições experimentais utilizadas para a tentativa de formação dos adutos entre o
HSA e EPCBZ (79)
Tabela III.24. Condições experimentais utilizadas para a tentativa de formação dos adutos entre o
HSA e 9-AL (88)
Tabela III.25. Condições experimentais utilizadas para a tentativa de formação dos adutos entre o
HSA e OXCBZ (63)
Tabela III.26. Condições experimentais utilizadas nos ensaios para a tentativa de formação dos
adutos entre o DNA e OXCBZ (63)
Tabela III.27. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de destacamento da valina N-terminal
da Hb modificada com EPCBZ (79)
Tabela III.28. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de destacamento da valina N-terminal
da Hb modificada com OXCBZ (63)
Tabela III.29. Condições experimentais utilizadas no tratamento das misturas reaccionais de HSA
modificada com vários electrófilos
Tabela III.30. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com
CBZ (62)
Tabela III.31. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com
EPCBZ (79)
Tabela III.32. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com 2-
OHCBZ (82)
Tabela III.33. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com 9-
AL (88)
Tabela III.34. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com
OXCBZ (63)

Tabela III.35. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com
MHD-SO ₃ - (110)
Tabela III.36. Condições experimentais utilizadas nos ensaios onde se investigou a formação de
adutos com DNA com a OXCBZ (63)274
Tabela III.37. Condições experimentais utilizadas nos ensaios para a tentativa de formação de adutos
com DNA e OXCBZ (63)
Tabela III.38. Metabolitos de Fase I e II da OXCBZ (63) obtidos por incubação da fracção S9 de
fígado de rato e o respectivo controlo positivo (NVP (3))
Tabela III.39. Metabolitos de Fase I e II da OXCBZ (63) obtidos por incubação da fracção S9 de
fígado humano e o respectivo controlo positivo (NVP (3))
Simbologias e Notações

ABC	abacavir
Acetona-d ₆	Acetona hexa-deuterada
AcEt	Acetato de etilo
ADH	Aldeído desidrogenase
ADRs	Reacções adversas a fármacos da tradução do inglês <i>Adverse Drug</i> <i>Reactions</i>
AEDs	Fármacos antiepilépticos da tradução do inglês Antiepileptic Drugs
AAEDs	Fármacos antiepilépticos Aromáticos da tradução do inglês Aromatic Antiepileptic Drugs
APCs	Células apresentadoras de antigénio da tradução do inglês antigen presenting cells
Aprox.	Aproximadamente
BaP	Benzo[a]pireno
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
c.c.f.p.	Cromatografia em camada fina preparativa
¹³ C-NMR	Ressonância magnética nuclear de carbono-13 da tradução do inglês Nuclear Magnetic Ressonance of carbon-13
CYP450	Citocrómo P450 da tradução do inglês Cytochrome P450
Cys 34	Resíduo de cisteína na posição 34 da albumina humana
CBZ	carbamazepina
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DCF	diclofenac
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico da tradução do inglês Deoxyribonucleic Acid
DP	Cisteinilglicina dipeptidase

DRESS	Síndrome de reacção a fármacos com eosinofilia e sintomas sistémicos tradução do inglês <i>Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic</i>
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática da tradução do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent assay
EMA	Agência Europeia do Medicamento da tradução do inglês <i>European</i> <i>Medicines Agency</i>
Eq.	Equivalente
ESI	Ionização por electrospray da tradução do inglês Electrospray Ionization
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FNT	fenitoína
GGT	γ-glutamil-transpeptidase
G6P	Glucose-6-fosfato
G6PDH	Glucose-6-fosfato desidrogenase
Glc	Derivado do ácido glucurónico
GSH	Glutationa
Hb	Hemoglobina
HCV	Hepatitis C virus
HIV	Virus da imunodeficiência Humana da tradução do inglês <i>Human</i> Immunodeficiency Virus
HLA	Antigénio Leucocitário Humano
HLM	Microssomas de fígado humano da tradução do inglês <i>Human Liver</i> <i>Microsome</i>
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da tradução do inglês <i>High</i> Pressure Liquid Chromatography
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por luz ultravioleta da tradução do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography with</i> ultraviolet diode array detection

¹ H-NMR	Ressonância magnética nuclear de protão da tradução do inglês <i>Nuclear magnetic ressonance of proton</i>
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução da tradução do inglês High resolution mass spectrometry
HSA	Albumina do soro humano da tradução do inglês Human Serum Albumin
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IAA	Iodoacetamida
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDR	Reacção idiossincrática de fármacos da tradução do inglês <i>Idiosyncratic</i> Drug Reaction
IFN-γ	Interferão do tipo II ou gama da tradução do inglês Interferon-gamma
J	Constante de acoplamento
LC-ESI(+)-HRMS	Cromatografia líquida acoplada espectrometria de massa de alta resolução com ionização por electrospray em modo positivo da tradução do inglês Liquid Chromatography Electrospray Ionizationin positive mode High Resolution Mass Spectrometry
LC-ESI(+)-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray em modo positivo</i> por tradução do inglês <i>Liquid</i> <i>Chromatograph Electrospray Ionization in positive mode Mass Spectrometry</i>
LC-ESI(-)-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray em modo negativo</i> por tradução do inglês <i>Liquid</i> <i>Chromatograph Electrospray Ionization in negative mode Mass</i> <i>Spectrometry</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa da tradução do inglês Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tandem da tradução do inglês Liquid ChromatographyTandem Mass Spectrometry
LSC	Contagem de cintilação em meio líquido da tradução do inglês <i>liquid</i> scintillation counting
NSAIDs	Non-steroidal Anti-inflammatory drug
m	Multipleto
[M+H] ⁺	Molécula protonada
[M-H] ⁻	Molécula desprotonada

MeCN	Acetonitrilo
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
МНС	Complexo principal de histocompatibilidade da tradução do inglês major histocompatibility complex
MLM	Microssomas de fígado de rato da tradução do inglês <i>Mouse Liver</i> Microsomes
MsCl	Cloreto de mesilo
MS	Espectrometria de Massa da tradução do inglês Mass Spectrometry
m/z	Razão massa/carga
NADPH	Fosfato do dinucleótido de nicotinamida e adenina <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (forma reduzida)
NAC	N ^a -acetil-L-Cisteína
NAL	N ^a -acetil-L-Lisina
NAT	N-acetil-transferase
NNRTIS	Inibidores da Trasncriptase Teversa Não-Nucleosídicos da tradução do inglês Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors
NMR	Ressonância Magnética Nuclear da tradução do inglês <i>Nuclear Magnetic Ressonance</i>
NRTIs	Inibidores da transcriptase Reversa Nucleosídicos da tradução do inglês Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors
NSAIDs	Fármaco anti-inflamatório não esteróide da tradução do inglês Non-steroidal Anti-inflammatory Drug
NVP	nevirapina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXCBZ	oxcarbazepina
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos da tradução do inglês <i>Polycyclic</i> <i>Aromatic Hydrocarbons</i>
PARA	paracetamol
PBMCs	Células mononucleares do sangue perifiérico da tradução do inglês peripheral blood mononuclear cell

PITC	Isotiocianato de fenilo
S	Singuleto
SDS	Dodecil sulfato de sódio da tradução do inglês sodium dodecyl sulfate
SJS	Síndrome de Stevens-Jonhson da tradução di inglês Stevens-Jonhson Syndrome
S _N	Substituição nucleofílica
SULTs	Sulfotransferases
SUDEP	Morte súbita inesperada por epilepsia da tradução do inglês <i>sudden unexpected death in epilepsy</i>
t	Tripleto
t. a.	Temperatura ambiente
TEN	Necrólise Epidérmica Tóxica da tradução do inglês <i>Toxic Epidermal</i> Necrolysis
TFA	Ácido trifluroacético
THF	Tetra-hidrofurano
<i>t</i> _{1/2}	Tempo de meia-vida
<i>t</i> _R	Tempo de retenção
TsOH	Ácido <i>p</i> -toluenossulfónico
UGT	Uridina 5'-difosfo-glucuronosil-transferase
UV	Ultravioleta
ValOEt	Valinato de Etilo
δ	Desvio químico em relação ao tetrametilsilano (em ppm)
η	Rendimento

Capítulo I • INTRODUÇÃO

Qualquer substância capaz de produzir um efeito terapêutico pode também produzir uma reacção adversa. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma reacção adversa a um fármaco (ADR, da tradução do inglês *adverse drug reaction*) é definida como "qualquer efeito nocivo, não intencional e indesejado de um fármaco, observado nas doses terapêuticas habituais em seres humanos para fins terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico" [1].

Embora exista um grande esforço no sentido de desenvolver fármacos totalmente seguros, as ADRs continuam a ser uma das maiores complicações dos programas de desenvolvimento de fármacos [2]. De tal modo que em Julho de 2012 foram implementadas reformas no sistema regulatório de farmacovigilância Europeu. Este sistema foi orientado para a vigilância de pós-comercialização dos fármacos com o objectivo de melhorar a saúde pública na Europa, reduzindo o impacto das ADRs no doente [3]. Ainda assim, os dados epidemiológicos mais recentes indicam que, na Europa, aproximadamente 3.6 % de todas as admissões hospitalares estão relacionadas com ADRs e mais de 10 % dos doentes internados sofre de algum tipo de ADR durante o seu internamento. Além disso, a percentagem de hospitalizações associadas a ADRs que termina em fatalidades é de cerca de 0.5 % [4].

Sendo as ADRs uma causa de debilitação ou até mesmo mortalidade de pacientes por todo o mundo, estas reacções constituem um grande problema na escolha do fármaco a administrar. A crescente incidência das ADRs tem sido associada ao uso crónico de fármacos, como por exemplo a varfarina (1, Tabela I.1) [5], o paracetamol (PARA, 2, Tabela I.1,) [6] ou a nevirapina (NVP, 3, Tabela I.1). O facto de uma grande percentagem da população se encontrar actualmente em tratamento crónico, e por isso exposta por um longo período de tempo a um ou mais fármacos, torna as ADRs um tópico de interesse não só para a comunidade médica e científica mas também para a população em geral, não podendo ser negligenciado.

O conhecimento da base molecular subjacente às ADRs permitirá não só desenvolver fármacos mais seguros mas também desenvolver ferramentas que possam conduzir à diminuição das ADRs, como a identificação de factores de risco, e estabelecer correlações de risco/benefício no seu uso.

I.1. Reacções idiossincráticas de fármacos

De uma maneira geral, as ADRs podem ser distinguidas de acordo com quatro categorias: A, B, C e D [7-9] (Tabela I.1). As reacções da categoria B ou reacções idiossincráticas, não são previsíveis nem apresentam uma relação dose-resposta. Embora raras, estas manifestações designadas por reacções idiossincráticas de

fármacos (IDRs da tradução do inglês *idiosyncratic drug reactions*), são consideradas as mais críticas devido à sua natureza imprevisível e podendo mesmo ser fatais. Embora os mecanismos envolvidos na origem das IDRs não sejam totalmente conhecidos, as manifestações clínicas estão muitas vezes associadas a reacções alérgicas ou de hipersensibilidade, o que sugere uma base imunológica [7, 10, 11]. Além disso, o facto de as IDRs estarem associadas a um número limitado de sub-grupos da população sugere também que estes efeitos adversos estão relacionados com uma susceptibilidade individual.

Ti	ро	Toxicidade	Incidência	Exemplo
Dependentes da dose	A	Manifestações previsíveis e conhecidas Aumento do efeito farmacológico Dose-dependentes Não mortais Ex.: hipotensão, hemorragias	~80% (overdose)	Varfarina (1)
Idiossincráticas	в	Manifestações não previsíveis Resposta imunológica Não dose-dependentes Causas desconhecidas Graves e potencialmente mortais Ex.: hepatoxicidade, reacções de hipersensibilidade	Raras Susceptibilidade individual	$ \begin{array}{c} $
Agudas	С	Manifestações previsíveis Activadas pelo processo metabólico do fármaco Dose-dependentes	Pouco Comuns	HO PARA (2)
Crónicas	D	Dose-dependentes Relacionadas com o tempo de uso Ex.: Teratogénese e Carcinogénese	Pouco Comuns Surgem após algum tempo do uso do medicamento	Talidomida (4)

Tabela I.1. Tipos de Rea	ções Adversas induzidas	por Fármacos	(ADRs)[7	′-9]	ŀ
--------------------------	-------------------------	--------------	----------	------	---

I.1.1. Papel da bioactivação de fármacos na indução de reacções idiossincráticas

O mecanismo exacto envolvido na indução das IDRs não é totalmente conhecido. No entanto, a maioria das hipóteses mecanísticas sugeridas até hoje envolve o sistema imunitário [10, 11]. A indução das IDRs está também associada à activação metabólica ou bioactivação do fármaco a metabolitos (electrófilos) que

poderão reagir com bionucleófilos dando origem a adutos covalentes. O conceito de bioactivação do fármaco, que por ligação covalente com macromoléculas induz algum tipo de toxicidade, foi a base dos trabalhos de vários autores, como modelo explicativo da indução da carcinogenicidade por exposição a agentes químicos [12]. A extensão deste conceito para a hepatotoxiciade induzida por fármacos foi conseguida com os estudos realizados nas décadas de 70 e 80, nomeadamente com o PARA (2). Deste modo, a bioactivação é considerada a maior causa de toxicidade induzida por fármacos e é actualmente aceite que a formação de ligações covalentes entre os metabolitos reactivos e macromoléculas é um dos passos chave envolvidos nestes mecanismos de toxicidade [11, 13-15]. Dependendo da biomacromolécula alvo, estes adutos poderão estimular a toxicidade directa das células, desencadeando uma resposta imunológica ou iniciar mutagénese e/ou carcinogénese [11].

Os fármacos apresentam propriedades físico-químicas que lhes permitem atravessar a camada lipídica das células e atingir os respectivos alvos, sejam eles receptores ou proteínas. No entanto, um fármaco ou qualquer outro xenobiótico, necessita ser eficientemente eliminado do organismo, evitando a sua acumulação nos tecidos e a consequente toxicidade (Figura I.1). O processo metabólico de xenobióticos é assim de extrema importância, na medida em que promove a transformação destes compostos em substâncias mais polares (hidrofílicas) facilitando o processo de eliminação do organismo (Figura I.1). A maioria das reacções envolvidas neste processo ocorrem no fígado mas também poderão ocorrer noutros órgãos como a pele ou o cérebro [16]. O processo de biotransformação é genericamente dividido em duas fases, reacções de Fase I e de Fase II [16]. De uma maneira geral, as reacções de Fase I correspondem a reacções de oxidação, redução e/ou hidrólise, que envolvem geralmente a acção das enzimas do citocromo P450 (CYP450, da tradução do inglês Cytochrome P450). Outras enzimas, como a flavina monooxigenase (FMO) ou a epóxido hidrolase (EH) podem também ser intervenientes nesta fase. Todas estas enzimas de Fase I têm a capacidade de promover a introdução de grupos funcionais (considerados polares), resultando numa modificação estrutural da molécula e o aumento da sua solubilidade em água. Relativamente às reacções de Fase II, que promovem a conjugação dos produtos gerados na Fase I, estão envolvidas enzimas como as sulfotransferases (SULTs), uridina difosfato glucuroniltransferases (UGTs) ou as glutationa-S-transferases (GSTs) [16]. Após a acção das enzimas de Fase I e II, os metabolitos resultantes são compostos modificados estruturalmente e com propriedades físico-químicas que geralmente permitem a sua excreção. A representação esquemática de alguns exemplos do tipo

de reacções que ocorrem na formação de metabolitos pode ser observada na Tabela I.2.

Embora as enzimas de Fase I e II mencionadas tenham como objectivo todo o processo de eliminação de um fármaco do organismo, estas mesmas enzimas poderão também converter o fármaco em metabolitos ou espécies altamente reactivas. Dependendo da estrutura química do fármaco ou dos metabolitos, o mesmo processo metabólico poderá dar origem a espécies electrófilas, que se não forem adequadamente destoxificadas, poderão reagir com biomacromoléculas como proteínas ou ácido desoxirribonucleico (DNA da tradução do inglês *deoxyribonucleic acid*), levando à formação de adutos covalentes [17] (Figura I.1).

Os adutos covalentes formados poderão interferir com as funções celulares levando à toxicidade induzida através duas formas: a toxicidade directa por acumulação nas células ou alteração da actividade das biomoléculas envolvidas, desencadeando imunitária e/ou mecanismos uma resposta de mutagénese/carcinogénese (Figura I.1). No caso particular de ocorrer a formação de adutos com proteínas, poderá ocorrer uma interacção dos adutos com os receptores imunitários, levando à formação de anticorpos e promovendo reacções alérgicas ou de hipersensibilidade [10]. Da mesma forma, os adutos covalentes com DNA constituem um inicio de indução de mutagenicidade e carcinogenicidade, caso estes erros não sejam reparados ou sofram reparações incorrectas pelos sistemas de reparação do DNA [18]. Por outro lado, os processos de necrose e apoptose resultam da ligação covalente a proteínas, como receptores ou factores de transcrição, induzindo danos na célula ou morte celular (Figura I.1).



Figura I.1. Papel da bioactivação na toxicidade induzida por fármacos. Adaptado de [15].

Os metabolitos ou compostos reactivos são formados essencialmente pelas vias de Fase I, quer pela actuação directa das enzimas intervenientes quer por rearranjo dos metabolitos formados. Exemplos deste tipo de compostos são os grupos carbonilo α,β -insaturados, aldeídos ou cetonas, oxiranos (epóxidos alifáticos ou epóxido de areno) e ainda espécies quinóides (Tabela I.3). No entanto, algumas das vias de Fase II também poderão gerar espécies reactivas como é o caso da acção das SULTs dando origem a compostos sulfonados (Tabela I.3). Todas estas espécies reactivas podem reagir com macromoléculas, por substituição nucleófila (S_N), por adição de Michael ou ainda por formação de bases de Schiff consoante a sua estrutura (Tabela I.3) [19, 20].

.

Tabela I.2. Exemplos de reacções de Fase I e Fase II envolvidas no metabolismo de xenobióticos. Adaptado de [16].



Tabela I.3. Exemplos de grupos funcionais que quando presentes em fármacos ou metabolitos de fármacos podem estar envolvidos na formação de adutos covalentes com macromoléculas (M). Adaptado de [19].

Espécie Reactiva	Tipo de reacção	Produto de reacção com macromolécula (M)
Carbonilo α,β-insaturado	Adição de Michael	M O R
R → R' O Cetonas e aldeídos	Base de Schiff	R N N
R R ou O Oxiranos	Substituição Nucleófila ^R \ M	OH R ou OH
Ou O	Adição de Michael Aromatização	OH HN R OU OH OH
o ^{_SO₃H} R Sulfatos	Substituição Nucleófila	R

Existem na literatura, vários exemplos de fármacos ou outros agentes químicos que estão associados a ADRs e em que o papel da bioactivação está claramente implicado. Um dos exemplos mais estudados, diz respeito ao PARA (2) [21]. Este fármaco é essencialmente biotransformado no fígado pela acção das enzimas do CYP450 dando origem aos metabolitos, 3-hidroxi-paracetamol (3-OHPARA, 5, Esquema I.1) e *N*-acetil-*p*-benzoquinona-imina (NAPQI, 6, Esquema I.1). Por outro lado, as enzimas de Fase II dão origem aos metabolitos estáveis (7 e 8, Esquema I.1) resultantes dos processos de sulfonação e glucuronidação [21, 22].

Devido à sua natureza química, a quinona-imina 6 é reactiva e pode reagir facilmente com nucleófilos [23]. De facto, NAPQI (6) é destoxificado por reacção com a

glutationa (GSH) dando origem ao conjugado **9** (Esquema I.1). No entanto, numa situação de dose excessiva do fármaco ou deplecção de GSH, a destoxificação do NAPQI (**6**) por conjugação, torna-se ineficiente. Assim, a quinona-imina **6** fica livre para reagir com macromoléculas podendo dar origem a adutos covalentes. A ligação do NAPQI (**6**) a proteínas hepáticas, dando origem a adutos covalente NAPQI-Macromolécula (Esquema I.1), está comprovadamente associada à toxicidade hepática induzida por **2** [24, 25]. De forma a contornar uma situação de intoxicação por **2**, é administrado ao doente N^{α} -*L*-acetil-cisteína (NAC), que estando envolvida na biossíntese da GSH, promoverá o aumento da sua concentração que consequentemente reagirá com o metabolito tóxico, NAPQI (**6**). A NAC é bastante eficaz quando administrada até 16 h após a intoxicação pelo PARA (**2**), sendo que o perigo de falha hepática ou até morte aumenta substancialmente após este período [26].



Esquema I.1. Via metabólica/bioactivação proposta para o PARA (2).

São referidos na literatura vários outros exemplos em que o envolvimento da bioactivação está intimamente ligado à ocorrência de IDRs. Os fármacos abacavir (ABC, **10**, Esquema I.2) e NVP (**3**) (Esquema I.3), usados no combate à infecção pelo

vírus da imunodeficiência humana (HIV da tradução do inglês *Human immunodeficiency vírus*) são exemplo disso.

O ABC (10) é um fármaco com actividade contra o HIV do tipo 1 e 2, actuando como inibidor nucleósido da transcriptase reversa (NTRI da tradução do inglês Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor). Como pró-fármaco, o ABC (10) apenas alcança a sua actividade farmacológica após a formação do metabolito activo, carbovir-5'-trifosfato (CV-TP, 11, Esquema I.2) resultante da acção de enzimas envolvidas no anabolismo [27]. O ABC (10) é extensivamente metabolizado no fígado originando produtos mais hidrofílicos que permitem a sua excreção. Por um lado, a acção das enzimas de Fase II, as UDPGTs, origina a formação do metabolito inactivo na forma de glucurónido (ABC-Glucurónido, **12**, Esquema I.2) [28]. Por outro lado, a acção da enzima álcool desidrogenase (ADH) origina a formação de um intermediário aldeído (13, Esquema I.2) que é subsequentemente oxidado pela aldeído desidrogenase (ALDH) ao derivado carboxilato (ABC-carboxilato, 14, Esquema I.2) [28]. No entanto, o aldeído 13 rapidamente tautomeriza para um derivado conjugado mais estável (ABC-AL, 15, Esquema I.2), sendo este um metabolito reactivo (aldeído α,β -insaturado) susceptível de reagir com macromoléculas [29]. A formação de adutos com bionucleófilos pode ocorrer via formação de bases de Schiff com resíduos contendo azoto (como exemplificado por 16 no Esquema I.2, em que se representa o produto de redução da base de Schiff) mas também via adição de Michael com resíduos de cisteína [29]. A formação de adutos com proteínas, nomeadamente com hemoglobina (Hb), já foi observada em doentes infectados com HIV tratados com ABC (10) [30]. Embora o papel da bioactivação não esteja totalmente esclarecido, foi sugerido que a formação de 15 esteja na origem das reacções de hipersensibilidade e do aumento do risco de disfunção cardíaca associados a 10 [30-32].



Esquema I.2. Via metabólica/bioactivação proposta para o ABC (10).

As vias de conjugação que incluem as reacções de glucuronidação ou sulfonação (ver tabela I.2), apesar de normalmente conduzirem a eliminação, podem também constituir uma via de bioactivação, promovendo a formação de intermediários electrófilos [33]. Um exemplo desta situação é o fármaco anti-HIV inibidor nãonucleósido da transcriptase reversa (NNTRI da tradução do inglês Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor), NVP (3). O metabolismo de Fase I de 3 é consistentemente reportado [34, 35] como envolvendo a oxidação das posições aromáticas 2, 3, 8 (17-19, Esquema I.3) e da posição benzilica 12 (20, Esquema I.3), pela acção das enzimas do CYP450. Todos os derivados oxidados sofrem subsequente conjugação aos glucurónidos correspondentes (21-24, Esquema I.3), que são excretados na urina [35]. Embora o mecanismo específico das IDRs associadas à NVP (3) (skin rash e hepatotoxicidade) ainda não esteja totalmente esclarecido, várias abordagens in vitro [36-38] e em modelos animais in vivo [39-42] sugerem que a bioactivação do metabolito de Fase I, 12-hidroxi-NVP (12-OHNVP, 20), a derivados electrófilos que subsequentemente podem reagir com macromoléculas promovendo a formação de adutos covalentes do tipo NVP-Macromolécula (25, Esquema I.3) é responsável pelas mesmas. A acção das SULTs sobre a 12-OHNVP (20) dá origem a um derivado sulfonado, 12-sulfoxi-nevirapina (12OSO3-NVP, 26, Esquema I.3), já detectado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS da tradução do inglês Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) em amostras de urina de ratos Brown-Norway fêmea tratados com NVP (3) [40]. Este derivado electrófilo

pode ainda dar origem a um intermediário do tipo quinóide (**27**, Esquema I.3) que pode resultar da saída do grupo sulfato, embora a sua formação possa ser explicada por outras vias (Esquema I.3). Ambos os derivados **26** e **27** (Esquema I.3), dada a sua natureza química, podem reagir com macromoléculas nucleofílicas, sendo por isso apontados como responsáveis pelas IDRs associadas a **3** [42, 43].



Esquema I.3. Via metabólica/bioactivação proposta para a NVP (3).

Na grande maioria da população, a formação de metabolitos ou compostos reactivos é contrabalançada com os mecanismos de destoxificação. No entanto, em indivíduos mais susceptíveis, o equilíbrio entre o mecanismo de bioactivação e a destoxificação poderá ser perturbado por vários factores como predisposição genética, deplecção da GSH, auto-medicação ou o alcoolismo. Por exemplo, numa situação de formação de adutos com GSH, uma via de destoxificação clássica, a deplecção da GSH pode aumentar os níveis de espécies electrofílicas disponíveis e, por conseguinte, a sua reacção com macromoléculas, conduzindo a respostas tóxicas. Um outro exemplo, no caso particular do PARA (2), o alcoolismo promove uma susceptibilidade para a toxicidade induzida por 2. O excesso de álcool não só promove a deplecção da GSH como também funciona como indutor da isoforma CYP2E1 do

CYP450, a principal isoforma envolvida na formação da quinona-imina NAPQI (6) (ver Esquema I.1).

Como já referido, as manifestações clínicas associadas às IDRs são consistentes com reacções ou mecanismos imuno-mediados e a maioria delas apresenta evidências substanciais do envolvimento da bioactivação dos xenobióticos, a metabolitos ou derivados reactivos. Os fármacos, enquanto xenobióticos são considerados moléculas pequenas (que apresentam peso molecular abaixo de 1 kDa) e, por isso, não são à partida, compostos imunogénicos. No entanto, desde os trabalhos elaborados por Landsteiner e Jacobs [44], nos quais foi observada uma correlação directa entre a administração de compostos aromáticos halogenados em modelos animais e reacções de hipersensibilidade, com o envolvimento de ligações covalentes destes compostos com proteínas, que se considera que a formação de metabolitos ou derivados reactivos corresponde ao primeiro passo no desenvolvimento das IDRs. A formação de derivados electrófilos, potencialmente tóxicos, que poderão reagir com as macromoléculas dá origem à formação de adutos covalentes. Estas macromoléculas modificadas, de peso molecular substancialmente superior ao fármaco, poderão ser consideradas imunogénicas e a sua presença levará o sistema imunológico a iniciar a sua resposta contra o aduto covalente. Este é o princípio do modelo mecanístico de haptenização (modelo 1, Tabela I.4) mais consensual na comunidade científica para explicar as IDRs. No entanto, nos últimos anos outros mecanismos plausíveis têm sido propostos [45]. Até à data, são considerados pelo menos quatro mecanismos distintos para explicar a indução da resposta imunológica por xenobióticos: 1) A hipótese de hapteno ou pro-hapteno [10, 46]; 2) a hipótese de interacção farmacológica directa ou "p-i concept" [47]; 3) O "danger model" (que é considerado complementar ao modelo de haptenização) [48]; 4) o mais recente "altered peptide model" [49]. As suas características, bem como a respectiva representação esquemática, encontram-se descritas na Tabela I.4. De salientar que, apesar de bastante distintos entre si, estes modelos não são exclusivos para um determinado xenobiótico, podendo ocorrer simultaneamente.

Tabela I.4. Mecanismos propostos para explicar as respostas imunológicas mediadas por xenobióticos. A representação esquemática é adaptada de [10].

	Mecanismo	Descrição	Representação esquemática
1	Haptenização ou pro- haptenização	Os xenobióticos e os seus metabolitos são demasiado pequenos para serem imunogénicos; No entanto, xenobióticos quimicamente reactivos (hapteno) ou seus metabolitos (pro-hapteno) podem ligar-se covalentemente a proteínas. As proteínas modificadas são hidrolisadas pelas células apresentadoras de antigénio (APCs da tradução do inglês <i>antigen presenting cells</i>) a péptidos que ao associar-se ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC da tradução do inglês <i>major histocompatibility complex</i>), interagem com os receptores das células T e geram um sinal (sinal 1, na representação esquemática) que desencadeia a resposta imune.	Hepatócito ou outra célula-alvo bioactivação Metabolito Reactivo Proteína Proteína Modificada
2	"p-i concepť'	Os xenobióticos são capazes de iniciar a resposta imune graças à sua interacção directa mas reversível (não covalente) com os receptores das células T. Neste mecanismo, a bioactivação e o proteossoma não são considerados.	A 1 3 Sinal 2
3	"danger model"	O dano celular é necessário para ocorrer a libertação de "sinais de perigo" que estimulem o sistema imunitário. Neste mecanismo, para a estimulação da resposta imune pelo sinal 1 (promovido pela formação de adutos covalentes de espécies reactivas com macromoléculas) é necessário um sinal co-estimulante (sinal 2, na representação esquemática) prévio. Estes "sinais de perigo" incluem diferentes formas de stress celular: químico (ex. formação de espécies reactivas), físico (ex. trauma cirúrgico) ou viral (ex. infecção).	2 Sinal 1
4	"altered peptide model"	O metabolismo não é necessário. A resposta imunológica pode ser estimulada pela ligação reversível (não covalente) do xenobiótico com o complexo MHC, e desta forma alterar os péptidos apresentados às células T.	↓ Resposta Imunológica

I.1.1.1. Metodologias in vitro para o estudo da bioactivação de fármacos

O estudo da biotransformação é parte integrante dos ensaios pré-clínicos efectuados pelas indústrias farmacêuticas para qualquer novo candidato a fármaco [50]. Esta avaliação, em princípio, deveria prever se uma nova molécula quando biotransformada, poderá dar origem a espécies reactivas iniciadoras de eventos tóxicos. Ainda assim, em alguns casos, alertas e *black box warnings* são lançados, devido à ocorrência de efeitos tóxicos graves, detectados só após a introdução do fármaco no mercado [15, 51]. Estes efeitos tóxicos, que em alguns casos acabam mesmo por resultar na retirada do fármaco do mercado, correspondem em grande parte a IDRs (tipo B, ver Tabela I.1)[51].

A avaliação efectuada nestes ensaios pré-clínicos envolve estudos *in vitro* e *in vivo* em modelos animais, nos quais são determinados parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos e o respectivo perfil toxicológico [52]. No entanto, uma das grandes dificuldades nesta avaliação corresponde à inexistência de modelos animais *in vivo* que permitam prever inequivocamente a ocorrência das IDRs em humanos [53].

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de Fase I de fármacos e xenobióticos, em geral. Como consequência, é também o local mais afectado pela toxicidade induzida por fármacos [51]. Para além da hepatotoxicidade, os metabolitos gerados no fígado são transportados pelo sistema circulatório resultando na sua interacção com outros órgãos como os rins, cérebro ou coração podendo resultar também em toxicidade induzida nestes locais (Figura I.2). Pelo papel que o fígado desempenha no processo metabólico, não é de estranhar que os sistemas *in vitro* desenvolvidos, e mais utilizados para a avaliação da toxicidade de fármacos, se baseiem maioritariamente neste órgão. Além disso, a relativa facilidade em obter e manusear as fracções sub-celulares ou células hepáticas permite resultados rápidos e a relativo baixo custo.



Figura I.2. Esquema representativo da centralização do metabolismo de fármacos, poluentes ambientais e outros xenobióticos, no fígado. Os metabolitos e espécies reactivas formadas podem posteriormente seguir, através do sistema circulatório, para outros pontos do organismo. Adaptado de [54].

De uma maneira geral, os sistemas desenvolvidos permitem experiências *in vitro* com diferentes fracções sub-celulares ou células, suplementados com co-factores de Fase I e Fase II, aos quais é adicionado o fármaco em estudo. Os metabolitos e as potenciais espécies reactivas geradas são assim armadilhados pela adição de nucleófilos, às incubações efectuadas. Estes nucleófilos correspondem a compostos que incluem grupos tiol, como o GSH ou NAC, ou grupos amina como a *N*^{*a*}-acetil-lisina (NAL) [55-57]. Entre os diferentes sistemas-modelo desenvolvidos estão as fatias de tecido hepático, linhas celulares ou fracções sub-celulares como microssomas, fracção *S9* ou fracção citosólica do homogenato de fígado. Uma breve descrição dos principais modelos *in vitro* bem como as respectivas vantagens e desvantagens pode ser encontrada na Tabela 1.5.

Tabela I.5. Resumo dos principais sistemas-modelo *in vitro* usados na avaliação da hepatoxicidade induzida por fármacos [55, 58, 59].

Modelo	Descrição
1.Superssomas	Correspondem ao resultado da manipulação genética de insectos infectados com o baculovírus de modo a passarem a produzir enzimas do fígado e outras enzimas envolvidas no metabolismo.
2. Fracção citosólica do fígado	Contém as enzimas de Fase II solúveis, como as SULTs e as UGTs sendo obtida por centrifugação diferencial a partir do homogenato de fígado inteiro.
3. Microssomas do fígado	Correspondem a vesículas do retículo endoplasmático dos hepatócitos contendo praticamente todas as enzimas envolvidas no metabolismo de Fase I e algumas de Fase II (UGTs). Estas vesículas são também obtidas por centrifugação diferencial e este é um dos métodos mais populares devido à sua disponibilidade e simplicidade.
4. Fracção S9 do fígado	Corresponde a ambas as frações microssomal e citosólica mencionadas nos modelos 2) e 3), apresentando assim as mesmas enzimas de Fase I e II.
5. Linhas celulares de hepatócitos	Correspondem a linhas de células de fígado e são um modelo menos popular uma vez que são células não diferenciadas e têm uma expressão incompleta de enzimas envolvidas no metabolismo. No entanto, este método é o que se aproxima mais das condições fisiológicas normais e inclui as células Hep G2, Hep 3B e BC2, por exemplo.
6. Linhas celulares transgénicas	Correspondem a linhas de células transgénicas que expressam enzimas de Fase I e II.
7. Hepatócitos	São bastante populares devido à sua grande semelhança com as condições <i>in vivo</i> do fígado, embora sejam bastante difíceis de isolar a partir do fígado humano.
8. Fatias de tecido hepático	Dizem respeito a culturas de fatias de tecido hepático. Têm como grande desvantagem a sua viabilidade que depende do corte correcto e posteriormente do seu armazenamento.
9. Perfusão do fígado	É considerada a melhor representação das condições <i>in vivo</i> embora nunca tenha sido testada com um fígado humano e apenas em pequena escala com fígados de animais.

Todos estes modelos apresentam limitações nomeadamente na sua reprodutibilidade e fiabilidade. A falta das reais condições de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), em resultado da desconecção do ambiente celular e ausência do sistema circulatório e outros orgãos, não permite em certas situações correlacionar os resultados com a real toxicidade *in vivo*. Actualmente, estão a ser desenvolvidas novas estratégias complementares [54, 57] no sentido de colmatar estas lacunas. As novas abordagens como sistemas de culturas 2D e 3D, o fígado artificial ou sistemas de co-culturas celulares permitem mimetizar mais correctamente os processos biológicos tornando os modelos *in vivo* o mais preditivos possível.

Infelizmente, estas abordagens apenas permitem no presente a identificação estrutural preliminar de metabolitos ou espécies reactivas não permitindo ainda a total substituição dos ensaios *in vivo* [55]. Na Figura I.3 é possível observar a comparação entre os sistemas-modelo para a avaliação da hepatoxicidade mencionados na Tabela I.5 e com os ensaios *in vivo*, na sua complexidade, facilidade de execução e semelhança com os modelos animais.



Figura I.3. Modelos *in vitro* e *in vivo* utilizados no estudo de bioactivação de fármacos por ordem de semelhança com sistemas *in vivo*. Adaptado de [55].

I.1.2. Biomarcadores

O termo biomarcador quando associado à terapêutica humana é sinónimo de novas abordagens usadas no sentido de obter fármacos mais seguros e eficazes para o doente, e sempre na tentativa de minimizar os seus efeitos adversos [60]. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de biomarcadores expandiu-se no sentido de encontrar "endpoints" específicos e preditivos para monitorizar respostas biológicas a várias doenças ou a exposição a fármacos e outros agentes químicos [60, 61]. Embora o uso de biomarcadores na previsão de doenças tenha tido relativo sucesso, a aplicação dos mesmos no que diz respeito à avaliação do risco por exposição a xenobióticos ou a fármacos em particular, é mais limitada [62]. Actualmente, a implementação do uso de biomarcadores no desenvolvimento de fármacos tem como objectivo o tratamento de doenças de forma eficaz, permitindo a previsibilidade de um possível efeito adverso e permitindo o uso de uma terapia mais específica e personalizada a cada doente.

Os marcadores biológicos ou biomarcadores são genericamente definidos como características que podem ser objectivamente medidas e avaliadas como indicadoras de processos biológicos normais, processos patogénicos ou de uma resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica [63]. No contexto da toxicologia farmacológica, um biomarcador pode ser definido como a resposta biológica a um ou mais fármacos sendo que a análise de tecidos e fluidos corporais pode ser usada para detectar os agentes químicos e os seus metabolitos, enzimas intervenientes ou outras substâncias biológicas, possibilitando a correlação entre o fármaco e a resposta tóxica [64].

Um determinado biomarcador poderá ser usado individualmente. No entanto, e de forma a estabelecer correlações mais sólidas poderão ser usados em simultâneo diferentes tipos de biomarcadores. Para ser considerado um biomarcador confiável este terá que se correlacionar com uma resposta biológica ao fármaco em estudo, sendo que essa resposta terá de permitir uma correlação dose-efeito persistente o suficiente para ser medida. Além disso, o biomarcador terá de ser sensível e o mais específico possível, de modo a permitir o estabelecimento de uma relação fidedigna [64, 65]. Preferencialmente, e para que possa ser medido e/ou quantificado, deverá ser obtido por métodos o menos invasivos possível (Esquema I.4).



Esquema I.4. Requisitos de um bom biomarcador. Adaptado de [65].

Os biomarcadores são classificados de acordo com três categorias: biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de susceptibilidade [65] (Esquema I.5). Dentro da categoria de biomarcadores de exposição existem os biomarcadores de dose interna ou dose efectiva [64]. Os biomarcadores de dose interna medem o nível do fármaco ou metabolito em tecidos ou fluidos corporais (como o sangue ou urina). Na medida em que existe uma variabilidade individual nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, é preferível medir a quantidade de agente tóxico nos tecidos ou fluidos e estimar a sua exposição a simplesmente fazer uma estimativa da exposição ao fármaco esperada. Os biomarcadores de dose efectiva são utilizados para quantificar a fracção do fármaco ou metabolito reactivo que é capaz de interagir com macromoléculas num alvo toxicologicamente relevante. Em particular, os metabolitos reactivos, uma vez que apresentam tipicamente tempos de meia vida ($t_{1/2}$) bastante curtos, *in vivo*, não podem ser medidos e/ou quantificados directamente. No entanto, a formação de adutos covalentes estáveis com DNA ou proteínas podem ser efectivamente medida e/ou quantificada. Assim, estes adutos covalentes formados por ataque nucleófilo das macromoléculas a espécies reactivas são frequentemente usados como biomarcadores específicos de dose efectiva [65].

A presença de um agente tóxico induz alterações fisiológicas e bioquímicas num organismo. Tais alterações podem ser usadas como biomarcadores de efeito [64], correspondendo à resposta biológica induzida pela exposição ao fármaco. A nível molecular, as alterações manifestam-se na regulação, activação ou inibição das funções celulares, como alterações no DNA e cromossomas, alterações da actividade enzimática ou alterações na transcrição génica. Os biomarcadores de susceptibilidade [64, 65] são uma medida de variabilidade genética das respostas tóxicas a um fármaco.



Esquema I.5. Classificação dos marcadores biológicos. CYPs: Enzimas do CYP450; EPH: Epóxido hidrolase; GSTs: Glutationa-S-transferases; NATs: N-

acetil-transferases. Adaptado de [65].

As enzimas que estão envolvidas no metabolismo de fármacos, como as enzimas do CYP450, EPHs, as *N*-acetil transferases (NATs) ou as SULTs apresentam polimorfismos e ou indução/inibição da sua actividade, o que representa uma variabilidade inter-pessoal que poderá afectar a distribuição e a permanência do fármaco no corpo e, consequentemente influenciar a resposta tóxica. No entanto, outros factores ambientais como a alimentação, estilo de vida, idade, sexo ou raça, poderão afectar também esta susceptibilidade individual, aumentando ou diminuindo o risco da exposição ao fármaco [65].

De uma maneira geral, os biomarcadores podem assumir várias formas nomeadamente proteínas ou péptidos, lípidos, anticorpos, diferentes tipos de células, metabolitos, hormonas, níveis enzimáticos ou estados fisiológicos como a pressão arterial ou febre [65].

Em toxicologia, os biomarcadores são essencialmente isolados a partir de fluidos corporais. O sangue e a urina são por excelência os fluidos mais usados na análise de biomarcadores uma vez que são de recolha fácil, podendo ser obtidos em grandes quantidades e de forma pouco invasiva. No caso particular do sangue, é também um tipo de tecido que contém vários tipos de células (eritrócitos ou linfócitos) e fluidos (plasma), constituindo um veículo que distribui os fármacos e os seus metabolitos bem como os produtos de excreção, de e para todos os órgãos, permitindo obter informação dos vários órgão afectados de forma simples e rápida. Por outro lado, a urina apresenta também uma grande quantidade de proteínas estáveis originárias da filtração renal e do processo de excreção das células epiteliais do trato urinário [66].

I.1.2.1. Metabolitos de excreção urinária, mercapturatos e conjugados com a glutationa

Os metabolitos ou espécies reactivas electrófilas são espécies potencialmente tóxicas que podem reagir rapidamente com biomacromoléculas, *in vivo*. Estas espécies geradas após a exposição a um fármaco são, regra geral, eficazmente armadilhados pela GSH como via de destoxificação e eliminadas do organismo, evitando assim a sua reacção com as macromoléculas [13, 67]. No entanto, quando ocorre uma deplecção da GSH, por exemplo após exposição recorrente, a modificação covalente de biomacromoléculas, sejam elas proteínas ou DNA, é promovida em alguma extensão, tal como acontece no exemplo da bioactivação do PARA (2) (ver Esquema I.1), já mencionado [21].

A reacção das espécies electrófilas, potencialmente tóxicas, com a GSH dá origem a S-conjugados do tipo 28 (Esquema I.6) cuja formação pode ocorrer

espontaneamente ou ser catalisada pela acção das GSTs, uma superfamília de enzimas citosólicas [68]. Estes conjugados, apesar de poderem funcionar como biomarcadores não são os indicadores de exposição adequados, na medida em que raramente são eliminados nesta forma pela urina, sendo por isso os seus níveis bastante baixos. Efectivamente, os conjugados com a GSH podem sofrer reacções de degradação dando origem a produtos de catabolismo, como os derivados do ácido mercaptúrico (Esquema I.6). O processo catabólico dos conjugados da GSH aos derivados mercapturatos envolve vários passos metabólicos [68]. O primeiro passo envolve a acção da γ-glutamil-transpeptidase (GGT) para a remoção do grupo glutamilo da GSH dando origem ao conjugado cisteinilglicina (29, Esquema I.6). O segundo passo corresponde à degradação de 29 pela cisteinilglicina dipeptidase (DP) dando origem ao mercapturato, isto é, ao conjugado com NAC (31, Esquema I.6), pela acção das NATs. Os mercapturatos formados são assim excretados do organismo, essencialmente pela via urinária.



Esquema I.6. Formação dos conjugados de GSH e os seus produtos de catabolismo. **RX:** espécie electrófila reactiva; **GGT:** γ-glutamil-transpeptidase; **DP:** cisteinilaglicina dipeptidase; **NAT:** *N*-acetil-transferase.

Os produtos resultantes do catabolismo dos conjugados com a GSH, nomeadamente os derivados mercapturatos, são potencialmente bons indicadores da bioactivação [69, 70]. A detecção e quantificação dos níveis de compostos do tipo de **31** na urina constituem uma medida indirecta da exposição a um fármaco e dão uma indicação da bioactivação destes, a espécies reactivas electrófilas capazes de reagir com a GSH endógena. A grande vantagem do uso destes produtos como biomarcadores é que não depende da morte celular para que ocorra a sua libertação e excreção pela urina sendo que a sua elucidação estrutural fornece informação acerca da estrutura das espécies reactivas e do mecanismo de bioactivação.

I.1.2.1.1. Técnicas de análise e detecção dos metabolitos de excreção urinária, mercapturatos e conjugados com a glutationa

A análise dos metabolitos de excreção urinária, seja na forma de mercapturatos ou conjugados com a glutationa, constitui um grande desafio devido à complexidade das matrizes biológicas. A detecção e identificação destes derivados em matrizes biológicas são complexas devido à presença de macromoléculas como proteínas, lípidos e outros compostos endógenos, estruturalmente diversos, que podem interferir as mesmas [71]. Além disso, a detecção dos metabolitos de excreção urinária é dificultada pelo facto de existirem em baixas concentrações (< µM). Assim, e muito embora as técnicas de análise sejam cada vez mais sofisticadas, permitindo uma especificidade e sensibilidade crescentes, é muitas vezes necessário recorrer a padrões sintéticos destes derivados ou análogos marcados isotopicamente, que permitem distingui-los de outros compostos com propriedades físico-químicas similares e que possam interferir na análise [71].

As técnicas de Espectrometria de Massa [72, 73] (MS da tradução do inglês *Mass Spectrometry*) acopladas a cromatografia gasosa (GC-MS da tradução do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) ou LC-MS são actualmente as mais usadas para a análise deste tipo de compostos. Em particular, nos últimos anos [73], o desenvolvimento de metodologias mais robustas e sensíveis, nomeadamente a técnica de Cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução por ionização por electrospray em modo positivo (LC-ESI(+)-HRMS da tradução do inglês *Liquid Chromatography with electrospray in positive mode High Resolution Mass Spectrometry*) tornou-se a ferramenta analítica de excelência para a detecção e identificação de metabolitos de uma maneira geral, e em particular os metabolitos de excreção urinária.

Na literatura encontram-se descritos vários exemplos da utilização da técnica de LC-MS na identificação de conjugados mercapturatos como biomarcadores de bioactivação. Um exemplo diz respeito ao estudo da bioactivação do NNRTI, NVP (3), já mencionado. Neste estudo [74] foram identificados dois derivados mercapturatos da NVP (3), a 3-mercapturato-NVP (3-NACNVP, 32, Esquema I.7) e a 12-mercapturato-NVP (12-NACNVP, 33, Esquema I.7) na bílis e urina de ratos expostos a 3. Estes dois compostos, considerados biomarcadores urinários estáveis, foram isolados e caracterizados estruturalmente através de uma abordagem integrada de Ressonância Magnética Nuclear (NMR da tradução do inglês *Nuclear Magnetic Ressonance*) e MS. Este trabalho constituiu a primeira indicação da possibilidade da NVP (3) ser bioactivada a espécies susceptíveis de reagirem com bionucleófilos sendo os

intermediários electrófilos do tipo areno epóxido (**34**, Esquema I.7) ou espécies quinóides (**27**, Esquema I.7) os mais plausíveis.



Esquema I.7. Mecanismo de bioactivação proposto para a formação dos mercapturatos, 3-NACNVP (32) e 12-NACNVP (33).

Um outro exemplo da utilização de LC-MS no desenvolvimento de metodologias para a análise de derivados do ácido mercaptúrico é o do fármaco antiinflamatório não esteróide (NSAIDs da tradução do inglês Non-steroidal Antiinflammatory Drug), diclofenac (DCF, 37, Esquema I.8). O uso de DCF (37) tem sido associado a uma hepatotoxicidade severa, com destacada incidência em mulheres e idosos. Embora o mecanismo associado à sua toxicidade não esteja completamente elucidado, acredita-se que a formação de espécies reactivas, a partir dos dois metabolitos maioritários de 37, 4'-hidroxi-diclofenac (4'-OHDCF, 38, Esquema I.8) e 5hidroxi-diclofenac (5-OHDCF, 39, Esquema I.8), está na origem destes eventos tóxicos [75]. Uma das possibilidades apontadas envolve a formação das quinona-iminas 40 e 41 (Esquema I.8), respectivamente a partir de 4'-OHDCF (38) e 5-OHDCF (39), que sendo espécies electrofílicas são capazes de reagir com a GSH formando os adutos de excreção (representados no Esquema I.8 como 42 e 43). Efectivamente, a análise de urinas e bílis de ratos tratados com DCF (38) permitiu observar por LC-MS, os adutos derivados do ácido mercaptúrico, 4'-OH/NACDCF (44) e 5-OH/NACDCF (45) [76]. A análise posterior de uma pool de urinas de 50 doentes em terapêutica com DCF (37) permitiu confirmar a formação de 44 e 45, por comparação com os padrões de fragmentação obtidos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS da tradução do inglês *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) [76]. Este resultado permitiu afirmar que a bioactivação do DCF (37) em humanos ocorre provavelmente por via da formação das quinona-iminas 40 e 41 mencionadas.



Esquema I.8. Mecanismo de bioactivação proposto para o DCF (37).

I.1.2.2. Adutos covalentes formados entre fármacos e biomacromoléculas

Como referido anteriormente, os adutos covalentes formados com proteínas ou DNA são também usados como biomarcadores de exposição, dando a indicação da dose efectiva de exposição a metabolitos reactivos. O facto de serem em geral quimicamente estáveis o tempo suficiente, ao ponto de existirem em concentrações aceitáveis para serem identificados e quantificados, torna este tipo de adutos excelentes candidatos para o seu uso como biomarcadores de exposição a fármacos [19]. Além disso, a formação de produtos de reacção que envolvem os centros nucleófilos das biomacromoléculas possibilita também, de forma indirecta, a comprovação da formação das espécies reactivas electrofílicas resultantes da bioactivação dos fármacos potencialmente tóxicos, que apresentam regra geral, tempos de vida muito curtos para serem detectados individualmente. Os metabolitos ou as espécies reactivas potencialmente tóxicas (representadas por RX na Figura I.4) correspondem a compostos que contêm centros de baixa densidade electrónica



susceptíveis de reagir com os centros de alta densidade electrónica das biomacromoléculas [19].

Biomacromolécula

Figura I.4. Representação esquemática da formação de produtos de reacção entre os centros nucleófilos (N, O e S) de uma biomacromolécula e as espécies reactivas electrófilas resultantes da bioactivação de um fármaco. Adaptado de [19].

A formação de adutos covalentes com proteínas ocorre devido à presença de grupos nucleófilos nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos [19]. Exemplos destes resíduos, que contêm átomos de oxigénio, azoto ou enxofre (a negrito na Figura I.4 e I.5), são os resíduos de histidina, triptofano, cisteína, serina, lisina, tirosina, ácido glutâmico e aspártico e ainda o grupo amina terminal da valina (representados pelo péptido-exemplo **46**, Figura I.5). O mesmo se verifica por exemplo, para as bases de DNA, desoxiguanosina (dG, **47**, Figura I.5) e desoxiadenosina (dA, **48**, Figura I.5) que apresentam centros nucleófilos de oxigénio, azoto e carbono. Os mecanismos de reacção associados à formação destes adutos envolvem essencialmente reacções do tipo das descritas na Tabela I.3 (ver secção I.1.1. deste capítulo).

Para além do carácter nucleófilo dos resíduos de aminoácido e das bases de DNA, outras características correspondentes à estrutura terciária da macromolécula como o impedimento estereoquímico, o pKa dos aminoácidos, a hidrofobicidade, interacções entre aminoácidos vizinhos e interacções electrónicas são igualmente determinantes na formação destes adutos.



Figura I.5. Exemplo de um péptido-modelo (**46**) contendo os resíduos de aminoácidos na sua forma predominante, a pH fisiológico e as bases de DNA, dG (**47**) e dA (**48**). Os átomos que estão na forma livre e que apresentam características nuceófilas estão representados a negrito.

Os adutos de proteínas mais utilizados como biomarcadores de exposição a fármacos são os resultantes da reacção com as proteínas do sangue, a hemoglobina (Hb) e a albumina [77, 78]. Como já referido anteriormente, o sangue é um tipo de fluido que pode ser recolhido convenientemente e em quantidades suficientes, de animais e humanos. Com apenas 1 mL de amostra de sangue é possível obter aproximadamente 150 mg de Hb das células vermelhas e entre 30-45 mg de albumina do plasma sanguíneo [19](Tabela I.6). Para além do fácil acesso, o uso de adutos com as proteínas do sangue como biomarcadores é também conveniente devido à cinética de *turnover* destas proteínas, que possuem tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) relativamente longos (Tabela I.6). Esta característica permite a identificação e a quantificação dos adutos formados, na medida em que sendo estáveis, estes persistem até ao processo natural de degradação das proteínas [19].

A albumina do soro humano (HSA da tradução do inglês *Human Serum Albumin*) é frequentemente usada como modelo para identificar proteínas modificadas por exposição a fármacos [32, 79-83]. Este facto deve-se a esta proteína do sangue apresentar vários resíduos passíveis de serem modificados covalentemente por agentes químicos. No caso particular dos resíduos de cisteína, a HSA tem na sua constituição 17 pares envolvidos em pontes de dissulfureto e apenas um resíduo de cisteína na sua forma livre, na posição 34 (Cys³⁴) [79]. Este resíduo tem uma alta capacidade nucleofílica, na medida em que se encontra na forma de tiolato devido à sua proximidade com três resíduos ionizáveis (uma histidina, uma tirosina e um ácido aspártico). Este facto torna este resíduo especialmente predisposto a reagir com eletrófilos.

A Hb, que apresenta o $t_{1/2}$ mais longo do que a HSA (Tabela I.6), é também usada como modelo de exposição a fármacos [30, 41]. Para além de outros resíduos nucleófilos já discutidos anteriormente, a existência de um resíduo de valina no *N*-terminal da cadeia proteica, mais disponível ao acesso de metabolitos reactivos, torna este aminoácido mais propício ao ataque nucleófilo [19].

Os adutos de DNA são também considerados bons biomarcadores de exposição a agentes carcinogénicos [84, 85]. De facto, adutos de DNA não reparados (ou erroneamente reparados) podem dar origem à morte celular e iniciar processos neoplásicos, permitindo estabelecer uma correlação entre o fármaco e a sua carcinogenicidade. Este tipo de adutos pode ser obtido a partir de vários tecidos nomeadamente pela extracção dos glóbulos brancos de amostras de sangue. No entanto, e ao contrário do que se verifica para as proteínas do sangue, a quantidade de DNA extraído é bastante reduzida (aproximadamente 6 μ g por mL de sangue) o que dificulta a quantificação dos potenciais adutos formados. Além disso, e devido aos processos de reparação do DNA, a identificação destes adutos é também dificultada devido ao seu baixo $t_{1/2}$ (Tabela I.6)[19].
Biomacromolécula	Célula/fluido	Concentração no sangue	Turnover
Hemoglobina	Glóbulos vermelhos	150 mg/mL	<i>t</i> _{1/2} :
			Humanos 126 dias
			Ratos 60 dias
			Ratinhos 40 dias
Albumina	Plasma sanguíneo	30-45 mg/mL	<i>t</i> _{1/2} :
			Humanos 23 dias
			Ratos 2,5 dias
			Ratinhos 1,9 dias
DNA	Glóbulos brancos	6 µg/mL	Cinética complexa

Tabela I.6. Biomacromoléculas cujos adutos são usados como biomarcadores e a respectiva disponibilidade e tempo de meia-vida, *in vivo*. Adaptado de [19].

I.1.3. Técnicas de análise, detecção, caracterização e quantificação de adutos covalentes com proteínas e DNA

Perante a formação de adutos covalentes, a identificação precisa da natureza do aduto formado e o local de ligação entre a espécie reactiva e a macromolécula é determinante para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas IDRs e, em particular, nas reacções de hipersensibilidade. As amostras biológicas como o sangue e a urina apresentam uma mistura complexa de proteínas, o que torna a identificação da macromolécula modificada uma tarefa bastante desafiadora. O isolamento das macromoléculas modificadas a partir de matrizes complexas, após os processos de lise celular e centrifugação, pode ser efectuado por simples precipitação, cromatografias de afinidade ou troca iónica ou ainda recorrendo a electroforese em géis de poliacrilamida [77]. Podem ser utilizados vários métodos de análise para a detecção de adutos com macromoléculas. No que diz respeito à modificação covalente de proteínas, as estratégias mais tradicionais correspondem à detecção radiométrica ou detecção recorrendo a abordagens imunoquímicas.

O uso de compostos radiomarcados é essencial na fase de desenvolvimento de fármacos para compreensão da sua biodistribuição no organismo. A maioria das indústrias farmacêuticas sintetiza compostos marcados com isótopos (tipicamente ³H

e/ou ¹⁴C) e promove a sua ligação covalente com as proteínas-alvo. Sejam estes estudos efectuados *in vitro* ou *in vivo*, estes adutos marcados podem ser facilmente detectados por contagem de cintilação em meio líquido (LSC da tradução do inglês *liquid scintillation counting*). A LSC é um método bastante barato e específico. No entanto tem como desvantagens o limite de detecção a baixas concentrações, o elevado custo do material radioactivo bem como toda a logística associada ao seu armazenamento/manuseamento.

Os imunoensaios são baseados na interacção específica anticorpo-antigénio. Originalmente, os imunoensaios eram utilizados na detecção e quantificação de biomacromoléculas. No entanto, uma nova geração de técnicas como o Western blot ou ELISA, em combinação com outros procedimentos de enriquecimento e/ou purificação de matrizes complexas (através de electroforese em géis de poliacrilamida ou LC) permitiu a análise de pequenas biomoléculas modificadas. Em resultado destes avanços, foram desenvolvidos imunoensaios específicos para biomarcadores de exposição a compostos carcinogénicos ou outros xenobióticos [86]. Um dos exemplos do uso de imunoensaios para a análise de ligações covalentes entre xenobióticos e macromoléculas surge com ensaios efectuados para o benzo[a]pireno (Esquema I.9, BaP, 49), na década de 80. O BaP (50) é um conhecido poluente ambiental, da categoria dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs da tradução do inglês polycyclic aromatic hidrocarbons) e um dos carcinogénicos mais estudados. Neste caso particular sabe-se que o intermediário reactivo 7β , 8α -di-hidroxi- 9α , 10α -epoxi-7,8,9,10-tetra-hidrobenzeno[a]pireno (Esquema I.9, 50) é o responsável pela actividade mutagénica e carcinogénica do BaP (49). A sua classificação como substância carcinogénica para humanos [Grupo 1 da classificação da Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC da tradução do inglês International Agency for Research on Cancer)] [87] muito se deve aos trabalhos efectuados por Santella e seus colaboradores [88, 89], que através do desenvolvimento de anticorpos específicos para o seu reconhecimento, observaram in vitro a modificação de macromoléculas, como HSA (51, Esquema I.9) ou DNA (52, Esquema I.9) com 50. Estes estudos abriram caminho para a possibilidade de biomonitorizar animais e humanos expostos a BaP (49) [90, 91].



Esquema I.9. Activação metabólica do benzo[*a*]pireno (49) e a formação dos adutos covalentes com macromoléculas 51 (HSA) e 52 (DNA).

Embora a abordagem imunoquímica seja bastante específica e em relativa extensão quantitativa, necessita de um conhecimento prévio do tipo de modificação observada e não exclui a detecção de espécies resultantes de reactividade cruzada do anticorpo, o que constitui uma grande desvantagem. No entanto, actualmente, e como já referido para os produtos de excreção urinária, a MS corresponde ao método mais poderoso para a análise de adutos com macromoléculas. Em especial, e no que diz respeito à modificação de proteínas, esta técnica é determinante, na medida em que por um lado permite a identificação da proteína mas também o local e o tipo de modificação encontrada.

O desenvolvimento, nas últimas três décadas, dos métodos de MS e em especial, de técnicas de LC-MS tornou esta técnica bastante sensível e versátil, permitindo o seu uso como ferramenta analítica de amostras biológicas bastante complexas e a detecção de compostos, mesmo em situações de baixa concentração. Em particular, as técnicas que envolvem o uso das metodologias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa por ionização de electrospray (LC-ESI-MS da tradução do inglês *Liquid Chromatograph-Electrospray lonization Mass Spectrometry*) são as mais amplamente utilizadas para a análise de metabolitos e adutos de proteínas. O uso da técnica de ionização por electrospray (ESI da tradução do inglês electrospray ionization) é dos mais adequados para este tipo de compostos na medida em que necessita de solventes polares no processo de ionização, o que é

33

compatível com a natureza química todos os compostos em questão. Por outro lado, a possibilidade de solubilizar a matriz contendo os compostos em estudo permite o acoplamento eficaz da MS à técnica de LC, o que constitui uma vantagem, uma vez que permite uma separação cromatográfica previa à análise por MS de misturas complexas.

Ainda assim, a complexidade das matrizes biológicas em estudo, contendo baixas concentrações de macromolécula modificada (quando comparadas com a concentração de macromoléculas não modificadas) implica muitas vezes o uso de outras ferramentas analíticas ou técnicas para promover uma melhor separação, extracção e/ou purificação previamente à sua análise.

I.1.3.1. Técnicas de isolamento e destacamento de adutos com biomacromoléculas

De forma a facilitar a análise, é possível destacar selectivamente, pela quebra de ligações químicas da macromolécula, resíduos da biomacromolécula contendo a modificação (resultante da reacção com as espécies reactivas). De uma maneira geral, as macromoléculas podem ser sujeitas a processos de digestão ou degradação química. No caso particular das proteínas, a quebra das suas ligações peptídicas pode ser efectuada por ambos os processos dando origem a adutos com aminoácidos ou péptidos (dependendo da metodologia usada). Relativamente aos adutos de DNA, o processo usado implica a quebra das ligações fosfodiéster, seja por digestão enzimática a desoxinucleósidos seja por digestão térmica às bases azotadas (nucleobases).

Nas secções seguintes dá-se destaque a algumas destas metodologias através de exemplos em que foram aplicadas.

I.1.3.1.A. Destacamento da valina N-terminal da hemoglobina

A valina *N*-teminal da Hb corresponde a um centro reactivo para espécies electrófilas. Este facto é devido, por um lado, à grande acessibilidade deste resíduo a diferentes xenobióticos mas também, em grande parte, por se encontrar numa forma não ionizada, a pH fisiológico, apresentando por isso um carácter nucleófilo [19]. Aproveitando esta característica, foram desenvolvidos vários métodos de destacamento selectivo de adutos com a valina *N*-terminal da Hb no sentido de encontrar um método mais suave, simples e selectivo quando comparado com uma

hidrólise total da proteína a aminoácidos. Surgiu assim o método de degradação de Edman (Esquema I.10) no qual os adutos formados com a valina *N*-terminal da Hb (representado por **53** no Esquema I.10) são selectivamente destacados da proteína, com recurso ao uso de um isotiocianato (**54**, Esquema I.10) como agente derivatizante [ex.: isotiocianato de fenilo (PITC) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC)], produzindo um derivado da hidantoína (aduto de Edman, **55**, Esquema I.10) [92, 93]. A simplicidade deste método, juntamente com a possibilidade de extracção selectiva dos derivados de hidantoína formados, por um solvente orgânico, diminui as interferências da matriz, aumentando assim a possibilidade de detecção destes adutos com uma maior sensibilidade.



Esquema I.10. Princípio geral associado à metodologia da degradação de Edman. RX: espécie electrófila correspondente ao metabolito reactivo/fármaco; PITC: isotiocianato de fenilo; FITC: isotiocianato de fenilo; de fluoresceína.

A degradação de Edman é um método que necessita da síntese prévia de adutos padrão sujeitos ao mesmo tratamento das amostras analisadas para a quantificação dos adutos de Hb *in vivo*. Apesar disso, o desenvolvimento deste método, aliado às características da própria Hb, permitiu o aproveitamento deste tipo de adutos como biomarcadores de exposição a fármacos. A aplicação desta metodologia pode ser observada nos trabalhos desenvolvidos em fármacos anti-HIV, NVP (**3**) e ABC (**10**) já mencionados, para os quais foi possível detectar os respectivos adutos de Edman (**56** e **57**, Esquema I.11), a partir de Hb isolada de amostras de

doentes sujeitos a terapêuticas com estes dois fármacos [30, 41] e por comparação com padrões sintéticos previamente obtidos.



Esquema I.11. Adutos de Edman obtidos pelo destacamento selectivo da valina *N*-terminal da Hb modificada com os fármacos anti-HIV, NVP (**3**) e ABC (**10**), nos estudos efectuados [30, 41].

I.1.3.1.B. Digestão enzimática de proteínas a péptidos ou aminoácidos

A proteómica é definida como o estudo do proteoma, que corresponde ao conjunto de proteínas expresso pelas células, tecidos ou organismos. Na prática, isto inclui não só métodos de separação, identificação e quantificação de proteínas mas também a caracterização das interacções proteicas, modificações covalentes e variações na sequência de proteínas. O grande desafio na identificação de proteínas e proteínas modificadas e sua caracterização diz respeito à elevada complexidade das matrizes biológicas em que estas se encontram. Algumas proteínas podem apresentar variantes com uma diferença de alguns aminoácidos sendo necessário utilizar ferramentas altamente sensíveis que permitam a distinção destas pequenas variações. A área da proteómica teve uma rápida evolução na última década em grande parte devido ao desenvolvimento das técnicas de MS e, em particular das técnicas de HRMS. Por exemplo, graças à técnica de HRMS, Antunes e colaboradores [36] estimaram a extensão da modificação in vitro das proteínas do sangue (HSA e Hb) relativamente ao fármaco anti-HIV, NVP (3). Utilizando um derivado mesilado do metabolito maioritário 12-OHNVP (20), como substituto mimético do metabolito reactivo, 12-OSO₃-NVP (26) (Esquema II.11), foi efectuada a análise da massa intacta destas proteínas modificadas, contendo incrementos de múltiplos de 264 u, como resultado da incorporação de vários fragmentos de NVP (**3**). A determinação da massa intacta da HSA não modificada evidenciou dois sinais a m/z 66509 e 33327 correspondentes à molécula protonada, mono- e di- carregada respectivamente (Figura I.7a). Por comparação com estes valores, a análise da proteína modificada revelou um incremento de 1092 u para a molécula mono-carregada, o que evidenciou a ocorrência de modificação em quatro resíduos distintos (Figura I.6a). Embora com um resultado bastante mais complexo, a mesma análise foi efectuada para a Hb modificada e não modificada (Figura I.6b). A análise dos cromatogramas evidenciou o aparecimento de vários sinais com valores de m/z muito próximos do valor de m/z correspondente à massa intacta da Hb protonada não modificada, evidenciando igualmente a modificação da Hb em vários resíduos. Embora sem conseguir determinar os resíduos específicos de ligação com a espécie reactiva, esta abordagem permitiu demonstrar que efectivamente ocorreram modificações das proteínas do sangue com um derivado de **3**.



Figura I.6. Análise de massa intacta de (A) HSA não modificada e modificada com um derivado mesilado de NVP (3) e (B) Hb não modificada e modificada com um derivado mesilado da NVP (3). É claramente observado um significativo incremento de massa após a modificação das respectivas proteínas. Adaptado de [36].

Uma outra abordagem utilizada e que se baseia na técnica de MS denomina-se *top-down* [77, 94]. Esta abordagem é baseada na análise da proteína intacta e na subsequente análise por técnicas HRMS dos iões gerados e da sua fragmentação (Figura I.7). Este método tem a vantagem de não gerar péptidos evitando a necessidade de uma separação posterior e prevenindo a perda de informação. No entanto, requer uma elevada quantidade de proteína purificada e gera espectros complexos devido à elevada multiplicidade de carga dos iões formados.



Figura I.7. Esquema sequencial descritivo da abordagem top-down. Adaptado de [95].

Paralelamente ao desenvolvimento da técnica em si surgiram também várias metodologias para a análise de misturas de proteínas modificadas e não modificadas, tendo em conta a necessidade de utilizar pequenas quantidades de amostra. Estas metodologias envolvem por exemplo, a hidrólise enzimática total ou parcial das proteínas.

Embora actualmente menos utilizado, um dos métodos usados no estudo de proteínas modificadas envolve a digestão enzimática total da proteína aos aminoácidos que a constituem. As desvantagens desta abordagem são não só o desconhecimento da posição concreta da proteína que foi modificada mas também a necessidade de haver uma síntese prévia de adutos padrão plausíveis para que, por comparação com os adutos resultantes da digestão enzimática, seja possível a sua identificação inequívoca na análise por MS. Um exemplo deste tipo de abordagem envolve novamente o fármaco anti-HIV NVP (**3**) e os respectivos adutos com a HSA. O trabalho levado a cabo por Antunes e seus colaboradores [36], envolvendo a digestão enzimática total da HSA modificada *in vitro* com um modelo electrófilo de **26** (Esquema I.3), e a comparação com padrões sintéticos, permitiu a detecção e identificação de adutos com resíduos de cisteína, serina, lisina, triptofano e serina, por MS.

Actualmente, existem duas abordagens principais, baseadas na técnica de MS e que envolvem a hidrólise enzimática de proteínas a péptidos, que são mais frequentemente adoptadas para a identificação e caracterização de proteínas modificadas e não modificadas. São elas, as abordagens *middle-down* e *bottom-up* [77, 95].

A abordagem *middle-down* [96] é considerada um compromisso entre os métodos *top-down* e *bottom-up* (Figura I.8). Esta técnica é muito utilizada para a análise de um grupo especial de proteínas, as histonas. Esta abordagem tira partido do facto das caudas das histonas poderem ser clivadas por enzimas mais específicas (que hidrolisam aminoácidos menos frequentes) gerando péptidos longos com 40-50 resíduos. Estes polipéptidos são subsequentemente analisados por MS e MS/MS. A vantagem desta técnica reside no facto de permitir a clivagem e análise da totalidade da cauda da histona (onde se acredita ocorrer a maioria das modificações), reduzindo o tamanho e a complexidade da sequência analisada quando comparada com a proteína intacta, por exemplo.



Figura I.8. Esquema sequencial descritivo da abordagem middle-down. Adaptado de [95].

A abordagem *bottom-up* [77, 94, 97] corresponde à estratégia mais usada na identificação de proteínas em amostras de grande complexidade [95]. Este método também conhecido como *shotgun* envolve uma digestão em gel ou em solução com recurso a uma degradação enzimática proteolítica, gerando péptidos curtos. No caso particular da digestão em gel, é efectuado um passo prévio de separação. Regra geral, as proteínas são separadas recorrendo à electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE da tradução do inglês *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*) de acordo com o seu peso molecular, sob a influência de um campo eléctrico aplicado. As proteínas isoladas são extraídas do gel e subsequentemente digeridas. A mistura de péptidos obtida pode ser posteriormente separada por LC ou electroforese capilar (CE da tradução do inglês *capillary electrophoresis*) e analisada por MS e MS/MS, gerando um conjunto de massas moleculares para cada péptido individualmente bem como o respectivo padrão de fragmentação (Figura I.9)



Figura I.9. Esquema sequencial descritivo da abordagem bottom-up. Adaptado de [95].

Foram desenvolvidos vários algoritmos especificamente para a identificação de proteínas tendo como base este tipo de dados [98]. Genericamente, o método consiste na geração de uma hidrólise enzimática virtual da proteína em estudo seguida do *screening* dos péptidos reais obtidos com base nas massas exactas, de modo a obter péptidos candidatos. Adicionalmente, o padrão de fragmentação (MS/MS) previsto para cada candidato é comparado (*matching*) com o padrão de fragmentação real obtido, colocando os resultados em função dos candidatos com maior *matching* (*score*) (Figura I.10). Os algoritmos de busca utilizados divergem na sua maioria na forma com atribuem o *score* aos péptidos candidatos. Exemplos de programas que se baseiam neste tipo de algoritmos são SEQUEST, Mascot, X!Tandem, Phenyx, Spectrum Mill, TagRecon, MaxQuant ou Myrimatch [98-103].



Figura I.10. Processo virtual levado a cabo pelos motores de busca na identificação e caracterização de proteínas.

Dependendo da proteína em estudo, várias proteases podem ser utilizadas para promover a quebra de ligações específicas. Uma das enzimas mais usadas nesta abordagem é a tripsina. Esta protease é caracterizada pela clivagem de ligações peptídicas em que o grupo carbonilo provém de um resíduo dos aminoácidos arginina (R) ou lisina (K). Outras enzimas que são utilizadas para clivar diferentes locais na cadeia proteica encontram-se listadas na Tabela I.7 [104].

Enzima	Clivagem depois de:	Excepção, quando ocorre antes de:
Tripsina (pH 8)	K, R	Р
Arg C (pH 8)	R	Р
Arg N (pH 4 - 9)	Antes de D	-
Quimotripsina (pH 8)	F, L, W, Y	P e depois de PY
Glu C (pH 7.8)	E	P, E
Glu C (pH 4)	D, E	D, E
Lys C (pH 8)	К	-
Pepsina (pH2 - 4)	F, L	-
Proteinase K (pH 6 - 10)	C. F G. M. S. W. Y	-

Tabela I.7. Enzimas mais usadas na degradação proteolítica e os respectivos locais de clivagem.

Nota: K: Lisina, R: Arginina, P: Prolina, D: Ácido Aspártico, F: Fenilalanina, L: Leucina, W: Triptofano, Y: Tirosina, E: Ácido Glutâmico, C: Cisteína, G: Glicina, M: Metionina, S: Serina.

A aplicação desta abordagem tem surgido na literatura nos últimos anos e são vários os exemplos descritos [82, 105-109]. Um dos exemplos diz respeito ao fármaco anti-HIV, ABC (10) já mencionado. Meng e colaboradores [105] observaram *in vitro e* in vivo a modificação covalente da HSA com 10. A estratégia consistiu primeiramente na caracterização dos adutos covalentes formados in vitro com a HSA e a espécie reactiva ABC-AL (15), resultante da acção da álcool desidrogenase (ADH) sobre 10. Recorrendo a uma abordagem bottom-up, que envolveu o uso da tripsina para promover a clivagem peptídica, foram identificados e totalmente caracterizados por LC-HRMS os péptidos modificados nas posições Lys 159, Lys190, His146, Arg 145, Cys34 e Gln33 do subdomínio IB (Tabela I.8). Os valores de incrementos correspondentes às modificações encontradas bem como os locais de ligação obtidos são compatíveis com a reactividade do aldeído α,β -insaturado **15** por formação de bases de Schiff com resíduos contendo azoto (ΔM 284) ou por via da adição de Michael a resíduos de cisteína (ΔM 284). Em alguns casos, verificou-se também após a ligação com 15 por qualquer uma das vias mencionadas, a ocorrência de cross*linking* com resíduos adjacentes (ΔM 266).

m∕z exp.	ΔΜ (u)	Sequência peptídica	Local de modificação
533.6	266	LDELRDEG K *ASSAK	Lys190/?
712.4	266	RHPYFYAPELLFFA K*R *	Lys159/Arg160
660.4	266	R * H *PYFYAPELLFFAK	Arg145/Hist146
546.5	284	R H *PYFYAPELLFFAK	His146
676.4	284	H*PYFYAPELLFFAK	His146
838.4	266	ALVLIAFAQYLQ Q*C* PFEDHVK	GIn33/Cys34
906.4	284	ALVLIAFAQYLQQ C *PFEDHVK	Cys34

Tabela I.8. Péptidos trípticos obtidos por modificação da HSA com ABC-AL (**15**), *in vitro*. O resíduo modificado encontra-se evidenciado com (*) e a negrito.

Subsequentemente, a análise de amostras de HSA de doentes em terapêutica com ABC (**10**) há pelo menos 2 anos, com a mesma metodologia utilizada nos ensaios *in vitro*, permitiu verificar a formação dos péptidos ALVLIAFAQYLQQ**C***PFEDHVK e **H***PYFYAPELLFFAK modificados nos resíduos Cys34 e His146, respectivamente, apresentando para além do mesmo t_R o mesmo padrão de fragmentação (obtido por LC-MS/MS) dos péptidos resultantes da modificação *in vitro*. Embora o mecanismo exacto das IDRs associadas a **10** não esteja totalmente esclarecido, esta metodologia veio evidenciar mais uma vez a formação de adutos covalentes com espécies reactivas geradas por bioactivação. Neste caso particular, o ABC (**10**) poderá formar adutos com o aldeído α,β -insaturado **15** por formação de bases de Schiff ou via da adição de Michael (Figura I.11).



Figura I.11. Identificação dos resíduos modificados com ABC (10), in vivo.

Um outro exemplo diz respeito ao analgésico PARA (2). Cook e colaboradores [82] desenvolveram e validaram uma metodologia de LC-MS baseada na abordagem *bottom-up* que permitiu a detecção e quantificação de adutos do tipo 3-(cistein-S-il)-PARA (58, Figura I.12.) com a HSA. Na medida em que a formação de adutos covalentes de proteínas com PARA (2) é tida como crítica na indução da hepatotoxicidade associada a 2, a quantificação destes adutos em amostras biológicas de forma sistemática constitui uma excelente ferramenta para a avaliação da exposição e toxicidade induzida.

O procedimento desenvolvido, esquematizado na Figura I.12 envolve um passo de filtração da amostra biológica seguido de uma digestão enzimática com uma mistura de proteases (Tipo XIV) de forma a libertar os péptidos modificados com 2. Ao extracto hidrolisado foi adicionado um padrão interno (PI, Figura I.12) e seguiu-se uma precipitação com acetonitrilo (MeCN) e análise por LC-MS/MS. Este método foi validado por dois instrumentos analíticos distintos recorrendo a amostras de doentes sujeitos a uma terapia crónica com PARA (2) sendo o limite de quantificação entre 0.010-10 µM. A aplicabilidade a outras matrizes biológicas foi também demonstrada pela aplicação da metodologia a plasma recolhido de ratos tratados com 2.



Figura I.12. Metodologia utilizada para a avaliação da exposição ao metabolito reactivo do PARA (2), *in vivo.*

I.2. Epilepsia e fármacos antiepilépticos (AEDs)

A epilepsia é uma doença do sistema nervoso que se caracteriza pela repetição, súbita e imprevisível, de crises que são consequência clínica de uma anormal e excessiva actividade eléctrica entre as células nervosas (neurónios) [110]. Esta alteração na actividade eléctrica do cérebro pode ocorrer em diferentes zonas cerebrais, traduzindo-se em diferentes manifestações clínicas [111]. As manifestações motoras são as mais frequentes e correspondem a contracções repetidas e involuntárias de um dos membros ou face, ou em casos extremos, de todo o corpo de um indivíduo. Estas crises convulsivas podem muitas vezes ser acompanhadas da perda do controlo dos intestinos e bexiga. Embora menos frequentes, podem ocorrer manifestações não motoras que envolvem a perda de consciência ou alheamento do mundo.

A epilepsia consiste num conjunto de distúrbios neurológicos de natureza crónica que têm um grande impacto na vida do doente a nível físico e psicológico, traduzindose numa diminuição significativa da qualidade de vida. Na medida em que a maioria das crises ocorre espontaneamente e de forma imprevisível, muitos doentes vivem em constante expectativa de um embaraço resultante de um comportamento socialmente inadequado. Esta condição neurológica é extremamente debilitante e quando não controlada pode ser fatal, quer pela doença em si (traumatismos físicos decorrentes de acidentes ou quedas) quer por morte súbita inesperada por epilepsia (SUDEP da tradução do inglês sudden unexpected death in epilepsy) [112]. Além disso, os doentes epilépticos sofrem de discriminação, uma vez que a epilepsia é ainda uma doença associada a um grande estigma social devido ao desconhecimento que o público em geral tem dela (é erradamente ainda associada à possessão espiritual ou confundida com uma doença mental). Actualmente, o melhor conhecimento da doença e as variadas possibilidades terapêuticas têm permitido alterar esta ideia sobre a doença, e consequentemente uma melhor integração do doente em contexto social e familiar.

Estima-se que 50 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de epilepsia [110]. Globalmente, estima-se que são diagnosticados todos os anos 2,4 milhões de novos casos [110]. Nos países desenvolvidos, a incidência anual é de 30 a 50 casos por cada 100.000 pessoas, chegando estes valores a duplicar em países em desenvolvimento [110]. Na Europa [113], a prevalência é de aproximadamente 8 casos por cada 1000 habitantes estimando-se por isso cerca de 6 milhões de doentes com epilepsia. A incidência da epilepsia varia com a idade sendo significativamente maior durante os primeiros anos de vida e na população idosa [113, 114].

45

Actualmente, existem disponíveis no mercado vários fármacos antiepilépticos (AEDs da tradução do inglês Antiepileptic Drugs) que podem ser usados para controlar as manifestações da doença. Até 1993 [115] existiam apenas oito AEDs disponíveis no mercado para o tratamento da epilepsia (Tabela I.9). Embora fármacos como fenobarbital (59, Tabela I.9), a fenitoína (60, Tabela I.9), o ácido valpróico (61, Tabela I.9) ou a carbamazepina (CBZ, 62, Tabela I.9) tenham a vantagem de uma reconhecida eficácia entre a comunidade médica, eles são também conhecidos como indutores/inibidores de enzimas hepáticas e estão associados a uma elevada interacção medicamentosa e efeitos adversos. Na década de 90, com os fármacos de 2ª geração [115, 116] como a oxcarbazepina (OXCBZ, 63, Tabela I.9), o felbamato (64, Tabela I.9) ou o topiromato (65, Tabela I.9), surge uma nova corrente de desenvolvimento que apresenta menos interacções entre fármacos, oferecendo mais opções de tratamento com melhor tolerabilidade e farmacocinética e menos efeitos adversos. Nas últimas duas décadas [117, 118], com o melhor conhecimento sobre a doença e os mecanismos a ela associados, surgiram os fármacos de 3ª geração. São exemplos o acetato de eslicarbazepina (66, Tabela I.9) ou a retigabina (67, Tabela I.9). Estes apresentam novos modos de acção farmacológica comparativamente aos AEDs de 1ª e 2ª geração conhecidos, abrindo a possibilidade para a terapia combinada ou politerapia, actuando em diferentes alvos terapêuticos simultaneamente com o objectivo de uma maior eficácia, e uma melhor qualidade de vida do doente.

Embora a maioria dos doentes, com terapia adequada, consiga controlar a repetição das crises convulsivas, 30 a 40 % dos doentes continuam a ter crises apesar do uso dos AEDs [119]. Os fármacos até aqui desenvolvidos não permitem a cura total da doença, actuando apenas ao nível do controlo das manifestações clínicas, sendo por isso necessária a toma de medicação diariamente, durante anos, algumas décadas ou até mesmo toda a vida. No entanto, a existência de vários AEDs, com diferentes perfis farmacocinéticos e acções farmacológicas permite não só uma melhor aplicação de terapêuticas personalizadas a cada doente mas também resolver situações de resistência aos fármacos que têm surgido em alguns doentes [120].



Tabela I.9. Exemplos de fármacos antiepilépticos (AEDs).

Ao contrário de outras classes terapêuticas, os AEDs não são normalmente divididos de acordo com os respectivos modos de acção. Tal facto deve-se essencialmente a dois factores. Por um lado, os mecanismos de acção não são totalmente compreendidos a nível molecular e alguns AEDs aparentam ter mais do que um modo de acção, a contribuir para a sua eficácia terapêutica [115]. Por outro lado, o mecanismo desencadeador da própria doença também não foi ainda totalmente estabelecido sendo que muitas vezes a abordagem terapêutica tomada não será baseada no mecanismo de acção do AED utilizado. Apesar de tudo, foram identificados alguns processos importantes no mecanismo de acção dos AEDs [115, 121-123]. Sabe-se que os AEDs actuam no sistema nervoso central (SNC) interferindo na anormal excitabilidade neuronal. De uma maneira geral, a acção dos AEDs pode ocorrer em dois alvos distintos:

- Modulação da condutância nos canais iónicos dependentes de voltagem (sódio, cálcio ou potássio);
- Inibição da actividade de neurotransmissores como o ácido γaminobutírico (GABA) (inibitório) ou glutamato (excitatório), interferindo na sua síntese, metabolismo ou na acção dos seus transportadores e/ou receptores [antagonistas dos receptores de GABA e agonistas dos receptores glutamatérgicos como o ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazolepropiónico (AMPA) ou o *N*-metil *D*-Aspartato (NMDA)].

A maioria dos AEDs desenvolvidos têm como alvos o canal iónico de sódio dependente de voltagem e os receptores de GABA [116, 122, 124] mas na última década tenham surgido AEDs com outros alvos terapêuticos [125, 126]. Embora não haja evidências que sugiram que estes novos fármacos são mais eficazes, eles apresentam um maior espectro de actividade, menos interacções medicamentosas e uma melhor tolerabilidade. Os mecanismos de acção propostos bem como os AEDs a eles associados podem ser observados na Figura I.13.

O bloqueio dos canais iónicos de sódio dependentes de voltagem é um dos alvos primários de muitos AEDs. A fenitoína (**59**), CBZ (**62**), OXCBZ (**63**) e o felbamato (**54**), entre outros, são exemplos de AEDs que actuam ao nível dos canais iónicos de sódio [115, 123, 124]. Estas moléculas têm alta afinidade para estes receptores no seu estado de inactivação. Ao bloquear o canal, prolongam este estado e consequentemente o processo de despolarização da membrana neuronal induzido

pelo influxo de iões de Ca²⁺ é reduzido, impedindo a libertação dos neurotransmissores na fenda sináptica e a propagação do impulso nervoso [127].

O GABA é principal neurotransmissor inibitório e vários fármacos actuam ao nível da sinapse inibitória interferindo com a sua síntese, metabolismo, transporte e receptores deste neurotransmissor. Por exemplo, as benzodiazepinas, os barbitúricos ou o topiromato (**65**) [115] [123, 124] são promotores da neurotransmissão inibitória por modularem alostericamente os receptores de GABA do tipo A (GABA_A) mediando a corrente de iões CI⁻. Por outro lado, o ácido valpróico (**61**) [115] inibe irreversivelmente a enzima mitocondrial GABA-transaminase que é a enzima responsável pelo metabolismo do GABA. Este mecanismo resulta num aumento da concentração do neurotrasmissor e temporariamente prolonga a libertação e presença do GABA na fenda sináptica.



Figura I.13. Mecanismos de acção propostos para alguns fármacos antiepilépticos (AEDs) (na caixa a cinzento), com actuação nos terminais nervosos excitatórios (lado direito) e inibitórios (lado esquerdo). AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico NMDA, N-metil D-Aspartato; GABA_A, ácido γ-aminobutírico do tipo A. Adaptado de [123].

I.2.1. Fármacos antiepilépticos aromáticos (AAEDs)

Os AEDs que apresentam pelo menos um anel aromático na sua estrutura química são denominados fármacos antiepilépticos aromáticos (AAEDs da tradução do inglês *Aromatic Antiepileptic Drugs*). Esta classe de fármacos tem sido associada a IDRs [128] e em especial a reacções de hipersensibilidade [129] bastante severas

podendo mesmo ser fatais. As reacções de hipersensibilidade reportadas como estando associadas aos AAEDs correspondem a reacções cutâneas severas como a Síndrome de Stevens-Jonhson (SJS da tradução do inglês *Stevens-Jonhson Syndrome*) [130, 131], Necrólise Epidérmica Tóxica (TEN da tradução do inglês *Toxic Epidermal Necrolysis*) ou Síndrome de Lyell [130] e Síndrome de reacção a fármacos com eosinofilia e sintomas sistémicos (DRESS da tradução do inglês *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms*) [132, 133]. Em particular, o fenobarbital (**59**), a fenitoína (**60**), a CBZ (**62**), a OXCBZ (**63**) e a lamotrigina (**72**), todos AAEDs, têm sido a associados a estas patologias.

A SJS e a TEN [134] são IDRs de extrema gravidade e potencialmente mortais, que se caracterizam pela necrose dos queratinócitos (células diferenciadas do tecido epitelial), e se expressam clinicamente por uma esfoliação mucocutânea intensa. Esta patologia é frequentemente precedida de febre elevada, tosse, conjuntivite, dor crónica e mal-estar geral. Apesar de alguma controvérsia na diferenciação das duas síndromes, estes são classificados de acordo com a extensão do destacamento epidérmico e lesões individualizadas; no SJS a percentagem é de 10-20% da superfície corporal com envolvimento de pelo menos duas áreas mucosas enquanto na TEN esta percentagem é superior a 20% com o envolvimento de várias mucosas. Estima-se que a incidência destas síndromes na população varia entre 1 a 7 e 1 a 2 casos por milhão de pessoas/ano para SJS e TEN, respectivamente [135]. A mortalidade associada a ambas SJS/TEM é considerável estando estabelecida entre 10 a 34% [136].

As SJS/TEN geralmente surgem como resposta idiossincrática à administração de fármacos e embora o mecanismo fisiopatológico ainda não seja totalmente conhecido, é consensual a existência de um mecanismo de base imunológica [134]. O facto de o intervalo de tempo entre a administração do fármaco indutor e o aparecimento das manifestações clínicas diminuir substancialmente em casos de recorrência destas síndromes aponta para a ocorrência de uma sensibilização primária e consequente memória imunológica. Por outro lado, em vários estudos efectuados verificou-se a existência de células mononucleares junto dos queratinócitos necróticos, bem como uma alteração das subpopulações linfocitárias (com linfócitos T CD4⁺ a nível da camada superior da derme e linfócitos CD8⁺ a nível da epiderme e junção dermo-epidérmica) [137]. Além disso, as SJS/TEN têm sido associadas a doenças auto-imunes, como o lúpus eritomatoso sistémico [138].

Esta resposta imunológica, qualquer que seja a forma como actua, é certamente modulada por diversos factores, que podem ir desde uma predisposição genética a uma infecção viral prévia. Nas últimas duas décadas, estudos farmacogenéticos sugerem de facto uma predisposição genética importante para o desenvolvimento destas reacções de hipersensibilidade. Esta teoria é suportada por estudos que associam o sistema antigénio leucocitário humano (HLA), nomeadamente alelos específicos para determinadas etnias a casos de SJS/TEN/DRESS induzidos por AAEDs [139].

O DRESS [132] é caracterizado por erupções cutâneas severas, febre, linfadenopatia, hepatite e alterações hematológicas, podendo envolver outros órgãos e originando insuficiência renal, cardíaca e pulmonar. Estima-se que a incidência desta síndrome afecte entre 1 a 2 casos por milhão de pessoas/ano e a mortalidade associada é de 20-30% [132, 140]. O mecanismo exacto responsável pelo DRESS também não é totalmente conhecido mas é consensual a sua associação a uma resposta imunológica pela acção de fármacos, sendo os mais comuns os AEDs, os antidepressivos, sulfonamidas e anti-inflamatórios [132].

Estas reacções de hipersensibilidade são consideradas um grave problema clínico. Dado o seu impacto na saúde dos doentes, e tendo em conta que estes fármacos são administrados a uma grande percentagem da população, incluindo crianças, durante um grande período de tempo, a determinação do risco associado aos AAEDs é crucial. Nos capítulos seguintes serão discutidos em pormenor dois AAEDs a que estão associadas as reacções adversas acima descritas.

I.2.1.1. Carbamazepina

A carbamazepina (5*H*-dibenzo[*b*,*f*]azepina-5-carboxamida, CBZ, **62**, Figura I.14) é um AED de primeira geração. A sua acção anticonvulsiva foi demonstrada por

Hernandez-Peon no III Congresso Internacional de Neurofarmacologia em Munique em 1962, tendo no ano seguinte sido comercializado na Europa [141]. A CBZ (62) é um AAED, derivado do iminoestilbeno, usado na primeira linha de controlo das crises convulsivas (parciais e generalizadas), em grande parte devido ao seu baixo custo. Além disso é também prescrito em situações de dor



Figura I.14. Estrutura da CBZ (62).

crónica, nevralgia do trigémeo [142] e doenças psiquiátricas como a doença bipolar, depressão ou esquizofrenia [143].

Farmacocinética e Farmacodinâmica

A CBZ (62) tem como modo de acção primário o bloqueio dos canais iónicos de sódio dependentes de voltagem, reduzindo a sua condutância e consequentemente impedindo a propagação do impulso nervoso [144]. No entanto, e embora não se saiba exactamente de que forma isso contribui para a sua actividade, acredita-se que a CBZ (62) também tenha acção sob os canais iónicos de cálcio e os receptores GABA_A [144, 145].

A CBZ (62) é uma molécula lipofílica que se dissolve lentamente no fluido gastrointestinal. Os dados sobre a sua biodisponibilidade indicam uma absorção errática devido à sua natureza físico-química [145]. Embora a sua janela terapêutica seja considerada entre 4 a 12 mg/mL [146], há dados contraditórios sobre este parâmetro na medida em que os doentes muitas vezes respondem a valores acima ou abaixo desta gama. Nos adultos, a sua biodisponibilidade é de 80% e o t_{1/2} varia entre 31 e 35 h [147]. No entanto, este parâmetro desce para 16 a 24 h depois de uma administração continuada, devido à capacidade de auto-indução das enzimas do CYP450 [148, 149]. Nos humanos [150], a CBZ (62) fixa-se entre 70 a 80% às proteínas séricas e, devido ao seu carácter lipofílico, tem a capacidade de passar a barreira hemato-encefálica.

A CBZ (62) é predominantemente transformada no fígado pelas enzimas do CYP450. O padrão metabólico da conversão de 62 a produtos mais hidrofílicos que permitam a sua excreção é complexo e variado. Tanto nos Humanos como em modelos animais, a principal via de excreção é a renal, embora também possa ocorrer pelas fezes. Nos humanos, aproximadamente 70% da dose ingerida pelo doente é eliminada pela urina, e destes 70% apenas 2 a 5 % na forma de CBZ (62) não transformada [151]. Até à data foram identificados mais de 30 metabolitos da CBZ (62) [152-155]. Nos Humanos [153, 154], a principal via metabólica da CBZ (62) envolve a oxidação da ligação dupla C¹⁰-C¹¹ formando a 10,11-di-hidroxi-10,11-epoxicarbamazepina (EPCBZ, 79, Esquema I.12) [152, 153, 156]. A EPCBZ (79) é também farmacologicamente activa [157, 158] e pensa-se que tal como a CBZ (62), tenha como modo de acção o bloqueio dos canais iónicos de sódio dependentes de voltagem [157, 158]. A formação de 79 é mediada essencialmente pelas isoformas do CYP450, CYP 3A4, CYP 3A5 e CYP 2C8 [159, 160]. A EPCBZ (79) é posteriormente convertida no diol *trans*-10,11-di-hidroxi-carbamazepina (*trans*-diol-CBZ, 80a. Esquema I.12) pela EH [152, 153, 161]. O isómero cis-10,11-dihidroxi-carbamazepina (cis-diol-CBZ, 80b, Esquema I.12) foi também identificado em urinas de ratos Sprague-Dawley e urinas de doentes tratados com CBZ (62)[152]. Embora em menor quantidade relativamente ao isómero trans-diol (80a) (25 a 100 vezes menos), foi sugerido que a formação do metabolito 80b poderá ser explicada pelo envolvimento de

bactérias existentes no intestino, de modo semelhante ao que foi observado para o metabolismo do benzeno [162] e alguns PAHs [163, 164]. A acção destas bactérias, através do seu metabolismo, promoverá a formação de um intermediário peróxido cíclico que, após redução nas paredes do intestino ou no fígado, dará origem a um cis-1,2-diol. Ainda em relação a esta via metabólica, foi identificado o metabolito 9hidroximetil-10-carbamoil-acridano (9-OH-acridano, 81, Esquema I.12) como produto de biotransformação da CBZ (62) [152, 165]. A origem da formação deste produto de contracção é controversa; vários autores sugerem que 81 poderá formar-se in vivo a partir da EPCBZ (79) ou do trans-diol-CBZ (80a) por contracção do anel de 7 membros. Os estudos de Eichelbaum [153] e colaboradores mostraram uma correlação entre o trans-diol-CBZ (80a) e 81. Os t_{1/2} determinados para cada um destes metabolitos em amostras de plasma de doentes em terapia combinada aumentaram de igual modo guando comparado com doentes em monoterapia, enquanto o mesmo parâmetro correspondente ao EPCBZ (79) se mantém constante em qualquer das situações. Um possível mecanismo para a formação de 9-OHacridano (81) a partir do trans-diol-CBZ (80a) corresponde a uma redução do produto resultante de um rearranjo do tipo pinacol do metabolito 80a. No entanto, o facto de o 9-OH-acridano (81) ser um metabolito minoritário em humanos e não ter sido identificado em ratos tratados com CBZ (62) [166] sugere a contribuição de uma outra via.

Embora minoritária, uma segunda via metabólica envolve a oxidação das posições aromáticas a metabolitos fenólicos mono- e di-hidroxilados. Os metabolitos maioritários mono-hidroxilados formados por esta via são a 2-hidroxi-carbamazepina (2-OHCBZ, 82, Esquema I.12, a azul) e a 3-hidroxi-carbamazepina (3-OHCBZ, 83, Esquema I.12, a azul) [152, 154, 155, 167]. Alguns estudos indicam também a possível formação de derivados mono-hidroxilados nas posições 1 e 4 do anel aromático [152-154, 167]. Embora nenhum intermediário tenha sido observado in vivo, os metabolitos fenólicos mono-hidroxilados, são presumivelmente originados pela formação de um precursor do tipo óxido de areno [168-170] e, no caso particular da 2-OHCBZ (82) e da 3-OHCBZ (83), a partir da 2,3-epoxi-carbamazepina (2,3-EPCBZ, 84, Esquema I.12, a azul). Estudos efectuados em microssomas de fígado humano (HLM da tradução do inglês Human Liver Microsome) incubados com CBZ (62) demonstraram a interveniência de várias isoformas do CYP450, nomeadamente CYP2B6, CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6 e CYP 2E1 [171]. Outro metabolito proveniente desta via, e que foi igualmente detectado em urinas de ratos tratados com CBZ (62) e doentes em monoterapia, é o 2-hidroxi-iminoestilbeno (2-OHIM, 85, Esquema I.12, a azul) [152]. A formação do 2-OHIM (85) é muito provavelmente originada por acção da

isoforma CYP 3A4 sobre a CBZ (62), dando origem ao metabolito 82 seguido da hidrólise da ureia [172, 173]. No entanto, há autores que defendem a formação de 85 a partir do iminoestilbeno (IM, 86, Esquema I.12, a azul) [172]. O IM (86) é também considerado um metabolito resultante da hidrólise da ureia da CBZ (62) muito embora só tenha sido detectado em urinas de rato [152].

O principal derivado di-hidroxilado observado é o catecol 2,3-dihidroxicarbamazepina (2,3-OHCBZ, **87**, Esquema I.12, a azul) resultante da oxidação dos metabolitos mono-hidroxilados maioritários **82** e **83** [152, 167]. Embora o metabolito 2,3-OHCBZ (**87**) possa conceptualmente ser formado a partir da 2-OHCBZ (**82**) e 3-OHCBZ (**83**), estudos em HLMs indicam que deverá ser a 3-OHCBZ (**83**) o maior responsável pela formação do catecol **87**, *in vivo* [171]. Duas observações apontam neste sentido: 1) a velocidade de formação de **87** a partir de HLMs incubados com 3-OHCBZ (**83**) é cinco vezes superior quando comparada com o 2-OHCBZ (**82**); 2) a taxa de conversão da CBZ (**62**) *in vitro*, em 3-OHCBZ (**83**) é cerca de vinte e cinco vezes superior relativamente à da conversão em 2-OHCBZ (**82**). O catecol **87** é gerado a partir de 3-OHCBZ (**83**) pela acção das isoformas CYP 3A4 e CYP 2C19 [171].

A CBZ (62) é directamente metabolizada ao *N*-glucorónido (Esquema I.12) [152, 167]. Estudos efectuados em HLMs incubados com 62 na presença das isoformas humanas maioritárias da UGT mostraram que a CBZ (62) é biotransformada apenas pela isoforma UGT2B7 [174]. Na medida em que esta isoforma também se encontra expressa nos rins e intestinos [16], assume-se que para além da biotransformação de 62 ocorrer no fígado, poderá também ocorrer nestes locais. Nos estudos de Lynn e colaboradores [167], a análise de urinas de doentes em terapia com CBZ (62) permitiu a observação dos produtos de excreção de alguns dos metabolitos descritos (80a, 82, 83, 85) nas formas conjugadas (*N*- e *O*-glucorónidos, Esquema I.12). Todos os metabolitos foram também encontrados na forma não conjugada tendo sido identificados por LC-MS mediante comparação com padrões sintéticos [153].

Uma via metabólica extra-hepática foi proposta por Frust e Uetrecht e corresponde à via do 9-acridina-carboxaldeído (9-AL, 88, Esquema I.12, a verde) [175-178]. Estes autores observaram que a CBZ (62) é metabolizada in vitro por leucócitos em fortes condições humanos activados. е oxidativas (sistema de myeloperoxidase/peróxido de hidrogénio e HOCI). As espécies identificadas foram 88, a acridina (AI, 89, Esquema I.12, a verde), a acridona (AO, 90, Esquema I.12, a verde) e os derivados clorados, cloroacridona (CI-AO, 91, Esquema I.12, a verde) e dicloroacridona (diCI-AO, 92, Esquema I.12, a verde) (no Esquema I.12., as posições dos substituintes R são meramente indicativas). Todos estes derivados resultam da

54

contracção do anel de sete membros da CBZ (62) a um anel de seis membros. Os autores propuseram que a contracção de anel poderia resultar de um carbocatião clorado intermediário (93, Esquema I.12, a verde) formado por ataque electrófilo do ácido hipocloroso à ligação dupla C¹⁰-C¹¹ de 62, seguido de transposição do tipo pinacólico [177]. Presumivelmente, o aldeído 88 formar-se-á por hidrólise do produto directo da transposição.



Esquema I.12. Metabolismo proposto para a CBZ (62). As duas vias metabólicas mais significativas encontram-se representadas por cores distintas, preto e azul. A via minoritária está representada pela cor verde.

Toxicidade

Todos os AEDs apresentam uma alta incidência de ADRs sendo esta a maior causa para a descontinuação do tratamento [179]. A maioria das ADRs associadas à CBZ (62) são relativamente moderadas e dependentes da dose administrada. De uma maneira geral, elas afectam o sistema nervoso central originando problemas de sono, fadiga, letargia, tonturas, dores de cabeça e problemas de memória [180, 181]. Outros sintomas menos frequentes mas que também se encontram descritos são problemas de peso [180]. No entanto, o uso crónico da CBZ (62) também tem sido associado a uma grande variedade de IDRs, nomeadamente a reacções cutâneas severas e alterações hematológicas, imunológicas ou hepáticas [128, 180, 182, 183]. Quando comparada com outros AEDs, verifica-se um grande número de casos reportados como estando associados a reacções de hipersensibilidade à CBZ (62), como SJS [184-186], TEN [184, 187, 188] e DRESS [189-192], chegando mesmo algumas a serem fatais [187, 188].

Nas últimas duas décadas foram efectuados estudos no sentido de investigar a possível existência de uma ligação genética entre os SJS/TEN/DRESS e o sistema HLA. Chung e colaboradores [193] foram os primeiros a identificar uma associação deste tipo ao efectuar a tipificação dos alelos dos genes HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1 de 44 doentes em terapia com CBZ (62) e que apresentavam SJS/TEN, de 101 doentes tolerantes à CBZ (62) e de 92 indivíduos saudáveis. Todos os indivíduos que participaram no estudo eram de etnia asiática, residentes em Taiwan. Estes autores reportaram que todos os 44 doentes (100%) com SJS/TEM apresentavam o alelo HLA-B*1502 positivo em comparação com apenas três (3%) dos doentes tolerantes à CBZ (62) e 8 dos indivíduos saudáveis (9%). Estudos posteriores [183, 194-196] confirmaram assim, que as reacções de hipersensibilidade mencionadas são significativamente mais comuns em indivíduos que possuem o alelo HLA-B*1502 e têm maior prevalência na população do sudeste asiático e ascendência asiática. Todas estas evidências levaram à Food and Drug Administration (FDA) a lançar um aviso à comunidade científica e a todos os profissionais de saúde [197], no final de 2007, alertando para o perigo das reacções de hipersensibilidade cutânea severas e potencialmente mortais, recomendando o mapeamento genético prévio para o alelo HLA-B*1502, no início do tratamento com CBZ (62), para doentes com ascendência asiática. Mais recentemente, foi também observada uma relação do mesmo tipo na população da Europa portadora do alelo HLA-B*1301 [198, 199].

Para além das reacções de hipersensibilidade, a CBZ (62) tem sido também associada a um aumento do risco de desenvolver lúpus eritematoso sistémico [200-203] com maior incidência nas mulheres [203]. Por outro lado, embora a associação entre a exposição a 62 e o desenvolvimento de malformações congénitas ainda não tenha sido consolidada, têm sido reportados alguns casos de efeitos teratogénicos relacionados com a administração da CBZ (62) [204, 205], em especial em co-administração com outros AEDs [206].

Bioactivação

Os mecanismos associados às reacções de hipersensibilidade induzidas pela CBZ (62) não estão totalmente esclarecidos. Várias hipóteses são apontadas para explicar os processos moleculares que ocorrem desde a exposição a 62 até à ocorrência destes efeitos adversos. Em comum, todas as reacções de hipersensibilidade induzidas por CBZ (62) parecem ter uma base imunológica, provavelmente desencadeada por 62 ou pelos seus metabolitos, por interacção com receptores do MHC de que resultará o estímulo das células do sistema imunitário. Estudos in vitro [207, 208] mostraram que células mononucleares do sangue periférico (PBMCs da tradução do inglês peripheral blood mononuclear cells) de doentes tratados com 62 e apresentando reacções de hipersensibilidade, proliferam na presença do fármaco. Além disso, há ainda estudos [209] mostrando que para além da proliferação das PBMCs, de doentes tratados com CBZ (62), ocorre também citotoxicidade e secreção de elevados níveis do interferão do tipo II ou gama (IFN-γ da tradução do inglês Interferon-gamma). No entanto, a natureza do antigénio apresentado no MHC às células T não é conhecida, podendo ser a própria CBZ (62) ou um conjugado peptídico formado com uma espécie reactiva de 62, após biotransformação.

Nos últimos anos, o mecanismo "altered peptide model" (ver mecanismo 4, Tabela I.4) tem sido apontado como um possível mecanismo responsável pelas reacções de hipersensibilidade induzidas pela CBZ (62). Esta teoria baseia-se na observação de uma interacção não covalente entre 62 e resíduos específicos do alelo HLA-B*1502, que é responsável por activar as células T [210, 211]. Este facto sugere que a ligação do próprio fármaco (sem necessitar de activação) poderá alterar os péptidos apresentados às células T e desta forma desencadear uma resposta imunitária conducente às reacções de hipersensibilidade. No entanto, à luz das evidências apresentadas nos capítulos seguintes, existem também indicações consistentes com um mecanismo de haptenização ou pró-haptenização, com o

58

envolvimento de possíveis espécies reactivas. Além disso, os possíveis mecanismos desencadeadores da resposta imunitária não são exclusivos, podendo ocorrer vários em simultâneo, entre os quis o modelo de haptenização (ver mecanismo 1, Tabela I.2). É de salientar que uma situação similar já foi também observada para o fármaco anti-HIV ABC (**9**), já mencionado [30, 49, 212, 213].

Várias abordagens *in vivo* e *in vitro* têm sido utilizadas no sentido de elucidar o envolvimento da bioactivação da CBZ (**62**) na indução dos eventos tóxicos. No entanto, a estrutura da(s) espécie(s) reactiva(s) desencadeadora(s) da resposta imunitária é controversa. O envolvimento da activação metabólica da CBZ (**62**) a espécies reactivas é suportado pelos estudos de Lillibridge e colaboradores [169]. Estes autores detectaram *in vitro* uma interacção covalente entre a CBZ (**62**) marcada com carbono-14, [¹⁴C]-CBZ (**62**) e microssomas de fígado de rato (MLM da tradução do inglês *Mouse Liver Microsomes*) mediada pela acção das enzimas do CYP450.

A aparente estabilidade in vivo do EPCBZ (79) tem sido usada como argumento para descartar a possibilidade deste metabolito farmacologicamente activo reagir com biomoléculas. No entanto, Bu e colaboradores [214] observaram a formação de um par de diastereómeros correspondentes ao aduto covalente formado entre 79 e a GSH [(S,S)-GSH-EPCBZ e (R,R)-GSH-EPCBZ, representados por 94a 94b е respectivamente, Figura I.15], in vitro, que caracterizaram totalmente por LC-MS e NMR. Paralelamente, foi investigada a ligação covalente do EPCBZ (79) marcado com carbono-14, [14C]-EPCBZ (79) em HLMs. Os resultados demonstraram que 79 forma adutos covalentes com os microssomas, numa extensão que decresce significativamente na presença de GSH. Esta observação sugere que a GSH compete directamente com os resíduos nucleófilos das proteínas, armadilhando o epóxido reactivo 79. Mais recentemente [215], foi demonstrada a reactividade in vitro do metabolito 79 com as proteínas HSA e a Glutationa-S-transferase humana (hGST). Os locais de ligação do EPCBZ (79) com estas duas proteínas foram determinados por metodologias de proteómica aliadas a técnicas de LC-MS, tendo-se verificado a ocorrência de ligação em resíduos de histidina (His146 e His338 no caso da HSA) e cisteína (Cys47 no caso da hGST). Além disso, outros estudos sugerem que a deficiência na actividade da EH poderá ter um papel interventivo na susceptibilidade individual às reacções adversas associadas à CBZ (62) [216-218].





(S,S)-GSH-EPCBZ (94a)

(R,R)-GSH-EPCBZ (94b)

Figura I.15. Adutos covalentes (par de diastereómeros) detectados *in vitro* em incubações de HLMs com CBZ (62) na presença de GSH, por comparação dos adutos padrão formados por reacção do EPCBZ (79) com a GSH.

A todas estas evidências acresce o facto de alguns xenobióticos, que apresentam anéis aromáticos e/ou ligações duplas na sua estrutura e que, ao passarem por processos de biotransformação que envolvem a formação de um epóxido, estão associados a algum tipo de toxicidade [86]. O BaP (**49**) e a aflatoxina B₁ (AFB₁, **95**, Esquema I.13), substâncias que se inserem na lista do Grupo 1 (substâncias carcinogénicas para os humanos) da classificação da IARC [87], incluem-se nesta categoria. Os agentes químicos mencionados são biotransfomados a metabolitos ou intermediários reactivos contendo pelo menos um anel epóxido, que é considerado responsável pela formação de adutos covalentes com proteínas e/ou DNA (representados por **51** e **97** no Esquema I.13) e consequentemente pela toxicidade a eles associada [88, 219]. À luz destas evidências, o EPCBZ (**79**) não deverá ser negligenciado enquanto potencial metabolito tóxico.



Esquema I.13. Representação esquemática da bioactivação dos xenobióticos, BaP (**49**) e AFB₁ (**95**) e da reacção dos respectivos metabolitos/intermediários reactivos com macromoléculas dando origem aos adutos covalentes **51** e **97.** A formação do intermediário 7β ,8 α -di-hidroxi-9 α ,10 α -epoxi-7,8,9,10-tetra-hidrobenzeno[α]pireno (**50**), a partir do BaP (**49**) é considerado o passo promotor da sua toxicidade [88]; o mesmo se verifica no caso da AFB₁ (**95**) com a formação do metabolito reactivo aflatoxina-exo-8,9-epóxido (**96**) [219].

O papel dos metabolitos fenólicos da CBZ (62) e dos precursores plausíveis na indução das IDRs associadas a 62 tem sido consistentemente proposto. De facto, o ataque nucleófilo das biomoléculas a intermediários do tipo óxido de areno é frequentemente proposto como mecanismo de toxicidade de um grande número de hidrocarbonetos aromáticos (representados genericamente pelo benzeno no Esquema 1.14) considerados tóxicos [88, 89]. Além disso, e de uma maneira geral, os compostos fenólicos gerados poderão também ter a capacidade de induzir citotoxicidade e genotoxicidade através de um processo de bioactivação a espécies quinóides [220]. Este processo envolve oxidações seguenciais produzindo o radical semiguinona (Esquema I.14) seguido da formação de espécies quinoídes sejam elas na forma de quinonas, quinona-iminas ou "quinone-methides" (Esquema I.14). Estas espécies quinoídes representam uma classe de intermediários metabólicos reactivos de xenobióticos, potencialmente tóxicas, in vivo, capazes de induzir citotoxicidade e carcinogenicidade [220, 221]. Embora os mecanismos associados a estes efeitos sejam complexos, do ponto de vista toxicológico, as espécies quinoídes apresentam duas propriedades químicas que lhe conferem reactividade em sistemas biológicos: são oxidantes, com capacidade de incorporar ciclos redox promovendo a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS da tradução do inglês Reactive Oxygen Species) mas também são electrofilos capazes de reagir com resíduos nucleófilos de macromoléculas quer por formação de bases de Schiff ou por adição de Michael, dando origem a adutos covalentes [220] (Esquema I.14).



Esquema I.14. Representação esquemática dos ciclos redox e alquilação de espécies quinóides que promovem a formação de espécies ROS e adutos covalentes, com a capacidade de induzir toxicidade. Adaptado de [153]

Estes dois tipos de mecanismos de bioactivação estão propostos como estando na origem das IDRs associadas a outros AEDs como o fenobarbital (**59**) ou a fenitoína (FNT, **60**, Esquema I.15). Por exemplo, Munns e colaboradores [222, 223] demonstraram que a FNT (**60**) é bioactivada *in vitro* pela acção das CYP450 a espécies mono e di-hidroxiladas que espontaneamente dão origem a quinonas, capazes de reagir com HLM. A formação do metabolito 3,4-dihidroxi-fenitoína (3,4-OHFNT, Esquema I.6, **98**) estará na origem do intermediário do tipo *o*-quinona (**100**, Esquema I.6) que se ligará covalentemente a proteínas.



Esquema I.15. Mecanismo proposto para a bioactivação da FNT (60) [222].

Na medida em que a CBZ (62) tem na sua estrutura anéis aromáticos, não é de surpreender que vários autores tenham proposto o intermediário 2,3-EPCBZ (84) (Esquema I.12) como potencial responsável pela indução das IDRs pela CBZ (62).

A primeira evidência da bioactivação da CBZ (62) a este tipo de intermediários foi observada por Bu e colaboradores [224]. Estes autores reportaram a formação de vários adutos com a GSH resultantes da reacção com intermediários do tipo 84 (Esquema I.12), por incubação de HLM com a CBZ (62). Mais tarde, a formação deste intermediário foi também inferida pela detecção do catecol 2,3-diOHCBZ (87). No entanto, tem sido sugerido que a formação do derivado di-hidroxilado 2,3-diOHCBZ (87) resulta maioritariamente da oxidação do produto fenólico 3-OHCBZ (83), como já referido [225]. A incubação de [³H]-3-OHCBZ (83) com MLM resultou na formação de uma ligação covalente com as proteínas microssomas que foi parcialmente inibida pela presenca de GSH [171]. No entanto, e embora a identidade do intermediário reactivo não tenha sido confirmada, resultados obtidos por LC-MS são consistentes com a formação de uma espécie do tipo o-quinona (101, Esquema I.12, a azul). Assim, tendo em conta o potencial toxicológico das espécies quinóides, a o-quinona (101) formada por oxidação de 2,3-diOHCBZ (87), poderá ser considerada como potencialmente responsável, pelo menos em parte, pela indução das IDRs associadas à CBZ (62). Por outro lado, espécies quinóides capazes de reagir com macromoléculas podem também ser geradas por uma via que envolve a conversão da 2-OHCBZ (82) ao 2-OHIM (85), que poderá ser oxidado a uma guinona-imina (QI, 102, Esquema I.12, a azul) [172, 173]. Ju e os seus colaboradores [173] demonstram que esta quinona-imina 102 é capaz de reagir com nucleófilos contendo enxofre, tais como a GSH e NAC. De facto, estes mesmos autores observaram, em urinas de doentes em terapia com CBZ (62), a formação de um metabolito na forma conjugada com o ácido glucurónico, cuja razão massa/carga (*m/z*) e o padrão de fragmentação eram compatíveis com o glucurónido do 4-metiltio-2-hidroximinostilbeno (103, Figura I.16). Acredita-se que a formação deste metabolito resulta de conjugação da GSH com a QI (102), sendo o produto obtido sujeito posteriormente a condições de glucuronidação e catabolismo.



Figura I.16. Derivado glucuronidado do metabolito 4-metiltio-2-hidroximinostilbeno (103) detectado na urina de doentes em terapia com CBZ (62).

Adicionalmente, foi também observada a formação do 9-AL (88), AI (89) e AO (90) em leucócitos activados, *in vitro*, sob fortes condições oxidativas que envolveram

ácido hipocloroso e mieloperoxidase. Foi também demonstrado que o 9-AL (88) tem a capacidade de se ligar covalentemente a neutrófilos [176, 177]. Tipicamente, os aldeídos têm a capacidade de reagir com aminas dando origem a bases de Schiff. Um exemplo deste tipo de reactividade é referido para o fármaco anti-HIV ABC (10). Este ao ser metabolizado pela enzima álcool desidrogenase (ADH) promove a formação de um intermediário aldeído ABC-AL (15), que já se provou ter a capacidade de reagir in vivo com macromoléculas (Esquema I.16). A formação de adutos com proteínas, nomeadamente com Hb (104, Esquema I.16), já foi observada em doentes infectados com HIV tratados com ABC (10) [30] e, embora o papel da bioactivação não esteja totalmente esclarecido, é sugerido que a formação do aldeído 15 esteja na origem nas reacções de hipersensibilidade e no aumento do risco de disfunção cardíaca, associadas aos regimes terapêuticos que incluem ABC (10) [30-32].



Esquema I.16. Bioactivação do fármaco anti-HIV, ABC (10).

Apesar desta via ser minoritária, dada a natureza química do aldeído 88, este metabolito não deverá ser descartado enquanto espécie reactiva potencialmente implicada na indução de efeitos adversos pela CBZ (62).

I.2.1.2. Oxcarbazepina

A oxcarbazepina (10,11-dihidro-10-oxo-5*H*-dibenzo[*b*,*f*]azepina-5-carboxamida,

OXCBZ, 63, Figura I.17) é um derivado estrutural da CBZ (62) que apresenta um grupo carbonilo na posição C¹⁰ do anel de iminoestilbeno, no lugar da ligação dupla C¹⁰-C¹¹ [226]. Embora a OXCBZ (63) tenha sido sintetizada pela primeira vez em 1965, apenas alguns anos após o seu precursor, este fármaco de 2ª geração só foi aprovado na década de 90, e inicialmente apenas na Europa [227]. A Figura I.17. Estrutura da OXCBZ (63).



OXCBZ (63) foi desenvolvida com uma pequena variação estrutural relativamente a 62, no sentido de mimetizar a sua eficácia mas evitando a formação de metabolitos potencialmente tóxicos associados à CBZ (62), e em especial o EPCBZ (79) [226]. Este AAED é usado no mesmo tipo de patologias que a CBZ (62) [226, 228].

Farmacocinética e Farmacodinâmica

Muito embora **63** apresente uma redução dos efeitos secundários em relação à CBZ (**62**), julga-se que o seu mecanismo de acção seja semelhante ao de **62** [116, 144].

A OXCBZ (63) é um composto lipofílico e de fácil distribuição corporal sendo a sua biodisponibilidade oral de aproximadamente 95%. É absorvida pelo sistema digestivo e atinge o seu pico máximo de concentração entre 1-3 h após a toma da dose. O t_{1/2} é de 1-4 h e janela terapêutica corresponde a 15-35 ng/mL. A OXCBZ (63) é essencialmente eliminada pelos rins [229]. Em estudos efectuados em dois voluntários saudáveis [230], após a administração de 400 mg de [¹⁴C]-OXCBZ (63), apenas 2% da radioactividade total no plasma correspondia à OXCBZ (63), enquanto 70% correspondiam ao derivado mono-hidroxidado (MHD, 105, Esquema I.17). Os restantes 28% correspondiam a metabolitos secundários como os conjugados, *O*-glucurónido (106, Esquema I.17) e *O*-sulfonato (107, Esquema I.17), formados após tautomerização de 63 e ainda os derivados di-hidroxilados (80a, 80b e 108, Esquema I.17)

A OXCBZ (63) é um pró-fármaco. É praticamente convertida na sua totalidade por uma aril-cetona-redutase, ao MHD (105), metabolito farmacologicamente activo. Nos Humanos a formação de 105 é esteroselectiva, formando-se 80% do enanteómero *S* [(*S*)-MHD, 105a, Esquema I.17] e 20 % do enanteómero *R* [(*R*)-MHD, 105b, Esquema I.17)] [231]. As duas formas enantioméricas não apresentam diferenças significativas na sua actividade farmacológica e ambas detectadas no plasma [231]. O metabolito MHD (105) poderá ser subsequentemente metabolizado por duas vias diferentes (Esquema I.17) [232]: 1) a via maioritária que envolve a formação do conjugado glucurónido do MHD (109, Esquema I.17) pela acção da UDPG transferase e 2) a via minoritária, que envolve a hidroxilação da posição C¹¹ do MHD (105) originando duas formas isoméricas do diol [*trans*-diol-CBZ (80 a) e *cis*-diol-CBZ (80b)], e/ou a oxidação das posições aromáticas de 108. De salientar que as duas formas isoméricas do diol, resultantes da oxidação da posição C¹¹ do MHD (105), são comuns aos dois fármacos aqui abordados, o que poderá explicar algumas semelhanças nos efeitos adversos observados para estes dois AAEDs.

Todos os derivados de **63** mencionados foram detectados em amostras de urina de doentes tratados com OXCBZ (**63**)



Toxicidade

Os resultados dos ensaios clínicos sugerem que a OXCBZ (63) é melhor tolerada quando comparada com o seu análogo 62 [226]. A maioria dos efeitos adversos é suave e dependente da dose. Estes efeitos adversos estão geralmente associados ao sistema nervoso central (ex. tonturas, dor de cabeça, fraqueza, falta de coordenação) ou ao sistema digestivo (ex. náuseas, vómitos, diarreias) [226]. No entanto, e apesar de 63 ter sido desenvolvido com o objectivo de suprimir os efeitos adversos induzidos pela CBZ (63), as mesmas reacções de hipersensibilidade são também associadas ao uso terapêutico deste fármaco de 2ª geração, em adultos e crianças. Reacções de hipersensibilidade cutânea como SJS/TEN [233-235] e DRESS [236, 237], já referidas para a CBZ (62), são exemplos de reacções associadas à OXCBZ (63). Em todos os doentes, os sintomas destas reacções desaparecem com o término da terapêutica. Os doentes que já experienciaram reacções de
hipersensibilidade induzidas pela CBZ (**62**) têm 25-30% de probabilidade de também desenvolver as mesmas reacções sob terapêutica de **63** [228].

O uso terapêutico da OXCBZ (63) tem também sido associado a uma variedade de outras patologias tais como reacções anafiláticas, angioedema e alterações hematológicas [226]. Embora sem evidências claras acerca da sua carcinogenicidade em Humanos, em estudos efectuados em ratinhos foram observados adenomas hepatocelulares após administração da OXCBZ (63). Neste mesmo estudo, verificouse que para além desta incidência ser dependente da dose, observou-se um aumento da incidência deste efeito, em ratinhos fêmea [228].

Bioactivação

Castrén e colaboradores [238] demonstraram que ¹⁴[C]-OXCBZ (**63**) se liga covalentemente ao DNA após incubação com microssomas de fígado humano, na presença de co-factores de Fase I. Estes autores sugerem que a formação de adutos com DNA poderá ocorrer através da bioactivação de **63** ao seu derivado monohidroxilado MHD (**105**). Estes dados sugerem um potencial carcinogénico, o que levanta questões acerca do seu uso numa base crónica. Apesar destes resultados, e embora não existam estudos efectuados neste sentido, há ainda a possibilidade de ocorrer uma reacção directa entre o grupo carbonilo da OXCBZ (**63**) e bionucleófilos de azoto dando origem a adutos covalentes via base de Schiff (Esquema I.18)

Apesar da escassa informação acerca das vias de conjugação por sulfonação para além da já descrita, é possível que as SULTS actuem directamente sobre o MHD (105), tal como foi observado nos derivados hidroxilados do BaP (49) [239]. Foi demonstrado que alguns derivados hidroxilados de 49 podem ser convertidos a metabolitos electrófilos do tipo ésteres do ácido sulfúrico pela acção das SULTs de alguns roedores. Estes metabolitos poderão estar parcialmente na origem do carácter mutagénico e tumorigénico do BaP (49). Da mesma forma, outros compostos com álcoois secundários em posições benzílicas, como é o caso do MHD (102) poderão sofrer o mesmo tipo de biotransformação. A formação de um sulfato electrófilo derivado de 105 (MHD-SO₃⁻, 110, Esquema I.18), que por sua vez poderá reagir com macromoléculas poderá estar também na génese das IDRs associadas a 63. De facto, a presença de SULTs na pele [240] corrobora a possibilidade associadas à OXCBZ (63).



Esquema I.18. Possíveis mecanismos de toxicidade da OXCBZ (**63**) que envolvem a reacção directa de bionucleófilos ao fármaco, com formação de uma base de Schiff, ou a bioactivação do metabolito **105** ao derivado electrófilo MHD-SO₃⁻ (**110**).

I.3. Conclusão

A extensão com que os novos antiepilépticos contribuirão para melhorar a qualidade de vida dos doentes depende não só do desenvolvimento de fármacos mais seguros mas também da capacidade de se poder prever os seus efeitos tóxicos, em cada doente. Em ambos os contextos, o conhecimento dos mecanismos promotores destes eventos associados aos AAEDs actualmente disponíveis no mercado é crucial. Os eventos tóxicos associados ao uso crónico dos AAEDs em doentes com epilepsia e doenças psiquiátricas têm sido objecto de grande preocupação por parte da comunidade científica. A administração destes fármacos potencialmente tóxicos numa base crónica deverá ser considerada criteriosamente, especialmente quando administrados a crianças e idosos.

As evidências aqui discutidas são consistentes com um papel activo da bioactivação dos AAEDs no desenvolvimento dos eventos tóxicos induzidos por esta classe de fármacos antiepilépticos. Na verdade, o papel dos metabolitos reactivos formados a partir dos AAEDs, que poderão reagir com macromoléculas (ex. proteínas do sangue ou DNA), como estando na origem dos efeitos tóxicos tem sido proposto consistentemente por vários autores. A CBZ (62) origina vários metabolitos reactivos como por exemplo, o EPCBZ (79) pela oxidação da ligação dupla de 62, o

intermediário óxido de areno que presumivelmente dá origem aos metabolitos hidroxilados nas posições aromáticas, espécies quinoídes [ex. *o*-quinona (**101**) e quinona-imina (**102**)] ou ainda o metabolito aldeído 9-AL (**88**). Estes compostos, quimicamente reactivos, poderão reagir com bionucleófilos, dando origem a adutos covalentes e consequentemente desencadeando a resposta tóxica induzida por **62**. Relativamente à OXCBZ (**63**), o seu principal metabolito MHD (**105**) é proposto como sendo responsável pela ligação de **63** ao DNA. Embora não exista uma prova definitiva da carcinogenicidade da OXCBZ (**63**) em humanos, estes resultados são consistentes com a carcinogenicidade induzida por **63** em modelos animais. A possibilidade de formação de um produto resultante da sulfonação do MHD (**105**), ainda não detectado *in vivo*, que seja reactivo com DNA poderá explicar estes resultados. Além disso, a reacção directa da OXCBZ (**63**) com bionucleófilos de azoto e a formação de espécies quinoídes a partir dos derivados fenólicos de **63** poderão constituir mecanismos de bioactivação plausíveis

A possibilidade de monitorizar a formação destes metabolitos tóxicos através da identificação e quantificação de adutos covalentes obtidos com proteínas do sangue e DNA terá um papel chave no estabelecimento de relações risco/benefício associadas à exposição a estes dois AAEDs. Paralelamente, o conhecimento do mecanismo desencadeador dos eventos tóxicos associados a estes fármacos poderá ser determinante para o desenvolvimento de fármacos antiepilépticos mais seguros. Capítulo II • Discussão de Resultados

II.1. Considerações prévias

Este trabalho teve como objectivo principal investigar o eventual papel da activação metabólica da CBZ (62) e OXCBZ (63) nas reacções adversas e/ou no potencial carcinogénico associados aos regimes terapêuticos com estes AAEDs. Efectivamente, a bioactivação destes fármacos poderá dar origem a metabolitos reactivos (electrófilos) com potencial para reagir com bionucleófilos (ex. proteínas ou DNA) formando adutos covalentes, que poderão estar na génese dos eventos tóxicos associados às terapias com 62 e 63.

Com os estudos efectuados pretendeu-se aprofundar o conhecimento dos eventuais mecanismos de toxicidade ao nível molecular, associados ao uso da CBZ (62) e OXCBZ (63). Para além disso, tendo em conta o potencial papel dos adutos covalentes, formados entre os metabolitos reactivos destes dois fármacos com proteínas e/ou DNA, como biomarcadores de bioactivação e toxicidade, um objectivo essencial foi a preparação de padrões sintéticos e o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas para a monitorização destes adutos *in vivo*. Neste capítulo serão discutidos todos os resultados experimentais obtidos neste contexto. O Esquema II.1. resume de forma gráfica a estratégia subjacente a todo o trabalho desenvolvido.

Numa fase inicial, os metabolitos potencialmente reactivos da CBZ (62) e OXCBZ (63) foram sintetizados ou gerados in situ por métodos biomiméticos (ex. ensaios realizados na presença do catalisador [Fe^{II} (bpmen)(Otf)₂](111)) ou sistemas metabolicamente competentes (ex. ensaios realizados com a fracção S9 de homogenato de fígado de rato e humano). De seguida avaliou-se a sua reactividade com aminoácidos modelo [ex. L-valinato de etilo (ValOEt), NAL, NAC] e desoxinucleósidos [ex. dG (48) e dA (49)]. As reacções efectuadas com o ValOEt foram utilizadas para mimetizar a formação de adutos com a valina N-terminal da Hb, que são frequentemente utilizados como biomarcadores de exposição/toxicidade [19, 30, 41, 93]. Relativamente às reacções com a NAL e a NAC, estas permitem avaliar a potencial diferença de reactividade com resíduos de cisteína ou lisina presentes nas proteínas, nomeadamente nas mais frequentemente utilizadas para estudos de exposição, como a Hb e a HSA [19]. Para além disso, tendo em conta que os conjugados com GSH e os mercapturatos são metabolitos de excreção amplamente utilizados como biomarcadores de exposição [69, 70], foi também efectuado o estudo da reactividade com a NAC e a GSH. Todos os adutos formados com os metabolitos reactivos e os nucleófilos mencionados foram sempre que possível, caracterizados por NMR e por LC-MS.

O conhecimento prévio da reactividade dos metabolitos com aminoácidos, possuindo cadeias laterais nucleófilas, tem posteriormente um papel importante aquando da análise dos adutos covalentes formados com proteínas, porque permite prever quais os aminoácidos mais susceptíveis de reagir com os metabolitos potencialmente reactivos. Por outro lado, dado serem utilizadas técnicas que envolvem a digestão ou degradação química de proteínas aos aminoácidos e a degradação térmica ou enzimática de DNA aos seus monómeros, é crucial a existência de padrões sintéticos dos adutos formados com aminoácidos ou os desoxinucleósidos para confirmação, por LC-MS, da sua presença nas biomacromoléculas em análise

Após o estudo da reactividade de cada um dos metabolitos ou intermediários reactivos de **62** e **63** com aminoácidos e desoxinucleósidos, foi efectuada a modificação de biomacromoléculas (ex. DNA, HSA e Hb). Estes estudos *in vitro* foram efectuados com o objectivo de auxiliar o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para a identificação das mesmas modificações em matrizes mais complexas, *in vivo*.



Esquema II.1. Resumo da estratégia adoptadada para a síntese dos metabolitos potencialmente reactivos da CBZ (62) e da OXCBZ (63) e a formação de adutos com bionucleófilos monoméricos ou biomacromoléculas e a respectiva caracterização estrutural.

II.2. Estudo da reactividade da carbamazepina (62) e dos seus metabolitos reactivos com aminoácidos e glutationa

II.2.1. Hipóteses de trabalho: possíveis mecanismos de bioactivação da carbamazepina (62)

De uma maneira geral, no organismo, os compostos contendo ligações duplas sejam eles compostos aromáticos, heterocíclos ou olefinas, sofrem reacções de oxidação, pela acção das mono-oxigenases microssomais [16]. Como já referido no capítulo I, a CBZ (62) é predominantemente metabolizada a produtos de oxidação pelas enzimas do CYP 450, no fígado, embora o metabolismo extra-hepático também tenha sido verificado *ex vivo* (Esquema II.2).



Esquema II.2. Principais vias de bioactivação e metabolitos CBZ (**62**) considerados para efectuar o estudo de reactividade com aminoácidos e biomacromoléculas.

A oxidação da ligação dupla C¹⁰-C¹¹ de **62** ao EPCBZ (**79**) ocorre pela acção das isoformas do CYP 450, 3A4, 3A5 e 2C8 [159, 160]. Muito embora, o epóxido **79**

seja considerado um metabolito estável por alguns autores [161, 216], tem sido apontado por outros como possível responsável pelas reacções de hipersensibilidade associadas à CBZ (62) [214, 224]. Tal poderá dever-se ao seu potencial carácter electrófilo, podendo sofrer um ataque por bionucleófilos, como DNA ou proteínas, formando ligações covalentes que resultam na abertura do anel do epóxido, como são os exemplos dos xenobióticos BaP (49) ou a AFB₁ (95) já referidos na secção I.2.1.1. do Capítulo I. Uma vez formado no organismo, o EPCBZ (79) é também hidrolisado ao *trans*-diol-CBZ (80a) pela acção da epóxido hidrolase (EH) [216, 217], o que de certa forma contribui para o seu processo de destoxificação, minimizando a possibilidade da reacção de 79 com biomacromoléculas.

A reactividade do EPCBZ (79) foi avaliada em estudos onde foi efectuada a incubação de 79 marcado com carbono-14, [14C]-EPCBZ (79) em HLMs [214]. A observação de um decréscimo significativo na formação de adutos do [14C]-EPCBZ (79) com as proteínas microssomais na presença de GSH demonstra a capacidade de competição directa entre a GSH e os resíduos nucleófilos das proteínas. Adicionalmente, foi também avaliada a reactividade directa entre o EPCBZ (79) e a GSH, in vitro. Bu e seus colaboradores [214] observaram a formação de um par de diasterómeros correspondente ao aduto covalente entre 79 e a GSH, o GSH-EPCBZ(94), que caracterizaram totalmente por LC-MS e NMR, evidenciando a capacidade da GSH de armadilhar 79, formando adutos estáveis (Figura II.1). No entanto, é de referir que a formação do aduto padrão 94 foi conseguida mediante um grande excesso de GSH relativamente ao electrófilo. Mais recentemente [107, 215], foi demonstrada a reactividade do metabolito 79 com a HSA e a Glutationa-S-transferase humana (hGST). Os locais de ligação do EPCBZ (79) com estas duas proteínas foram determinados por metodologias de proteómica aliadas a técnicas de LC-MS, tendo-se verificado a ligação em resíduos de histidina (His146 e His338 no caso da HSA) e cisteína (Cys47 no caso da hGST).



Figura II.1. Caracterização estrutural total do aduto GSH-EPCBZ (**94**), efectuada por Bu e seus colaboradores [214]. **A:** Fragmentação obtida para o ião a *m/z* 560 correspondente ao aduto GSH-EPCBZ (**94**) obtido por reacção do EPCBZ (**79**) com a GSH ou incubação da CBZ (**62**) em HMLs; **B:** espectro de ¹H-NMR (700 MHz, D₂O) obtido para **94**; **C:** Mecanismo de fragmentação proposto para *m/z* 560 correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ do aduto GSH-EPCBZ (**94**),. Adaptado de [214].

Relativamente à reactividade do metabolito EPCBZ (**79**), deverá ter-se também em conta que a formação do *trans*-diol-CBZ (**80a**), poderá ser fortemente comprometida por uma deficiência funcional da EH. Tal poderá criar um desequilíbrio entre o processo de bioactivação da CBZ (**62**), pela formação do epóxido **79** e o processo de destoxificação, com a formação de **80a**, permitindo a formação de adutos covalentes com macromoléculas. Embora tenham sido verificadas mais variações nos alelos do gene correspondente à EH em indivíduos que apresentavam reacções de hipersensibilidade comparativamente a doentes sem qualquer IDR, não foi até hoje determinado uma variação específica e única [217, 241]. No entanto, são vários os casos reportados de doentes que apresentam casos graves de IDRs associados à toma de CBZ (**62**), e que apresentavam uma diminuição da actividade da EH [218]. Esta diminuição da EH poderá ser responsável pela acumulação do EPCBZ (**79**), permitindo a sua reacção com macromoléculas e consequentemente promovendo as reacções de hipersensibilidade. Como ocorre em grande parte dos xenobióticos, a formação de metabolitos fenólicos pela acção das enzimas do CYP450 passa pela formação de um intermediário do tipo areno [163, 242]. No caso particular da CBZ (62), acredita-se que a formação dos seus metabolitos fenólicos maioritários, a 2-OHCBZ (82) (Esquema II.2) ou a 3-OHCBZ (83) (Esquema II.2) passa por um intermediário reactivo 2,3-areno-CBZ (84) (Esquema II.2) [168]. Adicionalmente, os metabolitos 82 e 83 podem sofrer nova oxidação, dando origem ao catecol 2,3-OHCBZ (87)[171], que por sua vez poderá sofrer uma reacção de oxidação adicional, promovendo a formação de uma *o*-quinona (101) (Esquema II.2).

Embora nunca tenha sido directamente observada, a o-quinona (101) é considerada umas das espécies reactivas que está na origem da formação de adutos com proteínas microssomais [169, 171], e que poderão estar na génese das ADRs associadas à CBZ (62). Aliás, situação semelhante pode ser observada num outro AAEDs, a FNT (60) já referida na secção I.2.1.1. do Capítulo I. Por outro lado, o metabolito fenólico 2-OHCBZ (82) poderá ainda estar envolvido na formação de outras espécies reactivas como o metabolito 2-OHIM (85) ou a QI (102) (Esquema II.2). Os metabolitos, 82 e 85, detectados na urina de ratos tratados com 62 [173] e de doentes em terapia com CBZ (62) [152], têm a possibilidade de oxidar rapidamente a intermediários reactivos, as quinona-iminas QI (102) e 112 [173], respectivamente. Embora o mecanismo que leva à formação da QI (102) seja controverso, esta apenas foi detectada in vivo, na forma do conjugado do ácido glucurónido do metabolito 4metiltio-2-hidroximinostilbeno (103, Esquema II.3) [173]. Acredita-se que a formação deste metabolito ocorre devido à reacção de conjugação da GSH com a QI (102), formada por reacções sucessivas de oxidação e hidrólise, a partir da CBZ (62). No entanto, a ordem pela qual estes acontecimentos ocorrem não está totalmente esclarecida (Esquema II.3). A posição de ligação da GSH apenas foi inferida pelo facto de os mesmos autores terem sintetizado o aduto resultante da reacção directa entre a QI (102) e a NAC, sendo inequívoca a posição de adição no carbono C4, atribuída pela caracterização por NMR. Apesar de tudo, em incubações de 2-OHIM (85) ou QI (102) em HLMs na presença de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH da tradução do inglês Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) e dos nucleófilos GSH ou NAC, não se verificou a formação de gualquer aduto [172]. Tendo em conta estas evidências é plausível uma hipótese alternativa que nunca foi abordada: a formação transiente da quinona-imina 112 com potencial para reagir com bionucleófilos formando adutos covalentes (Esquema II.3).



Esquema II.3. Formação do metabolito 4-metiltio-2-hidroxi-iminostilbeno (**103**), detectado in vivo [172]. A hipótese alternativa para a formação do metabolito **103** através da formação da quinona-imina **112** está representada a cinzento.

Embora só tenha sido observado *ex vivo*, a formação do 9-AL (**88**) é também considerada uma via de bioactivação da CBZ (**62**) [178]. Efectivamente, a formação deste metabolito não pode ser descartada enquanto possível promotor das IDRs associadas a **62** devido à presença de um aldeído na sua estrutura, potencialmente reactivo. Os aldeídos têm a capacidade de ligar-se covalentemente aos resíduos de proteínas contendo aminas na sua cadeia lateral dando origem a bases de Schiff. Como já referido no Capítulo I, secção 2.1.1, um exemplo deste tipo de reactividade verifica-se no fármaco anti-HIV ABC (**10**) pela detecção de adutos covalentes com Hb em doentes infectados com HIV tratados com ABC (**10**) [30].

A formação do 9-AL (88) foi detectada como produto resultante do metabolismo da CBZ (62), com um sistema fortemente oxidativo (na presença de mieloperoxidase/H₂O₂) em incubações com leucócitos humanos activados [176, 177]. Nestes ensaios verificou-se também a ligação covalente entre 62 e as células do sistema imunitário, que se acredita que envolva a bioactivação à espécie reactiva 9-AL (88). De forma a compreender o mecanismo associado à reactividade deste metabolito, Furst e os seus colaboradores [176] testaram a sua reactividade na presença de nucleófilos de azoto (na forma de *n*-butilamina e *NAL*) e enxofre (na forma de GSH), tendo-se efectivamente observado a formação de adutos covalentes

com os nucleófilos de azoto. Os leucócitos não só são as mais importantes células envolvidas no sistema imunitário mas apresentam também propriedades fortemente oxidativas, na medida em que têm a capacidade de produzir mieloperoxidase. Na presença da H₂O₂ estão assim criadas condições para ocorrer oxidação de xenobióticos, e neste caso particular, a formação do aldeído **88**. De facto, este tipo de processos metabólicos já foi observado em vários fármacos que apresentam uma grande incidência de IDRs, em especial agranulose ou lúpus [243].

Perante estas evidências, os principais metabolitos reactivos e potencialmente tóxicos da CBZ (62), considerados para este trabalho foram: o EPCBZ (79), as quinona-iminas QI (102) e 112, a *o*-quinona (101) formada a partir do metabolito dihidroxilado, 2,3-OHCBZ (87) e ainda o aldeído 9-AL (88) (ver esquema Esquema II.2, caixas a tracejado).

II.2.1.1. Metabolitos reactivos da carbamazepina (62) formados a partir da sua oxidação com um catalisador biomimético de Fe (II): formação de adutos com aminoácidos

De forma a compreender inequivocamente o papel da activação metabólica da CBZ (62) é importante obter padrões sintéticos quer dos seus metabolitos quer dos possíveis adutos formados entre estes e bionucleófilos. No que diz respeito aos metabolitos maioritários de Fase I da CBZ (62), o EPCBZ (79) e os metabolitos fenólicos 2-OHCBZ (82) e 3-OHCBZ (83), as suas sínteses já se encontram descritas [173, 216, 244-248]. No entanto, e no caso particular dos metabolitos fenólicos 82 e 83, a sua síntese envolve vários passos sintéticos e rendimentos globais baixos. Esta limitação motivou primeiramente, a investigar novas estratégias de síntese no sentido de simplificar o processo e a maximizar a formação dos metabolitos e os hipotéticos adutos.

Entre a vasta variedade de catalisadores "bio-inspirados" que mimetizam os mecanismos *in vivo* das CYPs, a classe dos complexos não-heme contendo Fe(II) constituem um dos mais explorados grupos de catalisadores para a oxidação de diferentes substratos [249, 250]. Em particular, o uso da família dos complexos de Fe(II) como centro metálico e com ligandos tetradentados contendo azoto como catalisadores para a oxidação de olefinas e compostos aromáticos, mediada por H₂O₂, tem sido consistentemente reportada para a oxidação de vários xenobióticos [251-253]. A reacção com estes complexos envolve a formação de espécies de Fe(V)=O e Fe(IV)=O⁻ de alta valência, similar ao estado de oxidação formal associado ao local activo das CYPs ou outras mono-oxigenases que contêm o grupo heme (Esquema

80

II.4.A), dando origem a intermediários do tipo óxido de areno (no caso do substrato corresponder a um composto aromático) que subsequentemente podem resultar em compostos fenólicos, ou ainda a formação de epóxidos (no caso do substrato corresponder a uma olefina). Por exemplo, o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂], com bpmen: *N*,*N*-bis-(2-metilpiridil)-1,2-diaminoetano (**111**, Esquema II.4.B), insere-se nesta categoria [251, 254]. O uso deste catalisador para a oxidação directa de xenobióticos contendo anéis aromáticos era já conhecido no grupo de trabalho e uma representação geral do seu mecanismo pode ser observado no Esquema II.4.B.

Assim, como ensaio preliminar, usou-se uma metodologia desenvolvida pelo grupo de trabalho [251], para gerar os possíveis produtos resultantes da oxidação da CBZ (62) na presença do catalisador Fe(II)(bpmen)(Otf)₂ (111), e que consistiu na adição de 111 e ácido acético a uma solução de CBZ (62) em acetonitrilo/acetato de etilo (1:1) (a partir deste ponto denominados MeCN e AcEt, respectivamente), seguido de H₂O₂ (Esquema II.5). A mistura foi deixada a 37 °C e o extracto orgânico analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por luz ultravioleta (HPLC-DAD da tradução do inglês *High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet diode array detection*) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por *electrospray em modo positivo* (LC-ESI(+)-MS por tradução do inglês *Liquid Chromatograph Electrospray lonization in positive mode Mass Spectrometry*) ao longo de 72 h.



Esquema II.4. Comparação dos mecanismos de oxidação de xenobióticos (na figura representado por um anel aromático com um substituinte R) a partir de: **1**: acção do CYP450 [Substrato liga-se ao grupo heme resultando numa transferência de um e^{-} (**A**), permitindo a ligação do O₂ (**B**); um segundo e^{-} é transferido (**C**) gerando espécies intermediárias de alta valencia (**D** e **E**) que permitem a inserção do átomo de oxigénio no substrato (**F**). O substrato oxidado dissocia-se da enzima na forma de óxido de areno dando origem subsequentemente aos metabolitos fenólicos] e **2**: o catalizador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**) [A H₂O₂ e o ácido acético ligam-se ao centro metálico de Fe (**A** e **B**) dando origem ao intermediário hidroperoxoférrico (III)(**114**); A quebra da ligação O-O (**C**) promove a perda de H₂O e a consequente formação de espécies de alta valência Fe^V(O)(OAc) e Fe^{IV}(O)⁻⁺(OAc)(**115**); A inserção do oxigénio no substrato ocorre (**D**), promovendo a formação do óxido de areno e da espécie Fe^{III}(OAc) (**116**)].

Antes de cada análise foi retirada uma alíquota da mistura reaccional que foi tratada com uma solução saturada de bissulfito de sódio seguida de uma extracção com acetato de etilo.



Esquema II.5. Condições experimentais utilizadas para a reacção de oxidação da CBZ (62) com o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111).

A análise por HPLC-DAD e LC-ESI(+)-MS evidenciou a formação de vários produtos resultantes da oxidação de 62 (Esquema II.6). Primeiramente, foi possível observar a formação de vários compostos cujo valor de m/z é compatível com a monooxidação de qualquer das posições aromáticas bem como a formação de um epóxido na ligação C¹⁰-C¹¹ da CBZ (62) (no Esquema II.6 os produtos resultantes da monooxidação em posições aromáticas estão representados pela 2-OHCBZ (82)). Todas estas espécies apresentam um padrão de fragmentação semelhante, obtido por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray em modo positivo (LC-ESI(+)-MS/MS por tradução do inglês Liquid Mass Chromatography Electrospray ionization in positive mode Tandem Spectrometry), onde é possível observar os fragmentos a m/z 236 correspondente à perda de -NH₃ (17 u) e a m/z 210 correspondente à perda do –HNCO (43 u) (Figura II.2.A1).



Esquema II.6. Produtos resultantes da oxidação da CBZ (**62**) com H₂O₂, na presença do catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**). Os metabolitos 2-OHCBZ (**82**) e 2,3-OHCBZ (**87**) bem como a *o*-quinona (**101**) ou o diol **117**, representam uma das estruturas possíveis, uma vez que as posições de oxidação possíveis são variáveis da mesma estrutura.

Nesta fase do trabalho, perante este resultado e na ausência de padrões sintéticos, não foi possível diferenciar estes produtos. Tendo em conta que o catalisador utilizado tem a capacidade de gerar não só intermediários do tipo óxido de areno (e consequentemente compostos fenólicos), a partir de compostos aromáticos mas também epóxidos, a partir de olefinas, considerou-se que todos os compostos resultantes da mono-oxidação de **62** se formaram: o EPCBZ (**79**) bem como os

derivados fenólicos resultantes da oxidação de qualquer uma das 4 posições aromáticas possíveis de **62**. Mais tarde, como se poderá verificar nas secções 1.1.1. e 1.1.2. deste capítulo, os metabolitos EPCBZ (**79**) e 2-OHCBZ (**82**) foram sintetizados. Desta forma, e por comparação com o tempo de retenção (t_R) e o padrão de fragmentação foi possível confirmar a sua formação na reacção de oxidação da CBZ (**62**) com H₂O₂, na presença do catalisador **111**, sendo o EPCBZ (**79**) o produto maioritário. Ainda assim, não se exclui a formação de outros derivados resultantes da oxidação noutras posições do anel de iminoestilbeno da CBZ (**62**).

Dado a possibilidade do catalisador 111 permitir uma segunda oxidação de compostos fenólicos [251], fez-se uma busca de produtos cujos valores de m/z fossem compatíveis com produtos resultantes de oxidações consecutivas, como produtos do tipo diol, catecol ou o-quinona (Esquema II.6). A análise por LC-ESI(+)-MS destas misturas mostrou evidências da presenca de compostos do tipo catecol e quinona (representados no Esquema II.6 pelos metabolitos 2,3-OHCBZ (87) e o-quinona (101), respectivamente) pelo aparecimento de sinais de m/z compatíveis com este tipo de estruturas (Figura II.2.A3 e Figura II.2.A4). O mesmo se verificou para a formação do metabolito diol-CBZ (80) e de compostos do tipo de 117 (Esquema II.6), como se pode verificar na Figura II.2.A2. No entanto, a formação do diol-CBZ (80) deverá ter ocorrido por abertura do anel do EPCBZ (65). Salienta-se ainda que todos os compostos mencionados resultantes da oxidação de 62 na presença do catalisador 111, foram observados ao fim de 30 min. de reaccão, não parecendo ter ocorrido um consumo significativo da CBZ (62) ao longo das 72 h subsequentes. Mais uma vez, a falta de padrões sintéticos não permitiu confirmar as posições de oxidação. No entanto, os espectros de LC-ESI(+)-MS/MS obtidos (Figura II.2. A2-4) são compatíveis com as apresentadas, verificando-se essencialmente estruturas os fragmentos correspondentes à perda de -NH₃ (17 u) e o grupo -HNCO (43 u) (no caso dos compostos do tipo catecol e quinona) e também a perda de água (no caso dos compostos tipo diol), relativamente ao ião precursor. A confirmação da formação destes compostos foi também obtida pela análise da mesma mistura reaccional por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução por ionização de electrospray em modo positivo [LC-ESI(+)-HRMS da tradução do inglês liquid chromatography high resolution mass spectrometry by positive electrospray mode]. Esta análise evidenciou a formação de espécies do tipo catecol e o-quinona pelo aparecimento dos valores de $[M+H]^+$ a m/z 267.0767±1 ppm e 269.0929±3 ppm, respectivamente. O erro associado a estes valores, quando comparado com os respectivos m/z teóricos, está dentro do limite considerado aceitável para moléculas com peso molecular inferior a 1000 u (5 ppm). O mesmo se verificou para os produtos

do tipo diol, evidenciados pelo aparecimento de dois sinais distintos com valores de m/z 271.1078±1 ppm e 271.1080±1 ppm. Numa tentativa de confirmar as posições de oxidação destes compostos por NMR tentou-se a purificação desta mistura reaccional. No entanto, a complexidade da mesma e a instabilidade dos produtos obtidos não permitiu a conclusão desse objectivo.



Figura II.2. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de oxidação da CBZ (**62**) com o sistema H₂O₂/catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂](**111**) (**A**) e os extractos iónicos a *m/z* 253 (**A1**), *m/z* 271 (**A2**), *m/z* 267 (**A3**) e *m/z* 269 (**A4**) com os respectivos espectros de MS/MS bem como as estruturas esperadas e as respectivas fragmentações (evidenciadas a laranja). As estruturas correspondentes aos compostos 2-OHCBZ (**82**), 2,3-OHCBZ (**87**), o-quinona (**101**) e diol **117** são representativas das espécies oxidadas nas várias posições aromáticas possíveis.

Os resultados obtidos com o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**) demonstraram a formação de várias espécies oxidadas formadas a partir da CBZ (**62**) e, embora não tenha sido possível o seu isolamento, estas poderão ser susceptíveis de sofrer um ataque nucleófilico. Assim, e na tentativa de armadilhar estas espécies reactivas, promoveu-se a mesma reacção com a CBZ (**62**) (1.0 eq.) na presença do catalisador **111** e, após 30 min., adicionou-se NAC (Ensaio 1, Tabela II.1) ou o ValOEt (Ensaios 2 e 3, Tabela II.1). Paralelamente, foram efectuados os respectivos ensaios em branco, onde não foi adicionado qualquer aminoácido (Ensaios 4 e 5, Tabela II.1).

Tabela II.1. Condições experimentais utilizadas nos ensaios efectuados para a oxidação da CBZ (**62**), com o sistema H₂O₂/catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂](**111**) na presença de um aminoácido, como agente armadilhante. No caso particular do ValOEt foi também testada a reacção na presença de NaBH₃CN como agente redutor.

Ensaio	Aminoácido (eq.)	NaBH₃CN (eq.)	Tempo de reacção (h)
1	NAC (4.0)	-	48
2	ValOEt (4.0)	-	72
3	ValOEt (4.0)	4.0	72
4	-	-	72
5	-	4.0	72

As reacções foram seguidas por HPLC-DAD e LC-ESI(+)-MS tendo-se verificado a formação de vários adutos com os dois aminoácidos utilizados. Quando se armadilhou as espécies reactivas, geradas *in situ* a partir de **62** na presença do catalisador **111**, com a NAC (ensaio 1, Tabela II.1) verificou-se por HPLC-DAD, a formação de vários produtos (ausentes no branco, ensaio 4, Tabela II.1). A análise por LC-ESI(+)-MS (Figura II.3) comprovou a formação de dois adutos distintos. Efectivamente, no cromatograma iónico obtido para esta mistura reaccional foi possível observar dois sinais com valores de *m/z* compatíveis com a presença das moléculas protonadas [M+H]⁺ dos adutos (Esquema II.7): 1) 1-(*N*^a-acetil-cisteína-*S*-il)-2-hidroxi-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-OHCBZ, **118**), proveniente do ataque nucleófilo da NAC a uma posição aromática da quinona-imina **112**; e 2) 10-hidroxi-11-(*N*^a-acetil-cisteína-*S*-il)-10,11-di-hidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-EPCBZ, **119**), formado por abertura do anel do EPCBZ (**79**) pela

NAC. De referir, no entanto, que apesar de se ter detectado a formação do composto compatível com uma estrutura do tipo *o*-quinona (**101**), não foram detectados adutos resultantes da adição de Michael da NAC a este potencial metabolito reactivo.



Esquema II.7. Adutos resultantes da reacção da NAC com as espécies reactivas geradas *in situ* a partir da CBZ (62) na presença de H₂O₂ e [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111).

A formação do aduto NAC-OHCBZ (**118**) (Esquema II.7) foi confirmada através do padrão de fragmentação do ião *m/z* 414 correspondente à molécula protonada $[M+H]^+$ deste aduto, obtido por LC-ESI(+)-MS/MS (Figura II.3.A4). Foram observados os fragmentos a *m/z* 396, 372 e 368 correspondentes à saída de água (18 u), do grupo acetilo (-H₂C₂O, 42 u) e ácido fórmico (-HCOOH, 45 u) da NAC, respectivamente. Além disso, observa-se também a saída do grupo -HNCO da CBZ (**62**), dando origem ao ião fragmento a *m/z* 371. Por outro lado, a análise por LC-ESI(+)-MS/MS do ião precursor *m/z* 416 (Figura II.3.A3) revelou também um padrão de fragmentação compatível com o aduto NAC-EPCBZ (**119**)(Esquema II.7) onde é possível observar para além do fragmento maioritário a *m/z* 398 correspondente à perda de uma molécula de água a partir da molécula protonada [M+H]⁺ deste aduto, os fragmentos a *m/z* 253 e 164 correspondentes à cisão da ligação C-S, com a saída da unidade de NAC (164 u.). Foi também possível observar os fragmentos a *m/z* 310 e 356 correspondentes à perda de HCOOH e do grupo -H₂C₂O do aminoácido, a partir do ião fragmento a *m/z* 398, respectivamente. Por último, observa-se também um fragmento

a m/z 380, correspondente à perda de água a partir do fragmento a m/z 398 (Figura II.3.A3).

Na tentativa de obter a caracterização por NMR dos adutos obtidos, promoveuse a reacção descrita no Ensaio 1 (Tabela II.1) em maior escala. Nestas condições apenas o aduto NAC-OHCBZ (**118**) foi isolado, com um rendimento de 1%. Embora a formação do aduto **118** seja inequívoca, a posição de oxidação e de ligação com o aminoácido não puderam ser determinadas por MS. A análise por LC-ESI(+)-MS/MS apenas deu a indicação da presença da NAC e do grupo hidroxilo (-OH) no anel aromático. No entanto, a análise do aduto **118** por NMR permitiu a determinação inequívoca da posição de ligação destes dois substituintes no anel da CBZ (**62**).



Figura II.3. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de oxidação da CBZ (**62**) na presença H_2O_2 , catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**) e a NAC (**A**) e os respectivos cromatogramas iónicos extraídos a: m/z 237 (**A1**), m/z 253 (**A2**), m/z 416 (**A3**) e m/z 414 (**A4**) com os espectros MS/MS correspondentes; (**B**) Mecanismos de fragmentação propostos para os adutos NAC-OHCBZ (**118**) e NAC-EPCBZ (**119**).

A análise do espectro de ¹H-NMR do aduto NAC-OHCBZ (**118**) (Figura II.4.A) mostrou a presença de um singuleto a integrar para um protão, a 9.9 ppm compatível com o protão lábil do ácido carboxílico da NAC, vários sinais no intervalo 8.26-6.40 ppm a integrar para um total de oito protões (compatível com a presença de dois substituintes nos anéis aromáticos de 62) e ainda um multipleto a 1.26 ppm, a integrar para três protões correspondentes aos três protões do grupo metilo da NAC. Observando mais atentamente a multiplicidade dos sinais a campo baixo, no intervalo 8.26-6.40 ppm, é possível observar três dupletos distintos, um duplo dupleto e três multipletos. Este padrão de multiplicidades indica não só que de facto a NAC e o grupo -OH estão em posições aromáticas mas também que estes dois substituintes estão em posições consecutivas do mesmo anel aromático (apenas se observam dois multipletos distintos a integrar para um protão cada). De salientar que, comparativamente à CBZ (62), o sinal a aprox. 6.95 ppm (singuleto) correspondente aos dois protões da ligação dupla C¹⁰-C¹¹ dá lugar a um dupleto a integrar para um protão, a 6.41 ppm (correspondente ao portão na posição C¹⁰<u>H</u> de **62**) e um outro sinal a 7.4 ppm (correspondente ao protão da posição C¹¹H de **62**), como resultado da perda de simetria da molécula. Estas atribuições foram efectuadas tendo como base as correlações observadas nos espectros de NMR bidimensionais de heteronuclear single quantum coherence (HSQC) e homonuclear correlated spectroscopy (COSY) sendo esta última experiência determinante. Efectivamente, no espectro de COSY (Figura II.4.B) é possível observar a correlação entre o dupleto a 6.41 ppm, correspondente ao protão C¹⁰H (e que apresenta uma correlação no espectro de HSQC com o sinal de ¹³C-NMR a 114.9 ppm, compatível com a presença de um carbono sp²), com o multipleto a 7.49-7.43 ppm que integra para dois protões. Esta correlação implica que um dos dois protões corresponda o protão C¹¹H, sendo o outro um protão aromático. Estas observações são, por um lado, são indicativas da perda de simetria da molécula e, por outro lado, atestam que a substituição da molécula da CBZ (62) ocorreu no anel aromático. Ainda no espectro de COSY verifica-se uma correlação entre os sinais correspondentes aos protões aromáticos ArC³H e ArC⁴H, a 7.28 ppm e 8.25 ppm, respectivamente (e que apresentam uma correlação no espectro de HSQC com os sinais de ¹³C-NMR a 123.7 ppm e 128.7 ppm, respectivamente). Tendo em conta o facto de não apresentarem qualquer outra correlação (pelo menos tão evidente) no espectro de COSY indica que são dois protões do mesmo anel e são também protões vicinais, sugerindo que a inserção da NAC ocorreu na posição ArC¹H ou ArC²H da CBZ (62).



Figura II.4. Espectros de ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) (A) e COSY (500 MHz, CDCl₃) (B) do aduto NAC-OHCBZ (118).

Deverá, no entanto, ser referido que o sinal atribuído ao protão aromático ArC⁴<u>H</u> corresponde a um duplo dupleto com constantes de acoplamento (*J*) ~1 e 8 Hz. Embora não muito comum e, à partida, se esperasse apenas um dupleto resultante de um acoplamento *orto* com o protão ArC³<u>H</u> (J ~ 6-9 Hz), deverá ter-se em conta que podem ocorrer acoplamentos a longa distância (acoplamentos superiores a 3 ligações). Efectivamente, em estruturas aromáticas com anéis condensados, como o naftaleno (**120**, Figura II.5) ou o antraceno (**121**, Figura II.5), esta situação é visível, podendo ser observadas constantes de acoplamento a quatro ligações (⁴*J*) ou cinco ligações (⁵*J*) de distância ao longo do anel, com valores aprox. 1 Hz (Figura II.5) [255, 256]. Por analogia, na medida em que a CBZ (**62**) é também constituída por dois anéis aromáticos fundidos a um ciclo-heptatrieno, o *J*~1 Hz do protão aromático ArC⁴<u>H</u> pode ser explicado pelo ⁵*J* com o protão C¹¹<u>H</u> da ligação dupla (Figura II.5). Esta correlação, embora ténue, pode ser inclusive observada no espectro de COSY (ver Figura II.4.B, correlação evidenciada a preto).



Figura II.5. Constantes de acoplamento (*J*, Hz) observadas entre protões que distam até 5 ligações no naftaleno (**120**) e o antraceno (**121**) e a sua comparação com as constantes de acoplamento determinadas para os protões $C^{11}H \in C^{4}H$ do aduto NAC-OHCBZ (**118**).

O valor do desvio químico do protão C¹¹<u>H</u>, que apresenta um deslocamento para campo mais baixo em relação ao sinal da mesma posição na CBZ (**62**) (6.99 ppm), pode, à partida, ser explicado pela influência dos substituintes do anel aromático adjacente. De forma a comprovar a influência efectiva do grupo -OH e/ou da NAC, sob o protão C¹¹<u>H</u>, efectuou-se um estudo *in silico*. Primeiramente, procedeu-se à optimização da geometria da estrutura do aduto NAC-OHCBZ (**118**) ao nível DFT/B3LYP [257], utilizando as funções base 6-311+G(d) [258], pelo programa Gaussian 09 [259]. Com esta optimização foi possível verificar a proximidade do protão C¹¹H dos átomos electronegativos de enxofre (a amarelo) e oxigénio (a

vermelho) da NAC (Figura II.6) e as respectivas distâncias teóricas, a 0.275 e 0.215 nm.

Quando a distância internuclear (*d*) resultante da proximidade entre dois grupos é inferior à soma dos seus raios de van der Waals (Figura II.7), os núcleos envolvidos sofrem forças de repulsão fracas, resultando numa distorção momentânea da densidade electrónica [260]. Neste caso particular, a soma dos raios de van der Waals dos átomos de oxigénio (r_1 , Figura II.7) e hidrogénio (r_2 , Figura II.7) da NAC (0.260 nm) [261] é inferior à distância teórica determinada entre os dois. Assim, a proximidade do átomo electronegativo de oxigénio do ácido carboxílico da NAC deverá promover uma distorção da nuvem electrónica do núcleo do protão C¹¹<u>H</u> e a consequente diminuição da densidade electrónica, resultando num desblindamento deste protão deslocando-o para campo mais baixo [262].



Figura II.6. Optimização da geometria do aduto NAC-OHCBZ (**118**), determinado *in silico* pelo programa GAUSSIAN 09 [259] onde se pode observar o arranjo espacial em forma de "borboleta" do anel iminoestilbeno e as distâncias dos átomos de enxofre (0.275 nm) e oxigénio do grupo carbonilo (0.215 nm) da NAC ao protão C¹¹<u>H</u> da ligação dupla. Os átomos estão representados com as seguintes cores: **carbono**, hidrogénio, **oxigénio e azoto** e enxofre.



Figura II.7. Curva de energia total de interacção (J) da interação entre dois átomos em função da distância internuclear, d (nm) entre eles. Quando a soma dos raios dos dois núcleos é inferior à sua distância ocorrem forças de repulsão. Se a mesma soma é superior à distância temos forças de atracção.

Este tipo de desblindamento, já reportado na literatura [263-265], é conhecido como o efeito de desblindamento causado pelas forças de repulsão de van der Waals intramoleculares. Este efeito pode ser observado em moléculas bastante impedidas e que por isso apresentem estruturas bastante rígidas, constrangindo grupos específicos a estarem próximos, como é o caso de derivados do adamanteno (**122** e **123**, Figura II.8).



Figura II.8. Desvios químicos de ¹H-RMN observados para derivados do adamanteno, **122** e **123**.

As cargas parciais foram também calculadas, pelo método de Mulliken, no mesmo programa [259]. A avaliação da densidade electrónica de todos os átomos do aduto NAC-OHCBZ (**118**) (Figura II.9) permitiu verificar que os protões $C^{10}H$ e $C^{11}H$ possuem uma tonalidade verde clara semelhante à tonalidade observada para os protões aromáticos (correspondente a uma baixa densidade electrónica).



Figura II.9. Cargas parciais de Mulliken determinadas in silico para o aduto NAC-OHCBZ (118).

Tendo em conta as evidências apresentadas, é possível afirmar que, de facto, ocorreu a introdução da NAC no anel aromático e as evidências apontam para que este tenha sido introduzido nas posições 1 ou 2 do anel da CBZ (**62**), adjacente ao grupo OH. Embora, a quinona-imina **112** não tenha sido detectada por LC-ESI(+)-MS, sabe-se que ocorreu a formação do metabolito 2-OHCBZ (**82**) (comprovada mais tarde pela sua síntese e comparação do t_R e padrão de fragmentação). Assim, e tendo em conta que a NAC é considerada um nucleófilo mole, a sua inserção deverá ter ocorrido no carbono aromático ArC¹H, adjacente à posição de oxidação de **62**. Um mecanismo que explique a formação deste aduto implica a formação da quinona-imina **112**, por oxidação do metabolito fenólico 2-OHCBZ (**82**), entretanto formado a partir da CBZ (**62**) na presença do [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**). A adição posterior da NAC promove a formação do aduto NAC-OHCBZ (**118**) por adição 1,4 de Michael a **112**.

Mais tarde foi confirmada a formação de NAC-OHCBZ (**118**) por este mecanismo (como se poderá verificar em II.1.1.2). Efectivamente, o aduto obtido por oxidação da 2-OHCBZ (**82**) na presença de NAC apresentava o mesmo $t_{\rm R}$ e o mesmo padrão de fragmentação, obtido por LC-ESI(+)-MS/MS, do aduto obtido por oxidação direta da CBZ (**62**) com o complexo de Fe (II) **111**. Os dados físicos e espectroscópicos determinados para os adutos NAC-OHCBZ (**118**) e NAC-EPCBZ (**119**) encontram-se descritos na Tabela II.2.

Tabela II.2. Caracterização estrutural por NMR e MS dos adutos obtidos por reacção da CBZ (62) com o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111) na presença de H₂O₂ e NAC (a azul).

Composto	HN + OH HN + OH	HO HO
η (%)	1	-
¹ H-NMR	9.95 (1H, s, CO ₂ <u>H</u>), 8.40 (1H, sl, N ⁵ <u>H</u>), 8.25 (1H, dd, <i>J</i> =1.2 e 8.0 Hz, ArC ⁴ H) 8 12-8 10 (1H m ArC ⁶ H ou ArC ⁹ H) 7 88-7 84 (1H m	
(500 MHz, CDCl ₃)	$ArC^{7}H$ ou $ArC^{8}H$), 7.79-7.76 (1H, m, $ArC^{7}H$ ou $ArC^{8}H$), 7.49-7.43 (2H, m, $ArC^{6}H$ ou $ArC^{9}H$ e $C^{11}H$), 7.28 (1H, d, <i>J</i> = 8 Hz, $ArC^{3}H$) 6.41	-
δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	(1H, d, $J=\overline{8.5}$ Hz, $C^{10}\underline{H}$), 4.81 (1H, sl, N <u>H</u>), 4.46 (1H, d, $J=14.5$, C <u>H</u> _{2a}), 3.76 (1H, d, $J=14.5$, C <u>H</u> _{2b}), 1.26 (3H, m, C <u>H</u> ₃)	
¹³ C-NMR	135.8 (ArC ⁷ ou ArC), 135.4 (C ¹¹), 133.3 (ArC ⁶ ou ArC ⁹) 131.1 (ArC ⁶ ou ArC ⁹) 130 (ArC ⁷ ou ArC ⁸) 128 5 (ArC ⁴) 123 5 (ArC ³ H)	-
(500 MHz, CDCl ₃), δ (ppm)	(AIC 60 AIC) 130. (AIC 60 AIC), 120.3 (AIC), 123.3 (AIC H),114.9 (C10) 13.6 (CH3)	
MS-ESI (+) , <i>m/z</i>	414 [M+H] ⁺ , 396 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 372 [M+H-H ₂ C ₂ O] ⁺ , 371 [M+H- HNCO] ⁺ , 368 [M+H-HCOOH] ⁺ , 326 [368-H ₂ C ₂ O] ⁺ , 253 [M+H- NAC] ⁺	416 [M+H] ⁺ , 398 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 380 [398-H ₂ O], 356 [398- H ₂ C ₂ O], 310 [356-HCOOH] ⁺ , 253 [M+H-NAC] ⁺ , 236 [253- NH ₃] ⁺ , 210 [253-HNCO] ⁺ , 164 [NAC+H] ⁺
HRMS-ESI (+), m/z (erro, ppm)	414.1123 calculado para [M+H] ⁺ C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₅ S,414.1118 (1.2) 4 ⁻	16.1281 calculado para [M+H]⁺ C ₂₀ H ₂₁ N₃O₅S,416.1275 (1.2)

A reactividade das espécies electrófilas formadas a partir da CBZ (62) na presença do cat. [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111) foi também avaliada usando o ValOEt (ensaios 2 e 3, Tabela II.1) como agente armadilhante. A análise por LC-ESI(+)-MS permitiu identificar dois sinais a $t_{\rm R} \sim 17$ e 21 min., ambos com um valor de m/z 398, que representa um incremento de 145 u relativamente a um produto resultante da oxidação/hidroxilação da CBZ (62) (253 u). O padrão de fragmentação, verificado por LC-ESI(+)-MS/MS do ião precursor a m/z 398, mostra a mesma fragmentação para os dois sinais, sendo esta compatível com a incorporação do aminoácido ValOEt. Tendo em conta o padrão de fragmentação obtido para os dois sinais, a incorporação do ValOEt poderá ter ocorrido por duas vias distintas: a) ataque nucleófilo do aminoácido ao epóxido formado, a partir da oxidação da ligação dupla C¹⁰-C¹¹ de 62 dando origem ao aduto 10-hidroxi-11-(valinato de etilo-N^a-il)-10,11-di-hidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-EPCBZ, 124, Figura II.10.A1); e/ou b) ataque nucleófilo do ValOEt ao óxido de areno gerado in situ em qualquer posição do anel aromático, com consequente abertura do anel. Nas duas situações é possível observar o fragmento maioritário a m/z 380, correspondente à perda de uma molécula de água e os fragmentos a m/z 146 e 253, correspondentes à cisão da ligação C-N, com a saída do aminoácido, a partir da molécula protonada de cada um dos adutos (Figura II.10.A1). Mais tarde foi possível confirmar que o sinal a $t_R \sim 17.0$ min. corresponde ao aduto ValOEt-EPCBZ (124), resultante do ataque nucleófilo do ValOEt ao epóxido 79 gerado in situ pela oxidação da CBZ (62). Esta conclusão foi possível após a comparação do produto formado a partir da reacção com o EPCBZ (79) sintetizado e o aminoácido (secção II.2.1.2.), apresentando o mesmo $t_{\rm R}$ e padrão de fragmentação. No entanto, como será mais à frente explicado, acredita-se que o sinal a $t_{\rm R} \sim 21$ min. corresponda na realidade à soma dos produtos syn+anti resultantes da formação do aduto ValOEt-EPCBZ (124). Paralelamente, foi também observado um sinal a $t_R \sim 16$ min. (Figura II.10.A2) cujo valor de m/z é compatível com a molécula protonada [M+H]⁺ de um aduto resultante do ataque nucleófilo do ValOEt à quinona-imina 112. A formação do aduto 125 (ValOEt-OHCBZ, Figura II.10.A2., representação genérica) foi comprovada por LC-ESI(+)-MS, não só pelo aparecimento do sinal a *m/z* 396, correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ de 125, mas também pelo aparecimento dos fragmentos a m/z 146 e 251 correspondentes à cisão da ligação C-N, com a saída do ValOEt, a partir da molécula protonada [M+H]⁺ (Figura II.10.A2). Verificou-se ainda o fragmento a m/z 322, correspondente à perda do grupo isopropilo (-HC(CH₃)₂) do ValOEt. No entanto, a posição de inserção bem como a posição ou posições de oxidação da CBZ (62) não puderam ser determinadas pelo método de análise utilizado.



Figura II.10. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de oxidação da CBZ (**62**) com o sistema H₂O₂/catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**) na presença de ValOEt (**A**) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 398 (**A1**) e m/z 396 (**A2**), correspondentes às moléculas protonadas [M+H]⁺ dos adutos ValOEt-EPCBZ (**124**) e ValOEt-OHCBZ (**125**), respectivamente, com os seus espectros MS/MS e as fragmentações propostas (a laranja).

Havendo a possibilidade de formação de quinonas, e tendo em conta que estas poderão reagir, via base de Schiff, com a amina da cadeia lateral do ValOEt, promoveu-se a mesma reacção na presença do redutor NaBH₃CN (ensaio 3, Tabela II.1). O objectivo seria estabilizar a imina formada dando origem a uma amina. No entanto, não se detectou qualquer sinal compatível com adutos deste tipo. De salientar, que todos os produtos mencionados no ensaio sem redutor, foram também observados neste ensaio.

Os dados físicos e espectroscópicos determinados para os adutos ValOEt-EPCBZ (**124**) e ValOEt-OHCBZ (**125**) encontram-se descritos na Tabela II.3.

Tabela II.3. Análise por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(+)-HRMS dos adutos obtidos por oxidação da CBZ (**62**) com H₂O₂ na presença do catalisador **111** e posterior reacção com ValOEt (a azul).

Composto	HO +	ValOEt-OHCBZ (125)
MS-ESI (+), <i>m/z</i>	398 [M+H] ⁺ , 380 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 253 [M+H-ValOEt] ⁺ , 210 [253- HNCO] ⁺ ,146 [ValOEt+H] ⁺	396 [M+H] ⁺ , 322 [M+H-H ₆ C ₃] ⁺ , 253 [M+H-ValOEt] ⁺ , 208 [253- HNCO] ⁺ , 146 [ValOEt+H] ⁺
HRMS-ESI (+), m/z (erro, ppm)	398.2085 calculado para [M+H] ⁺ C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₄ , 398.2074 (2.8)	396.1934 calculado para [M+H]⁺ C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O₄, 396.1918 (3.5)

Muito embora os resultados obtidos com os ensaios efectuados com o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111) tenham demonstrado a formação de espécies susceptíveis de sofrer ataque nucleófilo por aminoácidos contendo grupos laterais com átomos de enxofre e azoto, apenas foi obtido um padrão sintético totalmente caracterizado de um dos adutos formados, o aduto NAC-OHCBZ (118). Além disso, não foi possível isolar estas espécies reactivas nem confirmar as posições de oxidação devido à sua instabilidade e a complexidade da mistura reaccional. Por outro lado, com esta estratégia também não foi possível aceder a adutos resultantes da formação do metabolito 9-AL (88). Assim, de forma a obter padrões sintéticos dos metabolitos ou espécies reactivas de interesse e os respectivos adutos, decidiu-se tentar outras abordagens sintéticas mais específicas para cada situação,

nomeadamente a partir dos metabolitos previamente sintetizados. A discussão desta nova abordagem encontra-se descrita nas alíneas seguintes.

II.2.1.2. Reactividade da epoxi-carbamazepina (79) com bionucleófilos

A falta de dados inequívocos acerca do papel do metabolito EPCBZ (**79**) na promoção das IDRs, e tendo em conta os resultados apresentados em II.2.1., decidiuse fazer um estudo mais aprofundado relativamente a este metabolito. Deste modo, começou-se por sintetizar o EPCBZ (**79**). A estratégia adoptada para a sua síntese consistiu na oxidação directa da ligação dupla C¹⁰-C¹¹ da CBZ (**62**) na medida em que envolve um passo único e, à partida, uma reacção rápida e simples.

Numa primeira tentativa, utilizou-se um procedimento adaptado da literatura [247], por reacção, à temperatura ambiente, de uma suspensão de CBZ (**62**), carbonato de sódio (NaCO₃) e uma mistura de permanganato de potássio (KMnO₄) e alumina (Al₂O₃) (35% p/p) em diclorometano (CH₂Cl₂), na presença de ácido peracético (CH₃CO₃H). (Esquema II.8).



Esquema II.8. Esquema reaccional das condições utilizadas na primeira tentativa de síntese do EPCBZ (79).

Embora a patente de Learmonth e seus colaboradores [247] reporte um rendimento na ordem dos 90%, o rendimento obtido foi substancialmente inferior a este valor. Efectivamente, pela análise HPLC-DAD foi evidente a baixa conversão da CBZ (**62**), com t_R ~ 23 min., no produto de oxidação pretendido (Figura II.11). A análise da mistura reaccional por LC-ES(+)-MS permitiu confirmar que para além do produto resultante da epoxidação (a t_R ~ 19 min.), houve ainda a formação de um produto lateral, o diol-CBZ (**80**) a t_R ~12 min.. A análise por LC-ESI(+)-MS/MS dos iões correspondentes às moléculas protonadas [M+H]⁺ de **79** e **80**, a *m/z* 253 e 271 respectivamente, revelou iões-fragmento compativeis com formação destes dois produtos de oxidação (Figura II.11). A formação destes produtos foi confirmada por ¹H-NMR (Figura II.12): o aparecimento de dois singuletos a 4.23 e 5.29 ppm correspondentes a protões de um carbono sp³ ligados a um heteroátomo são
compatíveis com a formação do EPCBZ (**79**) e do diol-CBZ (**80**), respectivamente, estando estes sinais de acordo com os valores de desvio químicos reportados na literatura [216, 248, 266]. Além disso, o singuleto a 6.9 ppm, correspondente aos protões da ligação dupla C¹⁰-C¹¹ da CBZ (**62**), evidencia também a presença do material de partida por reagir. A proporção relativa da formação do EPCBZ (**79**) e do diol-CBZ (**80**) foi dada pelos valores de integração correspondentes aos sinais acima mencionados. Considerando apenas estes dois produtos e **62**, o EPCBZ (**79**) e o diol-CBZ (**80**) foram obtidos numa proporção relativamente a **62** de aproximadamente 1:1:2 (CBZ: EPCBZ:diol-CBZ), evidenciando que a formação do produto lateral diol-CBZ (**80**) é superior relativamente a **79**.



Figura II.11. Cromatograma obtido por HPLC-DAD da mistura reaccional correspondente à tentativa de síntese do EPCBZ (**79**) pelo método de Learmonth [247] (**A**). Estão também representados os espectros de massa dos produtos maioritários aos tempos $t_{\rm R} \sim 12$, 19 e 23min., obtidos por LC-ESI(+)-MS/MS com as respectivas fragmentações propostas para os compostos diol-CBZ (**80**), EPCBZ (**79**) e CBZ (**62**).

A reacção de epoxidação descrita por Leranmonth [247] envolvia o uso de um excesso de ácido peracético, na presença de um catalisador, neste caso pastilhas de KMnO₄ suportado em Al₂O₃ [35%(p/p)]. No entanto, para esta reacção foi usada uma mistura de KMnO₄ e Al₂O₃ neutra, simplesmente misturando os dois reagentes num almofariz na tentativa de homogeneizar a mistura e promovendo a ligação do ião MnO₄⁻ ao Al₂O₃. Neste caso, o excesso do ião permanganato MnO₄⁻ na sua forma livre promoveu a formação de um complexo π entre o metal e a ligação dupla de **62**, seguido da formação de um éster cíclico através de uma adição electrocíclica [3+2] entre o oxidante e a CBZ (**62**)[267, 268]. O éster cíclico deverá ter sofrido hidrólise no

momento do tratamento final da mistura reaccional dando origem ao diol-CBZ (80) (Esquema II.9), facto já observado por outros autores em condições experimentais semelhantes [269, 270].



Figura II.12. Espectros de ¹H-NMR (400 MHz, CDCl3) de: CBZ (62) padrão (A) e mistura reaccional correspondente à tentativa de síntese de EPCBZ (79) (B) evidenciando o não consumo total do material de partida 62 e a formação do produto maioritário, diol-CBZ (80).



Esquema II.9. Mecanismo proposto para a formação do diol-CBZ (80) a partir da CBZ (62).

Pelo facto de o tratamento acima referido não ter conduzido a resultados satisfatórios, testou-se um segundo método [216], onde se utilizou o ácido *meta*-cloroperoxibenzóico (*m*-CPBA) como oxidante, em CH₂Cl₂.

A mistura reaccional foi deixada à temperatura ambiente durante quatro dias (Esquema II.10). Após este tempo, o precipitado branco (ácido clorobenzóico) foi filtrado e o excesso de *m*-CPBA foi destruído com uma solução aquosa de bissulfito de sódio. Após evaporação do solvente por destilação a pressão reduzida, o resíduo sólido total foi analisado por ¹H-NMR (Figura II.13). Embora se tenha observado a formação do diol-CBZ (**80**), pelo aparecimento do singuleto a 5.3 ppm, a diferença para a formação do epóxido **79** pretendido foi bastante mais pronunciada comparativamente ao método anteriormente testado. A proporção CBZ:EPCBZ:diol-CBZ foi de aproximadamente 2:4:1 tendo o rendimento do EPCBZ (**79**), na mistura bruta, sido de 33%.



Esquema II.10. Esquema reaccional das condições utilizadas na tentativa de síntese do EPCBZ (79) segundo o método descrito em [216].



Figura II.13. Espectro de ¹H-NMR (300 MHz, CDCI₃) obtido na tentativa de síntese do EPCBZ (79) pelo método descrito em [216].

Para a separação dos compostos desta mistura reaccional testaram-se diferentes métodos cromatográficos incluindo cromatografia em camada fina preparativa (c.c.f.p.) em alumina neutra e sílica e também por HPLC-DAD semipreparativo. No entanto, a purificação do EPCBZ (79) só foi conseguida quando se submeteu a mistura reaccional a um processo de recristalização em THF seguido de uma purificação das águas-mães por c.c.f.p. [acetato de etilo]. O EPCBZ (79) obtido por recristalização correspondia apenas a 7% e a sua análise por ¹H-NMR evidenciou o singuleto a 6.95 ppm correspondente aos dois protões da ligação dupla da CBZ (62) como contaminação (1% do precipitado). As águas-mães foram assim purificadas por c.c.f.p [acetato de etilo] tendo-se conseguido o isolamento o EPCBZ (79) puro na forma de sólido fino branco, com um rendimento de 11%. Apesar de a literatura [216] apresentar para este procedimento um rendimento na ordem dos 65%, o epóxido 79 está descrito como tendo sido obtido também com contaminação de CBZ (62). Além disso, outras publicações reportam a mesma síntese de 79 com rendimentos nunca superiores a 35% o que é compatível com o rendimento obtido pela análise da mistura bruta por ¹H-NMR (sem purificação).

A caracterização do EPCBZ (**79**) encontrada na literatura é bastante limitada. Deste modo, e para facilitar a análise dos possíveis adutos formados a partir de **79**, foi efectuada a sua caracterização total por NMR e LC-ESI(+)-MS. A identificação dos desvios químicos foi efectuada por comparação dos dados de ¹H-NMR descritos na literatura para a CBZ (**62**) e **79** [216, 248] mas também tendo como base as experiências heteronucleares de acoplamento ¹³C-¹H, HSQC e *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC) realizadas.

A confirmação da obtenção do EPCBZ (**79**) foi obtida por LC-ESI(+)-MS, uma vez que apresenta um sinal a m/z 253 correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ bem como o respectivo dímero de fase gasosa [2M+H]⁺ m/z 505. A presença do sinal a m/z 253, com um incremento de 16 u relativamente ao correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ da CBZ (**62**) (m/z 236), indica um ganho de um átomo de oxigénio, compatível com a estrutura apresentada. A análise do padrão de fragmentação (Esquema II.11) obtido por LC-ESI(+)-MS/MS, do ião precursor m/z 253 foi possível observar o fragmento maioritário m/z 236, correspondente à perda de -NH₃ e ainda um fragmento m/z 180 correspondente a perda de -HNCO. É ainda possível observar o fragmento maioritário e a perda de $-H_2CO$ ou -2CO [271]. Na Tabela II.4 são apresentados os dados físicos e espectroscópicos obtidos para o EPCBZ (**79**).



Esquema II.11. Mecanismo de fragmentação proposto para o ião percursor *m/z* 253, correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ do EPCBZ (**79**), quando analisado por LC-ESI(+)-MS/MS.

Composto	$ \begin{array}{c} $
η (%)	11
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	7.50 (2H, d, <i>J</i> =7.4 Hz, ArC¹ <u>H</u> e ArC⁰ <u>H</u>), 7.43-7.40 (4H, m, ArC³ <u>H</u> , ArC⁴ <u>H</u> , ArC⁶ <u>H</u> e ArC ⁷ <u>H</u>), 7.38-7.32 (2H, m, ArC² <u>H</u> e ArC ⁸ <u>H</u>), 4.42 (1H, sl, N⁵ <u>H</u>), 4.28 (2H, s, C¹⁰ <u>H</u> e C¹¹ <u>H</u>)
¹³ C-NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	161.6 (С ¹² =О), 138.3 (ArC ^{4a} e ArC ^{6a}) 131.6 (ArC ^{1a} e ArC ^{9a}) 131.4 (ArC ¹ e ArC ⁹), 130.5 (ArC ³ <u>H</u> e ArC ⁷ <u>H</u>), 130.2 (ArC ⁴ <u>H</u> e ArC ⁶ <u>H</u>), 128.4 (ArC ² e ArC ⁸), 58.6 (С ¹⁰ е С ¹¹)
MS-ESI (+), <i>m/z</i>	505 [2M+H]⁺, 253 [M+H]⁺, 236 [M+H-NH₃]⁺, 210 [M+H- HNCO]⁺,180 [236-2CO]⁺ ou 180 [210-H₂CO]⁺

Tabela II.4. Caracterização estrutural efectuada por NMR e MS do metabolito EPCBZ (79).

O passo seguinte envolveu o estudo da reactividade do EPCBZ (79) com aminoácidos que possuem na sua cadeia lateral grupos nucleófilos, podendo assim reagir com o 79 por abertura do seu anel epóxido. Os aminoácidos escolhidos foram o ValOEt, a NAL e a NAC. Foi também testada a reactividade de 79 com o tripéptido endógeno GSH.

Perante as dificuldades sentidas na obtenção do EPCBZ (**79**) puro e de forma a maximizar a sua reacção com os bionucleófilos, não se prevendo, à partida, reacções da CBZ (**62**) ou o diol-CBZ (**80**) com os bionucleófilos, decidiu-se usar a mistura bruta da formação de **79** pelo método descrito em [216], após o respectivo tratamento da mistura reaccional e remoção do solvente por destilação a pressão reduzida.

A formação dos adutos covalentes com aminoácidos nucleófilos e GSH a partir do EPCBZ (**79**) envolveu a preparação de uma solução de um aminoácido (NAC, NAL e ValOET) ou GSH (4.0 a 50.0 eq) em tampão fosfato 50 mM, a pH fisiológico (7.4). A solução da mistura contendo o EPCBZ (**79**) (1.0 eq) em THF ou acetonitrilo foi depois adicionada lentamente às soluções anteriormente preparadas e deixadas reagir, a 37 ^oC entre 2 a 72 h. O número de equivalentes usado para os nucleófilos foi calculado tendo como base o rendimento de **79**, determinado a partir do espectro de ¹H-NMR da respectiva mistura reaccional. De forma a facilitar a identificação dos adutos formados, foram ainda preparadas soluções de controlo contendo todos os reagentes (com excepção dos aminoácidos ou GSH), tendo igualmente sido submetidas às mesmas condições experimentais. Todas as misturas reaccionais foram controladas por HPLC-DAD analítico e comparadas com as misturas reaccionais de controlo.

O estudo da reactividade do epóxido **79** iniciou-se com o aminoácido ValOEt. Em todos os ensaios efectuados para esta reacção, uma solução de **79** em THF foi adicionada a uma solução de ValOEt em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (Tabela II.5). Numa primeira abordagem utilizou-se um excesso de nucleófilo de 5.0 eq. relativamente ao material de partida (Ensaio 1, Tabela II.5). No entanto, a análise comparativa por HPLC-DAD da mistura reaccional e a reacção controlo não evidenciou o aparecimento de nenhum sinal significativo, correspondente à formação de produtos nem à diminuição do sinal correspondente ao EPCBZ (**79**). Assim, promoveu-se a mesma reacção mas com um excesso de 10.0 eq. de nucleófilo (ensaio 2, Tabela II.5) tendo-se verificado o aparecimento de um sinal a t_R~17.0 min.

Ensaio	ValOEt (eq.)	Tempo de Reacção (h)
1	5.0	72
2	10.0	72

Tabela II.5. Condições experimentais utilizadas na reacção do EPCBZ (79) e ValOEt.

A análise da mistura reaccional por LC-ESI(+)-MS mostrou tratar-se do aduto ValOEt-EPCBZ (**124**) já observado nos ensaios efectuados com a CBZ (**62**) e o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**), na presença H_2O_2 e de ValOEt. Este aduto, resultante do ataque nucleófilo do aminoácido ao anel de epóxido e consequente abertura do mesmo, apresenta o mesmo t_R e padrão de fragmentação já observado e descrito anteriormente. Perante este resultado tentou-se isolar o produto correspondente ao aduto ValOEt-EPCBZ (**124**) por HPLC-DAD semi-preparativo, para posteriormente ser analisado por ¹H-NMR. No entanto, devido à quantidade reduzida de amostra não foi possível a sua caracterização por esta técnica.

Os ensaios efectuados com a NAL foram efectuados adicionando uma solução da mistura reaccional contendo **79**, em THF, a uma solução do aminoácido (4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4, e deixada reagir por 72 h. Tal como na reacção com o ValOEt, a análise comparativa dos cromatogramas de HPLC-DAD da mistura

reaccional e o controlo, não evidenciou o aparecimento de nenhum sinal significativo, correspondente à formação de produtos nem à diminuição do sinal a correspondente ao EPCBZ (79). Ainda assim, a mistura reaccional foi analisada por LC-ESI(+)-MS tendo-se verificado a formação do aduto 10-(Nª-acetil-lisina-N-il)-11-hidroxi-10,11-dihidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAL-EPCBZ, **126**, Figura II.14.A1) pelo aparecimento no espectro de LC-ESI(+)-MS do sinal a m/z 441 correspondente à sua molécula protonada [M+H]⁺. Este valor representa um incremento de 188 u relativamente à molécula protonada [M+H]* 79, compatível com a incorporação do aminoácido NAL. A estrutura apresentada foi confirmada pelo padrão de fragmentação observado por LC-ESI(+)-MS/MS do ião precursor (m/z 441) e que evidenciou o aparecimento dos fragmentos maioritários m/z 423 e 380, correspondentes à perda de uma molécula de água e à subsequente perda do grupo -HNCO, respectivamente. Foi igualmente possível observar os fragmentos m/z 189 e 253 correspondentes à cisão da ligação C-N entre o EPCBZ (79) e a NAL (Figura II.14). Na Tabela II.6 são apresentados os dados físicos e espectroscópicos obtidos para o aduto NAL-EPCBZ (126).



Figura II.14. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção do EPCBZ (79) com a NAL (A). Cromatograma iónico extraído a *m*/z 441 (A1) correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ do aduto NAL-EPCBZ (126). Também se apresenta o espectro de MS/MS correspondente a este ião, obtido por LC-ESI(+)-MS/MS e os mecanismos de fragmentação propostos para o aduto NAL-EPCBZ (126) (B).



 Tabela II.6. Caracterização estrutural efectuada por MS-ESI(+) do aduto NAL-EPCBZ (126).

MS-ESI (+), *m/z* 441 [M+H]⁺, 423 [M+H-H₂O]⁺, 380 [423-HNCO]⁺, 253 [M+H-NAL]⁺, 236 [253-NH₃]⁺, 189 [NAL+H]⁺

De modo análogo ao efectuado com os nucleófilos de azoto, promoveu-se a reacção entre o epóxido **79** e a NAC. A reacção com a NAC foi também efectuada adicionando uma solução da mistura reaccional de formação do EPCBZ (**79**) em THF a uma solução de 5.0 ou 10.0 eq. de aminoácido em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (Tabela II.7). Ambas as misturas reaccionais foram seguidas por HPLC-DAD analítico e a comparação com as reacções controlo evidenciaram o aparecimento de um sinal, embora pouco intenso, que não correspondia aos materiais de partida.

Ensaio 1	NAC (eq.)	Tempo de reacção (h)
1	5.0	48
2	10.0	72

Tabela II.7. Condições experimentais utilizadas na reacção entre o EPCBZ (79) e a NAC.

A análise por LC-ESI(+)-MS das misturas reaccionais revelou a formação do aduto NAC-EPCBZ (**119**), já detectado nos ensaios preliminares efectuados com a CBZ (**62**) oxidada com catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**) na presença de H₂O₂, seguido da adição da NAC. O aduto obtido apresenta o mesmo padrão de fragmentação já descrito, obtido por LC-ESI(+)-MS/MS (Figura II.3 vs Figura II.5). De referir, que no cromatograma iónico extraído do ião a m/z 416, correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ de **119**, é possível observar dois sinais que apresentam exactamente o mesmo padrão de fragmentação (Figura II.15, A1a e A1b) que foram inicialmente atribuídos aos dois diastereómeros esperados, resultantes da reacção de

abertura do anel epóxido de **79** pela NAC. No entanto, estes dois sinais não apresentam intensidades iguais, como à partida se esperaria.

Numa tentativa de confirmar a posição de ligação da NAC a EPCBZ (**79**), tentouse o isolamento do aduto NAC-EPCBZ (**119**) por HPLC-DAD semi-preparativo, com o objectivo de caracterizá-lo por NMR. No entanto, mais uma vez não foi possível uma vez que a quantidade do aduto isolado não foi suficiente para o uso desta técnica.



Figura II.15. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de uma mistura de EPCBZ (79) e CBZ (62) e a NAC (A). Cromatograma iónico extraído a *m*/z 416 (A) com os respectivos espectros MS/MS obtidos por LC-ESI(+)-MS (A1a e A1b) e as fragmentações propostas para o aduto NAC-EPCBZ (119).

O tipo de reactividade observada entre o EPCBZ (**79**) com NAC, um nucleófilo de enxofre, já era em certa medida esperado. Como já referido anteriormente, Bu e seus colaboradores [214] observaram a formação de um aduto covalente entre o EPCBZ (**79**) e GSH. Estes autores alegam que a formação do aduto GSH-EPCBZ (**94**) resulta do ataque nucleófilo do grupo tiol (-SH) do resíduo da císteina da GSH, ao epóxido **79** e a consequente abertura do anel. No entanto, numa análise mais cuidadosa dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para estas reacções, verificouse que a formação do aduto NAC-EPCBZ (**119**) não parecia estar directamente ligada

à diminuição da intensidade do sinal cromatográfico correspondente ao EPCBZ (**79**), como seria de esperar. Em vez disso, a formação de **119** parecia estar dependente da diminuição do sinal correspondente à CBZ (**62**) (Figura II.16). Este facto, aliado à observação já referida, de os dois diastereómeros aparentemente não se terem formado numa razão de 1:1, sugere que os resultados obtidos não resultaram unicamente da abertura do anel de epóxido do metabolito **79**.





A reacção correspondente à abertura do anel de um epóxido por substituição nucleófila resulta na formação de um produto *anti* em que a orientação dos dois grupos (hidroxilo e nucleófilo) é diametralmente oposta. No caso particular da formação do aduto **119**, e tendo em conta que o nucleófilo usado é enantiomericamente puro (enantiómero *L*), o ataque nucleófilo da NAC ao EPCBZ (**79**) resulta numa mistura de 2 diastereómeros (Esquema II.12). Não havendo qualquer impedimento estereoquímico, como é o caso do epóxido **79**, a proporção da formação destes dois isómeros deveria ser semelhante. Assim, o facto de se observar dois sinais com o mesmo padrão de fragmentação a t_R distintos mas com intensidades bastantes díspares levantou também algumas suspeitas quanto à origem do aduto NAC-EPCBZ (**119**).



Esquema II.12. Isómeros do aduto NAC-EPCBZ (119) formados na reacção do ÉPCBZ (79) e (10*S*, 11*S*, 2'*R*)-NAC-EPCBZ (119) (10*R*, 11*R*, 2'*R*)-NAC-EPCBZ (119)

Perante estas evidências, e no sentido de determinar a influência da presença da CBZ (62) na formação do aduto NAC-EPCBZ (119), promoveu-se uma serie de reacções nas mesmas condições referidas anteriormente mas onde se adicionou a CBZ (62) ou o EPCBZ (79) puros, adquiridos comercialmente, por substituição da mistura contendo os dois compostos.

A reacção efectuada entre o EPCBZ (**79**) puro e a NAC resultou, sem surpresa, na formação do aduto NAC-EPCBZ (**119**). Ao contrário do que foi verificado anteriormente por LC-ESI(+)-MS, apenas se observou um sinal a *m/z* 416 correspondente à molécula protonada de **119** (Figura II.17.A1). Sabendo que o aduto NAC-EPCBZ (**119**), obtido a partir do EPCBZ (**79**), resulta de um mecanismo de abertura do anel epóxido e origina apenas um par de diastereómeros (ver Esquema II.12), é seguro afirmar que este sinal corresponde aos dois isómeros obtidos, e que as condições cromatográficas utilizadas não permitiram a sua separação.

Surpreendentemente, na reacção efectuada apenas com CBZ (62), a formação deste aduto é também observada. A análise desta mistura reaccional por LC-ESI(+)-

MS mostrou dois sinais distintos com um valor de m/z 416 (Figura II.17.B1a e Figura II.7.B2b). Um deles apresenta o mesmo t_R e padrão de fragmentação do produto identificado na reacção efectuada a partir do EPCBZ (**79**) puro e o outro, menos intenso, que elui ligeiramente mais cedo, exactamente como já se havia observado na reacção efectuada a partir da mistura de CBZ (**62**) e EPCBZ (**79**). Além disso, verificou-se também a formação de um outro produto com menos duas unidades de massa (m/z 414) comparativamente ao aduto NAC-EPCBZ (**119**) e com um padrão de fragmentação bastante semelhante, o que sugere uma semelhança estrutural entre os dois produtos (Figura II.17.B2)

A análise posterior da mistura reaccional primeiramente efectuada, entre a mistura de CBZ (62) e o EPCBZ (79) e a NAC, permitiu verificar que este produto cuja molécula protonada $[M+H]^+$ tem um valor m/z 414, também se formou nestas condições, mas estava ausente na mistura reaccional obtida por reacção deste aminoácido com 79 puro (Figura II.17.A2). Assim, e tendo em conta os resultados obtidos nestes ensaios preliminares, podemos concluir que quando se utilizou uma mistura de CBZ (62) e EPCBZ (79), o aduto 119 formou-se quase exclusivamente por reacção com a CBZ (62) e o aduto com m/z 414 é exclusivamente um derivado da CBZ (62). Para além de nunca ter sido reportado na literatura a possibilidade de reacção directa da CBZ (62) com bionucleófilos, sem necessidade de bioactivação, este resultado sugere que muito provavelmente esta reacção é muito mais favorável do que a reacção de abertura do anel do epóxido 79. A importância destes factos, caso ocorram *in vivo*, levou-nos a um estudo mais cuidado desta via.



Figura II.17. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre a EPCBZ (79) e a NAC (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a *m/z* 416 (A1) (com o respectivo espectro de MS/MS, obtido por LC-ESI(+))-MS e m/z 414 (A2); Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente reacção entre CBZ (62) e a NAC (B) e os cromatogramas iónicos extraídos a *m/z* 416 (B1a e B1b) e *m/z* 414 (B2), com os respectivos espectros de MS/MS, obtido por LC-ESI (+).

II.2.1.3. Reactividade da carbamazepina (62) com bionucleófilos

De acordo com as evidências apresentadas anteriormente, a CBZ (62) parece reagir directamente com bionucleófilos como a NAC, dando origem a dois adutos distintos. Um destes adutos apresenta o mesmo valor de m/z do produto resultante da abertura do anel do epóxido **79** (mas dando origem, para além dos dois diastereómeros *anti* também , em alguma proporção, aos diastereómeros *syn*) e o outro que apresenta menos duas unidades de massa em relação ao anterior, formando-se exclusivamente a partir da CBZ (62) (Esquema II.13). Embora o valor de m/z correspondente ao produto obtido exclusivamente a partir da CBZ (62) possa corresponder a várias estruturas, os dados obtidos apontam para a formação do aduto $10-(N^{r_i}$ -acetil-cisteína-S-il)-11-hidroxi-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-CBZ, **127**, Esquema II.13).



Esquema II.13. Representação esquemática dos produtos obtidos a partir da CBZ (62) e do seu metabolito EPCBZ (79) por reacção com a NAC.

A determinação desta estrutura teve como base os dados obtidos por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(+)-MS/MS, uma vez que para além do sinal m/z 414 correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ de **127**, observaram-se os iões fragmento m/z 396, correspondente à perda água do ácido carboxilico da NAC, bem como os fragmentos a m/z 372 e 368, correspondentes à perda dos grupos $-H_2C_2O$ e -HCOOH, respectivamente. A confirmação da presença do aminoácido foi mais uma vez dada pelo fragmento a m/z 253 correspondente à cisão da ligação C-S com a saída da NAC. Os mecanismos de fragmentação propostos para o aduto NAC-CBZ (**127**) podem ser observado no Esquema II.14.



Esquema II.14. Mecanismos de fragmentação propostos para o aduto NAC-CBZ (127), resultante da reacção CBZ (62) e a NAC, quando analisado por LC-ESI(+)-MS/MS

Embora o padrão de fragmentação obtido seja muito semelhante ao obtido para o aduto NAC-OHCBZ (**118**), os *t*_R's verificados para cada um dos produtos são diferentes. Ainda assim, e numa tentativa de confirmar a estrutura apresentada para o aduto NAC-CBZ (**127**) obtido, tentou-se o seu isolamento por HPLC-DAD semipreparativo, com o objectivo de caracterizá-lo por NMR. O rendimento desta reacção não foi determinado uma vez que a análise do produto isolado por LC-ESI(+)-MS revelou tratar-se de uma mistura de compostos. Ainda assim foi possível obter algumas evidências da formação de **127**. As evidências da formação do aduto NAC-CBZ (**127**) tiveram como base inicial o reconhecimento, no espectro de ¹H-NMR, de um conjunto de sinais na zona com o intervalo de desvios químicos 7.53-7.16 ppm, a integrar para oito protões, correspondentes aos oito protões aromáticos do anel de iminoestilbeno de **127**. A presença destes sinais a integrar para oito protões é prova inequívoca que o aminoácido não se encontra inserido em nenhuma posição aromática. Além disso, observa-se um singuleto largo a 5.92 ppm, a integrar para dois protões (e que apresenta uma correlação no HMBC com um carbono quaternário a 173.6 ppm), correspondente aos protões lábeis -NH₂ da carbamida de NAC-CBZ (127) e ainda do singuleto a 1.82 ppm, a integrar para três protões (e que apresenta uma correlação no espectro de HSQC com o carbono a 22.4 ppm) correspondente aos protões -CH₃ do grupo acetilo (-COCH₃) da NAC. Foi possível ainda identificar, a 4.43 ppm um multipleto a integrar para um protão (e que apresenta uma correlação no espectro de HSQC com um carbono a 51.9 ppm) correspondente ao protão α C²H do aminoácido. A observação do espectro de ¹H-NMR evidencia ainda a presença de um conjunto de sinais na zona com o intervalo 3.27-2.75 ppm, a integrar para 6 protões e dois singuletos largos a 5.17 ppm e 4.00 ppm (a integrar para um protão cada um). A confirmação da presença da ligação dupla C¹⁰-C¹¹ foi determinada com o auxílio de experiências de irradiação selectiva no espectro de ¹H-NMR (Figura II.18 e II.19). Comparando com um espectro de ¹H-NMR sem irradiação selectiva (a preto, na Figura II.18), a irradiação dos sinais cujas freguências correspondem aos singuletos largos a 5.92 ppm (a roxo, Figura II.18), 5.17 ppm (a azul, Figura II.18) e 4.00 ppm (a verde, Figura II.18) não provocou qualquer variação nos restantes sinais.



Figura II.18. Comparação dos espectros de ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) do aduto NAC-CBZ (127) com irradiações a 4.00 ppm (verde), 5.17 ppm (azul) e 5.92 ppm (roxo).

O mesmo procedimento foi efectuado para um conjunto de frequências correspondentes ao intervalo 3.27-2.75 ppm (Figura II.19). A escolha das frequências a irradiar teve como base a observação mais atenta do espectro de ¹H-NMR, onde se conseguem observar 6 multipletos distintos, de intensidades diferentes. A irradiação selectiva de cada uma destas frequências deu origem a alterações no espectro. Assim, a irradiação da frequência correspondente ao multipleto a 4.43 ppm, promoveu uma simplificação dos multipletos correspondentes aos intervalos 3.27-3.23 ppm, 3.09-2.9 ppm e 2.79-2.75 ppm (que no total integram para quatro protões), tornando estes sinais menos definidos. Por outro lado, quando se irradia qualquer frequência correspondente a estes quatro protões ocorre igualmente uma simplificação nos restantes três conjuntos de multipletos. Com este resultado, e sendo que o multipleto a 4.43 ppm correspondente ao C²<u>H</u>, protão α da NAC, os sinais cujo conjunto de multipletos estão compreendidos entre 3.09-2.90 ppm e 2.79-2.75 ppm correspondem



Figura II.19. Comparação dos espectros de ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) do aduto NAC-CBZ (**127**) com irradiações efectuadas no intervalo ~5.0-2.6 ppm.

A integração destes sinais para quatro protões pode ser explicada pela existência de um equilíbrio ceto-enólico (Esquema II.15) sendo que dois conjuntos de multipletos correspondem aos dois protões C^{1} '<u>H</u> da forma ceto e os restantes à forma enólica. A ausência de qualquer sinal compatível com um protão ligado a um carbono sp^3 e acoplados a um heteroátomo constitui por si só uma evidência da presença de uma ligação dupla da CBZ (62). Apesar de tudo, não foram observadas quaisquer evidências de um sinal compatível com um grupo carbonilo de uma cetona (~200 ppm). De facto, o equilíbrio deverá ser bastante favorecido no sentido do enol devido à estabilização conferida pela aromaticidade do anel iminostilbeno da NAC-CBZ (127).



Esquema II.15. Equilíbrio ceto-enólico proposto para o aduto NAC-CBZ (127).

A análise do espectro de ¹³C-NMR mostrou apenas um conjunto de sinais muito pouco intensos sendo apenas possível atribuir uma correspondência a alguns carbonos de **127**. Destaca-se dois sinais a campo baixo, a 173.6 e 173.2 ppm sem qualquer correlação no espectro de HSQC, correspondentes aos carbonos quaternário dos grupos carbonilo C¹²=O e C⁴=O. Na Tabela II.8 são apresentados os dados de NMR e MS, compatíveis com o aduto NAC-CBZ (**127**).

Composto	$HO = HN^{4'} 5'$ $HO = 10^{-10} HN^{4'} 5'$ H
¹ H-NMR (DMSO- <i>d</i> ₀) δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	7.53-7.16 (8H, m, ArC ² <u>H</u> , ArC ³ <u>H</u> , ArC ⁴ <u>H</u> , ArC ⁶ <u>H</u> , ArC ⁷ <u>H</u> e ArC ⁸ <u>H</u>), 5.92 (2H, sl, C ¹² N <u>H</u>), 4.43 (1H, m, C ² ' <u>H</u>), 3.27-2.75 (4H, m, C ¹ ' <u>H</u> a e <u>C¹'H</u> b) 1.82 (3H, s, C ⁵ ' <u>H</u>)
¹³ C-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	173.6 (C ¹² =O), 173.2 (C ⁴ '=O), 130.0-128.0 (ArC ² , ArC ³ , ArC ⁴ <u>H</u> , ArC ⁶ , ArC ⁷ e ArC ⁸), 22.4 (C ⁵ ')
MS-ESI (+) , <i>m/z</i>	414 [M+H] ⁺ , 396 [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 372 [M+H-H ₂ C ₂ O] ⁺ , 368 [M+H- HCOOH] ⁺ , 326 [368-H ₂ C ₂ O] ⁺ , 253 [M+H-NAC] ⁺

Tabela II.8. Caracterização estrutural obtida por NMR e MS para o aduto NAC-CBZ (127).

Perante os resultados obtidos para a reacção entre a CBZ (**62**) e a NAC, testou-se também a reactividade de **62** na presença de outros bionucleófilos. Tal como foi efectuado para o EPCBZ (**79**), promoveu-se a reacção com o ValOEt (ensaio 1, Tabela II.9), a NAL (ensaio 2, Tabela II.9) (ambos nucleófilos de azoto) e a GSH (ensaio 3, Tabela II.9), numa mistura de Tampão fosfato 50 mM/THF (4:1), pH 7.4, a 37 °C.

 Tabela II.9.
 Condições experimentais utilizadas nos ensaios efectuados para testar a reactividade da CBZ (62) na presença de nucleófilos de azoto e enxofre.

Ensaio	Nucleófilo (eq.)	Tempo de reacção (h)
1	ValOEt (4.0)	72
2	NAL (5.0)	72
3	GSH (5.0)	48

Nas reacções levadas a cabo com nucleófilos de azoto não se detectou, por análise HPLC-DAD, a formação de qualquer produto nem o respectivo consumo de **62**. Ainda assim, todas as misturas reaccionais foram posteriormente analisadas por LC-ESI(+)-MS, sem contudo se detectar a formação de qualquer produto. No entanto, no que diz respeito à reacção efectuada na presença de GSH, à semelhança do que já se havia observado com a NAC, formaram-se dois adutos que quando analisados por LC-

ESI(+)-MS, diferem apenas de duas unidades de massa, apresentando valores a m/z558 e 560, e eluindo a $t_{\rm R}$ distintos (Figura II.20). Efectivamente, é possível observar dois sinais a eluir a $t_{\rm R} \sim 9$ e 10 min. que apresentam ambos, nos espectros obtidos por LC-ESI(+)-MS, um sinal m/z 560 e o mesmo padrão de fragmentação (Figura II.20.A3a e Figura II.20.A3b). Embora o aduto GSH-EPCBZ (94) já se encontre descrito na literatura [214, 224] como sendo o produto de dois diasteroiómeros resultantes da reacção entre o EPCBZ (79) e a GSH, o comportamento observado pela análise da mistura reaccional parece ser similar ao observado para a formação do aduto NAC-EPCBZ (119). A presença de dois sinais distintos, com intensidades diferentes a m/z560 poderão corresponder igualmente aos produtos syn e anti, respectivos. De salientar, que quando se promoveu a reacção da GSH com o EPCBZ (79) comercial, apenas se observou por LC-ESI(+)-MS com as mesmas condições cromatográficas, um sinal com m/z 560, a $t_{\rm R}$ ~10 min. Apesar de Bu e colaboradores [214, 224] afirmarem terem isolado o aduto 94 por HPLC-DAD semi-preparativo, o que permitiu a sua caracterização por NMR (ver Figura II.1), após várias tentativas, tal nunca foi conseguido para este trabalho, mesmo reproduzindo as condições reaccionais utilizadas, quer por reacção da GSH com a CBZ (62) ou o EPCBZ (79). Adicionalmente, os mesmos autores reportam a formação de 94 por incubação da CBZ (62) em HMLs, co-factores de Fase I e um suplemento de GSH. Tendo em conta os resultados obtidos é possível concluir que neste caso, o aduto 94 deverá ter sido formado por duas vias distintas: a reacção directa da CBZ (62) com a GSH e a reacção com o EPCBZ (79) após a actuação das enzimas de Fase I.

Para além destes dois adutos foi identificado um outro aduto, que elui a ~13 min., e que no cromatograma obtido por LC-ESI(+)-MS apresenta um sinal a m/z 558 (Figura II.20.A2). Este valor bem como o correspondente padrão de fragmentação obtido por LC-ESI(+)-MS/MS são compatíveis com a formação do aduto 10-(γ -glutamilcisteinilglicina-S-iI)-11-hidroxi-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (GSH-CBZ, **128**, Figura II.20.A2). No espectro obtido por LC-ESI(+)-MS/MS para o ião precursor a m/z 558 (Figura II.20.A2) é possível observar os fragmentos maioritários a m/z 308 e 253, correspondentes à cisão da ligação C-S entre a CBZ (**62**) e a GSH. Verifica-se ainda os fragmentos correspondentes à quebra de ligações da GSH. O mecanismo proposto pode ser observado no Esquema II.16.



Figura II.20. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre a mistura de CBZ (62) e a GSH (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a *m/z* 237 (A1), *m/z* 560 (A2) e *m/z* 558 (A3) com os espectros de MS/MS (obtidos por LS-ESI(+)-MS) para os adutos GSH-CBZ (94) e GSH-CBZ (128).



Esquema II.16. Mecanismos de fragmentação propostos para o aduto GSH-CBZ (128) (*m/z* 558), quando analisado por LC-ESI(+)-MS/MS.

As evidências apresentadas mostram claramente que nas reacções com a CBZ (62) há uma selectividade para nucleófilos de enxofre, ao contrário do que se verifica para as reacções com o EPCBZ (79) (Tabela II.10).

presença de nucleófilos de azoto e enxofre; \checkmark	indica a formação de aduto, ^a Formação de
dois adutos distintos, ^b Formação de um aduto ap	enas.

Tabela II.10. Comparação da reactividade da CBZ (62) e o seu metabolito EPCBZ (79) na

Composto	Nucleófilo	de Enxofre	Nucleófilo de Azoto			
Composto	NAC	GSH	ValOEt	NAL		
CBZ (62)	🗸 a	🗸 a	-	-		
EPCBZ (79)	√ b	✓ b	√ b	√ b		

A ausência da formação de adutos a partir da CBZ (62) com nucleófilos de azoto sugere também a intervenção do grupo tiol (-SH) na formação destes produtos com a CBZ (62). Por outro lado, a presença de diastereómeros distintos nas reacções com a CBZ (62) e EPCBZ (79), indica uma diferença mecanística na formação dos adutos comuns aos dois materiais de partida. O mecanismo envolvido na formação dos adutos GSH-EPCBZ (94) ou NAC-EPCBZ (119) a partir do EPCBZ (79) é facilmente explicado pelo ataque nucleófilo do átomo de enxofre ao anel epóxido e consequente abertura. No entanto, o mesmo já não é tão simples quando se considera a formação dos adutos 94, 119, 127 e 129 a partir da CBZ (62), já que as condições utilizadas são à partida condições não oxidativas.

Deste modo, várias questões se levantam relativamente à formação destes compostos:

- 1. Qual a origem do grupo hidroxilo (-OH) nos adutos formados a partir da CBZ (62)?
- 2. Poderá a reactividade e a selectividade da reacção com a CBZ (62) ser influenciada pelas condições experimentais?
- Qual o mecanismo associado à formação de dois adutos distintos a partir da CBZ (62)?

No sentido de esclarecer estas questões efectuou-se uma série de estudos paralelos, onde se fez variar as condições experimentais até aqui utilizadas. Na literatura não se encontraram descritos casos de inserção de grupos hidroxilo (-OH) a ligações duplas em condições tão suaves como as utilizadas até aqui, o que levanta questões relativamente à fonte de oxigénio. Uma vez que o THF utilizado como solvente poderá ter como contaminantes peróxidos, considerou-se que esta poderia ser uma eventual fonte de oxigénio. Assim, alterou-se o solvente da reacção para

MeCN, com o intuito de esclarecer se a eventual presença vestigial de peróxidos poderia estar a promover a reacção de oxidação. Quando de efectuou a reacção da CBZ (**62**) com a GSH, numa mistura de água e acetonitrilo [H₂O/MeCN (4:1)], sem qualquer controlo da atmosfera do meio reaccional (ensaio 1, Tabela II.11), os adutos GSH-EPCBZ (**94**) e GSH-CBZ (**128**) foram igualmente detectados por LC-ESI(+)-MS, demonstrando que não seria a eventual presença de peróxidos no solvente, a causa da formação destes compostos. Excluída esta primeira hipótese, outras hipóteses foram avançadas para a possível fonte de oxigénio, nomeadamente a água utilizada como solvente ou ainda o oxigénio da atmosfera. Assim, no sentido de testar estas hipóteses foram efectuadas reacções na presença de água marcada com oxigénio-18 (H₂¹⁸O), com e sem controlo da atmosfera (ensaios 2-4, Tabela II.11). Como a mudança de solvente utilizada no ensaio anterior não demonstrou ser relevante em termos de formação de produtos, todos os ensaios realizados com H₂¹⁸O foram analisadas ao fim de 24h de reacção, a 37 °C, por LC-ESI(+)-HRMS.

 Tabela II.11. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de reactividade da CBZ (62) com

 a GSH, na presença de H2¹⁸O. ^a Para este ensaio, o MeCN utilizado foi previamente seco.

Ensaio	CBZ (62) (µmol)	GSH (eq.)	Solvente (4:1)	Atmosfera
1	2.5	50.0	H ₂ O/MeCN	Sem controlo
2	2.5	50.0	H ₂ ¹⁸ O/MeCN	Sem controlo
3	2.5	50.0	H ₂ ¹⁸ O/MeCN ^a	O ₂
4	2.5	50.0	H ₂ ¹⁸ O/MeCN ^a	N_2

A averiguação da contribuição da $H_2^{18}O$ na formação dos adutos GSH-EPCBZ (**94**) e GSH-CBZ (**128**) foi efectuada com base no perfil isotópico obtido, quando a mistura reaccional foi analisada por LC-HRMS/MS-ESI (+). As composições de oxigénio-16 (¹⁶O) e oxigénio-18 (¹⁸O) dos dois adutos foram determinadas com base nas abundâncias relativas dos sinais com as respectivas massas exactas a *m/z* 560.1810 (¹⁶O) ou *m/z* 562.1852 (¹⁸O) para o aduto GSH-EPCBZ (**94**) e *m/z* 558.1653 (¹⁶O) ou *m/z* 560.1696 (¹⁸O) para o aduto GSH-CBZ (**128**). Caso ocorresse uma contribuição exclusiva da $H_2^{18}O$, na inserção do grupo hidroxilo em cada um dos adutos, seria de esperar no espectro de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tandem de alta resolução por ionização de *electrospray* em modo positivo [LC-HRMS-ESI(+)da tradução do inglês *liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry by positive electrospray mode*], um desvio de

duas unidades de massa, no sinal de *m/z* correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ de cada um deles (Figura II.21). Note-se que este desvio não altera a contribuição dos restantes elementos com isótopos abundantes (carbono, enxofre e azoto) e, por isso, a percentagem de abundância relativa dessas contribuições mantêm-se.



Figura II.21. Perfil isotópico e as respectivas abundâncias relativas esperadas para os adutos GSH-EPCBZ (94) e GSH-CBZ (128) sendo a contribuição da H₂¹⁸O na inserção do grupo hidroxilo inexistente (a cinzento) ou exclusiva (a preto).

O perfil isotópico obtido para os dois adutos no ensaio levado a cabo com água não marcada isotopicamente (Ensaio 1, Tabela II.12) está concordante com os valores de percentagem de abundância relativa esperados (~ 10%). Em nenhum dos ensaios efectuados na presença de H₂¹⁸O foi observado a ausência da contribuição da molécula protonada [M+H]⁺ cujo aduto contém ¹⁶O. No entanto, ao comparar as percentagens de abundância relativa dos sinais correspondentes aos dois isótopos, verifica-se uma maior contribuição do isótopo ¹⁸O nos adutos obtidos na presença de H₂¹⁸O (Ensaios 2-4, a negrito na Tabela II.12), relativamente aos adutos obtidos no

ensaio efectuado com água não marcada isotopicamente. Esta alteração indica nitidamente que ocorreu inserção de ¹⁸O em ambos os adutos, **94** e **128**, mas essa inserção não é totalmente devido à H₂¹⁸O, uma vez que existe uma mistura de compostos contendo ¹⁶O e ¹⁸O (Figura II.22). Estes resultados sugerem uma contribuição embora não exclusiva da água utilizada como solvente, indicando que a fonte de oxigénio deverá ter mais do que uma proveniência.

A utilização de um padrão interno (neste caso usou-se a NVP (3)) permitiu realizar uma quantificação relativa do consumo da CBZ (62) nos vários ensaios, assim como da eficiência da reacção na formação dos adutos, GSH-EPCBZ (94), NAC-EPCBZ (119), NAC-CBZ (127) e GSH-CBZ (128). Curiosamente, nos ensaios efectuados com nucleófilos de enxofre, verificou-se que o consumo de 62 nos ensaios conduzidos em atmosfera de O2 era substancialmente mais significativo quando comparado com a mesma reacção efectuada sob atmosfera de N2 (Figura II.23). Estes dados demonstram inequivocamente a intervenção do O2 no mecanismo reaccional envolvido na formação dos adutos a partir da CBZ (62). Para além disso, o facto do consumo de CBZ (62) só se verificar na presença de nucleófilos de enxofre, mais uma vez confirma a interveniência do grupo funcional tiol (-SH) no mecanismo dos respectivos adutos (Figura II.23). Efectivamente, no caso particular da NAC, o consumo de CBZ (62) é de quase 100% ao fim de 24h, na presença de O2, enquanto na reacção com a GSH o consumo é de aprox. 24% (Figura II.23). A mesma variação é observada no que diz respeito à formação dos adutos. Para além da formação dos adutos ser muito mais significativa quando as reacções são efectuadas na presença de O2, os adutos 119 e 127, promovidos pela reacção da CBZ (62) e a NAC, são igualmente formados em maior extensão quando comparados com os homólogos, na presença de GSH (Figura II.23). As diferenças entre as percentagens de consumo da CBZ (62) bem como na formação dos adutos 94, 119, 127 e 128, nas reacções com NAC e GSH poderão eventualmente dever-se ao maior impedimento estereoquímico da molécula de GSH. De salientar ainda, que em todas as situações o isómero syn dos adutos 94 e 119 se forma em todas as reacções, embora em menor quantidade comparativamente ao produto anti de cada um dos adutos.

À luz das evidências até aqui obtidas tentou-se elucidar o mecanismo envolvido na formação dos adutos 94, 119, 127 e 128. Tendo em conta que se obteve uma mistura de isómeros *syn e anti* de 94, nos ensaios efectuados com a CBZ (62), colocou-se a hipótese de se tratar de um mecanismo radicalar. Embora o isómero *syn* não pareça à partida o mais intenso, (provavelmente pela sua formação não ser favorecida devido ao impedimento estereoquímico), a sua formação só é possível considerando um mecanismo radicalar.

130



Figura II.22. Comparação do perfil isotópico obtido para os adutos *anti* GSH-EPCBZ (94) e GSH-CBZ (128) nos ensaios efectuados com a CBZ (62) e GSH, na presença/ausência de H₂¹⁸O (A e B) e controlo da atmosfera do meio reaccional (C e D).

Tabela II.12. Abundâncias relativas (%) dos iões correspondentes à molécula protonada [M+H]⁺ dos adutos GSH-EPCBZ (94) e GSH-CBZ (128), obtidas na análise por LC-ESI(+)-HRMS nos ensaios efectuados para a reacção entre CBZ (62) e a GSH (representada a azul), com H₂¹⁸O e controlo da atmosfera do meio reaccional. (*) valores teóricos de [M+H]⁺ para produtos marcados com ¹⁸O.

Ensaio		H₂O		H ₂ ¹⁸ O		H ₂ ¹⁸ O + O ₂		H ₂ ¹⁸ O + N ₂	
Aduto	<i>m/z</i> teórico	MH ⁺ , <i>m/z</i> sinal mono-isotópico experimental (erro associado, ppm) I Abundância relativa (%))
GS OH	[M+H] ⁺ , 560.1810	560.1815 ± 0.9	100	560.1820 ± 1.8	100	560.1815 ±0.9	100	560.1822 ± 2.1	100
H N CO	[M+H+2]⁺, 562.1823	562.1813 ± 1.8	9	-	-	-	-	-	-
synGSH-EPCBZ (94)	*[M+H]+, 562.1852	-	-	562.1851 ± 0.2	21	562.1846 ±1.1	27	562.1855 ± 0.5	27
$\begin{array}{c} \mathbf{GS} \mathbf{OH} \\ \mathbf{H}_{2N} \mathbf{H}_{2N} \mathbf{H}_{2N} \mathbf{O} \\ \mathbf{anti} \mathbf{GSH} - \mathbf{EPCBZ} (94) \end{array}$	[M+H]⁺, 560.1810	560.1816 ± 1.1	100	560.1811 ± 0.2	100	560.1819 ± 1.1	100	560.1819 ± 1.6	100
	[M+H+2]⁺, 562.1823	562.1827 ± 0.7	8	-	-	-	-	-	-
	*[M+H]+, 562.1852	-	-	562.1853 ± 0.2	22	562.1855 ± 0.5	62	562.1857 ± 0.9	58
GSH-CBZ (128)	[M+H] ⁺ , 558.1653	558.1658 ± 0.9	100	558.1665 ± 2.1	100	558.1665 ± 2.1	100	558.1667 ± 2.5	89
	[M+H+2]⁺, 560.1666	560.1684 ± 3.2	8	-	-	-	-	-	-
	* [M+H]+, 560.1696	-	-	560.1706 ± 1.8	21	560.1706 ± 1.7	84	560.1706 ± 1.8	100



.

Figura II.23. Consumo da CBZ (**62**) na presença dos vários nucleófilos, em atmosfera de O₂ (cinzento escuro) ou N₂ (cinzento claro) e a formação dos adutos GSH-EPCBZ (**94**), NAC-EPCBz (**119**), NAC-CBZ (**127**) e GSH-CBZ (**128**). Todos os ensaios foram efectuados na presença de um padrão interno NVP (**3**) e analisados por LC-ESI(+)-MS às 2h e 24h.

As evidências apontam para que o passo inicial da reacção envolva a formação de um radical ti-ilo (RS[•], Esquema II.17), intermediário na reacção de oxidação da GSH ou NAC. Efectivamente, a existência de oxigénio residual em solução é muitas vezes avançado como responsável pela iniciação de alguns processos radicalares em cadeia, e que ocorrem na ausência de qualquer outro iniciador radicalar [272, 273]. Este dado suporta o facto de, em condições em que se borbulha O₂ na mistura reaccional, a reacção é significativamente mais completa devido a uma maior extensão da reacção para a formação destes radicais iniciadores. De salientar que a metodologia usada na síntese da GSH oxidada à escala industrial é efectuada precisamente fazendo borbulhar O₂ numa solução de GSH reduzida [274, 275].

Os radicais ti-ilo (RS⁻) têm a capacidade de abstrair átomos de hidrogénio (H) de vários sistemas alílicos reversivelmente, bem como de se adicionar a ligações carbono-carbono ou carbono-heteroátomo [273, 276, 277]. Em especial, a adição destes radicais a olefinas é geralmente fácil [273] e envolve a formação de um novo radical centrado num átomo da ligação dupla (Esquema II.17). Este tipo de intermediário radical é consistentemente reportado em reacções de isomerização cistrans de lípidos [277] e alcenos, de uma maneira geral, ou na síntese de polímeros baseada na "click chemistry" [278], por exemplo. Assim, perante a formação do radical RS⁻, a adição deste à ligação dupla C¹⁰-C¹¹ da CBZ (62) deverá promover a formação de um outro radical centrado no carbono C¹¹ de 62 (129, Esquema II.24). Uma vez formado, o radical 129 poderá promover as várias reacções: 1) 129 poderá sofrer dismutação, dando origem ao tiol-eno 130 e ao aduto 131 (Esquema II.17); 2) a formação de 129 deverá implicar a formação do um bis-aduto 132 (Esquema II.17) por reacção radicalar de terminação com um segundo radical RS; e 3) o radical 129, na presença de O₂ poderá dar origem ao radical hidroperóxido 133 (Esquema II.17), de forma análoga ao que acontece nos mecanismos envolvidos nas reacções de peroxidação lipídica [279].



Esquema II.17. Hipótese mecanística para a formação dos adutos GSH-EPCBZ (94), NAC-EPCBZ (119), NAC-CBZ (127) e GSH-CBZ (128) e que envolve a formação do radical ti-ilo, RS' e a sua adição à CBZ (62). A formação de produtos laterais por processos de dismutação e TOCO está também representada. RS representa genericamente os dois nucleófilos de enxofre estudados, NAC e GSH.

A cisão homolítica do intermediário **134** (Esquema II.17) promove a libertação do radical **135** (Esquema II.17) que por redução dará origem aos adutos GSH-EPCBZ (**94**) e NAC-EPCBZ (**119**), já identificados nas misturas reaccionais de **62** com GSH e NAC, respectivamente. A formação do radical **136** (Esquema II.18) a partir destes adutos, centrado no carbono ligado ao grupo hidroxilo, é bastante favorável dado a sua estabilidade. Este, por sua vez, por dismutação, poderá dar origem aos adutos **94**, **119**, **127** e **128**, já identificados. Por outro lado, a formação de **133**, poderá também estar envolvido num processo conhecido por co-oxidação de tiol-olefinas (TOCO da tradução do inglês *Thiololefin cooxidation process*) que leva à formação de um sulfóxido hidroxilado (**137** Esquema II.17). O processo de TOCO foi inicialmente descrito por Kharash e seus colaboradores [280] e envolveu a reacção de olefinas com mercaptanos na presença de O₂, dando origem a uma mistura racemica de compostos do tipo **138** (Esquema II.18). O envolvimento de radicais hidroperóxido na formação de compostos deste tipo foi avançado posteriormente através de estudos mecanísticos [281, 282].



Esquema II.18. Processo de TOCO desenvolvido por Kharash e seus colaboradores [281] para a formação de sulfóxidos hidroxilados (**138**) a partir de olefinas.

Assim, com o intuito de encontrar os intermediários ou produtos laterais que pudessem sustentar a hipótese mecanística avançada, fez-se uma nova procura recorrendo às misturas reaccionais já obtidas. A análise por LC-ESI(+)-HRMS das misturas reaccionais de 62 com a NAC (via a) e a GSH (via b) (Esquema II.19) mostraram a formação dos produtos cujas m/z são compatíveis com a estrutura dos produtos laterais propostos. Os produtos resultantes da dismutação do radical 129a (via a), 130a e 131a bem como o bis-aduto 132a resultante do ataque do radical N-acetil-cisteinilo (CyS⁻, Esquema II.19) com o radical **129a**, foram detectados nas reacções efectuadas na presença de O_2 e N_2 , e apresentam o padrão de fragmentação espectável (Tabela II.13). Embora o intermediário radicalar 129a não tenha sido detectado, a formação dos compostos 130ª, 131a e 132a suporta a teoria da sua formação. Além disso, foi também detectado o produto resultante do processo TOCO 137a (via a) (Esquema II.19) mas apenas na reacção onde se borbulhou O2. À luz do que já foi referido, a formação de 137a implica a formação do intermediário hidroperóxido 133a, Esquema II.19). De modo similar, e como seria de esperar, o mesmo tipo de compostos foi observado na reacção de 62 com a GSH (via b), Esquema II.19), o que indica que seguem a mesma linha mecanística. De facto, a análise por LC-ESI(+)-HRMS(Figura II.24) mostrou sinais de m/z compatíveis com a formação dos produtos **130b** e **131b**, resultantes de dismutação do radical **129b**, o bis-aduto **132b**, resultante da reacção do radical glutationilo com o radical **129b**, e ainda o produto **137b** resultante do processo TOCO. De uma maneira geral, os padrões de fragmentação obtidos (Tabela II.13 e Figura II.24) para os compostos **130b** a **132b** reflectem a quebra da ligação C-S entre a CBZ (**62**) e a GSH mas também a fragmentação característica do tripéptido GSH. De salientar ainda que a fragmentação obtida para o aduto **137b**, com m/z 576, apresenta um sinal a m/z 558, compatível com a perda de uma molécula de água, bem como os fragmentos a m/z 324 e 253, compatíveis com a quebra C-S=O (Figura II.24).



Esquema II.19. Hipótese mecanística para a formação produtos laterais por processos de dismutação e TOCO.
Tabela II.13. Caracterização estrutural efectuada por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(+)-HRMS dos produtos laterais obtidos por reacção da CBZ (62) com os nucleófilos de enxofre (**RS**), NAC (a) e GSH (b).





Figura II.24. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre a CBZ (62) e a GSH, na presença de O₂ (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 542.1715 (A1), *m/z* 544.1874 (A2), *m/z* 849.2542 (A3) e m/z 576.1730 (A4) com os espectros de massa correspondentes aos adutos 130b, 131b, 132b e 137b, respetivamente.

Até aqui a proposta mecanística não explica a incorporação de átomos ¹⁸O, quando a reacção é efectuada na presença de água marcada com este isótopo. No entanto, a possível libertação do radical hidroxilo (HO⁻) (ver Esquema II.19) por cisão homolítica do intermediário **134**, pode promover uma cascata de reacções que dão origem ao radical hidroxilo marcado com oxigénio-18 (H¹⁸O⁻) (Esquema II.20). A presença no meio reaccional de radicais HO⁻ e H¹⁸O⁻ poderá igualmente promover vários tipos compostos: 1) Formação dos compostos **139** e MHD (**105**) (Esquema II.20) por dismutação do intermediário **140** (Esquema II.20), gerado por adição directa do radical hidroxilo à CBZ (**62**); 2) reacção directa com o intermediário **129**, dando origem aos adutos GSH-EPCBZ (**94**) e NAC-EPCBZ (**119**), marcados ou não marcados com ¹⁸O e, consequentemente, aos adutos NAC-CBZ (**127**) e GSH-CBZ (**128**), igualmente marcados com ¹⁸O ou não marcados; e 3) adição do radical às posições aromáticas da CBZ (**62**), com formação de compostos fenólicos (**141**, Esquema II.20).

De forma a comprovar a formação do radical hidroxilo (HO, Esquema II.20) fezse uma nova busca por valores de m/z compatíveis com as moléculas protonadas [M+H]⁺ dos compostos resultantes da dismutação do radical **140** (Esquema II.23). A análise da mistura racional de 62 com GSH, na presença de O2, por LC-ESI(+)-HRMS mostrou a formação dos compostos 139 e MHD (105) (Esquema II.20) pelo aparecimento dos sinais a m/z 253.0978 ± 2.4 ppm e 255.1132 ± 1.6 ppm, correspondentes às moléculas protonadas [M+H]⁺ e a m/z 275.0795 ± 0.4 ppm e 277.0960 ± 2.5 ppm, correspondentes aos adutos sodiados [M+Na]⁺, respectivamente (Figura II.25). O erro associado a estes valores, quando comparado com os respectivos valores de m/z teóricos, está dentro do limite aceitável (Tabela II.14). A confirmação da formação destes compostos resultantes da dismutação do radical 141 foi dada pelo padrão de fragmentação obtido para os iões a m/z 253.0972 e 255.1128, correspondentes às moléculas protonadas [M+H]⁺ dos compostos 139 e 105, respectivamente (Figura II.25 e Tabela II.14). De uma maneira geral foi possível observar os fragmentos correspondentes à perda do grupo -HNCO (43 u) e ao produto de contracção característico do anel iminostilbeno (com *m/z* 180).



Esquema II.20. Proposta mecanística para a intervenção da água na formação dos adutos GSH-EPCBZ (94), NAC-EPCBZ (119), NAC-CBZ (127) e GSH-CBZ (128) e os respectivos adutos marcados com ¹⁸O, 94-¹⁸O, 119-¹⁸O, 127-¹⁸O, 128-¹⁸O, quando a reacção é efectuada em H₂¹⁸O. A formação do radical hidroxilo marcado (⁻¹⁸ OH) e não marcado (⁻OH) promove: (1) a reacção com a CBZ (62) levando à formação dos produtos laterais resultantes da dismutação; (2) a reacção com o intermediário 129 (resultante da adição do radical ti-ilo à ligação dupla de 62) promovendo a formação dos adutos 94, 94-¹⁸O, 119 e 119-¹⁸O e subsequentemente 127, 127-¹⁸O, 128 e 128-¹⁸O; e (3) adição ao anel aromático da CBZ (62) dando origem a compostos fenólicos.



Figura II.25. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre a CBZ (**62**) e a GSH em MeCN/H₂O, na presença de O₂ (**A**) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 253.0972 (**A1**) e *m/z* 255.1128 (**A2**) com os espectros de MS/MS obtidos por LC-ESI(+)-HRMS. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre a CBZ (**62**) e a GSH em MeCN/H₂¹⁸O, na presença de O₂ (**B**) e o cromatograma iónico extraído a *m/z* 253.0972 (**B1**) com o espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(+)-HRMS.

Composto	LC-HRMS-ESI(+), <i>m</i> / <i>z</i> , erro associado (ppm)		
	277. 0953, calculado para [M+Na] ⁺ C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂ , 277.0948(2.5); 255.1132, calculado para [M+H] ⁺ C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂ , 255.1128 (1.6); 180.0804 [208.0739-C <mark>O</mark>] ⁺ (5.0).		
	275.0796, calculado para $[M+Na]^+ C_{15}H_{12}N_2O_2$, 275.0795 (0.4); 253.0972, calculado para $[M+H]^+ C_{15}H_{12}N_2O_2$, 253.0978 (2.4); 208.0752 $[M+H-CONH]^+$, (2.4); 180.0809 $[208.0752-CO]^+$ (2.2).		
H ¹⁸ 0 NH ₂ 139-180	277.0841 calculado para [M+Na] ⁺ C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ¹⁸ O, 277. 0833 (2.9); 255.1014 calculado para [M+H] ⁺ C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ¹⁸ O, 255.1019 (2.0); 210.0804 [M+H-HNCO] ⁺ , (5.2); 180.0808 [210.0804-C ¹⁸ O] ⁺ (5.2).		

Tabela II.14. Caracterização por LC-ESI(+)-HRMS dos produtos obtidos por dismutação da reacção da CBZ (62) com o radical hidroxilo (H¹⁸ O' /HO').

A mesma análise foi efectuada nas reacções realizadas com H₂¹⁸O e controlo da atmosfera do meio reaccional. A $t_{\rm R}$ ~11.0 min, o sinal que anteriormente apresentava um valor de m/z 253.0978±2.4 ppm e 275.0796±0.4 ppm, correspondentes à molécula protonada [M+H]⁺ e ao aduto sodiado [M+Na]⁺ de 139, apresenta uma alteração na sua razão isotópica (Figura II.25). Quando se isolou o extracto a m/z 253.0972, no espectro de LC-HRMS-ESI(+), observou-se que o sinal a m/z 255.1019±2.0 ppm correspondente a [M+2+H]⁺ apresentava um aumento significativo de intensidade (Figura II.25). Este sinal, sendo o correspondente à contribuição do oxigénio-18, mostra que houve incorporação de H¹⁸O' dando origem ao aduto **139** marcado com oxigénio-18 (139-18O). Esta variação foi igualmente observada no valor de molécula sodiada [M+Na]⁺ a *m/z* 277.0833±2.9 ppm obtido (Figura II.25). Estes resultados foram complementados com o padrão de fragmentação obtido, estando de acordo com a estrutura apresentadas para 139-18O. Todos os erros associados estão dentro dos limites aceitáveis para moléculas com peso molecular inferior a 1000 u. De salientar que, apesar dos compostos 105 e 139-¹⁸O apresentarem um valor de m/z muito similar, foi possível distingui-los por LC-ESI(+)-HRMS(Figura II.25).

Para além dos produtos de dismutação foi também possível identificar vários outros sinais (com diferentes t_R 's) e que exibem no espectro de LC-ESI(+)-MS um valor de m/z 253, compatível com a molécula protonada [M+H]⁺ dos produtos resultantes da oxidação da CBZ (62). Independentemente dos mecanismos associados, a oxidação de 62 pode ocorrer em várias posições (Esquema II.21): 1) a oxidação da ligação dupla C¹⁰-C¹¹ poderá dar origem aos compostos OXCBZ (63), EPCBZ (79) ou 139; e 2) a oxidação das posições aromáticas poderá dar origem aos compostos mono-hidroxilados (representados genericamente por 141). Por comparação com padrões obtidos comercialmente [OXCBZ (63) e EPCBZ (79)] e sintéticos [2-OHCBZ (82)] (Figura II.26) parece ocorrer a formação de 63, 79 ou 82. No entanto, com o programa cromatográfico utilizado na análise, não é possível dizer com segurança se todos os compostos se formam.



Esquema II.21. Produtos possíveis de obter pela reacção de oxidação da CBZ (62), exibindo todos um valor de molécula protonada [M+H]⁺ a *m*/z 253.



Figura II.26. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre a mistura de CBZ (62) e a NAC, na presença de O₂ e um padrão interno (**A**) com os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 237 (**A**1) e *m/z* 253 (**A**2), com os respectivos espectros de MS/MS obtidos por LC-ESI(+)-MS. A comparação com os padrões comerciais de OXCBZ (63), EPCBZ (79) e 2-OHCBZ (82) está também representada, com os respectivos espectros MS/MS também obtidos por LC-ESI(+)-MS.

Em estudos efectuados para o tratamento da CBZ (62) enquanto contaminante de águas residuais e potencial agente ecotóxico, este tipo de resultados já havia sido reportado. A degradação de 62 por processos de oxidação avançados que incluem degradação fotocatalítica, irradiação ultravioleta na presença de H₂O₂ ou cloro [283] ou oxidação química com reagente de Fenton [284] promove a formação destas mesmas espécies acima referidas. Em todos estes trabalhos os autores explicam a formação dos compostos OXCBZ (63), EPCBZ (79) e 139 por via radicalar através do intermediário radicalar similar a 147, resultante da reacção da CBZ (62) com o radical hidroxilo (HO⁻). A possível formação do EPCBZ (79) nestas condições reaccionais levantou a questão sobre a possível contribuição de 79 como intermediário para a formação dos adutos NAC-EPCBZ (119), NAC-CBZ (127), GSH-EPCBZ (94), GSH-CBZ (128), por reacção da CBZ (62) com a NAC ou GSH, respectivamente. À partida, o facto de não se detectar nas reacções com CBZ (62), o diol-CBZ (80) proveniente da abertura do epóxido 79, poderá indicar que este intermediário não se forma ou forma-se em quantidades vestigiais. Ainda assim, para investigar esta hipótese, a reacção

entre a CBZ (62) e a GSH foi efectuada na presença de brometo de sódio (NaBr) com o intuito de investigar a possibilidade de ocorrer a abertura do anel epóxido pelo ião brometo. Surpreendentemente, nestas condições, após a análise por LC-ESI(+)-HRMS foi detectado (embora muito pouco intenso) o aduto 10-bromo-11-(yglutamilcisteinilglicina-S-il)-10,11-di-hidro-5H-di-benzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida (GSH/Br-CBZ, 142, Tabela II.15), apresentando no espectro de LC-ESI(+)-HRMS um sinal correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ de 142 com uma distribuição isotópica compatível com a presença de bromo. Efectivamente, a análise por LC-ESI(+)-HRMS mostrou claramente a formação do aduto GSH/Br-CBZ (142) pela existência de dois sinais a m/z 622.0950 e 624.0948, com uma intensidade relativa de 94% e 100%, correspondentes à contribuição dos dois isótopos ⁷⁹Br e ⁸¹Br, respectivamente. Além disso, a análise por LC-ESI(+)-HRMS permitiu também observar os fragmentos a m/z 315.0132 e 317.0104, correspondentes à quebra da ligação C-S da GSH e 62, para os dois isótopos. Mais uma vez o erro associado aos valores de [M+H]⁺ e aos fragmentos obtidos é baixo, estando dentro do erro admitido (Tabela II.15).

Tabela II.15. Caracterização por LC-ESI(+)-HRMS do produto GSH/Br-CBZ (**142**), resultante da reacção entre a CBZ (**62**) e a GSH.

Composto	LC-ESI(+)-HRMS <i>m/z</i> , (erro associado, ppm)		
$HO \\ O HN + NH \\ HI \\ HI \\ O HI \\ O$	624.0948, calculado para [M+H] ⁺ C ₂₅ H ₂₈ ⁸¹ BrN ₅ O ₇ S, 624.0948 (0); 622.0950 calculado para [M+H] ⁺ C ₂₅ H ₂₈ ⁷⁹ BrN ₅ O ₇ S, 622.0966 (2.6); 317.0104 [M+H-GS] ⁺ , (2.8); 315.0132 [M+H-GS] ⁺ , (0.3).		
GSH/Br-CBZ (142)			

Na hipótese do EPCBZ (**79**) não se formar, este resultado levanta uma questão relativamente à proveniência do aduto bromado, GSH/Br-CBZ (**142**). A possibilidade de este poder ser formado a partir de uma reacção de abertura de um intermediário cíclico, do tipo catião ti-iranium, poderá ser questionada. No entanto, não estão reportados na literatura exemplos da formação deste tipo de intermediários nas condições reaccionais utilizadas. Uma hipótese para a formação deste aduto, com base no mecanismo proposto, poderá envolver o ataque nucleófilo do ião brometo ao catião **143** (Esquema II.22), que se forma por libertação do radical anião superóxido, a

partir do intermediário hidroperóxido **133b**. Embora a formação do radical anião superóxido não seja, à partida favorável, a força motora deste passo reside na formação do catião **143**, que é fortemente estabilizado por ressonância (Esquema II.22). De facto estão reportados na literatura alguns exemplos em que se verifica que após a formação de um radical peróxido, a saída do radical na forma de anião superóxido é bastante facilitada pela formação de um carbocatião relativamente estável [285-287].



Esquema II.22. Mecanismo proposto para a formação do aduto bromado, GSH/Br-CBZ (142).

De facto, a formação de um carbocatião deste tipo a partir do intermediário radicalar **140** por reacção com O_2 poderá explicar a formação do eventual aduto *syn* ValOEt-EPCBZ (**124**), referido na secção II.2.1.1 deste capítulo. A formação de um intermediário do tipo **140** a partir do catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**) poderá na presença de O_2 , promover a formação de um carbocatião com carga positiva no carbono C¹¹ (facilmente estabilizada por ressonância). O ataque nucleófilo do azoto daria origem ao aduto **124**. No entanto, a comprovação desta teoria carece de mais ensaios mecanísticos.

Tendo em conta o mecanismo aqui proposto, todas estas recções são passíveis de ocorrer *in vivo*. As implicações em termos de mecanismos de excreção/toxicidade da CBZ (**62**), que poderão decorrer deste tipo de reactividade são imensas. Por um lado, à luz das evidências aqui apresentadas, comprovou-se que a formação dos adutos GSH-EPCBZ (**94**) (já detectado *in vivo*) e NAC-EPCBZ (**119**) pode ocorrer da reacção directa com a CBZ (**62**), sem necessidade de bioactivação. De facto, na ausência de acção enzimática, a reacção destes bionucleófilos com **62** é muito mais favorável do que a reacção de abertura do anel epóxido do metabolito de Fase I, EPCBZ (**79**). Por outro lado, sendo estes adutos de excreção da CBZ (**62**), poderá haver implicações ao nível da biodisponibilidade deste fármaco. De salientar ainda, o facto deste trabalho ter apresentado evidências para uma possível nova via mecanística para a toxicidade da CBZ (**62**). Perante as evidências demonstradas, a modificação de resíduos de cisteínas das proteínas promovida pela CBZ (**62**) poderá não requerer qualquer tipo de bioactivação podendo a CBZ (**62**) reagir directamente

com estes resíduos, *in vivo*, por um mecanismo radicalar, ao contrário do que se tem acreditado até aqui. O mesmo poderá ocorrer com resíduos contendo nucleófilos de azoto, caso ocorra a formação de um intermediário catiónico. A ocorrer, este processo poderá ter uma maior implicação em situações de défice de GSH (onde a destoxificação por via da formação de mercapturatos, não é tão eficaz) e em estados de hiperóxia, onde a maior concentração de oxigénio poderá, como aqui demonstrado, promover uma reacção mais extensa de bionucleófilos de enxofre com a CBZ (62). De salientar que na últimas décadas, o stress oxidativo tem vindo a ser considerado um dos possíveis mecanismos que contribuem para a iniciação e/ou progressão da epilepsia [288, 289] sendo que o equilíbrio e a manutenção da formação das ROS em estados de epileptogénese, fulcral não só como prevenção do dano celular mas também para impedir a progressão da doença. No que diz respeito à CBZ (62), estudos mostraram que de facto a terapia com 62 pode ser associada à indução de distúrbios nos vários sistemas antioxidantes enzimáticos e no aumento da peroxidação lipídica, em doentes em monoterapia [290-292].

II.2.1.4. Reactividade da 2-hidroxi-carbamazepina (82) com aminoácidos.

Tendo em conta o papel da 2-OHCBZ (82) enquanto precursor da formação de espécies reactivas quinóides e os resultados obtidos nos ensaios efectuados com o catalisador de Fe (II) (111), utilizado na oxidação directa da CBZ (62) (ver secção 2.1.2 deste capítulo), decidiu-se testar a reactividade do metabolito 82 na presença de bionucleófilos. Deste modo, procedeu-se à sua síntese utilizando um método modificado do procedimento desenvolvido por Chang [244] para a síntese da 2-OHCBZ (82). A estratégia sintética adoptada (Esquema II.23) envolveu a oxidação do IM (86) com nitrosodissulfonato de potássio ([KSO₃)₂NO], sal de Frémy), dando origem à QI (102), seguido da formação do composto fenólico 2-OHIM (85) por redução com hidrossulfito de sódio (Na₂S₂O₄). De forma a introduzir o grupo carbamoílo na posição 5 (azoto) do anel de IM (86), foi necessário proteger o grupo -OH fenólico. Neste caso usou-se como grupo protector o cloreto de terc-butildimetilsilano (TBDMS-CI da tradução do inglês tert-butyldimethylsilyl chloride) dando origem ao composto 2-(tercbutildimetilsililoxi)-5H-dibenzo [b,f] azepina (2-OTBDMS-IM, 144, Esquema II.23). Todos os compostos foram totalmente caracterizados por NMR e LC-ESI(+)-MS estando de acordo com o reportado na literatura [244, 293]. O mesmo se verificou relativamente aos rendimentos reaccionais. Os últimos dois passos d) e e), (Esquema II.30) da estratégia sintética adoptada diferem do descrito [244]. A introdução do grupo carbamoílo foi efectuada usando o reagente isocianato de clorossulfonilo (CISO₂NCO) dando origem ao produto 2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-5H-dibenzo [b,f] azepina-6carboxamida (2-OTBDMS-CBZ, **145**, Esquema II.23). A sua caracterização foi efectuada por ¹H-NMR onde se verificou essencialmente a presença de sinais a campo alto a 0.99 e 0.22 ppm a integrar para nove e seis protões, respectivamente, indicando a presença do grupo protector. Além disso, verificou-se um singuleto largo a 5.05 ppm a integrar para dois protões correspondentes ao -NH₂ do grupo carbamoílo introduzido. A análise por ¹³C-NMR mostrou ainda a presença de um sinal a 157.3 ppm correspondente ao carbono do grupo carbamoílo. A evidência clara da formação de **145** e da introdução do grupo carbamoílo foi dada por LC-ESI (+)-MS onde foi possível observar um sinal a *m/z* 367 correspondente à suamolécula protonada [M+H]⁺. A análise dos fragmentos obtidos a partir do ião precursor (*m/z* 367) por LC-ESI(+)-MS/MS evidenciou os sinais a *m/z* 350 e 324, compatíveis com a saída de -NH₃ (17 u) e o grupo –HNCO (43 u), respectivamente.

A remoção do grupo protector foi efectuada com fluoreto de tetra-*n*-butilamónio (TBAF), tendo-se obtido a 2-OHCBZ (**82**). A caracterização estrutural total de 2-OHCBZ (**82**) foi efectuada por NMR e LC-ESI(+)-MS e está de acordo com o descrito na literatura [225]. De salientar que comparativamente a 2-OTBDMS-CBZ (**145**), a análise de **82** por ¹H-NMR evidenciou a ausência dos sinais a 0.99 e 0.22 ppm, atribuídos aos grupos metilo do grupo protector TBDMS-CI. Igualmente, a análise por ¹³C-NMR evidenciou a ausência dos sinais a 25.54 e 18.29 ppm, atribuídos aos carbonos do mesmo grupo. Por outro lado, a análise por LC-ESI(+)-MS mostrou um sinal a *m/z* 253 compativel com a molécula protonada [M+H]⁺ de **82** sendo o seu padrão de fragmentação semelhante ao descrito para o EPCBZ (**79**), como seria de esperar.



Esquema II.23. Estratégia de síntese adoptada para a formação do metabolito de Fase I da CBZ (62), 2-OHCBZ (82): a) Sal de Frémy (tampão fosfato 100 mM, pH 7.4), acetona, 16 h

(93%); **b)** Solução aq. sat. Na₂S₂O₄, CHCl₃, 10 min. (90%); **c)** TDBMS-Cl, Et₃N, CH₂Cl₂, 48 h (66%); **d)** 1. CH₂Cl₂ seco, CISO₂NCO,16 h; 2. H₂O, 24 h (43%); **e)** TBAF, THF, 2h (15%).

No sentido de avaliar a possível contribuição de espécies quinóides derivadas dos metabolitos fenólicos da CBZ (62) para as respostas tóxicas associadas aos regimes terapêuticos com este fármaco, investigou-se a oxidação da 2-OHCBZ (82) com Sal de Frémy. Este reagente é frequentemente utilizado na formação de quinonas a partir de derivados fenólicos (Reacção de Teuber) [294-296], mimetizando as oxidações envolvendo apenas um electrão que ocorrem nos processos metabólicos mediados por enzimas, em sistemas biológicos [297]. A reacção foi conduzida a 37 °C, usando um excesso de 1.2 eq. do oxidante relativamente a 82, numa mistura de THF e tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (1:2). Após 30 min., as espécies quinóides geradas *in situ* foram extraídas com diclorometano (2x1 mL), seguido da remoção do solvente orgânico com uma corrente de azoto. Após a redissolução em THF, uma solução de NAC em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (4.0 eq., assumindo que todo o metabolito 82 foi consumido) foi adicionada à mistura e deixou-se incubar por 12 h (Esquema II.24).



Esquema II.24. Esquema reaccional das condições utilizadas para a reacção de oxidação do 2-OHCBZ (82), com sal de Frémy.

Pela análise da mistura reaccional por LC-ESI(+)-MS foi possível observar vários sinais, a $t_{\rm R}$ 11.7, 12.9, 13.1 e 18.3 min., com valor de m/z 414, compatível com a molécula protonada [M+H]⁺ de produtos resultantes da incorporação de NAC a **82** (Figura II.27.A1). A possibilidade de formação de adutos deste tipo é comprovada não só pela existência de vários sinais no espectro de LC-ESI(+)-MS com um valor de m/z 414 mas também pelo facto destes sinais exibirem o mesmo padrão de fragmentação, (Figura II.27.A1), o que indica a semelhança estrutural entre todos eles. Este tipo de produtos pode ser explicados pela formação da quinona-imina **112**, gerada *in situ* pela oxidação da 2-OHCBZ (**82**) com o sal de Frémy (Esquema II.25), seguida de uma adição de Michael. Sendo a NAC um nucleófilo mole, o ataque ao electrófilo ocorre preferencialmente por adição 1,4 de Michael. No caso particular da 2-OHCBZ (**82**) a adição poderá ocorrer nas posições C1, C3 e/ou C4 do anel aromático (a azul,

Esquema II.25). A adição na posição C1 ou C3 de **82** corresponderá a uma adição 1,4 de Michael relativamente ao azoto N5, fortemente favorecida pela estabilização da carga positiva da quinona-imina **112** (Esquema II.25). No entanto, a posição C4 corresponde também a uma adição 1,4 de Michael, relativamente ao oxigénio. Apesar de menos favorável, o produto resultante da adição da NAC ao carbono C4 é também possível. De facto, o produto resultante da adição na posição C1 já havia sido observado nos ensaios efectuados com o catalisador de Fe (II) (**111**), na oxidação directa da CBZ (**62**) aos seus metabolitos. O aduto NAC-OHCBZ (**118**) foi assim obtido pelas duas vias, apresentando o mesmo $t_{\rm R}$ (~18 min.) e o mesmo padrão de fragmentação (Figura II.27.A1).

Surpreendentemente, verificou-se a formação de um outro produto a t_R ~ 16.0 min. cujo valor de m/z 416 é compatível com a molécula protonada [M+H]⁺ do aduto 2-hidroxi-10-(N^{α} -acetil-cisteína-S-il)-10,11-dihidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (10NAC-2OHCBZ, **146**, Esquema II.25), resultante da adição *da* NAC na

ligação dupla C¹⁰-C¹¹ de **82** (Esquema II.25, a laranja). À luz do que foi observado com os ensaios realizados com a CBZ (**62**), a formação do aduto 10NAC-2OHCBZ (**146**) poderá ser explicada por um mecanismo radicalar, que envolve a formação do radical intermediário **147** (Esquema II.25), a partir do radical ti-ilo da NAC por reacção com o oxigénio do ar. Assim, a dismutação do radical intermediário **147** formado, poderá ter promovido a formação dos adutos 10NAC-2OHCBZ (**146**) e **148** (Esquema II.25).



Figura II.27. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de oxidação da 2-OHCBZ (82) com o sal de Frémy, na presença de NAC (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 414 (A1) e m/z 416 (A2) com os espectros de MS/MS (obtidos por LC-ESI(+)-MS) e ainda os extractos a *m/z* 269 (A3) e *m/z* 267 (A4) correspondentes ao metabolito catecol 2,3-OHCBZ (87) e à o-quinona (101), respectivamente; Os mecanismos de fragmentação propostos para o aduto 10NAC-2OHCBZ (146) estão também representados (B).



Esquema II.25. Produtos formados pela oxidação de 2-OHCBZ (82) pelo Sal de Frémy, na presença de NAC.

A formação de 10NAC-2OHCBZ (**146**) foi comprovada por LC-ESI(+)-MS/MS (do ião precursor *m/z* 416) tendo-se verificado o aparecimento dos fragmentos maioritários a *m/z* 398 e 356, correspondentes à saída de água (18 u) e à subsequente perda do grupo $-H_2C_2O$ (42 u) da unidade de NAC. Foram também observados os fragmentos correspondentes à quebra da ligação C-S entre a NAC e **82**, a *m/z* 253 e 164, respectivamente (Figura II.27.A2). De salientar que a formar-se o aduto **148**, resultante da reacção de dismutação do radical **147**, apresentaria um valor de *m/z* 414 correspondente à sua molécula protonada [M+H]⁺. Efectivamente, como já referido, o cromatograma obtido apresenta quatro sinais com *t*_R's distintos para este valor (Figura II.27.A1). Considerando que a reacção por via de adição 1,4 de Michael poderá originar três produtos distintos, o quarto sinal deverá corresponder a **148**. Ainda assim, a falta de padrões sintéticos não permite confirmar esta hipótese.

Dado a capacidade do sal de Frémy gerar *in situ* o catecol 2,3-OHCBZ (**87**) e consequentemente a *o*-quinona (**101**), averiguou-se a existência de valores de m/z cujo valor correspondente à molécula protonada [M+H]⁺, fosse compatível com adutos resultantes da adição da NAC a **101**. No entanto, tal como se verificou nos ensaios preliminares de oxidação da CBZ (**62**) com o catalisador biomimético [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**), apesar de se verificar a formação do catecol 2,3-OHCBZ (**87**) e a *o*-quinona (**101**) (Figura II.27.A3 e Figura II.27.A4), nenhum aduto resultante da adição a esta última foi observado.

A formação dos adutos NAC-OHCBZ (118) e similares comprova que ocorreu a formação da espécie quinóide 112. Embora a formação de adutos com a GSH a partir da QI (102) já tenham sido observados in vivo, a quinona-imina 112 nunca foi considerada como potencial promotora dos eventos tóxicos induzidos pelo AAED 62. Em parte, tal poderá ser explicado pela detecção do aduto 4-metiltio-2-hidroxiiminostilbeno (103) na urina de doentes em terapia com a CBZ (62) [173]. Estes autores defendem a formação de 103 como consequência de uma reacção de adição 1,4 de Michael da GSH com a QI (102), que por sua vez, terá sido originado pela hidrólise da 2-OHCBZ (82). No entanto, nos ensaios realizados para este trabalho, não foram observados quaisquer adutos resultantes da adição da NAC a 102 nem qualquer produto resultante da hidrólise de 2-OHCBZ (82), o que prova que tanto a quinona-imina 112 como os seus produtos de conjugação são estáveis, nas condições testadas. Este resultados, assim como os resultados obtidos por oxidação da CBZ (62) com o catalisador de Fe(II) (111) demonstram que a quinona-imina 112 poderá formarse in vivo e tem a capacidade de reagir com bionucleófilos, não podendo ser descartada como um factor relevante para a indução das IDRs associadas à CBZ (62).

II.2.1.5. Reactividade do 9-acridina-carboxaldeído (88) com aminoácidos

Os aldeídos são espécies com um tempo de vida curto, *in vivo*. Esta característica torna estas espécies extremamente difíceis de detectar e consequentemente, de estabelecer correlações directas entre os seus níveis no organismo e a indução de eventos tóxicos. No entanto, tal como outros electrófilos reactivos, os aldeídos podem ligar-se covalentemente com biomacromoléculas formando adutos covalentes, podendo desta forma ser quantificados. Tipicamente, os aldeídos têm a capacidade de reagir com aminas dando origem a bases de Schiff. Deste modo, decidiu-se avaliar a reactividade com o grupo α-amino da valina com este metabolito da CBZ (**62**). Assim começou-se por sintetizar o 9-AL (**88**) a partir do IM (**86**) de acordo com a metodologia descrita por Kawashima e Ishiguro [298], usando *m*-CPBA como oxidante (Esquema II.26). O 9-AL (**88**) e o sub-produto *N*-óxido-acridina-9-carboxaldeído (O-9-AL, **151**, Esquema II.33) obtido foram totalmente caracterizados por NMR e LC-ESI(+)-MS estando de acordo com o descrito na literatura [298].



Esquema II.26. Condições de oxidação do IM (86) utilizadas para a formação do metabolito da CBZ (62), 9-AL (88) e o produto lateral O-9-AL (151).

As condições utilizadas para a avaliação da reactividade do 9-AL (88) com o valinato de etilo e as condições utilizadas encontram-se descritas na Tabela II.16.

Tabela II.16. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre 9-AL (**88**) e ValOEt, na presença de redutor (NaBH₃CN).

Ensaio	9-AL (88) (eq.)	ValOEt (eq.)	Tempo de reacção (h) para a adição do NaBH₃CN (eq.)
1	1.0	4.0	1 h, 1.0 eq.
2	1.0	4.0	24 h, 1.0 eq.
3	1.0	4.0	-

Todos os ensaios foram efectuados na presença de 9-AL (**88**) (1.0 eq.) em THF e ValOEt (4.0 eq.), em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4. Foi adicionado NaBH₃CN (1.0 eq.) após 1 h (Ensaio 1, Tabela II.16) ou 24 h (Ensaio 2, Tabela II.16) do início da reacção. Após a adição do redutor, os ensaios foram deixados em agitação a 37 °C por mais 12 h. As misturas reaccionais foram seguidas por HPLC-DAD tendo-se verificado nos dois ensaios, o consumo total do 9-AL (**88**) bem como a formação de vários produtos (Figura II.28).



Figura II.28. Cromatograma HPLC-DAD da mistura reaccional correspondente reacção do 9-AL (88) com o ValOEt, na presença de redutor aos tempos de 1h (a preto) e 24h (a cinzento). O cromatograma HPLC-DAD do padrão, 9-AL (88) encontra-se também representado (a laranja).

A análise por LC-ESI(+)-MS de ambos os ensaios mostrou que o produto a $t_{\rm R}$ ~20 min. apresenta um valor de m/z 337, compatível com a molécula protonada [M+H]+ do aduto 9-metil-(valinato de etilo- N^{α} -il)-acridina (VALOEt-9-AL-1,**152**, Figura II.29.A1), resultante da formação de uma base de Schiff entre o aldeído **88** e a α -amina do ValOEt, seguido da estabilização da imina formada por redução. No entanto, apesar de a análise por LC-ESI(+)-MS ter evidenciado a formação de **152** em ambos os ensaios, pela análise por HPLC-DAD verifica-se que a formação do aduto VALOEt-9-AL-1 (**152**) é menor, quando se adiciona o redutor após 24h de reacção. Esta diminuição é acompanhada da formação de vários compostos a $t_{\rm R}$ superiores a 25 min.. Embora esta diminuição possa ser explicada pela degradação do metabolito 9-AL (**88**) ou do próprio aduto **152**, não foi possível identificar estes produtos de degradação.

Perante estas evidências promoveu-se a reacção de acordo com o Ensaio 1 (Tabela II.16) em maior escala. A mistura reaccional foi purificada por HPLC semipreparativo tendo-se isolado o produto a $t_{\rm R}$ ~20 min.. O espectro de ¹H-NMR da fracção isolada é compatível com uma mistura de dois compostos (Figura II.30.A). Assim, tentou-se separar esta mistura por c.c.f.p. de alumina [*n*-hexano/AcEt (9:1)]. Apesar de terem espectros de ¹H-RMN distintos, a análise das duas fracções por LC-ESI(+)-MS mostrou um mesmo sinal (com igual t_R) com um valor de m/z 337. O padrão de fragmentação para ambas as fracções, obtido por LC-ESI(+)-MS/MS é semelhante e apresenta os sinais a m/z 180 e 208, correspondentes à quebra das ligações -C-N-C- entre o metabolito **88** e ValOEt. Outros fragmentos com m/z 265 e 291, correspondentes a quebras de ligações do aminoácido contendo o metabolito, foram também observadas. Desta forma, perante estas evidências concluiu-se tratar-se de do aduto VALOEt-9-AL-1 (**152**) e do aduto VALOEt-9-AL-2 (Figura II.30.B2, **153**)

A confirmação da formação destes dois compostos foi obtida por ¹H-NMR (Figura II.30.B.1 e Figura II.30.B.2). Nos espectros de ¹H-RMN de ambas as formas foi possível observar os sinais correspondentes aos oito protões aromáticos do anel da acridina (~ 8.5-7.5 ppm), o multipleto correspondente aos protões -CH₂ do grupo etilo (~4.3 ppm) e ainda os sinais correspondentes aos grupos -CH₃ do grupo isoproprilo (~ 1.0 ppm) e grupo etilo (~1.4-1.2 ppm) do ValOEt. No caso particular de **152** (Figura II.30.B1) destaca-se o conjunto de dois dupletos, a integrar para um protão cada, no intervalo 4.78-4-61 ppm. Estes dois sinais, correspondentes aos dois protões C¹¹H, apresentam correlações no espectro de HMBC, com os carbonos C^{2^r} (68.1 ppm) do ValOEt e ainda com os carbonos quaternários ArC⁹ (143.4 ppm), ArC^{1a} e ArC^{8a} (126.3 ppm). Por outro lado, o aduto ValOEt-9-AL-2, **153** (Figura II.30.B2) não apresenta os sinais e correlações no espectro de HMBC com os carbonos C^{2^r} (81.7 ppm) do ValOEt e ainda com o carbono quaternário C⁹ (136.9 ppm). Este sinal é compatível com um protão de uma imina.

Embora minoritário, o que impossibilitou, à partida o seu isolamento, na análise por LC-ESI(+)-MS da mistura correspondente ao ensaio 1 (Tabela II.16) foi evidenciada a formação de um outro aduto cujo valor de m/z 339 é compatível com a molécula protonada [M+H]⁺ do aduto 9,10-dihidrometil-9-(valinato de etilo- N^{a} -il)-acridina (VALOEt-9-AL-3, **154**, Figura II.29.A2). A comprovação da formação deste aduto foi dada por LC-ESI(+)-MS/MS do ião precursor m/z 339, pelo aparecimento do sinal m/z 194 correspondente à saída do ValOEt.

A explicação para a formação do aduto **154** poderá ser dada primeiramente pela formação do aduto ValOEt-9-AL-1 (**152**), a partir da imina **153** formada entre o 9-AL (**88**) e o ValOEt (Esquema II.27) seguido da sua estabilização por redução com o NaBH₃CN. De salientar que o aduto ValOEt-9-AL-1 (**152**) apresenta um grupo imina na sua estrutura (a azul, no Esquema II.27). A presença de um excesso de redutor, e em específico o NaBH₃CN, poderá ter promovido uma segunda redução, dando origem ao aduto ValOEt-9-AL-3 (**154**) (Esquema II.27).



Figura II.29. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção do metabolito 9-AL (88) com ValOEt, na presença de NaBH₃CN (adicionado ao fim de 1h) (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 337 (A1) e m/z 339 (A2), correspondentes aos adutos ValOEt-9AL-1 (152) e ValOEt-9AL-3 (154), respectivamente e os espectros de MS/MS (obtidos por LC-ESI(+)-MS);Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção do metabolito 9-AL (88) com ValOEt, na ausência de NaBH₃CN (B) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 337 (B1) (correspondente à mistura tautomérica dos adutos ValOEt-9AL-1 (152) e *m/z* 339 (B2) com a evidência da ausência de formação do aduto ValOEt-9AL-3 (154).



Figura II.30. Comparação dos espectros de ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) da mistura reaccional entre o 9-AL(88) e o ValOEt (**A**) e os adutos ValOEt-9AL-1 (**152**) (**B1**, 500 MHz, acetona-*d*₆) e ValOEt-9AL-2 (**153**) (**B2**, 500 MHz, CDCl₃). Os espectros de HMBC para cada uma das formas ValOEt-9AL-1 (**152**) (**C1**, 500 MHz, acetona-*d*₆) e ValOEt-9AL-2 (**153**) (**C2**, 500 MHz, CDCl₃) estão também representados.

ppm

9.3

9.6

9.5 9.4

ppm



Esquema II.27. Hipótese mecanística proposta para a formação dos vários adutos, entre o aldeído 88 e o ValOEt.

II.3. Estudo reactividade da oxcarbazepina (63) e dos seus metabolitos reactivos com aminoácidos

II.3.1. Hipóteses de trabalho: possíveis mecanismos de bioactivação da oxcarbazepina (63)

Como já referido no capítulo I, secção 2.1.2., uma das vias metabólicas consideradas para a OXCBZ (63) corresponde às reacções de conjugação de Fase II do enol resultante do equilíbrio ceto-enólico de 63, dando origem aos metabolitos *O*-glucurónido (106) e *O*-sulfonado (107) (Esquema II.28). Embora a forma enólica nunca tenha sido detectada, ambos os metabolitos de Fase II, 106 e 107, foram detectados na urina de doentes tratados com OXCBZ (63) [230]. Considerada a via metabólica principal, a OXCBZ (63) é reduzida pela acção da aril-cetona-redutase ao derivado mono-hidroxilado, MHD (105). Este, por sua vez, pode originar três outras vias minoritárias [232] (Esquema II.28): 1) oxidação da posição C-11 do anel iminoestilbeno da OXCBZ (63) dando origem ao diol-CBZ (80), metabolito comum ao AAED CBZ (62); 2) oxidação das posições aromáticas dando origem a compostos do tipo 108 (Esquema II.28); e 3) conjugação com o ácido glucurónico dando origem ao MHD-*O*-glucorónido (109).



Esquema II.28. Metabolismo proposto para a OXCBZ (63).

Para além da semelhança estrutural entre os dois AAEDs em estudo, CBZ (62) e OXCBZ (63), ambos estão associados a IDRs do mesmo tipo, nomeadamente reacções de hipersensibilidade. No entanto, e no que diz respeito à OXCBZ (63), esses efeitos têm uma incidência menor apresentando-se menos severos. Talvez por isso se possa explicar a quase inexistência de estudos relativos ao papel da bioactivação de 63 associados à indução de toxicidade por este AAED.

Do ponto de vista estrutural, a OXCBZ (63) apresenta um grupo carbonilo na forma de cetona, na posição C-10 do anel iminoestilbeno. Embora menos reactivo que um aldeído, este tipo de grupo funcional poderá ser considerado reactivo, podendo reagir com bionucleófilos de azoto formando bases de Schiff. Assim, devido à presença desta cetona, a OXCBZ (63) poderá reagir directamente com bionucleófilos de azoto sem necessitar de bioactivação, dando origem a uma base de Schiff (Esquema II.29). Por outro lado, e apesar da escassa informação acerca das vias de conjugação por sulfonação, para além da já mencionada, é possível que a acção das SULTs actue sobre o MHD (105) dando origem ao metabolito MHD-SO₃⁻ (110) (Esquema II.29). Embora os mecanismos de conjugação estejam associados aos processos de destoxificação de xenobióticos [16], muitos compostos podem ser biotransformados a metabolitos reactivos por via da *O*-sulfonação [299]. Neste caso

específico do grupo sulfato, o facto de constituir um bom grupo de saída, poderá originar uma quebra heterolítica que poderá resultar na formação de um carbocatião (Esquema II.29) que está estabilizado por conjugação [299].



Esquema II.29. Mecanismo de bioactivação proposto para a OXCBZ (63).

Este tipo de mecanismo de bioactivação já foi reportado por exemplo para o BaP (**50**), em modelos animais [239]. O metabolismo de Fase I deste composto aromático conduz à formação de álcoois secundários benzílicos que uma vez formados podem dar origem a ésteres do ácido sulfúrico por via da O-sulfonação. Estes autores defendem que a mutagénese e a carcinogénese associada ao BaP (**50**) poderá também estar relacionada com a formação destes metabolitos sulfonados, que podem gerar espécies electrófilas reactivas com a capacidade de reagir com o DNA. No caso particular da OXCBZ (**63**), o metabolito MHD (**105**) constituiu um álcool benzílico secundário, tal como está evidenciado no Esquema II.29, a negrito. De forma análoga, a possível formação do MHD-SO₃⁻ (**110**) poderá levar à formação de adutos covalentes do tipo **156** (Esquema II.29). Este mecanismo poderá constituir uma via molecular plausível para justificar as reacções de hipersensibilidade, como o SJS e TEN associados a este AAED. De facto, a presença das SULTs na pele corrobora a possibilidade deste mecanismo de bioactivação ocorrer neste órgão podendo estar implicado neste tipo de reacções [16].

Mais uma vez, tendo em conta a falta de informação sobre esta matéria, e de forma a compreender o papel da bioactivação metabólica da OXCBZ (**63**), tentou-se obter os padrões sintéticos, quer dos metabolitos quer dos possíveis adutos formados entre **63** ou os seus metabolitos reactivos com bionucleófilos.

II.3.1.1. Reactividade da oxcarbazepina (63) com aminoácidos

A síntese da OXCBZ (**63**) foi efectuada de acordo com a estratégia sintética descrita por Dominguez e colaboradores [300] (Esquema II.30). Embora existam várias estratégias sintéticas descritas na literatura, a maioria é baseada em transformações do IM (**86**) ou de **86** reduzido na ligação dupla C¹⁰-C¹¹, que envolve uma sequência de reacções de oxidação e redução em condições críticas. No entanto, esta estratégia permite, com cinco passos sintéticos e condições bastante suaves, obter **63** a partir da 2'-aminoacetofenona (**157**, Esquema II.30) e o 1,2-dibromobenzeno (**158**, Esquema II.30) através de acoplamentos C-C ou C-N por reacções do tipo Buchwald-Hartwig. Para além da síntese da OXCBZ (**63**), o objectivo secundário era também usar a mesma via sintética para obter derivados hidroxilados da OXCBZ (**63**) em posições aromáticos, que posteriormente poderão dar origem aos metabolitos do tipo **108** por redução da cetona em C-10 (Esquema II.28). No entanto, por limitações de tempo esta via não foi posteriormente testada.

A preparação da OXCBZ (63) iniciou-se com a protecção da 2'aminoacetofenona (157) com cloreto de 4-toluenossulfonilo (TsCl) em CH₂Cl₂, na presença de piridina. Ao produto *N*-(*p*-tosilo)-2'-aminoacetofenona (159, Esquema II.30) formado foi adicionado 1,2-dibromobenzeno (158), na presença do catalisador acetato de paládio (II) [Pd(OAc)₂] e o ligando xantphos (4,5-bis(difenilfosfino)-9,9dimetilxanteno), em refluxo, promovendo o acoplamento C-C. Após a remoção do grupo protector da 2-(2-bromofenilo)-1-[2-*N*-(4-metilbenzeno sulfonamida) fenil] etanona (160, Esquema II.30) por hidrólise ácida com ácido sulfúrico, ao produto 1-(2aminofenil)-2-(2-bromofenil) etanona (161, Esquema II.30) juntou-se o catalisador Pd(OAc)₂ com o ligando BINAP (2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binafteno) em refluxo de tolueno, promovendo o acoplamento C-N intermolecular dando origem a 10,11-dihidro-5*H*-dibenzo [*b*,*f*]azepina-10-ona (162, Esquema II.30). A introdução do grupo carbamoílo para a formação da OXCBZ (63) foi conseguida adicionado a 162, o isocianato de clorossulfonilo (CISO₂NCO) em atmosfera inerte.



Esquema II.30. Preparação dos precursores e síntese da OXCBZ (**63**); Reagentes e condições: **a**) TsCl, py, CH₂Cl₂,16h (47%); **b**) 1,2-dibromobenzeno (**158**), Pd (OAc)₂, Xantphos, Cs₂CO₃, tolueno/H₂O, refluxo, 72h (71%); **c**) H₂SO₄ conc., 16h (89%); **d**) Pd (OAc)₂, BINAP, K₃PO₄, tolueno/H₂O, refluxo, refluxo, 24h (85%); **e**) 1. CISO₂NCO, CH₂Cl₂ seco, 16h; 2. H₂O, rt, 24h (13%).

Todos os compostos foram caracterizados por ¹H-NMR, ¹³C-NMR e LC-ESI(+)-MS estando de acordo com o descrito na literatura. De destacar que a formação da OXCBZ (63) foi comprovada pelo aparecimento no espectro de ¹H-NMR de vários sinais: 1) no intervalo de 8.10-7.31 ppm vários sinais, a integrar para oito protões, compatíveis com os oito protões aromáticos de 63; 2) um singuleto largo a 4.93 ppm, a integrar para dois protões, correspondente ao grupo -NH₂ do grupo carbamoílo introduzido. Além disso, no espectro de ¹³C-NMR, o aparecimento de dois sinais a 191.3 e 155.8 ppm compatíveis com os dois grupos carbonilo a C10 e C12, respectivamente. As restantes atribuições foram efectuadas com base nas experiencias bidimensionais de HSQC e HMBC. A confirmação da formação da OXCBZ (63) foi obtida ainda por LC-ESI(+)-MS pelo aparecimento do sinal a m/z 253 correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ de 63. Quando analisado por LC-ESI(+)-MS/MS, este ião deu origem a vários fragmentos compatíveis com a estrutura atribuída: 1) a m/z 236 correspondente à saída de -NH₃; 2) a m/z 210 correspondente à saída de -HNCO; e 3) a m/z 180 correspondente à saída de H₂CO- por contracção do anel de sete membros do anel iminostilbeno de 63. De salientar que estes mecanismos de fragmentação são semelhante aos observados para o EPCBZ (79) e 2-OHCBZ (82). Os dados físicos e espectroscópicos da OXCBZ (63) encontram-se na Tabela II.17.

O rendimento global desta via sintética foi de apenas 1%, bastante baixo comparativamente ao reportado (~ 43%). Tal dever-se-á essencialmente ao facto de não se terem mantido todas as condições anidras necessárias para a eficiência destas reacções.

Composto	$ \begin{array}{c} $
η (%)	13
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	8.10 (1H, dd, <i>J</i> =8.0, 1.6, ArC ¹ <u>H</u>), 7.66 (1H, dd, <i>J</i> =8.0, 1.0, ArC ⁹ <u>H</u>), 7.60-7.58 (1H, m, ArC ³ <u>H</u>), 7.51-7.48 (1H, m, ArC ⁴ <u>H</u>), 7.40-7.37 (1H, m, ArC ⁶ <u>H</u>), 7.37-7.31 (3H, m, ArC ² <u>H</u> , ArC ⁷ <u>H</u> e ArC ⁸ <u>H</u>), 4.93 (2H, sl, N <u>H</u>), 4.45 (1H, d, <i>J</i> =16.0, C ¹¹ <u>H</u> _a), 3.84 (1H, d, <i>J</i> =16.0, C ¹ⁱ <u>H</u> _b)
¹³ C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)	191.9 (C ¹⁰ =O), 155.8 (C ¹² =O), 143.2 (ArC ^{4a}), 141.5 (ArC ^{9a}), 134.2 (ArC ^{1a}), 138.1 (ArC ³), 130.8 (ArC ¹), 130.4 (ArC ⁶), 130.1 (ArC ^{6a}), 129.5 (ArC ⁹), 129.2 (ArC ²), 128.9 (ArC ⁸), 127.9 (ArC ⁴), 127.5 (ArC ⁷), 49.2 (C ¹⁰)
MS-ESI (+) , <i>m/z</i>	253 [M+H]⁺, 236 [M-NH₃]⁺, 210 [M+H-HNCO]⁺, 180 [210-H₂CO]⁺.

Tabela II.17. Caracterização estrutural obtida por NMR e MS para a OXCBZ (63) sintetizada.

O passo seguinte envolveu o estudo da reactividade da OXCBZ (63) com aminoácidos que possuem na sua cadeia lateral grupos nucleófilos capazes de reagir com o 63 por via da formação de bases de Schiff. Para tal, os aminoácidos escolhidos foram o ValOEt e a NAL, por mimetizarem os grupos *N*-amina terminal da Hb e os grupos laterais das lisinas, respectivamente. Perante as dificuldades sentidas na obtenção da OXCBZ (63) por via sintética e, muito embora as limitações encontradas fossem à partida contornáveis, devido ao tempo dispensado para esta via e o custo associado, decidiu-se usar OXCBZ (63) comercial.

A síntese dos adutos covalentes a partir da OXCBZ (**63**) envolveu a utilização de um excesso de 4.0 eq. de aminoácido dissolvido numa solução 50 mM de tampão fosfato, pH 7.4 (Tabela II.18). No caso particular do aminoácido ValOEt, a solução foi previamente tratada com K₂CO₃ (4.0 eq.). A solução da OXCBZ (**63**) (1.0 eq) em DMF foi depois adicionada lentamente, às soluções anteriormente preparadas, e deixadas

reagir, a 37 °C. Nos Ensaios 1 e 2 (Tabela II.18) retiraram-se aliquotas da mistura reaccional principal, a tempos destintos (0.5, 1, 2 e 24 h) e que foram analisadas por HPLC-DAD e LC-ESI(+)-MS. Nos Ensaios 3 e 4 (Tabela II.18) foram igualmente retiradas aliquotas aos mesmos tempos acima mencionados, às quais se adicionou o redutor NaBH₃CN e deixaram-se incubar a 37 °C por mais 24 h. Tal como nos Ensaios 1 e 2, todas as misturas reaccionais foram monitorizadas por HPLC-DAD e analisadas por LC-ESI(+)-MS. De forma a facilitar a identificação dos adutos formados, foram ainda efectuados ensaios controlo contendo todos os reagentes (com excepção dos aminoácidos), tendo sido submetidas às mesmas condições experimentais (Ensaios em Branco 1 e 2 Tabela II.18).

Tabela II.18. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre a OXCBZ (**63**) e os aminoácidos ValOEt ou NAL, na presença ou ausência de redutor (NaBH₃CN).

Ensaio	Aminoácido (4.0 eq.)	Solvente (1.0 mL)	NaBH₃CN (eq.)
1	valinato de etilo	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-
3	N ^a -acetil-lisina	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-
3	valinato de etilo	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0
7	N ^a -acetil-lisina	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0
Branco 1	-	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-
Branco 2	-	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0

Na análise das misturas reaccionais aos quatro tempos estudados correspondentes ao Ensaio 3 (Tabela II.18) observou-se a formação de dois adutos distintos (Figura II.31.A). A análise por LC-ESI (+)-MS mostrou dois sinais a $t_R \sim 17$ e 29 min.. O primeiro sinal apresenta um valor de *m/z* 382, correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ do aduto 10-(valinato de etilo-*N*-il)-10,11-dihidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-OXCBZ, **163**, Esquema II.31), resultante da reacção entre a OXCBZ (**63**) e o valinato de etilo, via base de Schiff. A amina formada foi estabilizada pela redução com NaBH₃CN dando origem ao aduto ValOEt-OXCBZ (**163**).



Esquema II.31. Formação do aduto ValOEt-OXCBZ (163), a partir da OXCBZ (62).

A formação do aduto ValOEt-OXCBZ (**163**) foi comprovada pela análise de LC-ESI(+)-MS/MS do ião a m/z 382 correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ de **163**, com o aparecimento dos fragmentos maioritários m/z 308 e 180 correspondentes à saída do grupo -H₂C₂O do aminoácido e o produto resultante da contracção do anel de sete membros do anel iminoestilbeno de **63**, após a quebra do grupo -CONH e a saída do aminoácido, respectivamente. A confirmação da posição do aminoácido foi dada pela observação dos fragmentos maioritários m/z 237 e 146 correspondentes à cisão C-N entre **63** e o ValOEt (Figura II.31.A1).

O aduto que eluiu a $t_R \sim 29$ min. apresenta um valor de *m/z* 380, compatível com a molécula protonada [M+H]⁺ do um aduto com menos duas unidades de massa comparativamente ao aduto **163**. De igual modo, a análise por LC-ESI(+)-MS/MS do ião precursor *m/z* 380 permitiu observar fragmentos com menos duas unidades de massa, comparativamente aos fragmentos observados para o aduto ValOEt-OXCBZ (**163**), o que envidência por si só uma semelhança estrutural entre os dois produtos. Estes resultados permitiram concluir que este aduto corresponde ao 10-(valinato de etilo-*N*-il)-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-CBZ, **164**, Figura II.31.A2).

Embora a detecção de ambos os adutos se tenha verificado a partir dos 30 min. de reacção, o tempo máximo de 2 h parece corresponder ao tempo de incubação óptimo para a formação máxima dos dois adutos, não havendo diferenças significativas ao fim de 24 h. Quando a mesma análise foi efectuada para as misturas do Ensaio 1 (Tabela II.18) na ausência de redutor, não se verificou a formação do aduto ValOEt-OXCBZ (**163**), como seria de esperar. No entanto, a formação do aduto ValOEt-CBZ (**164**) foi observada. A formação deste aduto, que na realidade corresponde a uma enamina, pode ser explicada pela formação do ião iminium **165** (Esquema II.32) sendo que a *driving force* para a formação deste produto é a formação da enamina e o consequente estabelecimento de aromaticidade no anel de iminoestilbeno (Esquema II.31).







Figura II.31. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção da OXCBZ (**63**) com ValOEt, na presença de NaBH₃CN (adicionado ao fim de 1 h) (**A**) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 382 (**A1**) e m/z 380 (**A2**), correspondentes aos adutos ValOEt-OXCBZ (**163**) e ValOEt-CBZ (**164**), respectivamente com os espectros de MS/MS obtidos por LC-ESI(+)-MS; Cromatograma iónicos extraídos a: *m/z* 382 (**B1**) correspondente à reacção do metabolito OXCBZ (**63**) com ValOEt, na ausência de NaBH₃CN (**B**) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 382 (**B1**) correspondente ao aduto ValOEt-CBZ (**164**) e *m/z* 380 (**B2**) (com a evidência da ausência de formação do aduto ValOEt-OXCBZ (**163**).

Os resultados obtidos para os ensaios efectuados com o aminoácido ValOEt foram reproduzidos nos ensaios efectuados com a NAL, tendo-se obtido os adutos análogos $10-(N^{\alpha}-acetil-lisina-N-il)-10,11-dihidro-5H-di-benzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida (NAL-OXCBZ,$ **166** $, Tabela II.19) e <math>10-(N^{\alpha}-acetil-lisina-N-il)-5H$ -di-benzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida (NAL-CBZ, **167**, Tabela II.19), nas mesmas condições.

A caracterização estrutural dos adutos obtidos a partir da OXCBZ (63) com os nucleófilos de azoto pode ser observada na Tabela II.19. A formação destes adutos é aqui descrita pela primeira vez, demonstrando a capacidade da OXCBZ (63) reagir com bionucleófilos, em particular bionucleófilos de azoto, sem qualquer necessidade de bioactivação prévia, podendo estar na génese da toxicidade associada a 63.

Tabela II.19. Caracterização estrutural obtida por LC- ESI(+)-MS dos adutos resultantes da reacção entre a OXCBZ (**63**) e os nucleófilos de azoto, ValOEt e NAL (representados a azul, como ValOEt ou NAL, respectivamente).

Composto	MS-ESI (+), <i>m/z</i>			
$(V_{A}) = (V_{A})^{O} + (V_{$	382 [M+H] ⁺ , 365 [M-NH ₃] ⁺ , 339 [M+H-HNCO] ⁺ , 308 [M+H- CO ₂ CH ₂ CH ₃] ⁺ , 237 [M+H-ValOEt] ⁺ , 194 [M+H-CONH-ValOEt] ⁺ , 146 [ValOEt+H] ⁺ .			
HN HN O NH ₂ ValOEt-CBZ (164)	380 [M+H] ⁺ , 363 [M-NH ₃] ⁺ , 337 [M+H-HNCO] ⁺ , 306 [M+H- CO ₂ CH ₂ CH ₃] ⁺ , 235 [M+H-ValOEt] ⁺ , 192 [M+H-HNCO-ValOEt] ⁺ , 146 [ValOEt+H] ⁺ .			
HO HNH ₂ HN O NH ₂ NAL-OXCBZ (166)	425 [M+H] ⁺ , 383 [M+H-COCH ₃] ⁺ , 382 [M+H-HNCO] ⁺ , 253 [M+H- C ₇ H ₁₄ O ₃ N] ⁺ , 237 [M+H-NAL] ⁺ , 189 [NAL+H] ⁺ , 194 [M+H-HNCO- NAL] ⁺ .			
HO HN HN NH ₂ NH ₂ NAL-CBZ (167)	423 [M+H] ⁺ , 381 [M+H-COCH ₃] ⁺ , 380 [M+H- HNCO] ⁺ , 318 [M+H- C ₃ H ₅ O ₃ N] ⁺ , 252 [M+H-C ₇ H ₁₄ O ₃ N] ⁺ , 235 [M+H-NAL] ⁺ , 189 [NAL+H] ⁺ , 192 [M+H-HNCO-NAL] ⁺ .			

II.3.1.2. Reactividade do derivado da oxcarbazepina (63), 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepina-5-carboxamida, MHD-SO₃ (110) com aminoácidos

Tendo em conta as evidências já discutidas na secção II.3.1.1. deste capítulo, decidiu-se testar a reactividade da espécie reactiva plausível, MHD-SO₃- (**110**). Primeiramente, promoveu-se a síntese do MHD (**105**) a partir da OXCBZ (**63**) usando um método descrito na literatura [301] e que consistiu numa simples redução com boro-hidreto de sódio (NaBH₄), seguida de uma precipitação em água fria. O produto resultante foi totalmente caracterizado por NMR e LC-ESI(+)-MS estando de acordo com o descrito na literatura para **105** [301].

De modo análogo ao que já havia sido feito no grupo de trabalho [36, 37] para avaliar a reactividade do metabolito da NVP (**3**), 12-sulfoxi-nevirapina (12OSO₃⁻- NVP, **26**), com biomoléculas, tentou-se preparar um modelo sintético electrófilo mesilado no grupo hidroxilo, (10OMs-MHD, **168**, Esquema II.33). A utilização deste modelo sintético conferia, à partida, uma maior estabilidade em solução aquosa em comparação com o análogo sulfonado **110** sendo também a sua síntese relativamente fácil em condições suaves. Além disso, é esperado que este derivado mesilado tenha uma reactividade semelhante a **110** devido à sua semelhança do ponto de vista químico. Assim, começou-se por tentar promover a formação do composto **168**, através da reacção entre o MHD (**105**) e cloreto de metanossulfonilo (MsCI) na presença de uma quantidade equimolar de trietilamina (Et₃N) (Tabela II.20).

Ensaio	Solvente	Base (eq.)	MsCl (eq.)	Tempo de reacção (h)
1	THF	Et ₃ N (1.2)	4.8	16
2ª	THF	Et₃N (1.2)	1.2	0.3
3ª	THF	Et ₃ N (1.2)	1.2	24
4	THF	-	1.2	1
5	THF	NaHCO₃ (1.2)	1.2	1
6	piridina	piridina (12) ^b	5.0	0.5

Tabela II.20. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre a OXCBZ (63) e MsCI para a tentativa de formação do modelo sintético electrófilo mesilado 10OMs-MHD (168).

^aNeste ensaio, a Et₃N e o MsCl foram usados foram previamente seco e destilado, respectivamente, de acordo com os procedimentos descritos. ^bA piridina foi usada também como solvente.

No Ensaio 1 (Tabela II.20), a reacção foi deixada reagir por 16 h e após extracção com CH_2CI_2 foi purificada por c.c.f.p [*n*-hexano/AcEt (1:1)]. Surpreendentemente, o produto maioritário obtido ao ser analisado por ¹H-NMR apresentava os desvios químicos correspondentes à CBZ (**62**), tendo esta sido isolada com um rendimento de 62%. A reacção de mesilação levada a cabo no Ensaio 1 (Tabela II.20) entre o MHD (**105**) e o MsCI resultou essencialmente num produto de eliminação que coincidentemente corresponde à CBZ (**62**) (Esquema II.33).



Esquema II.33. Formação do produto de eliminação (maioritário) correspondente à CBZ (62), a partir da reacção de mesilação do MHD (102).

Nos Ensaios 2 e 3 (Tabela II.20), foi efectuada a mesma reacção mas utilizando THF anidro e o MsCI previamente purificado. Ambas as reacções foram seguidas por HPLC-DAD analítico tendo-se verificado apenas o aparecimento de um sinal correspondente à CBZ (**62**), por comparação com um padrão comercial. Ainda assim, as misturas reaccionais foram analisadas por LC-ESI(+)-MS, não se observando qualquer sinal correspondente à formação do produto pretendido (m/z 333). Posteriormente foram testadas outras condições, nomeadamente modificando a base (Ensaios 4, 5 e 6, Tabela II.20) e o solvente (Ensaio 6, Tabela II.20) utilizados. No entanto, a análise por HPLC-DAD analítico mostrou igualmente apenas a formação de CBZ (**62**).

A dificuldade sentida na tentativa da preparação do modelo sintético electrófilo mesilado, 10OMs-MHD (**168**) levou-nos a abandonar esta abordagem e desta forma tentar sintetizar o MHD-SO₃⁻ (**110**). A síntese de **110** foi promovida segundo um método descrito na literatura [302] e que envolveu a reacção do MHD (**105**) com o complexo de trióxido de enxofre e piridina (Py.SO₃), em piridina anidra. A análise desta mistura reaccional por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por *electrospray em modo negativo* (LC-ESI(-)-MS por tradução do inglês *Liquid Chromatography Electrospray Ionization in negative mode Mass Spectrometry*) permitiu confirmar que o sinal a t_R ~16 min. correspondia ao produto 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b*,*f*]azepina-5-carboxamida (MHD-SO₃⁻, **110**) pretendido e onde se

verificou um sinal a m/z 333 correspondente à molécula desprotonada [M-H]⁻ de **110**. A análise dos fragmentos obtidos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tandem com ionização por *electrospray* em modo negativo (LC-ESI(-)-MS/MS por tradução do inglês Liquid Chromatography Electrospray ionization Tandem Mass Spectrometry in positive mode) levou à formação dos fragmentos a m/z 290 e 97 que são compatíveis com a saída do grupo –HNCO (43 u) e do ião hidrogenosulfato (-⁻ OSO₃H), respectivamente.

O passo seguinte envolveu o estudo da reactividade do MHD-SO₃ (110) com aminoácidos que possuem na sua cadeia lateral grupos nucleófilos, com o objectivo de investigar os que poderão reagir com 110 através de uma reacção de substituição nucleófila (S_N), com saída do grupo -SO4⁻. Os aminoácidos escolhidos foram mais uma vez o ValOEt, a NAL e a NAC. A tentativa de síntese dos adutos covalentes de 110 com aminoácidos nucleófilos envolveu a preparação de uma solução do aminoácido (4.0 eq.) em água, à qual se adicionou uma solução do MHD-SO₃- (110) (1.0 eq) em DMF. As misturas reaccionais foram incubadas, a 37 °C por 72 h e seguidas por HPLC-DAD analítico ao longo deste período. A comparação com o ensaio em branco não mostrou a formação de nenhum sinal compatível com um produto novo. Ainda assim, todas as misturas foram analisadas por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(-)-MS. Nos ensaios efectuados na presença de nucleófilos de azoto não se verificou a formação de qualquer aduto (Figura II.34) tendo-se observado apenas a formação de CBZ (62) e o MHD (105) (resultante da hidrólise de 110) (Figura II.34). No ensaio efectuado na presença de NAC foi possível identificar um sinal compatível com a formação do aduto 10-(N^a-acetil-cisteína-N-il)-10,11-dihidro-5H-di-benzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida (**131a**, Figura II.35) a $t_{\rm R}$ ~18 min., já identificado na reacção directa da CBZ (**62**) com NAC, apresentando o mesmo $t_{\rm R}$ e padrão de fragmentação.

Uma vez que a formação da CBZ (62) foi observada nestes ensaios, decidiu-se assim testar a reacção com a NAC mas promovendo a reação com o MHD-SO₃⁻ (110) gerado *in situ* a partir do MHD (105), de forma a tentar minimizar a formação do produto de eliminação 62 e aumentar a formação do aduto pretendido. Assim, 30 min. após o inicio da reacção entre o MHD (105) (1.0 eq.) e o Py.SO₃ em DMF a 40 °C, foi adicionada uma solução de NAC (4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4. A mistura reaccional foi analisada por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI (-)-MS (Figura II.36) tendo-se identificado igualmente o aduto 131a e diminuição da formação de 62. No entanto esta diminuição foi acompanhada da formação dos adutos NAC-EPCBZ (119) e NAC-CBZ (127) (Figura II.36). Tal como discutido na secção II.2.1.2. deste capítulo, a formação destes dois adutos deve-se à reacção da CBZ (62) com NAC, promovida pela presença de oxigénio e água. Tal deverá significar que apesar de ter ocorrido


uma aparente diminuição da formação de **62**, esta deve-se essencialmente à reacção com NAC.

Figura II.32. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre MHD-SO₃⁻ (**108**) e NAL (**A**) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 333 (-) (**A1**), *m/z* 237 (**A2**) e *m/z* 255 (**A3**), com os espctros de MS/MS correspondentes ao metabolito MHD-SO₃⁻ (**110**), a CBZ (**62**) e o metabolito MHD (**105**), respectivamente (obtidos por LC-ESI(+)-MS). A ausência de formação do aduto correspondente à reacção de **110** com a NAL foi comprovada pela inexistência de sinais no cromatograma iónico extraído a *m/z* 425 (**A4**).



Figura II.33. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre MHD-SO₃⁻ (110) e NAC (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 255 (A1), *m/z* 237 (A2) e *m/z* 400 (A3) com os espectros de MS/MS (obtidos por LC-ESI(+)-MS), correspondentes ao metabolito MHD-SO₃⁻ (110), a CBZ (62) e ao aduto 131a, respectivamente. Os mecanismos de fragmentação propostos para o aduto 131a estão também representado (B).



Figura II.34. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre MHD (**105**) e SO₃.Py, na presença da NAC (**A**) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 237 (**A1**), *m/z* 400 (**A2**), *m/z* 414 (**A3**) e *m/z* 416 (**A4**) e os espectros de MS/MS (obtidos por LC-ESI(+)-MS) correspondentes a CBZ (**62**) e aos adutos NAC-OXCBZ (**131a**), NAC-CBZ (**127**) e NAC-EPCBZ (**119**), respectivamente.

A avaliação da formação da CBZ (62) e do MHD-SO₃⁻ (110) enquanto produtos do metabolismo da OXCBZ (63) nunca foi efectuada. À luz dos resultados obtidos nos ensaios efectuados, a formação de 62 a partir do metabolito hipotético MHD-SO₃⁻ (110) parece ser bastante plausível. Assim, tendo em conta a dificuldade de detecção de metabolitos sulfonados *in vivo*, a detecção da formação da CBZ (62) poderá constituir um indicador da formação de 110. De facto, os trabalhos de Breton e colaboradores [155] demonstraram a formação de CBZ (62) em doentes em terapia com 63. Num estudo em que se pretendia desenvolver um método cromatográfico baseado em LC-MS, para a detecção de todos os metabolitos da OXCBZ (63), foi efectuada a análise de plasma de quinze doentes em terapia com OXCBZ (63). Embora com valores abaixo do limite de quantificação, a CBZ (62) foi detectada em

todos os doentes avaliados. Além disso, foi também detectado o metabolito 3-OHCBZ (**83**), um metabolito de **62**, em três dos doentes testados, numa concentração de 0.023-0.03 mg/L. Estes resultados, embora não valorizados por estes autores, fundamentam em certa medida, a possibilidade de formação do metabolito sulfonado MHD-SO₃⁻ (**110**) em alguns doentes. Este facto poderá ainda justificar a semelhança de IDRs induzidas pelos dois AAEDs em estudo.

Numa tentativa de encontrar evidências deste mecanismo promoveu-se uma serie de ensaios usando um sistema mais biomimético.

II.3.1.3. Formação de metabolitos reactivos da oxcarbazepina (63) num sistema metabolicamente competente

Foram efectuadas incubações de OXCBZ (**63**) com a fracção sub-celular S9 de fígado de rato ou humano (S9 mix) na presença de co-factores de Fase I e Fase II, NADPH (com o respectivo sistema de regeneração) e o PAPS, respectivamente. Como controlo positivo foram efectuadas incubações nas mesmas condições substituindo **63** por NVP (**3**). A escolha deste fármaco como controlo positivo deveu-se ao facto do grupo de trabalho ter um vasto conhecimento no comportamento metabólico de **3** e da existência de padrões sintéticos dos metabolitos e adutos formados. Numa tentativa de armadilhar os metabolitos electrófilos formados nestas incubações foi adicionada GSH. Paralelamente, foram também efectuadas ensaios em branco na ausência dos fármacos e co-factores e ainda usando o S9 mix desnaturado. Todas as misturas foram incubadas a 37 °C durante 24 h e efectuadas em duplicado. Aos tempos de 1, 3, 6 e 24 h foram recolhidas aliquotas às quais se adicionou acetonitrilo frio de forma a terminar a acção metabólica. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e analisado por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(-)-MS.

Esta análise mostrou claramente a formação do metabolito de Fase I maioritário da OXCBZ (**63**), MHD (**105**) tendo sido identificado a $t_{\rm R} \sim 16$ min. com um sinal a m/z 255 correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ deste metabolito (Figura II.37). A análise por LC-ESI (+)-MS/MS deste ião mostrou os fragmentos a m/z 237 e 194 correspondentes à saída de uma molécula de água e de -HNCO (Figura II.37), compatível com **105**. De salientar que, especificamente nos ensaios efectuados com a fracção S9 de fígado humano, a formação do MHD (**105**) é significativamente mais lenta quando comparado com os ensaios efectuados com a fracção S9 de fígado a sua formação apenas a partir das 3 h de incubação.

Neste estudo foi ainda possível observar a formação de dois sinais a $t_R \sim 19$ e 22 min. que apresentam um valor de *m/z* 271 (Figura II.37) compatível com um

produto resultante da oxidação do MHD (**105**), na medida em que apresenta um incremento de 18 u, relativamente a **105**. A fragmentação obtida por LC-ESI(+)-MS/MS para os dois sinais confirma a formação destes dois produtos, resultantes da oxidação de **105**, pelo aparecimento do fragmento a *m/z* 253 correspondente à saída de uma molécula de água (18 u), a partir da molécula protonada [M+H]⁺ destes metabolitos. No entanto, a mesma análise não permite confirmar a posição da oxidação. Este resultado não é de estranhar tendo em conta que o metabolismo da OXCBZ (**63**) envolve a formação dos metabolitos minoritários, como o diol-CBZ (**80**) e **108** resultantes da oxidação do MHD (**105**) (ver Esquema II.28). Assim, é possível afirmar com alguma segurança que os dois produtos obtidos a *t*_R ~19 e 22 min. deverão corresponder aos produtos resultantes da oxidação do MHD (**105**) na posição C-11 e/ou em qualquer posição do anel aromático. Tendo em conta este resultado, procurou-se ainda produtos compatíveis com uma segunda oxidação do MHD (**105**) mas não foram encontradas evidências da sua formação.



Figura II.35. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à incubação da fracção S9 de fígado de rato na presença de OXCBZ (63) e cofactores de Fase I e II (24 h) (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 253 (A1), m/z 255 (A2), *m/z* 271 (A3) e *m/z* 331 (-) (A4) com os espectros de MS/MS (obtidos por LC-ESI(+)-MS) correspondentes à OXCBZ (63), os metabolitos de Fase I, MHD (105), diol-CBZ (80) e 108 e ainda o metabolito de Fase II, O-Sulfonado (107), respectivamente.

Quando se procurou produtos compatíveis com os metabolitos de Fase II, resultantes da sulfonação de 63, foi possível observar claramente a formação do derivado sulfonado 107. Este produto é resultante da sulfonação do produto enólico resultante do equilíbrio ceto-enólico da OXCBZ (63) (Esquema II.34) apresentando um sinal a m/z 331 correspondente à sua molécula desprotonada [M-H]⁻, quando analisado por LC-ESI(-). A análise por LC-ESI(-)-MS/MS (Figura II.37.A3) deste ião a mostrou os fragmentos m/z 288 e 97, compatíveis com a saída do grupo -HNCO e -HSO₄, respectivamente. Verifica-se ainda um fragmento a m/z 208, correspondente à quebra dos dois grupos mencionados anteriormente. Tal como observado para os metabolitos de Fase I, a formação de 107 na incubação de 63 com a fracção S9 de fígado de humano, é significativamente mais lenta quando comparada com a formação do mesmo produto na fracção S9 de fígado de rato. No entanto, o metabolito 110, resultante da sulfonação do MHD (105) ou a formação da CBZ (62), resultante da eliminação do grupo sulfato, não foram observados em nenhum dos ensaios efectuados. Igualmente, o aduto 169 (Esquema II.34), resultante da reacção hipotética entre 110 e GSH também não foi observado. Estes resultados indicam que não ocorreu sulfonação do MHD (110) nos sistemas utilizados. No entanto, tal poderá dever-se à ausência de isoformas de SULTs adequadas à sulfonação deste metabolito.

Tendo em conta que o metabolito maioritário da NVP (3), a 12OHNVP (20), é também proveniente de uma hidroxilação benzílica (estruturalmente similar ao MHD (105)) que é sulfonada in vivo [40], resolveu-se incubar 3, nas mesmas condições utilizadas nas incubações da OXCBZ (63), de forma a clarificar esta dúvida relativamente à existência de isoformas adequadas para a sulfonação de metabolitos com grupos hidroxilo em posição benzílica. Na verdade, muito embora se tivesse evidência da formação por LC-ESI(+)-MS da formação do metabolito 12-OHNVP (20) (por comparação com o padrão sintético) (Figura II.38), o único metabolito sulfonado identificado nas incubações com NVP (3) provinha de uma sulfonação de um metabolito fenólico. A análise por LC-ESI(-)-MS/MS do ião m/z 361 (Figura II.38.A4), compatível com a molécula desprotonada [M-H]⁻ de um produto resultante da sulfonação de um metabolito mono-hidroxilado de 3 (representado por 170 na Figura II.38.A4), levou à formação de um fragmento que comprova esta conclusão: o fragmento a m/z 281 (Figura II.38.A4) correspondente à perda de 80 u a partir da molécula desprotonada [M-H], que é característica de conjugados sulfatados aromáticos [303]. Efectivamente, os produtos de sulfonação em posições benzílicas tendem a fragmentar na ligação C-O, perdendo HSO4⁻ (97 u) [40] ou o radical anião SO_4 (96 u), quando analisados por ESI(-). Mais tarde no grupo de trabalho, a 12OHNVP (**20**) foi incubada nas mesmas condições e não se observou qualquer evidência para a formação de derivado sulfonado de **20**.

À luz destas evidências poder-se-á dizer que as fracções S9 de fígado utilizadas não possuem as isoformas adequadas para a sulfonação tanto do MHD (105) como da 12-OHNVP (20). No entanto, tendo em conta que a 12-SO₃-NVP (26) se forma *in vivo*, este resultado não exclui a possibilidade de 105 ser sulfonado *in vivo*. Efectivamente, a identificação da CBZ (62) em doentes sob terapêutica com OXCBZ (63), suporta por si só a ocorrência desta via *in vivo*.



Esquema II.34. Resumo dos resultados obtidos por incubação da OXCBZ (**63**) na fracção S9 do fígado humano ou de rato: Formação do metabolito de Fase II, **107**, a partir do produto enólico, resultante do equilíbrio ceto-enólico da OXCBZ (**63**). O metabolito resultante da sulfonação do MHD, **110**, o aduto **169**, resultante da reacção da GSH com MHD-SO₃⁻ (**110**), bem como a CBZ (**62**) não foram observados nas condições de incubação utilizadas.



Figura II.36. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à incubação de NVP (3) na fracção S9 de fígado de rato na presença de cofactores de Fase I e II (24 h) (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 267 (A1), *m/z* 283 (A2), padrão do 12-OHNVP(20) a *m/z* 283 (A3) e *m/z* 362 (A4) (com o espectro de MS/MS, obtido por LC-ESI(-)-MS) correspondentes à NVP (3), aos metabolitos de Fase I hidroxilados e ainda o metabolito de Fase II sulfonado 170, respectivamente

II.4. Estudo da reactividade da carbamazepina (62), oxcarbazepina (63) e dos respectivos metabolitos reactivos com proteínas e DNA II.4.1. Reactividade com a hemoglobina

Como já referido no Capitulo I, a valina *N*-terminal da Hb é considerada um centro reactivo primário para várias classes de electrófilos. Para além da grande acessibilidade deste resíduo às diferentes espécies reactivas electrófilas, esta valina terminal tem a particularidade de ter o seu grupo amina numa forma não ionizada, a pH fisiológico, apresentando assim um carácter nucleófilo [19].

A degradação química com base no procedimento de Edman permite que os adutos formados entre a valina *N*-terminal da Hb e a espécie electrófila (representados no Esquema II.35 por **53**) sejam selectivamente destacados da proteína, tornando desta forma a sua detecção e caracterização mais fácil. O método baseia-se no uso de um agente derivatizante, um derivado do isotiocianato (**54**), dando origem a um derivado da hidantoína (Aduto de Edman, **55**) (Esquema II.35) [92, 93]. O mecanismo geral envolvido no destacamento do aduto de Edman (**55**) encontra-se descrito no Esquema II.42 e envolve o ataque nucleófilo do azoto da valina *N*-terminal ao carbono de **54**, na presença de uma base, seguido da ciclização num anel de cinco membros. Os sucessivos passos de aquecimento promovem a formação do derivado de hidantoína **55** e consequentemente a libertação da proteína.

Na literatura não existe qualquer referência sobre a reactividade da Hb e os dois fármacos em estudo ou qualquer um dos seus derivados reactivos. Assim, e tendo em conta os adutos obtidos nos ensaios anteriores com o aminoácido ValOEt e os derivados oxidados da CBZ (62), EPCBZ (79) e 9-AL (88), e a OXCBZ (63), decidiu-se testar a reactividade da Hb com as mesmas espécies electrófilas. Embora existam vários procedimentos de Edman descritos na literatura, neste trabalho foram usados dois procedimentos distintos em que se utiliza o PITC como agente derivatizante. O primeiro método (Método I) envolve o uso de DMF como solvente e uma solução aquosa de NaOH 1M como base enquanto que o segundo método (Método II) envolve o uso de uma mistura de água/2-propanol 40% e acetato de potássio (CH₃CO₂K) como solvente e base.



Esquema II.35. Destacamento do aduto com a valina *N*-terminal da Hb (**53**) através da degradação de Edman, com recurso ao agente derivatizante isotiocianato (**54**). O Electrófilo está representado por **RX**, a azul).

Todos os adutos de Edman padrão foram obtidos previamente, a partir dos adutos obtidos entre o ValOEt e as espécies reactivas mencionadas. As condições utilizadas para a formação destes adutos, a partir das espécies reactivas consideradas, encontram-se na Tabela II.23. A caracterização estrutural de todos os adutos de Edman padrão formados encontra-se descrita na Tabela II.24, estando de acordo com as estruturas apresentadas.

Ensaio	Material de Partida	Redutor*	Método(s)	Formação de adutos
1	CBZ (62)	NaBH₃CN	I	1
2	EPCBZ (79)	-	lell	1
3	9-AL (88)	NaBH₃CN	П	✓
4	OXCBZ (63)	NaBH₃CN	l e ll	✓

Tabela II.21. Condições reaccionais usadas para a formação dos adutos de Edman padrão.

* Sempre que se promoveu a reacção na presença de redutor foi igualmente efectuada a reacção na ausência do mesmo. Método I – Solvente: DMF, Base: NaOH; Método II – Solvente: água/2-propanol (40%), Base: CH₃CO₂K. **Tabela II.22.** Caracterização estrutural dos adutos de Edman padrão obtidos. *Os adutos foram gerados por reacção inicial do ValOEt com espécies reactivas geradas por oxidação da CBZ (62) com H₂O₂, na presença do catalisador de [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (111) e posteriormente submetidos às condições de degradação; **Apenas o aduto 171 foi obtido a partir do material de partida.



Embora não se tenha verificado diferenças significativas na formação dos adutos de Edman, nos dois procedimentos usados, em trabalhos anteriores foi constatado que a degradação de Edman em amostras biológicas efectuadas pelo Método I, a presença de vestígios de DMF diminui significativamente a intensidade dos sinais de MS. Ainda assim, com excepção da CBZ (62) e do 9-AL (88), fez-se a avaliação da formação dos adutos de Edman utilizando os dois métodos.

Os adutos formados entre o ValOEt e as espécies reactivas geradas a partir da CBZ (62), por oxidação com o catalisador de Fe (II) (111) na presença de H_2O_2 foram submetidos ao procedimento de Edman (Método I) (Ensaio 1, Tabela II.24). Após o tratamento da mistura reaccional e subsequente análise por LC-ESI(+)-MS (Figura II.39) foi possível observar dois sinais a m/z 487 e 485 cujos valores de molécula protonada [M+H]⁺ são compatíveis com os adutos de Edman originados a partir dos adutos ValOEt-EPCBZ (124) e ValOEt-OHCBZ (125) respectivamente.

A confirmação de que se trata de 10-(1-feniltiohidantoína- N^{α} -il)-11-hidroxi-10,11di-hidro-5H-di-benzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-EPCBZ-Ed-1, 171, Tabela II.24) foi possivel pela observação de um sinal com o mesmo $t_{\rm R}$ guando igual procedimento foi aplicado à reacção entre o EPCBZ (79) e o ValOEt (Ensaio 2, Tabela II.24). Para além do mesmo $t_{\rm R}$, o padrão de fragmentação obtido por LC-ESI(+)-MS/MS é também semelhante (Figura II.39.A1 e Figura II.39.B1), comprovando a formação de 171 a partir do aduto ValOEt-EPCBZ (124) (resultante da abertura do anel epóxido por ataque nucleófilo do ValOEt). Relativamente ao sinal a m/z 485 tratase do aduto 10-(1-feniltiohidantoína-N^a-il)-11-hidroxi-10,11-di-hidro-5H-di-benzo-[b,f]azepina-5-carboxamida (ValOEt-CBZ-Ed-2, 172, Tabela II.24) originado a partir do aduto ValOEt-OHCBZ (125), resultante da adição do ValOEt numa posição aromática do anel de iminoestilbeno da CBZ (62). A comprovação da formação do aduto ValOEt-EPCBZ-Ed-2 (172) foi dada pela análise por LC-ESI(+)-MS/MS do ião precursor a m/z 485 (Figura II.39.A2), pelo aparecimento do fragmento a m/z 467 correspondente à saída de uma molécula de água. Foi possível ainda observar o fragmento m/z 251 correspondente à perda da hidantoína e também o fragmento m/z 208, típico da fragmentação da CBZ (62) substituída em posições aromáticas e correspondente à quebra da hidantoína e do grupo -HNCO.



Figura II.37. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção dos produtos obtidos na oxidação da CBZ (**62**) com o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**) na presença de H₂O₂, e ValOEt, seguida da degradação de Edman pelo Método I (**A**) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 487 (**A1**) e *m/z* 485 (**A2**) com os espectros de MS/MS (obtidos por LC-ESI(+)-MS), correspondentes aos adutos de Edman ValOEt-EPCBZ-Ed1(**171**) e ValOEt-CBZ-Ed2 (**172**), respectivamente; Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção do metabolito EPCBZ (**79**) com ValOEt seguida da degradação de Edman pelo Método I (**B**) e o cromatograma iónico extraído a *m/z* 487 (**B1**) com o espectro de MS/MS (obtido por LC-ESI(+)) correspondente ao aduto de Edman ValOEt-EPCBZ-Ed1 (**171**).

O EPCBZ (**79**), OXCBZ (**63**) e o 9-AL (**88**) foram incubados com a Hb comercial, numa proporção proteína:electrófilo de 1:1 (m/m) numa mistura de tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 e o solvente orgânico adequado (Tabela II.25). Quando necessário foi adicionada à mistura reaccional NaBH₃CN para a estabilização das bases de Schiff formadas entre o resíduo da valina *N*-terminal e as espécies reactivas. Após 48 h de incubação, todas as misturas foram submetidas aos procedimentos de Edman descritos na Tabela II.25

Ensaio	Electrófilo	Redutor	Método(s)	Formação de adutos
1	EPCBZ (79)	-	Ι	1
2	EPCBZ (79)	-	II	✓
3	9-AL (88)	NaBH₃CN	II	1
4	9-AL (88)	-	II	Х
5	OXCBZ (63)	NaBH₃CN	I	Х
6	OXCBZ (63)	-	I	Х
7	OXCBZ (63)	NaBH₃CN	II	х
8	OXCBZ (63)	-	II	Х

Tabela II.23. Condições reaccionais usadas no destacamento da valina *N*-terminal Hb do adutos de Edman formados formados após modificação desta proteína com vários electrófilos.

Método I – PITC + Solvente: DMF, Base: NaOH; **Método II** – PITC + Solvente: água/2-propanol (40%), Base: CH₃CO₂K.

Verificou-se que os metabolitos EPCBZ (**79**) e o 9-AL (**88**) formaram os respectivos adutos de Edman com a valina *N*-terminal da Hb, sendo que este último apenas se verificou quando se adicionou o redutor, à mistura reaccional. No entanto, para a OXCBZ (**63**) não se obteve evidências claras da formação de algum aduto de Edman. A análise das misturas reaccionais finais foi efectuada por LC-ESI(+)-MS e pela comparação com os $t_{\rm R}$ e padrões de fragmentação obtidos para os respectivos adutos de Edman padrão. Na Figura II.40 é possível verificar a análise por LC-ESI(+)-MS da mistura reaccional do Ensaio 3 (Tabela II.25), onde se verifica a $t_{\rm R} \sim 35$ min. um sinal a m/z 426, compatível com a molécula protonada [M+H]⁺ do aduto 9-metil-(1-feniltiohidantoína-*N*^a-il)-acridina (ValOEt-9-AL-Ed1, **173**). Embora o $t_{\rm R}$ tenha um ligeiro

desvio (cerca de 3 min.), quando comparado com o t_R do aduto Edman padrão, o padrão de fragmentação obtido por LC-ESI(+)-MS/MS de ambos é semelhante.

Para além dos adutos ValOEt-EPCBZ-Ed-1 (171) e ValOEt-9-AL-Ed1 (173) formados, foi observado o produto resultante do destacamento da valina *N*-terminal não modificada (originando o derivado da hidantoína não modificado com electrófilo) (feniltiohidantoína 55, Figura II.40). Este produto poderá funcionar como controlo da eficiência do procedimento de Edman e, no caso particular dos dois procedimentos adoptados (que envolveram o uso do agente derivatizante PITC), terá um valor de *m/z* 235. Curiosamente, quando se procurou por este produto na reacção que envolveu a incubação da Hb com a OXCBZ (63) seguida do tratamento para a formação do aduto de Edman, não foi encontrado. Este resultado, para além de indicar a baixa eficácia dos procedimentos de Edman adoptados para este ensaio em particular, não permite afirmar que não poderá ocorrer a formação de um aduto covalente entre 63 e a valina *N*-terminal da Hb.



Figura II.38. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de incubação do metabolito 9-AL (88) com a Hb, seguida do tratamento da mistura com o método II do procedimento de Edman (A) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 235 (A1) e *m/z* 426 (A2) com os espectros de MS/MS (obtidos por LC-ESI(+)-MS), correspondentes à hidantoína (55) e ao aduto de Edman ValOEt-9-AL-Ed1 (173), respectivamente. A comparação do aduto 173 obtido por reacção do 9-AL (88) com a Hb com o aduto padrão está também representada.

II.4.2. Reactividade com a albumina do soro humano

Como já referido no Capítulo I, a HSA é uma das proteínas usadas como modelo para a identificação de adutos covalentes de xenobióticos com macromoléculas [32, 79-83]. A HSA apresenta vários resíduos cujas cadeias laterais são nucleofílicas, como a histidina (His), a lisina (Lys), a arginina (Arg), a glutamina (Gln), a cisteína (Cys), o triptofano (Trp) e a serina (Ser). De salientar que apesar de existirem 35 resíduos de Cys, 34 formam 17 pontes de dissulfeto (ou dissulfureto) intramoleculares e conferem estabilidade à proteína. Apenas existe um resíduo de Cys na posição 34 (Cys34) na sua forma livre [79]. Este resíduo tem uma elevada capacidade nucleofílica, na medida em que se encontra na forma de tiolato devido à sua proximidade com três resíduos ionizáveis [a His39, Tyr84 e o ácido aspártico 38 (Asp38)]. Este facto torna este resíduo altamente reactivo a pH fisiológico e especialmente predisposto a reagir com eletrófilos [79].

A sequência de aminoácidos de uma proteína é única. Assim, a determinação das sequências de proteínas permite identificar proteínas ou modificações específicas das mesmas. Os processos de fragmentação de MS são actualmente bastante usados para a determinação destas sequências. Em particular, os processos de baixa energia favorecem a quebra das ligações peptídicas, nomeadamente na ligação entre o azoto do grupo amina e o carbono do grupo carbonilo da cadeia principal do aminoácido [304]. Os fragmentos resultantes, denominados iões fragmento b e y (nomenclatura Roepstorff) [305] apresentam um *C*- terminal e *N*-terminal catiónicos, respectivamente (Figura II.41). Fragmentações de outras ligações no péptido podem gerar outro tipo de espécies a (e x) ou c (e z) [304].



Figura II.39. Representação da fragmentação de um péptido quando analisado por MS/MS, evidenciando a fragmentação na ligação peptídica dando origem aos iões fragmento **b**₂ e **y**₃.

Tendo em conta os resultados obtidos nos estudos de reactividade da CBZ (62), OXCBZ (63) e os respectivos metabolitos reactivos, decidiu-se promover a reacção destes com a HSA. O esperado seria obter adutos do EPCBZ (79), 9-AL (88), OXCBZ (63) com resíduos contendo nas cadeias laterais nucleófilos de azoto bem como adutos de EPCBZ (79), 2-OHCBZ (82) e MHD-SO₃⁻ (108) com a Cys34. Assim, começou-se por incubar a HSA comercial com todos os electrófilos estudados, numa proporção proteína:electrófilo 1:1 (m/m) numa mistura de tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 e um solvente orgânico adequado (10%) (Tabela II.26). As misturas reaccionais foram deixadas em agitação lenta por 48 h, a 37 °C e, sempre que necessário, foi adicionado um redutor, com o objectivo de estabilizar potenciais iminas formadas com resíduos contendo na sua cadeia lateral grupos nucleófilos de azoto. Salvo indicação em contrário, todas as misturas reaccionais foram precipitadas por adição de acetona (4 vol.) a 0°C.

Numa primeira abordagem, pretendeu-se promover uma digestão enzimática da HSA modificada a aminoácidos, das misturas resultantes dos Ensaios 1 e 3 (Tabela II.26). Após uma extracção com AcEt (3x 1 mL) para retirar o electrófilo em excesso, à fase aquosa (contendo HSA modificada e não modificada) foram adicionadas soluções aquosas das proteases, Pronase E e leucinaminopeptidase M, largamente usadas para a degradação total de proteínas e de acordo com o Método VI descrito em III.9.2. Ambas as misturas foram deixadas reagir a 37 °C durante 24 h, sendo posteriormente analisadas por LC-ESI(+)-MS, sem qualquer tratamento prévio. Infelizmente, em ambos os ensaios não foram detectados quaisquer adutos formados entre a CBZ (62) ou EPCBZ (79) e os resíduos nucleófilos da HSA, mesmo quando se procurou por valores de m/z compatíveis com as moléculas protonadas [M+H]⁺ dos adutos formados com resíduos de Cys (núcleofilos de enxofre) ou Lys e His (nucleófilos de azoto). Se por um lado tal pudesse ser expectável para a CBZ (62), para o seu epóxido 79 não será necessariamente verdade. No entanto, no momento em que foram efectuados estes ensaios, apenas estava disponível no nosso laboratório um espectrómetro de massa de baixa resolução. Na medida em que a eficiência da reacção entre a HSA e os electrófilos considerados deverá ser baixa, a baixa sensibilidade do instrumento utilizado poderá explicar a ausência de resultados.

Ensaio	Electrófilo	Solvente	Redutor
1	CBZ (63)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF	-
2	CBZ (63)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/MeCN	-
3	EPCBZ (79)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF	-
4	EPCBZ (79)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/MeCN	-
5	9-AL (88)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF	-
6	9-AL (88)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF	NaBH ₃ CN
7	2-OHCBZ (82)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF	-
8	OXCBZ (63)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/MeCN	
9	OXCBZ (63)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/MeCN	NaBH ₃ CN
10	OXCBZ (63)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/DMF	-
11	MHD-SO ₃ - (108)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/DMF	-
Branco 1	-	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF	-
Branco 2	_	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF	NaBH₃CN
Branco 3	-	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/MeCN	-
Branco 4	-	Tampão fosfato 50 mM. pH 7.4/MeCN	NaBH ₃ CN
Branco 5	-	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/DMF	-

Tabela II.24. Condições reaccionais usadas para a incubação dos vários electrófilo com a HSA.

Numa segunda abordagem, promoveu-se novamente a digestão das misturas reaccionais dos Ensaios 1 e 3 (Tabela II.26), na presença das proteases, tripsina e quimotripsina. Esta digestão foi efectuada de acordo com o Método II descrito em III.9.2., usando uma proporção protease:proteína de 1:20 (m/m) sendo necessário o tratamento prévio da mistura com ureia, ditiotreitol (DTT) e iodoacetamida (IAA). Este tratamento promove a quebra das estruturas terciária e quaternária da HSA. O uso da ureia e do DTT permite a desnaturação da proteína e a quebra das pontes de dissulfeto formadas entre os resíduos de Cys, respectivamente. A IAA bloqueia estes mesmos resíduos, impedindo-os de voltar à sua forma oxidada.

Os precipitados foram dissolvidos numa solução aquosa de 5% MeCN e 0.05% TFA e analisados por nanoCromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de

Massa de alta resolução com ionização por nanoESI (também designada a partir daqui por LC-ESI(+)-HRMS), em modo dependente de dados *Auto MS/MS*, seguido de uma busca automática no software GMP Fury. Para ambos os ensaios foram usadas como modificações variáveis os incrementos 250.0737 u ou 252.0893 u (que correspondem à incorporação dos produtos resultantes da reacção com a CBZ (**62**) e EPCBZ (**79**)), nos resíduos de Cys, His, Lys, Ser, Trp e Arg. Em ambas as situações, a busca apresentou um *protein coverage* (%) moderado de aprox. 60%, tendo evidenciado vários candidatos possíveis a péptidos modificados da HSA. A inspecção manual feita posteriormente no software Bruker®DataAnalysis permitiu excluir espectros com fragmentos abundantes que não correspondem aos valores de *m/z* teóricos esperados e assumidos como tal. Todos os erros associados foram igualmente determinados manualmente.

Quanto aos resultados da mistura reaccional correspondente à incubação da HSA com a CBZ (**62**) (Ensaio 1, Tabela II.26), a pesquisa efectuada para as modificações variáveis de 252.0893 u ou 250.0737 u, correspondentes aos produtos resultantes do ataque radicalar à ligação dupla C¹⁰-C¹¹ de **62**, com introdução de oxigénio e o consequente produto de dismutação, respectivamente, não demonstraram a formação de qualquer aduto. Por outro lado, a mesma análise da mistura correspondente à modificação da HSA com o EPCBZ (**79**) (Ensaio 3, Tabela II.26) evidenciou a formação de um aduto com o resíduo His129. O aduto formado corresponde à reacção de abertura do anel epóxido por ataque nucleófilo da cadeia lateral da His 129 (anel imidazol). O péptido ¹²⁷LQHKDDNPNLP¹³⁸ modificado apresenta um *t*_R superior ao correspondente não modificado, o que está de acordo com o esperado. Os respectivos erros associados estão também dentro do limite aceitável.

Tabela II.25. Identificação do péptido modificado com EPCBZ (**79**) (incremento 252.0893 u) e o respectivo péptido não modificado por busca automática com o software GMP Fury, após a digestão da mistura reaccional com as proteases tripsina/quimotripsina. O local de modificação está assinalado a negrito com o respectivo incremento em superescrito.

Sequência	Z ⁺	<i>m/z</i> (exp.)	<i>m/z</i> (teórico)	erro (ppm)	t R
HSA + EPCBZ (79)					
¹²⁷ LQ H ^{EPCBZ} KDDNPNLPR ¹³⁸	+3	566.9509	566.9497	2.03	16.1
¹²⁷ LQHKDDNPNLPR ¹³⁸	+3	482.9228	482.9198	6.24	10.5

Tendo em conta a sequência peptídica e o conhecimento já adquirido para a reactividade do epóxido **79**, seria possível que o local de modificação fosse a Lys130. Porém pelo espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(+)-HRMS para *m/z* 566.9509 (Figura II.41), este resíduo pode ser excluído pela ausência de iões fragmento b/y, compatíveis com um incremento nessa posição. Por outro lado, observou-se o ião fragmento b_4^{2+} a *m/z* 380.1914 contendo a modificação 252.0893 u, e ainda os iões fragmento b_2 e b_7 a *m/z* 242.149 e 1103.4541, respectivamente, sem modificação mostrando que inequivocamente a modificação ocorreu na His129.



Figura II.40. Identificação do péptido modificado ¹²⁷LQ**H**^{EPCBZ}KDDNPNLPR¹³⁸ pelo espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(+)-HRMS para *m*/*z* 566.9509.

Contrariamente ao esperado, da busca automática efectuada para estes ensaios, não resultou nenhum péptido modificado na Cys34. Sabendo que as enzimas usadas nestes ensaios são específicas para quebra de ligações peptídicas contendo resíduos com cadeias laterais hidrofóbicas, como a fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) ou Trp (quimotripsina) e resíduos com cadeias laterais com carga eléctrica positiva (a pH fisiológico) como a Arg e a Lys (Tripsina) [306], um dos péptidos esperados que contém a Cys34 é o péptido ³¹LQQCPF³⁶. De facto, quando se procurou manualmente o valor de *m/z* 987.4393 e 494.2233 correspondente às moléculas protonadas mono e di-protonadas, [M+H]+ e [M+2H]²⁺, do produto de reacção entre o péptido ³¹LQQCPF³⁶ (734.3416 u) e o EPCBZ (**79**) (252.0893 u) observou-se a t_R ~37.0 min.. um sinal compatível. No entanto, dado a natureza da análise efectuada (em modo dependente de dados *Auto MS/MS*), a fragmentação dos iões precursores correspondentes a este sinal não foi efectuada, inviabilizando assim a sua identificação pelo motor de busca.

No sentido de obter o péptido ³¹LQQCPF³⁶ padrão modificado na Cys34 e desta forma poder comparar com o resultado obtido, promoveu-se a reacção entre o péptido ³¹LQQCPF³⁶ e o electrófilo EPCBZ (**79**). A análise por LC-ESI(+)-HRMS da mistura reaccional final (Figura II.43.A1) mostrou a t_R ~38.0 min. um sinal a *m/z* 987.4417±2.4 ppm compatível com a molécula protonada [M+H]⁺ do produto resultante entre o péptido ³¹LQQCPF³⁶ e **79**. O espectro de MS/MS obtido para este ião precursor (Figura II.43.A1) está de acordo com a atribuição proposta para o péptido ³¹LQQCPF³⁶ modificado na Cys34, por reacção com o epóxido **79** e consequente abertura do anel. É possível observar os iões fragmento b_2 (*m/z* 242.15), b_4 (*m/z* 725.31) e b_6 (*m/z* 969.46) (estes dois últimos contendo o incremento 252.0893 u) e ainda os iões fragmento y_3 (*m/z* 618.24).

De salientar que, embora na análise da mistura reaccional resultante da digestão tripsina/quimotripsina do ensaio 3 (Tabela II.26), o espectro MS/MS do ião precursor não tenha sido obtido, foi possível identificar este ião (m/z 987.4349±2.1 ppm) no espectro de *full scan*, por comparação com o padrão sintético preparado entre **79** e o péptido ³¹LQQCPF³⁶ (Figura II.41.A1 e Figura II.41.B1). Para além dos baixos erros associados aos valores de m/z obtidos para as moléculas protonadas [M+H]⁺, quando comparado com o aduto padrão, ambos apresentam *t*_R semelhantes.

Tabela II.26. Comparação do péptido ³¹LQQ<u>C</u>PF³⁶ modificado com EPCBZ (**79**) ou IAA obtido por busca manual do extracto hidrolisado resultante de digestão da mistura reaccional da HSA e **79**, com as proteases tripsina/quimotripsina. O local de modificação está assinalado a negrito com o respectivo incremento (252.0893 u) em superescrito. A carbamidometilação das cisteínas está representada com <u>C</u> (57. 0214 u).

Sequência	Z +	<i>m/z</i> (exp.)	<i>m/z</i> (teórico)	erro (ppm)	<i>t</i> _R (min)
HSA + EPCBZ (79)					
³¹ LQQ <u>C</u> PF ³⁶	+1	792.3725	792.3709	2.03	19.8
³¹ LQQ C ^{EPCBZ} PF ³⁶	+1	987.4372	987.4349	2.12	37.4
³¹ LQQCPF ³⁶ + EPCBZ (79)					
³¹ LQQCPF ³⁶	+2	734.3447	734.3416	4.22	28.2
³¹ LQQ C ^{EPCBZ} PF ³⁶	+1	987.4417	987.4393	2.43	38.0

Desenvolvimentos de novos biomarcadores de toxicidade dos fármacos carbamazepina e oxcarbazepina



Figura II.41. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de incubação do metabolito EPCBZ (**79**) com o péptido ³¹LQQCPF³⁶ (**A**) e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 987.4392 (**A1**) e *m/z* 734.3416 (**A2**) com os espectros de MS e MS/MS obtidos por LC-HRMS-ESI(+), correspondentes ao péptido ³¹LQQC^{EPCBZ}PF³⁶ e ³¹LQQCPF³⁶, respectivamente. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção de incubação do metabolito EPCBZ (**79**) e a HSA (**B**), após digestão com tripsina/quimotripsina, e os cromatogramas iónicos extraídos a: *m/z* 987.4392 (**B1**) com o espectro de MS e *m/z* 792.3732 (**B2**) com os espectros de MS e MS/MS,ambos obtidos por HRMS-ESI(+), correspondentes ao péptido ³¹LQQC^{EPCBZ}PF³⁶ e ³¹LQ³¹PC³¹

Muito embora se tivessem identificado os adutos do EPCBZ (79) com os resíduos Cys34 e His129, de forma a ter uma ideia mais abrangente de outros locais de possível modificação decidiu-se realizar também uma digestão com apenas tripsina. Assim, trataram-se as mesmas amostras (Ensaio 1 e 3, Tabela II.25) de acordo com o Método I descrito em III.9.2., onde se usou apenas tripsina como protease numa proporção protease:proteína de 1:20 (m/m) com o mesmo tratamento prévio da mistura com ureia, ditiotreitol (DTT) e iodoacetamida (IAA). Os precipitados foram analisados por LC-ESI(+)-HRMS (em modo dependente de dados Auto MS/MS) seguido de uma busca automática no software GMP Fury. Para ambos os ensaios foram usadas novamente como modificações variáveis os incrementos 250.0737 u ou 252.0893 u, nos resíduos de Cys, His, Lys, Ser, Trp e Arg. Em ambas as situações, a busca apresentou um protein coverage (%) elevado de aprox. 80%, tendo evidenciado vários candidatos a péptidos modificados da HSA. A inspecção manual feita posteriormente no software Bruker®DataAnalysis permitiu excluir espectros com fragmentos abundantes que não correspondem aos valores de m/z teóricos esperados e assumidos como tal. Todos os erros associados foram igualmente determinados manualmente.

Mais uma vez, a análise da reacção resultante da incubação da HSA com a CBZ (62) (Ensaio 1, Tabela II.25) com as modificações varáveis de 252.0893 u ou 250.0737 u, não evidenciaram a formação de qualquer aduto. Por outro lado, a mesma análise da mistura correspondente à modificação da HSA com o EPCBZ (79) (Ensaio 3, Tabela II.25) evidenciou novamente a formação de adutos com resíduos de His, nomeadamente a His91 e His270 (Tabela II.29).

Com o uso da tripsina como única protease foi possível encontrar novos locais de modificação para o EPCBZ (**79**) que até aqui não haviam sido observados, embora todos fossem resíduos de His. De forma a confirmar as posições de modificação His91 e His270 foram inspeccionados manualmente os respectivos espectros de MS/MS obtidos para os iões precursores a m/z 635.3185 e 780.3158, respectivamente (Figura II.44), correspondentes aos péptidos ⁸⁹SLH^{EPCBZ}TLFGDK⁹⁷ ²⁶⁵VHTE<u>CC</u>H^{EPCBZ}GDLLE<u>C</u>ADDR²⁸¹ modificados com o epóxido **79** (252. 0893 u). Por exemplo, para o péptido ²⁶⁵VHTE<u>CC</u>H^{EPCBZ}GDLLE<u>C</u>ADDR²⁸¹ é possível observar os iões fragmento b_2 (m/z 237.1369), b_3 (m/z 338.1817), b_4 (m/z 467.2265) e b_6 (m/z 787.2882) (todos sem conter o incremento 252.0893 u) e os iões fragmento b_7^{2+} (m/z 588.7296) e b_8^{2+} (m/z 617.2443) contendo o incremento mencionado

Tabela II.27. Identificação dos péptidos modificados com EPCBZ (**79**) e os respectivos péptidos não modificados, por busca automática com o software GMP Fury, após a digestão da mistura reaccional com a protease tripsina. O local de modificação está assinalado a negrito com o respectivo incremento (252. 0893 u) em superscrito. A carbamidometilação das cisteínas está representada com <u>C</u> (57. 0214 u).

Sequência	Z⁺	<i>m/z</i> (exp.)	<i>m/z</i> (teórico)	erro (ppm)	t _R (min)
HSA + EPCBZ (79)					
²¹ ALVLIAFAQYLQQCPFEDVH ⁴⁰	+3	830.7674	830.7665	1.07	41.4
²⁶⁵ VHTE <u>CC</u> HGDLLE <u>C</u> ADDR ²⁸¹	+3	696.2853	696.2840	1.82	12.8
²⁶⁵ VHTE <u>CC</u> H ^{EPCBZ} GDLLE <u>C</u> ADDR ²⁸¹	+3	780.3158	780.3140	2.32	21.1
⁸⁹ SLHTLFGDK ⁹⁷	+2	509.2730	509.2718	2.31	15.7
⁸⁹ SLH ^{EPCBZ} TLFGDK ⁹⁷	+2	635.3185	635.3168	2.74	28.3



Figura II.42. Identificação do péptido modificado ²⁶⁵VHTE<u>CC</u>H^{EPCBZ}GDLLE<u>C</u>ADDR²⁸¹ pelo espectro de MS/MS obtido por LC-HRMS-ESI(+)-MS/MS do ião *m/z* 780.3140.

De salientar que quando se procurou manualmente no espectro de LC-ESI(+)-HRMS correspondente à análise da mistura HSA e EPCBZ (79), o valor de m/z correspondente ao péptido mono e di-carregado [M+H]⁺ e [M+2H]²⁺ de ²¹ALVLIAFAQYLQQCPFEDVH⁴⁰ com a modificação 252.0893 u, na Cys34, não se encontrou qualquer valor compatível. Igual resultado foi obtido quando se procurou por valores de *m/z* correspondentes aos péptidos mono e di-carregado [M+H]⁺ e [M+2H]²⁺, com a mesma modificação, em resíduos de His, ¹⁴⁵RHPYFYAPELLFFAK¹⁵⁹ e ³³⁷RHPDYSVVLLLR³⁴⁸, observados recentemente por outros autores [215].

Numa tentativa de enriquecer as amostras hidrolisadas em péptidos modificados e facilitar a análise das mesmas, por HRMS-ESI(+), promoveu-se uma série de alterações ao procedimento. Estas alterações tiveram em conta principalmente o tratamento das amostras antes da digestão efectuada. Por um lado, e uma vez que se observou a precipitação dos electrófilos CBZ (62) e EPCBZ (79) durante a incubação com a proteína, alterou-se o solvente orgânico usado para acetonitrilo e, desta forma tentar uma melhor solubilidade (Ensaios 2 e 4, Tabela II.25). Ainda assim, a precipitação ocorreu e optou-se por extrair as misturas reaccionais com AcEt ou CH₂Cl₂ antes do passo de precipitação da proteína. Paralelamente, efectuaram-se ensaios em que se optou por filtrar a mistura reaccional em tubos de filtração Amicon® Ultra, com cut-off 10 kDa em substituição da precipitação. Estas adaptações tiveram em conta que a precipitação dos electrófilos utilizados na mistura reaccional não tivesse sido eficiente apenas por adição de acetona e que a presença dos electrófilos poderia inibir a acção das enzimas utilizadas. No entanto, em nenhuma das situações referidas se observou uma melhoria significativa nos resultados obtidos, sendo de uma maneira geral, a percentagem de protein coverage igual ou inferior às obtidas até aqui.

Com base na experiência adquirida para a análise das misturas reaccionais da HSA com a CBZ (62) e o EPCBZ (79), trataram-se as restantes amostras (Ensaio 5-11, Tabela II.25) de acordo com o Método I descrito em III.9.2., usando apenas tripsina como protease numa proporção protease:proteína de 1:20 (m/m) com o tratamento prévio da mistura com ureia, ditiotreitol (DTT) e iodoacetamida (IAA). Os precipitados foram analisados por nanoCromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa de alta resolução com ionização por nanoESI (LC-ESI(+)-HRMS)(em modo dependente de dados *Auto MS/MS*) seguido de uma busca automática no software GMP Fury. Para estes ensaios foram usadas como modificações variáveis os incrementos 250.0737 e 252.0893 u [nos ensaios da 2-OHCBZ (82)], 237.1022 e 235.0866 u [nos ensaios da OXCBZ (63)], 193.0886 e 191.0730 u [nos ensaios do 9-AL (88)] e por fim 236.0944 u [nos ensaios do MHD-SO₃-(110)], nos resíduos de Cys, His, Lys, Ser, Trp e Arg.

Com excepção do Ensaio 6 (Tabela II.25) correspondente à incubação do aldeído **88** com HSA, na presença de redutor, nenhum dos restantes electrófilos deu

origem a péptidos modificados. Na Tabela II.30 estão discriminados os péptidos modificados com o aldeído **88** encontrados (incremento 193.0886 u). De salientar que todas as modificações encontradas correspondem ao incremento 193.0886 u e dizem respeito à reacção do 9-AL (**88**) com os resíduos Lys e Arg (nucleófilos de azoto), após a dupla redução com o NaBH₃CN (Figura II.45).



Figura II.43. Modificação-tipo (correspondente ao incremento 193.0886 u) encontrada nos péptidos obtidos após digestão tríptica da mistura reaccional da incubação entre a HSA e o aldeído 88.

Embora preliminares, estes resultados mostram claramente que o metabolito 9-AL (88), uma vez formado in vivo, poderá reagir com resíduos de Lys e Arg de proteínas. A formação destes adutos covalentes poderá assim estar na origem de alguns eventos tóxicos associados ao uso crónico da CBZ (62). Adicionalmente, ao contrário do que foi recentemente reportado [215], mostrou-se que o metabolito EPCBZ (79) reage com a Cys34 da HSA. Este resultado mostra claramente que a utilização de várias proteases é necessária para descartar locais de modificação. Efectivamente, quando a digestão foi efectuada apenas com tripsina (tal como os autores referidos) não foi detectada a modificação nesta posição, muito provavelmente devido ao tamanho elevado do péptido tríptico que contém a Cys34, ²¹ALVLIAFAQYLQQCPFEDVH⁴⁰, que poderá dificultar a sua ionização. No entanto, quando se utilizou a mistura de proteases tripsina/quimotripsina, o péptido que contém a Cys34, ³¹LQQCPF³⁶, é mais pequeno devendo ser mais ionizável, possibilitando a identificação por HRMS da modificação nesta posição. De referir que esta identificação só foi possível uma vez que se preparou o aduto padrão ³¹LQQC^{EPCBZ}PF³⁶, o que reforça a importância dos padrões sintéticos para a detecção de adutos covalentes com proteínas.

Tabela II.28. Identificação dos péptidos modificados com 9-AL (**88**) e os respectivos péptidos não modificados, por busca automática com o software GMP Fury, após a digestão da mistura reaccional com a protease tripsina. O local de modificação está assinalado a negrito com o respectivo incremento (193.0886 u) em superscrito. A carbamidometilação das cisteínas está representada com <u>C</u> (57. 0214 u).

Sequência	Z ⁺	<i>m/z</i> (exp.)	<i>m/z</i> (teórico)	erro (ppm)	t _R (min)
HSA + 9-AL (88)					
³⁹⁷ VFDEFKPLVEEPQNLI ⁴¹³	+2	1023.0512	1023.0513	0.12	26.7
³⁹⁷ VFDEF K ^{9-AL} PLVEEPQNLI ⁴¹³	+2	1119.5942	1119.5959	1.52	32.0
²⁶⁵ VHTE <u>CC</u> HGDLLE <u>C</u> ADDRADLAK ²⁸⁶	+4	647.0355	647.0348	0.94	10.9
²⁶⁵ VHTE <u>CC</u> HGDLLE <u>C</u> ADD R ^{9-AL} ADLAK ²⁸⁶	+4	695.3073	693.3071	0.12	20.4
¹¹⁸ QEPERNE <u>C</u> FLQHKDDNPNLPR ¹³⁸	+3	873.7378	873.7381	0.60	13.3
¹¹⁸ QEPERNE <u>C</u> FLQH K ^{9-AL} DDNPNLPR ¹³⁸	+3	938.0935	938.1314	3.08	20.7

Os métodos de MS utilizados para este trabalho são os mesmos que são utilizados em estudos de proteómica para a identificação de proteínas e talvez não sejam os mais adequados para a identificação de modificações covalentes nas mesmas. De facto, muito embora os métodos dependentes de dados (Auto MS/MS) sejam muito úteis para a identificação de proteínas, bastando apenas identificar 3 péptidos únicos, estes não serão os mais adequados para identificar locais de modificação tendo em conta a baixa concentração de um péptido modificados relativamente a um péptido não modificado. A probabilidade de péptidos modificados serem escolhidos para MS/MS (no modo dependente de dados) é muito reduzido, o que limita a possibilidade da sua identificação através dos motores de busca utilizados (a existência de um espectro de MS/MS é condição necessária para a identificação de um péptido).

Assim, o facto de não se terem detectado modificações com os restantes electrófilos, não é garantia de que não se formem adutos covalentes com a HSA. Este trabalho mostra que há ainda uma grande necessidade de desenvolvimento de métodos de MS adequados para estudos de adutómica.

II.5. Estudo da reactividade da carbamazepina (62), oxcarbazepina (63) e os respectivos metabolitos reactivos com DNA

O controlo da epilepsia e o respectivo tratamento são particularmente importantes durante a gravidez, na medida em que os ataques epilépticos desregulados poderão originar quedas, ferimentos ou stress, podendo afectar tanto a mulher como o feto. Desta forma, e embora a administração de fármacos na gravidez de uma maneira geral seja totalmente desaconselhada, no caso particular desta doença, a toma de AEDs na forma de mono ou politerapia não é descontinuada.

Muito embora a associação da exposição da CBZ (**62**) à teratogenicidade ainda não tenha sido totalmente consolidada, vários estudos observacionais indicam que o uso deste AAED na gravidez está associado a algum risco de ocorrência de malformações congénitas ou ao desenvolvimento de anomalias neurológicas no feto [205, 307-309], em especial em co-administração com outros AEDs [206, 310]. Entre as manifestações descritas, encontram-se a espinha bífida [309], fenda palatina [311] ou malformações cardíacas [312]. No entanto, quando comparado com outros AEDs de primeira linha, o potencial efeito teratogénico por exposição a **62** na gravidez é substancialmente inferior [204, 307, 313]. Talvez por isso, a CBZ (**62**) continue a ser administrada a mulheres grávidas.

O mecanismo pelo qual a CBZ (62) induz o processo de teratogénese não é conhecido. No entanto, estudos efectuados em ratos indicam que a biotransformação da CBZ (62) em EPCBZ (79) poderá ser responsável pela toxicidade e malformações fetais induzidas [310, 314, 315]. A incidência de malformações em ratos Swiss-Vancouver fêmea foi observada, tendo-se verificado um aumento de 14%, 27% e 26% para doses de 300, 600 e 1000 mg/Kg de 79, respectivamente, e apenas 6% no grupo controlo [314]. Embora os mecanismos envolvidos na génese da teratogenicidade induzida por xenobióticos não sejam completamente conhecidos [315], a formação de adutos covalentes com o DNA poderá estar envolvida[316]. Este processo é também conhecido como o primeiro passo de carcinogénese de compostos genotóxicos. Adicionalmente, a conhecida actividade mutagénica, citotóxica e carcinogénica associada ao BaP (**50**) [88] ou a AFB1 (**95**) [219] já mencionadas, e que envolvem a formação de metabolitos reactivos contendo um anel epóxido, sustenta em grande parte esta teoria. Os estudos de genotoxicidade mais antigos (teste de Ames) [317, 318] [319], efectuados para a CBZ (62) e o EPCBZ (79) indicam resultados negativos para ambos. O mesmo se verificou para a reactividade com o DNA em ensaios in vitro, em incubações de 62 em microssomas de rato [238] e humanos [166], na presença de DNA, co-factores e ¹⁴C-CBZ (62). No entanto, estudos mais recentes dão conta de algum potencial genotóxico [320-322] da CBZ (62). Deste modo, este tópico continua a ser bastante controverso.

No que diz respeito à OXCBZ (63) também não existem evidências claras relativamente à sua carcinogenicidade e genotoxicidade em Humanos, sendo a literatura existente sobre o assunto bastante limitada. Num estudo [228] efectuado em ratos, em que a OXCBZ (63) e o seu metabolito maioritário MHD (105) foram administrados por gavagem, com doses até 250 mg/kg/dia e 600 mg/kg/dia, respectivamente, durante 2 anos, verificou-se a incidência de adenomas hepatocelulares em ratos fêmea expostos a 63, em doses superiores a 25 mg/kg/dia bem como a incidência de adenomas hepatocelulares e/ou carcinomas em ratos machos (para doses a 600 mg/kg/dia) e fêmeas (para doses superiores a 25 mg/kg/dia). Encontram-se também reportados na literatura alguns estudos in vitro indicativos da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da OXCBZ (63) [228, 323, 324] sem necessidade de bioactivação. Além disso, e ao contrario do que se verificou para a CBZ (62), a OXCBZ (63) demonstrou alguma reactividade com o DNA em ensaios *in vitro*, quando incubado em microssomas de rato [238] e humanos [166], na presença de DNA e co-factores. No entanto, esta reactividade só foi verificada na presença de metabolismo de Fase I.

Perante a controvérsia das evidências apresentadas decidiu-se testar primeiramente a reactividade do metabolito maioritário da CBZ (62), o EPCBZ (79) bem como a OXCBZ (63) e o possível metabolito reactivo MHD-SO₃⁻ (108) com os 2⁻- desoxinucleósidos livres, 2'-dG (48) e 2⁻-dA (49). Os ensaios foram realizados na presença de uma solução de 2'-desoxinucleósido em água/DMF (1:1) à qual foi adicionada lentamente a solução com o respectivo electrófilo em DMF (Tabela II.31).

Tabela II.29. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção de 2'-dG (**48**) e 2'-dA (**49**) e os electrófilos EPCBZ (**79**), OXCBZ (**63**) e MHD-SO₃⁻ (**110**). No caso particular da reacção com a OXCBZ (**63**), os ensaios foram efectuados na presença ou ausência de redutor (NaBH₃CN).

Ensaio	Electrófilo (1.0 eq.)	2'-desoxinucleosido (1.0 eq.)	NaBH₃CN (eq.)
1	EPCBZ (79)	2´-dG (48)	-
2	EPCBZ (79)	2´-dA (49)	-
3	OXCBZ (63)	2´-dG (48)	-
4	OXCBZ (63)	2´-dA (49)	-
5	OXCBZ (63)	2´-dG (48)	4.0
6	OXCBZ (63)	2´-dA (49)	4.0
7	MHD-SO3 ⁻ (110)	2´-dG (48)	-
8	MHD-SO ₃ ⁻ (110)	2´-dA (49)	-
Branco 1	EPCBZ (79)	-	-
Branco 2	OXCBZ (63)	-	-
Branco 3	OXCBZ (63)	-	4.0
Branco 4	MHD-SO ₃ ⁻ (110)	-	-

Todos os ensaios foram analisados por LC-ESI(+)-MS. Relativamente aos ensaios realizados com o epóxido **79** na presença da 2'-dG (**48**) e 2'-dA (**49**) (Ensaios 1 e 2, Tabela II.31), não foram obtidas evidências da formação de qualquer aduto. O mesmo se verificou nos ensaios efectuados com a OXCBZ (**63**), com e sem redutor (Ensaios 3 a 6, Tabela II.31). No entanto, nos ensaios efectuados com o MHD-SO₃⁻ (**110**), e em particular com a base livre 2'-dA (**49**) (Ensaio 8, Tabela II.31) foram identificados dois sinais a m/z 488 correspondentes à molécula protonada [M+H]⁺ do aduto 10-(deoxiadenina-*N*-il)-10,11-dihidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (10-dA-OXCBZ, **176**, Figura II.46). A análise por LC-ESI(+)-MS/MS (Figura II.46) comprovou a formação de 10-dA-OXCBZ (**176**) na medida em que mostrou o fragmento a m/z 372 compatível com a quebra da ligação glicosídica da base, resultando na perda da desoxirribose (dR)(correspondente a 117 u) e os fragmentos

m/z 237 e 252 compatíveis com a quebra da ligação C-N entre o electrófilo e a base, respectivamente. A análise efectuada por LC-ESI(+)-MS/MS para este aduto não é indicativa da posição de ligação de **110** na 2´-dA (**49**), sendo por isso a estrutura apresentada para o aduto meramente indicativa (Figura II.46).



Figura II.44. Cromatograma iónico total da mistura reaccional correspondente à reacção entre o MHD-SO₃- (110) e a 2'-dA (49) (A) e o cromatograma iónicos extraído a *m/z* 488 (A1) com os espectros de MS/MS obtidos para os dois sinais (a e b) correspondentes ao aduto 10-dA-OXCBZ (176); Os mecanismos de fragmentação propostos para o aduto 10-dA-OXCBZ (176) stão também evidenciado (B).

A molécula de dA (**49**) apresenta dois grupos locais com carácter nucleófilo para reagir com o MHD-SO₃⁻ (**110**). São eles a amina exocíclica -NH₂ e o azoto N1 (ver Figura I.5). De facto, pela observação do cromatograma do extracto iónico a *m/z* 488, correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ do aduto 10-dA-OXCBZ (**176**), verificam-se dois sinais maioritários e ambos apresentam um padrão de fragmentação semelhante e compatível com **176**. Este resultado parece indicar que a ligação entre o metabolito **110** e a 2´-dA (**49**) ocorreu em duas posições distintas da base. Embora sejam necessárias outras técnicas de caracterização estrutural para confirmar as posições de ligação, é muito provável que a ligação tenha ocorrido nas posições acima indicadas.

Pela experiência do grupo de trabalho sabe-se que os derivados electrófilos muitas vezes não reagem com os 2'-desoxinucleósidos individualmente mas ainda assim têm a capacidade de reagir directamente com o DNA. Exemplo disso pode ser observado nos trabalhos de caracterização estrutural de adutos do tamoxifeno (um conhecido modulador selectivo de estógeno usado para a redução da incidência de cancro da mama em mulheres com alto risco de desenvolvimento da doença) com DNA efectuados por Gamboa da Costa e colaboradores [325]. Assim, promoveu-se a reacção com os mesmos electrófilos considerados nos ensaios descritos anteriormente e o DNA. Todas as misturas reaccionais foram divididas em duas aliquotas de igual volume e submetidas a dois tratamentos distintos.

Num primeiro tratamento promoveu-se a degradação enzimática utilizando um procedimento descrito na literatura [326] e que envolve o uso de uma combinação de enzimas (tipicamente nuclease, DNase com fosfodiesterase e uma fosfatase alcalina) capazes de quebrar as ligações fosfodiéster entre os nuceotídeos constituintes do cadeia de DNA, dando origem aos nucelósidos dG (desoxiguanosina), dA (desoxiadenina), dC (desoxicitidina) e dT (desoxitimidina). No caso de ocorrer uma reacção do electrófilo com o DNA, estre processo de degradação deveria originar a mesma quebra de ligações entre os monómeros mas os nucleósidos obtidos surgirão modificados. Assim, a análise por LC-ESI(+)-MS das misturas finais foi efectuada procurando por valores de m/z correspondentes às moléculas protonadas [M+H]⁺ de cada 2'-desoxinuceósido mais o respectivo incremento relativo ao electrófilo usado. Estes valores foram determinados assumindo que o ataque de cada nucleósido ocorrerá por: 1) abertura do anel de epóxido de 79 originando um produto hidroxilado; reacção via base de Schiff a partir da OXCBZ (63) e estabilizada por NaBH₃CN; e 3) reacção SN com saída do grupo sulfato de MHD-SO₃ (110). Infelizmente, em nenhum dos ensaios foi observada a formação de gualquer aduto compatível com os valores de *m/z* previamente calculados. Inclusive, o aduto 10-dAOXCBZ (**176**) detectado por reacção de **110** com a 2'-dA (**49**), não foi observado por esta via.

Num segundo tratamento promoveu-se a degradação térmica utilizando um procedimento também descrito na literatura [327]. Este tipo de tratamento permite a detecção de adutos despurinantes, que resultam na formação de locais abásicos. De modo semelhante ao que foi efectuado nos ensaios de degradação enzimática, a analise por LC-ESI(+)-MS foi efectuada tendo como base a formação do mesmo tipo de adutos com guanina (G), adenina (A) (purinas) e citosina (C) e timidina (T) (adutos despurinantes). No entanto nenhum destes adutos foi observado.

No que diz respeito à ausência de reactividade dos nucleosídos e DNA com o EPCBZ (79), era um resultado de certa forma espectável devido ao resultado negativo do teste de Ames, já referido na literatura. De facto, alguns autores defendem que a genotoxicidade associada a CBZ (62) não está intimamente ligada com a formação de adutos com o metabolito EPCBZ (79) mas sim da deficiência de ácido fólico induzida por este [328]. Vários estudos bioquímicos dão conta que a deficiência na formação do ácido fólico é responsável por perturbações no processo de síntese de DNA e crescimento celular [315] [329], o que poderá explicar os casos de teratogenicidade associados a 62 [205, 314]. A ausência de reactividade da OXCBZ (63) com o DNA foi igualmente expectável tendo em conta os ensaios efectuados em microssomas de ratos e Humanos, dando conta da ausência de ligação de 63 ao DNA, na ausência de co-factores de Fase I. Muito embora, a formação de adutos de 110 com DNA não tenham sido observados, o resultado obtido com a 2'-dA demonstra claramente a reactividade deste possível metabolito. A não observação do aduto com o DNA poderá ter a ver com dificuldades experimentais associadas ao processo de precipitação do DNA, após a degradação enzimática, e necessária para a análise por LC-ESI(+)-MS. Assim, tendo em conta a formação do aduto **176**, e a ocorrer a formação do metabolito 110 in vivo, não poderá ser descartada a possibilidade da carcinogénese associada ao AAED 63 envolver a bioactivação deste fármaco.
II.6. Conclusões e perspectivas futuras

O trabalho desenvolvido envolveu várias abordagens *in vitro* que tinham como objectivo a síntese e a caracterização de adutos covalentes, obtidos a partir dos metabolitos dos AAEDs, CBZ (62) e OXCBZ (63), bem como o desenvolvimento das metodologias analíticas para os detectar a níveis expectáveis *in vivo*.

Os metabolitos da CBZ (62), o EPCBZ (79), a 2-OHCBZ (82) e o 9-AL (88), e da OXCBZ (63), o MHD (105) e o MHD-SO₃⁻ (110) foram sintetizados por métodos adaptados da literatura ou gerados *in situ* utilizando o catalisador biomimético $Fe(II)(bpmen)(Otf)_2$ (111) ou recorrendo à fracção S9 do homogenato de fígado, um sistema metabolicamente competente.

A reactividade de todos os metabolitos potencialmente tóxicos considerados para este estudo foi avaliada inicialmente na presença de aminoácidos modelo contento nucleófilos de azoto (ValOEt e NAL) ou enxofre (NAC). Em alguns casos, a reactividade com a GSH, 2'-desoxinucleósidos, Hb, HSA e DNA foi também testada. De uma maneira geral, todos os metabolitos considerados como potencialmente tóxicos apresentaram alguma reactividade com aminoácidos ou a GSH, dando origem a adutos covalentes. Todos estes adutos foram caracterizados por LC-ESI-MS e, sempre que possível, por RMN. De destacar a formação do aduto NAC-OHCBZ (118), obtido por duas vias distintas [a partir da oxidação da CBZ (62) com o catalisador biomimético Fe(II)(bpmen)(Otf)₂ (111) e pela oxidação do metabolito 2-OHCBZ (82) com sal de Frémy] e totalmente caracterizado também por NMR. A formação deste aduto envolve provavelmente a adição 1.4 de Michael da NAC ao metabolito reactivo **112** (quinona-imina). O eventual envolvimento desta quinona-imina, nos eventos tóxicos associados à CBZ é também aqui considerado pela primeira vez. De realçar a utilidade e a eficácia do catalisador Fe(II)(bpmen)(Otf)₂ (111), que permite a formação de metabolitos reactivos aromáticos a partir do fármaco (mimetizando a actividade do CYP450) e a subsequente formação de adutos covalentes, por reacção com bionucleófilos, em quantidades adequadas para o seu isolamento e caracterização.

Quanto ao metabolito maioritário da CBZ (62), o EPCBZ (79), que tem sido apontado até à data como um dos metabolitos envolvidos na toxicidade deste AAED, verificou-se a formação de adutos covalentes com nucleófilos de azoto e enxofre. No entanto, a extensão da reacção deste metabolito com nucleófilos de enxofre (ex. GSG) foi muito inferior à reportada por outros autores. Adicionalmente, um ensaio preliminar, em que se utilizou uma mistura de CBZ (62) e EPCBZ (79), indicou que o fármaco reagia mais eficientemente com NAC do que o seu metabolito maioritário. Este resultado levou a um estudo subsequente com vista ao estudo comparativo da

reactividade da CBZ (62) e do seu metabolito 79 com vários bionucleófilos. Este estudo conduziu a resultados muito interessantes e inovadores, indicando que a CBZ (62) reage muito mais eficientemente com bionucleófilos de enxofre (NAC ou GSH) do que o seu metabolito 79, em particular em condições de oxigenação intensa. Foi possível identificar e caracterizar (por HRMS) vários adutos por reacção directa da CBZ (62) com bionucleófilos de enxofre, tendo o aduto NAC-CBZ (127) sido também caracterizado por RMN. Os resultados obtidos num estudo subsequente permitiram avançar com uma proposta mecanística para a formação destes adutos, que envolve a formação prévia de um radical ti-ilo e o consequente ataque à ligação dupla C¹⁰-C¹¹ da CBZ (62). O facto de estas reacções serem promovidas pela presença de oxigénio e/ou radicais tem implicações em termos da biodisponibilidade deste fármaco e da sua toxicidade. Efectivamente, em situações de défice de GSH ou em situações de hiperóxia (ou stress oxidativo), a formação de adutos entre a CBZ (62) e os resíduos de Cys de proteínas poderá ocorrer em maior extensão e eventualmente dar início a eventos tóxicos. Estes resultados são da maior importância, não só porque constituem a primeira evidência de que a CBZ (62), sem necessidade de bioactivação, poderá estar envolvida na indução de eventos tóxicos, como também porque apontam para o facto de condições de hiperóxia e stress oxidativo serem eventuais factores de risco.

A modificação da proteína plasmática HSA com 79, seguida da abordagem proteómica por HRMS, que envolve a digestão da proteína a péptidos (usando duas condições proteolíticas distintas) e subsequente análise por LC-HRMS/MS, permitiu a identificação de adutos covalentes entre o EPCBZ (79) e os resíduos Cys34, His 91, 129 e 270 da HSA. Este resultado indica que este metabolito (também) poderá ter um papel na indução de toxicidade pela CBZ (62). Por outro lado, a abordagem utilizada foi também fulcral para sublinhar a importância da utilização de condições proteolíticas distintas para se ter uma visão abrangente das modificações ocorridas. Efectivamente, tal como o grupo de Park reportou recentemente [215], não é possível a identificação da modificação na Cys34 da HSA quando se usa apenas tripsina na digestão. No entanto, ao contrário do que estes autores alegam, esta posição é modificada pelo epóxido **79**, tal como ficou comprovado com a utilização de uma mistura de proteases tripsina/quimiotripsina para a digestão da proteína. Por falta de tempo não foi avaliada a possibilidade de ocorrência de modificações de proteínas de sangue por reacção directa com a CBZ, na presença de O2. No entanto, este é um assunto que deve ser sem dúvida esclarecido em estudos subsequentes, nomeadamente na presença de GSH e O₂, como agentes iniciadores e potenciadores, respectivamente. Seria também interessante avaliar futuramente a formação de adutos de excreção (com NAC e GSH) *vs* adutos com proteínas do sangue em modelos animais tratados com **62** em condições de stress oxidativo e sobre-exposição de O₂.

A avaliação da reactividade do metabolito aldeído da CBZ (62), o 9-AL (88) permitiu caracterizar vários produtos com bionucleófilos de azoto. Todos os casos correspondem a adutos resultantes da redução com NaBH₃CN da base de Schiff resultante da reacção do aldeído 88 com um nucleófilo de azoto. Este estudo permitiu sintetizar o aduto de Edman padrão, ValOEt-9AL-Ed3 (173), que tornou possível a avaliação da formação de adutos entre este metabolito e a valina terminal da Hb, por degradação de Edman e posterior análise por LC-MS por comparação com o padrão sintetizado. Ainda neste contexto, a reacção com aminoácidos livres (ex. ValOEt) permitiu caracterizar todos os produtos formados na reacção, facto indispensável para o conhecimento prévio dos incrementos de massa a utilizar nas pesquisas efectuadas para a detecção de adutos formados com a HSA, pela abordagem proteómica por HRMS. Através desta abordagem foi possível a identificação de adutos formados entre o 9-AL (88) e a HSA nos resíduos Lys130 e 402 e Arg281.

A possibilidade da OXCBZ (63) reagir directamente com bionucleófilos foi aqui explorada pela primeira vez. Quando se fez reagir este fármaco com os nucleófilos de azoto, ValOEt e NAL, com subsequente estabilização por redução, foi possível isolar dois adutos (um resultante da redução da imina e outro correspondente à enamina). No entanto, não se observou a formação de qualquer aduto por modificação da Hb (utilizando a metodologia de destacamento de Edman), HSA, 2´-desoxinucleósidos ou do DNA. Ainda assim, subsiste uma dúvida que gostaríamos de ver esclarecida em estudos subsequentes: será que a OXCBZ não reage eficientemente com a Hb ou a HSA ou a detecção de adutos com estas proteínas requer uma optimização das metodologias de proteómica por HRMS.

A hipótese de formação do metabolito potencialmente reactivo MHD-SO₃⁻ (**110**), foi aqui também considerada pela primeira vez. Embora nos ensaios de incubação da OXCBZ (**63**) na fracção S9 do fígado de rato e humano não tenham evidenciado a formação de **110** e respectivos adutos, esta não é prova suficiente para descartar a formação deste potencial metabolito reactivo. Efectivamente, quando se incubou o metabolito da NVP (**3**), a 12-OHNVP (**20**), nas mesmas condições não se obteve indicação de sulfonação deste metabolito, muito embora se saiba que o 12-SO₃⁻ NVP (**26**) se forma *in vivo*. A prova indirecta da formação do MHD-SO₃⁻ (**110**) é a identificação de CBZ (**62**) em doentes sob terapêutica com OXCBZ (**63**). Efectivamente, uma vez formado, o MHD-SO₃⁻ (**110**) origina espontaneamente CBZ (**62**) em solução, por uma reacção de eliminação. Para além disso, a formação de adutos por reacção directa de **110** com nucleófilos de enxofre (NAC) e azoto (2'-dA)

demonstra o potencial reactivo/tóxico deste hipotético metabolito, sendo necessários mais estudos no sentido de avaliar a seu papel na indução de eventos tóxicos associados à OXCBZ (63).

Quanto à utilização de metodologias analíticas de proteómica por HRMS, foi notória a dificuldade na detecção dos adutos formados com proteínas. Há assim uma grande urgência para o desenvolvimento de metodologias analíticas mais adequadas à detecção de péptidos modificados que podem estar presentes em concentrações muito baixas. Neste contexto, será desejável avaliar, em estudos posteriores, a vantagem da utilização de metodologias de aquisição não dependentes de dados (DIA) face às utilizadas de uma forma comum (que são dependentes dos dados, DDA). Por outro lado, no que toca às metodologias de tratamento de resultados para a detecção de adutos, há também um longo caminho a percorrer.

Todos os adutos padrão preparados e as metodologias analíticas desenvolvidas neste trabalho estão agora disponíveis para investigar o papel destas possíveis vias de toxicidade. Estas são ferramentas cruciais para a identificação dos adutos caracterizados neste trabalho em doentes sob terapêutica com os dois AAEDs estudados neste trabalho, permitindo a determinação de potenciais relações entre a sua ocorrência (ou concentração) e a identificação de eventos tóxicos nestes doentes. A identificação/quantificação destes adutos poderá constituir um teste útil na identificação de factores de risco e na aplicação dos efeitos adversos induzidos por estes AAEDs.

Capítulo III • Parte Experimental

III.1. Considerações prévias

Durante a realização deste trabalho, recorreu-se a alguns procedimentos gerais que serão descritos resumidamente nos parágrafos seguintes:

III.1.1. Reagentes, Solventes e Materiais

Todos os reagentes cuja síntese não se encontra descrita foram adquiridos à Sigma Aldrich, SA (Madrid, Espanha) e possuíam a pureza requerida ou foram sempre que necessário purificados. A CBZ (62) e o EPCBZ (79) foram adquiridos à Sigma Aldrich, SA (Madrid, Espanha). A OXCBZ (63) foi adquirida à TCI Europe (Zwijndrecht, Bélgica). O péptido LQQCPF com 99% de pureza foi adquirido à GeneCust Europe (Ellange, Luxamburgo) e usado como recebido. Nos ensaios efectuados no estudo mecanístico da CBZ (62) utilizou-se água marcada com oxigénio 18 com pureza isotópica de 99% adquirida à Sigma Aldrich, SA (Madrid, Espanha). As enzimas usadas nas hidrólises enzimáticas (Tripsina, Quimotripsina, Leucina Aminopeptidase M e Pronase E) bem foram adquiridas à Sigma Aldrich, SA (Madrid, Espanha) e foram usadas como recebidas.

Os solventes utilizados para a síntese de metabolitos e adutos eram de grau p.a. e foram quando necessário, purificados ou secos de acordo com métodos padronizados [330].

O catalisador $Fe(II)(bpmen)(Otf)_2$ (**111**) já existente no laboratório foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito na literatura [251].

Todas as reacções com bionucleófilos foram incubadas em tubos de polipropileno de 2 mL (*eppendorfs*) ou 15 mL (*falcons*), utilizando um monobloco de aquecimento e agitação da *eppendorf*.

Para a realização das cromatografias em camada fina (c.c.f.) e camada fina preparativa (c.c.f.p.) foram utilizadas placas de sílica gel GF_{254} da Merck com espessura 0.2 mm e 0.5 mm, respectivamente. O eluente é mencionado em cada caso, indicando-se a proporção dos componentes, no caso de eluentes mistos. A detecção dos compostos foi efectuada por irradiação de luz ultravioleta (UV) a um comprimento de onda de 254 nm e/ou 366 nm.

As cromatografias em coluna foram efectuadas com suportes de sílica gel 60 H GF_{254} da Merck com grânulo de 0.040-0.063 mm ou sílica gel 60 GF_{254} com grânulo de 0.063-0.200 mm, sendo igualmente referido, em cada caso, o eluente usado e a proporção dos componentes, no caso de eluentes mistos.

Para as separações cromatográficas por extracção de fase sólida foram utilizados cartuchos Strata® (Phenomenex, Torrance, CA, USA) com enchimento de

fase reversa C18 (tamanho do poro 55 μm, 70Å) e 500 mg/6 mL de capacidade. Antes de cada utilização, os cartuchos foram previamente activados com metanol e equilibrados com água.

Para a purificação dos extractos provenientes da hidrólise de proteínas foram utilizados cartuchos Hypersep C18[™] (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) com enchimento de fase reversa C18 (tamanho do poro 40-60 μm) e 500 mg/3 mL de capacidade. Antes de cada utilização, os cartuchos foram previamente eluídos com metanol e equilibrados com água/ácido fórmico 5%.

III.1.2. Equipamento

III.1.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) foi efectuada com coluna analítica de fase reversa RP-18e (Luna C18 (2), 250 x 4.6 mm, 5 μ m) ou coluna semipreparativa de fase reversa RP-18e (Luna C18 (2), 250 x 4.6 mm, 5 μ m), ambas da Phenomenex®. Os cromatogramas foram obtidos num sistema de HPLC (Dionex) equipado com bomba (Ultimate 3000) e detector de fotodiodos (DAD, Ultimate 3000).

Como método cromatográfico para HPLC analítico ou semi-preparativo foram usados dois sistemas gerais. Sempre que qualquer um dos seguintes métodos não tenha sido utilizado, será indicado.

Método de eluição A (ensaios com CBZ (62)): Gradiente linear de 32 min. de 5-70% de acetonitrilo em 1% de ácido fórmico aquoso, até aos 32 min., seguido de 8 min. de um gradiente linear de 100% de acetonitrilo, com um fluxo de 1 mL/min (HPLC analítico) ou 3 mL/min (HPLC semi-preparativo).

Método de eluição B (ensaios com OXCBZ (63)): Gradiente linear de 30 min de 5-70% de acetonitrilo em acetato de amónio 10 mM pH 8, seguido de 2 min até 100% de acetonitrilo, com um fluxo de 1 mL/min (HPLC analítico) ou 3 mL/min (HPLC semi-preparativo).

III.1.2.2. Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Todas as amostras para NMR foram preparadas ao ar e à temperatura ambiente. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão (¹H-NMR) foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III 300, Bruker Avance III 400 ou Bruker Avance III Plus 500 operando a 300 MHz, 400 MHz ou 500 MHz, respectivamente. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 (¹³C-NMR) foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III 400 e Bruker Avance III Plus 500, operando a 100.6 e 120.8 MHz, respectivamente. Os desvios são expressos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). Em cada situação será indicado o solvente usado bem como os dados obtidos que serão apresentados da seguinte forma: **Núcleo estudado** (solvente): desvio químico (δ , ppm) [intensidade relativa (nH), multiplicidade (s-singuleto; sl-singuleto largo; d-dupleto; t-tripleto; dd-duplo dupleto; m-multipleto), constante de acoplamento (*J*, Hz) e atribuição na molécula (Cⁿ<u>H</u>-protão *n*, Cⁿ-carbono *n*, ArCⁿH-protão aromático *n* e ArCⁿ-carbono aromático *n*).

Em ambos os casos as escalas dos desvios químicos foram calibradas usando o sinal residual dos solventes deuterados: δ (¹H NMR): 7.26 (CDCl₃), 2.05 [(CD₃)₂CO], 3.31 (CD₃OD), 2.50 [(CD₃)₂SO] e δ (¹³C NMR): 77.0 (CDCl₃), 29.4 [(CD₃)₂CO], 49.0 (CD₃OD), 39.5 [(CD₃)₂SO].

A elucidação estrutural de todos os compostos sintetizados foi efectuada com base na análise dos resultados obtidos nas experiências bidimensionais. As experiências de *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC), *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC), *homonuclear correlation spectroscopy* (COSY) foram efectuadas usando os programas de pulso *standard* da Bruker.

III.1.2.3. Espectrometria de massa (MS)

As análises de LC-ESI-MS foram efectuadas em dois equipamentos distintos:

1) Ion trap quadrupolar Varian 500-MS (Varian, Inc., Palo Alto, CA) equipada com uma fonte de ionização por electrospray e acoplada a um sistema HPLC. Com excepção das amostras que foram injectadas directamente na fonte, as amostras foram separadas a 30 °C, usando uma coluna Luna C18 (2) (150mm x 2 mm, 3 µm; Phenomenex, Torrance, CA), utilizando um fluxo de 200 µL/min. As condições de eluição foram as seguintes: 2 min. de eluição isocrática com 5% acetonitrilo (eluente A) e 0.1% de ácido fórmico em água (eluente B), seguido de um gradiente linear de 30 min até 70% de eluente A, me por gradiente linear por mais 2 min. até 100% de A, finalizando com 10 min. de eluição isocrática com A. O espectrómetro de massa foi operado em modo de electrospray positivo (ESI+) ou negativo (ESI-) com os seguintes parametros optimizados: energia de excitação entre 0.9 e 2.4 V; gás nebulizador (N₂), 50 psi; gás de secagem (N₂), 30 psi; Tipicamente, os espectros obtidos correspondem a 25-35 scans e foram obtidos numa janela de 100-1000 u. Os espectros de MS/MS foram obtidos com uma janela de isolamento de 2 Da, 28-35 % de energia relative de colisão e com um tempo de excitação de 30 ms. A aquisição e o processamento dos dados foram efectuados usando o software Varian MS Control, versão 6.9 (Varian, Inc., Palo Alto, CA).

2) Ion trap quadrupolar LCQ Fleet equipada com uma fonte de ionização por electrospray (ThermoFisher Scientific) acoplada a um sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 HPLC. Com excepção das amostras que foram injectadas directamente na fonte, as amostras foram separadas a 30 °C, usando uma coluna Luna C18 (2) (150mm x 2 mm, 3 µm; Phenomenex, Torrance, CA), utilizando um fluxo de 200 µL/min. Para a eluição foram utilizadas as seguintes condições: 2 min. de eluição isocratica com 5% acetonitrilo (eluente A) e 0.1% de ácido fórmico em água (eluente B), seguido de um gradiente linear de 30 min até 70% de eluente A, e de 2 min. até 100% de A. finalizando com 10 min. de eluição isocrática com A. O espectrómetro de massa foi operado em modo de electrospray positivo (ESI+) ou negativo (ESI-) com os seguintes parametros optimizados: voltagem de electrospray ± 4.5 kV; voltagem do capilar, 16/-18 V; gás nebulizador (N_2), 80 unidades arbitrárias; gás de secagem (N_2), 5 unidades arbitrárias; temperatura do capilar, 270 °C. Tipicamente, os espectros obtidos correspondem a 25-35 scans e foram obtidos numa janela de 100-1000 u. Os espectros de MS/MS foram obtidos com uma janela de isolamento de 2 Da, 28-35 % de energia relative de colisão e com um tempo de excitação de 30 ms. A aquisição e o processamento dos dados foram efectuados usando o software Xcalibur 2.2.

Em qualquer dos casos, os resultados obtidos serão referidos pela seguinte ordem: Razão massa/carga (*m/z*) e atribuição do ião ou fragmento correspondente.

As análises de LC-ESI(+)-HRMS foram efectuadas usando dois sistemas distintos:

1) Para ensaios com proteínas e após digestão enzimática (metodologia *bottom-up*) usou-se um sistema de HPLC Ultimate 3000 nanoRSLC (Thermoscientific, Bremen, Alemanha) acoplado a um analizador híbrido de *time-of-flight* (tempo de voo) ortogonal (oTOF) IMPACT II (Bruker Daltoniks, Bremen, Alemanha) e equipado com com uma fonte de ionização por nano*electrospray* (Captive Spray, Bruker Daltoniks, Bremen, Alemanha). As amostras foram separadas usando uma coluna Acclaim PepMap C18 (75 μm x 150 cm, 3 μm, 100 Å) (ThermoFisher Scientific), utilizando um fluxo de 300 nL/min e um volume de injecção de 10 μL. A coluna e o *autosampler* foram mantidos a 40 °C e a 8°C, respectivamente. A fase móvel consistiu em 5 min. de eluição isocratica com 2% de 80% acetonitrilo e 20% de ácido fórmico aquoso (0.1%) (eluente A) e 98% de 0.1% de ácido fórmico em água (eluente B), seguido de um gradiente linear de 65 min até 50% de eluente A, e de 15 min. até 90% de A. Após 5 min. de gradiente isocrático com o eluente A, seguiu-se novo gradiente linear até 2% do eluente A, durante 5 min., finalizando-se com 15 min. de eluição isocrática com A.

A calibração interna do equipamento foi efectuada com *Lock Mass* usando o modo Enhance Quadratic. As aquisições foram efectuadas por *Auto MS* numa janela de *m/z* 50-1500 em modo *data-dependent*. Em alguns casos foi incluída uma lista de precursores. Os dados adquiridos (raw files) foram gerados e processados pelo software DataAnalysis (Bruker Daltoniks, Bremen, Alemanha) e a identificação dos compostos efectuada por procura em bases de dados (ver secção III.1.2.4) ou inspecção manual dos espectros de MS e MS/MS.

2) Os restantes ensaios foram efectuados usando um sistema de HPLC Ultimate 3000 nanoRSLC (Thermoscientific, Bremen, Alemanha) acoplado a um analizador híbrido de *time-of-flight* (tempo de voo) ortogonal (oTOF) IMPACT II (Bruker Daltoniks, Bremen, Alemanha) e equipado com com uma fonte de ionização por *electrospray* (Bruker Daltoniks, Bremen, Alemanha). As amostras foram separadas usando uma coluna HypersilGold C18 (1,9 mm, 2,1 x 150 mm) (ThermoFisher Scientific).

A calibração interna foi efectuada com formato/acetato de sódio introduzido na fonte de ionização via um loop de 20 μ L no inicio de cada análise, usando a *divert valve*, usando o modo *high-precision calibration* (HPC). As aquisições foram efectuadas por *Auto MS* numa janela de *m/z* 50-1500 em modo *data-dependent*. Em alguns casos foi incluída uma lista de precursores.

Os dados adquiridos (raw files) foram gerados e processados pelo software Bruker®DataAnalysise a identificação dos compostos efectuada por inspecção manual dos espectros de MS e MS/MS.

Em qualquer dos casos, os resultados obtidos serão referidos pela seguinte ordem: Razão massa/carga (m/z), atribuição do ião ou fragmento molecular correspondente e erro associado (ppm).

III.1.2.4. Busca em Base de Dados

Os espectros de MS/MS gerados pelo software Bruker®DataAnalysis foram convertidos numa *peak list* (lista de valores de MS/MS) em formato .mgf. através da ferramenta *Protein Analysis* do mesmo software. Após este pré-processamento, efectuou-se uma busca usando a base de dados *Global Proteome Machine* (GPMDB) para *Homo sapiens* através das interfaces GPM Fury (versão 3.0) ou X! tandem (2011.12.01.1 [13]). Numa busca padrão, usou-se uma tolerância de massa para o ião precursor de ±10 ppm e ±40 ppm para os iões fragmento, permitindo 3 *miss-cleavage*. A carbamidometilação (57. 0214 u) dos resíduos de Cys e a oxidação (15.9949 u) dos resíduos de metionina (Met) foram considerados como variáveis fixas sendo que para cada situação e dependendo da análise, os incrementos correspondentes aos

eletrófilos em estudo para os resíduos de Cys, His, Lys, Ser, Trp, Gln e Arg foram consideradas modificações variáveis. Os péptidos identificados com *scores* individuais inferiores a 30 foram eliminados e os péptidos resultantes foram posteriormente inspeccionados manualmente no cromatograma iónico total obtido. Os erros associados (%) foram calculados também manualmente a partir dos valores de *m/z* teóricos esperados (ProteomicToolKit®).

III.2. Preparação de materiais de partida para as reacções com bionucleófilos

III.2.1. Preparação de electrófilos derivados da 5*H*-dibenzo[*b,f*] azepina-5carboxamida, carbamazepina (62)

III.2.1.1. Por oxidação directa da carbamazepina (62)

A reacção foi efectuada segundo o procedimento desenvolvido no grupo de trabalho [251]. A uma solução de CBZ (**62**) (10 mg, 42.3 µmol, 1.0 eq.) em acetonitrilo/acetato de etilo (1:1) (1 mL) foi adicionado ácido acético (12.1 µL, 211.6 µmol, 5.0 eq.) e o catalisador [Fe(II)(bpmen)(Otf)₂] (**111**) (2.6 mg, 10% mmol), previamente preparado [251]. De seguida adicionou-se peróxido de hidrogénio 35% (p/p) (5 µL, 57.1 µmol, 1.35 eq.) e deixou-se em agitação a 37 °C. A vários tempos distintos recolheram-se aliquotas (ver Tabela III.1), e a cada uma delas, adicionou-se uma solução aq. sat. de bissulfito de sódio (200 µL), seguido de uma extracção com acetato de etilo (1 mL). A reacção foi seguida por HPLC analítico e analisada por LC-ESI(+)-MS. Paralelamente realizaram-se os mesmos ensaios na ausência de catalisador.

Ensaio	Volume de 62 (µL)	CBZ (62) (mg)	Tempo de reacção (h)
1	100	1.0	0.5
2	100	1.0	1
3	100	1.0	3
4	100	1.0	6
5	100	1.0	24
6	100	1.0	48
7	400	4.0	72

Tabela III.1. Condições experimentais utilizadas para a oxidação da CBZ (**62**) com [Fe(II) (bpmen)(Otf)₂] (**111**)

III.2.1.2. Síntese de 1a,10b-di-hidro-6*H*-dibenzo[*b,f*] oxireno[*d*]azepina-6carboxamida, epoxi-carbamazepina (79)

III.2.1.2.1. Por reacção do ácido peroxiacético na presença de permanganato de potássio

Utilizou-se uma adaptação ao método descrito na literatura [247] . A uma suspensão de carbamazepina (CBZ, **62**) (0.250 g, 1.1 mmol, 1.0 eq.) em carbonato de sódio (0.360 g, 3.4 mmol, 3.2 eq.) em diclorometano (5 mL), adicionou-se uma mistura de alumina neutra com permanganato de potássio (4 mg, 4.4 mol, 3.5 % p/p). De seguida, adicionou-se lentamente ácido peroxiacético (233 µL, 3.2 mmol, 3.0 eq.), causando a subida lenta da temperatura até um refluxo lento. A suspensão foi deixada em agitação durante 16 h. A mistura reaccional foi filtrada para remover os reagentes sólidos e ao filtrado adicionou-se uma solução aq. de carbonato de sódio 2 M (2.5 mL) e uma solução aq. sat. de sulfito de sódio (2.5 mL). Após agitação por 1 h, adicionou-se diclorometano (10 mL). Separou-se de fases, lavou-se a fase orgânica com água (2x 10 mL), *brine* (10 mL) e secou-se com sulfato de magnésio anidro.

III.2.1.2.2. Por reacção com o ácido m-cloroperoxibenzóico

A uma solução de CBZ (**62**) (0.250 g, 1.1 mmol, 1.0 eq.) em diclorometano (5 mL), adicionou-se ácido *m*-cloroperoxibenzóico (*m*-CPBA) (0.256 g, 1.5 mmol, 1.5 eq.) em pequenas porções de cada vez. A solução incolor foi deixada à temperatura ambiente, durante 4 dias. Após este tempo, a solução laranja formada foi colocada em banho de gelo e o precipitado formado filtrado. A fase orgânica foi lavada com uma solução aq. sat. de hidrogenocarbonato de sódio e seca com sulfato de magnésio e o solvente evaporado por destilação a pressão reduzida. A mistura bruta foi recristalizada de THF dando origem a um precipitado branco que após lavagem com THF foi analisado por ressonância magnética nuclear. Verificou-se que para além de 1a,10b-di-hidro-6*H*-dibenzo[*b*,*f*] oxireno[*d*]azepina-6-carboxamida (**79**) (20.9 mg, 7%),

1% da mistura bruta). As águas mães foram evaporadas por destilação a pressão reduzida, e o resíduo obtido redissolvido em diclorometano e purificado por c.c.f.p [AcEt]. Para além do material de partida CBZ (**62**), foi obtida a epoxi-carbamazepina (EPCBZ, **79**) (28.5 mg, 11%), na forma de sólido branco. ¹**H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.50 (1H, d,

o precipitado apresentava vestígios de 62 (aproximadamente



J=7.4 Hz, ArC¹<u>H</u> e ArC⁹<u>H</u>), 7.43-7.40 (4H, m, ArC³<u>H</u>, ArC⁴<u>H</u>, ArC⁶<u>H</u> e ArC⁷<u>H</u>), 7.38-

7.32 (2H, m, $ArC^{2}H$ e $ArC^{8}H$), 4.42 (1H, sl, $N^{5}H$), 4.28 (2H, s, $C^{10}H$ e $C^{11}H$) ¹³**C-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ : 161.6 ($C^{12}=O$), 138.3 (ArC^{4a} e ArC^{6a}), 131.6 (ArC^{1a} e ArC^{9a}), 131.4 (ArC^{1} e ArC^{9}), 130.5 (ArC^{3} e ArC^{7}), 130.2 (ArC^{4} e ArC^{6}), 128.4 (ArC^{2} e ArC^{8}), 58.6 (C^{10} e C^{11}) **MS** (ESI+) *m/z*: 505 [2M+H]⁺, 253 [M+H]⁺, 236 [M-NH₃]⁺, 210 [M+H-HNCO]⁺,180 [236-2CO]⁺ ou 180 [210-H₂CO]⁺.

II.2.1.3. Preparação de derivados aromáticos hidroxilados III.2.1.3.1. Síntese de 2-hidroxi-5*H*-dibenzo[*b*,*f*]azepina, 2-hidroxiiminoestilbeno (85)

O 2-hidroxi-iminoestilbeno (2OHIM, **85**) foi preparado segundo um procedimento adaptado da literatura [293] e de acordo com a estratégia sintética observada no Esquema III.1. A preparação de todos os precursores bem como a descrição da síntese de 2OHIM (**85**) encontra-se descrita nas alíneas seguintes. O rendimento global da reacção foi de 84% e a caracterização obtida para todos os compostos está de acordo com o descrito na literatura.



Esquema III.1. Preparação de precursores e síntese do 2OHIM (85); Reagentes e condições:
a) Sal de Frémy, tampão fosfato 100 mM, pH 7.4, 16h b) Solução aq. sat. Na₂S₂O₄, CHCl₃.

A. Preparação da dibenzo[b,f]azepina-2-ona (102)

A uma solução de iminoestilbeno (IM, **86**) (0.250 g, 1.3 mmol, 1.0 eq.) em acetona (5 mL), adicionou-se lentamente uma solução de sal de Frëmy (1.04 g, 3.9 mmol, 3.0 eq.) em tampão fosfato 100 mM, pH 7.4 (15 mL). A solução ficou em agitação durante 10 min.. Ao fim deste tempo, o precipitado amarelo formado foi filtrado e a solução foi deixada no frio, ao abrigo da luz, por 16h. A solução vermelha foi extraída com éter etílico (3x 25 mL). A fase orgânica foi lavada com água e seca com sulfato de magnésio anidro. Após filtração, o solvente orgânico foi evaporado por destilação a pressão reduzida (banho de água mantido à temperatura ambiente) e a mistura bruta purificada por c.c.f.p. [*n*-hexano/AcEt (8:2)]. Desta forma isolaram-se para além do material de partida recuperado, os seguintes compostos:

Dibenzo[*b,f*]azepina-2-ona (QI, **102**), na forma de sólido vermelho (249 mg, 93%). ¹**H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.95 (1H, d, *J*=7.9, ArC⁹<u>H</u>), 7.64-7.48 (4H, m,

ArC⁶<u>H</u>, ArC⁷<u>H</u>, ArC⁸<u>H</u> e C¹<u>H</u>), 7.00-6.95 (2H, m, C³<u>H</u> e C¹¹<u>H</u>), 6.78 (1H, d, J=12, C¹⁰<u>H</u>), 6.58 (1H, d, J=2.4, C⁴<u>H</u>) ¹³**C-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ : 186.6 (C²=O), 154.1 (C^{4a}), 146.1 (ArC^{6a}), 144.6 (C⁴), 139.9 (C^{1a}), 137.5 (ArC⁹), 136.3 (C³), 134.5 (C¹⁰), 132.8 (ArC⁶ ou ArC⁸), 132.5 (ArC^{9a}), 132.4 (C¹¹),



132.0 (ArC⁷), 130.9 (ArC⁶ ou ArC⁸), 127.4 (C¹) **MS** (ESI+) *m/z*: 208 [M+H]⁺, 180 [210-CO]⁺.

Dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído (9AL, 88) na forma de sólido amarelo. ¹H-

NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.56 (1H, s,C¹¹<u>H</u>), 8.76 (2H, m, ArC¹<u>H</u> e ArC⁸<u>H</u>), 8.34-8.32 (2H, m, ArC⁴<u>H</u> e ArC⁵<u>H</u>), 7.87-7.83 (2H, m, ArC³<u>H</u> e ArC⁶<u>H</u>), 7.74-7.70 (2H, m, ArC²<u>H</u> e ArC⁷<u>H</u>) ¹³**C**-**NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ : 193.8 (C¹¹<u>H</u>), 149.4 (ArC^{4a} e ArC^{5a}), 132.7 (ArC⁹), 130.7 (ArC⁴ e ArC⁵), 130.3 (ArC³ e ArC⁶), 129.0



(ArC² e ArC⁷), 124.0 (ArC^{1a} e ArC^{8a}), 123.7 (ArC¹) **MS** (ESI+) *m/z*: 208 [M+H]⁺, 180 [M-COH]⁺.

B. Preparação do 2-hidroxi-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepina, 2-hidroxiiminoestilbeno (85)

A uma solução da QI (**102**) (25 mg, 0.12 mmol, 1.0 eq.) em clorofórmio (10 mL) adicionou-se uma solução sat. de hidrosulfito de sódio (Na₂S₂O₄) (4 mL). A solução vermelha ficou em agitação vigorosa tendo-se observado uma mudança de cor para amarelo (após aproximadamente 30 min.). Adicionou-se água (5 mL) e extraiu-se com clorofórmio (3 x 5 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio e após filtração, evaporada por destilação a pressão reduzida. O composto 2-hidroxi-5*H*-dibenzo[*b*,*f*]azepina (2-OHIM, **85**) foi obtido por recristalização (clorofórmio) na forma de sólido amarelo (22.6 mg, 90%). ¹H-NMR (400 MHz, acetona-*d*₆) δ : 7.84 (1H, s, C²O<u>H</u>), 6.98 (1H, td, *J*=7.6. 1.6, ArC⁷<u>H</u>), 6.83 (1H, dd, *J*=7.6, 1.2, ArC⁹<u>H</u>), 6.74 (1H, m,

ArC⁸<u>H</u>), 6.67 (1H, d, *J*=7.9, ArC⁶<u>H</u>), 6.55 (2H, m, ArC³<u>H</u> e ArC⁴<u>H</u>), 6.37 (1H, d, *J*=2.8, ArC¹<u>H</u>), 6.23 (1H, d, *J*=11.7, ArC¹⁰<u>H</u>), 6.20 (1H, d, *J*=11.7, ArC¹¹<u>H</u>), 6.11 (1H, sl, N⁵<u>H</u>) ¹³**C**-**NMR** (400 MHz, acetona- d_6) δ : 153.9 (ArC²), 151.5 (ArC^{6a}), 142.4 (ArC^{4a}), 133.4 (ArC¹⁰), 132.7 (ArC¹¹), 131.9 (ArC^{1a}), 131.2 (ArC⁹), 130.6 (ArC^{9a}), 130.2 (ArC⁷), 122.7 (ArC⁸), 121.1



(ArC⁴), 119.9 (ArC⁶), 117.5 (ArC¹), 116.6 (ArC³) **MS** (ESI+) *m/z*: 210 [M+H]⁺, 180 [210-CO].

III.2.1.3.2. Síntese da 2-hidroxi-5*H*-dibenzo[*b*,*f*]oxireno[*d*]azepina-6carboxamida, 2-hidroxi-carbamazepina (2-OHCBZ, 82)

A 2-hidroxi-carbamazepina (2-OHCBZ, **82**) foi preparada segundo os procedimentos adaptados da literatura [244, 293] e de acordo com a estratégia sintética observada no Esquema III.2. A preparação de todos os precursores bem como a descrição da síntese de **82** encontra-se descrita nas alíneas seguintes. O rendimento global da reacção foi de 4% e a caracterização estrutural dos compostos obtidos está de acordo com o descrito na literatura.



Esquema III.2. Preparação dos precursores e síntese da 2-OHCBZ (**82**); Reagentes e condições: **a)** TDBMS-CI, Et₃N, CH₂Cl₂, 48h **b)** 1. CH₂Cl₂ seco, CISO₂NCO,16 h; 2. H₂O, 24h **c)** TBAF, THF, 2 h.

A. Preparação de 2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-5*H*-dibenzo [*b,f*] azepina (144)

A uma solução de 2OHIM (**85**) (0.1 g, 0.48 mmol, 1.0 eq.) em diclorometano anidro (8.0 mL) adicionou-se cloreto de *tert*-butil-dimetilsilano (TBDMS-CI) (0.216 g, 1.43 mmol, 3.0 eq.) e trietilamina (100 μ L, cat.). A solução amarela ficou em agitação à temperatura ambiente durante 48 h. O solvente orgânico foi removido por destilação a pressão reduzida e a mistura bruta foi purificada por c.c.f.p [*n*-hexano/acetato de etilo (8:2)]. Para além do material de partida recuperado (3.6 mg), o composto sililado de 2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-5*H*-dibenzo [*b*,*f*] azepina (2-OTBDMS-IM, **144**) foi obtido na forma de sólido amarelo (101 mg, 66%). ¹**H-NMR** (400 MHz, acetona-*d*₆) δ: 7.00-6.97 (1H, m, ArC⁷<u>H</u> ou ArC⁸<u>H</u>), 6.82 (1H, *J*=8.0, d, ArC⁶<u>H</u> ou ArC⁹<u>H</u>), 6.76-6.72 (1H, m, ArC⁷<u>H</u> ou ArC⁸<u>H</u>), 6.66 (1H, *J*=8.0, d, ArC⁶<u>H</u> ou ArC⁹<u>H</u>), 6.59 (1H, *J*=8.5 Hz, d, ArC⁴<u>H</u>), 6.53 (1H, *J*=2.8 e 8.5, dd, ArC³<u>H</u>), 6.39 (1H, *J*=2.8, d, ArC¹<u>H</u>), 6.27 (1H, *J*=11.8, d, C¹¹<u>H</u>), 6.21 (1H, *J*=11.8, d, C¹⁰<u>H</u>), 0.96 (9H, s, Si-C(C<u>H</u>₃)₃), 0.16 (6H, s, Si(CH₃)₂) ¹³**C**-

NMR (400 MHz, acetona- d_6) δ : 150.9 (ArC²), 150.3 (ArC^{5a}), 143.4 (ArC^{4a}), 132.7 (C¹⁰), 131.6 (C¹¹), 131.0 (ArC^{1a}), 130.4 (ArC⁶ ou ArC⁹), 129.7 (ArC^{9a}), 129.4 (ArC⁷ ou ArC⁸), 122.0 (ArC⁷_ou ArC⁸), 121.3 (ArC¹), 120.4 (ArC³), 120.0 (ArC⁴), 119.1 (ArC⁷ ou ArC⁹), 25.2 (Si-



<u>C(CH₃)₃)</u>, 17.8 (Si-C(<u>C</u>H₃)₃) **MS** (ESI+) m/z: 324 [M+H]⁺, 308 [M-CH₃]⁺, 294 [M+H-C₂H₆]⁺, 266 [M+H-(CH₃)₃]⁺, 210 [M+H-Si(CH₃)₂(CH₃)₃]⁺.

B. Preparação da de 2-(*tert*-butildimetilsililoxi)-5*H*-dibenzo [*b,f*] azepina-6carboxamida (152)

A uma solução de 2-OTBDMS-IM (**144**) (0.020 g, 61.8 μmol, 1.0 eq.) em diclorometano seco (6 mL) foi adicionado, sob atmosfera de azoto, clorosulfonilo isocianato (19.5 μL, 222.5 μmol, 3.6 eq.). Após 16 h em agitação, à temperatura ambiente, adicionou-se lentamente água fria (6 mL) e deixou-se em agitação por mais 24 h. O pH da mistura reaccional foi neutralizado com uma solução sat. NaHCO₃ e a solução resultante extraída com diclorometano (3x15 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio e a mistura reaccional purificada por c.c.f.p [*n*-hexano/AcEt (8:2)]. O composto 2-(*tert*-butildimetilsililoxi)-5*H*-dibenzo [*b*,*f*] azepina-6-carboxamida (2-OTBDMS-CBZ, **145**) foi obtido (9.8 mg, 43%). ¹**H-NMR** (400

MHz, acetona- d_6) δ : 7.46-7.29 (5H, m, ArC⁴<u>H</u>, ArC⁶<u>H</u>, ArC⁷<u>H</u>, ArC⁸<u>H</u>, ArC⁹<u>H</u>), 6.98-6.90 (4H, *m*, ArC¹<u>H</u>, ArC³<u>H</u>, C¹¹<u>H</u> e C¹⁰<u>H</u>), 5.05 (2H, sl, N⁵<u>H</u>), 0.98 (9H, s, Si-C(CH₃)₃), 0.21 (6H, s, Si(C<u>H₃</u>)₂) ¹³**C-NMR** (400 MHz, acetona- d_6) δ : 156.9 (C¹²=O), 155.1 (ArC²), 142.3-127.5 (ArC), 121.4



(C¹⁰ ou C¹¹), 120.1 (C¹⁰ ou C¹¹) 25.5 (Si-<u>C</u>(CH₃)₃), 18.3 (Si-C(<u>C</u>H₃)₃) **MS** (ESI+) *m/z*: 367 [M+H]⁺, 350 [M+H-NH₃]⁺, 324 [M+H-HNCO]⁺.

C. Preparação de 2-hidroxi-carbamazepina (82)

A uma solução amarela de 2-OTBDMS-CBZ (**145**) (9.8 mg, 26.7 µmol, 1.0 eq.) em THF (1 mL) adicionou-se fluoreto de tetrabutilamónio (TBAF) (5 µL). Imediatamente foi observado uma variação da solução para a cor vermelha. A solução foi deixada em agitação, à temperatura ambiente por 2 h. Adicionou-se *brine* (2 mL) e extraiu-se com diclorometano (3x2 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e purificada por c.c.f.p [CH₂Cl₂/metanol (9:1)]. O composto 2-hidroxi-5*H*-dibenzo[*b*,*f*]oxireno[*d*]azepina-6-carboxamida (2-OHCBZ, **82**) foi obtido na forma de sólido branco (1.02 mg, 15 %). ¹**H-NMR** (400 MHz, acetona-*d*₆) δ: 8.70 (1H, sl, OH por

troca com D₂O), 7.45-7.38 (3H, m, ArC⁴<u>H</u> e ArC⁶<u>H</u> ou ArC⁷<u>H</u> ou ArC⁸<u>H</u> ou ArC⁹<u>H</u>), 7.32-7.28 (2H, m, ArC⁶<u>H</u> ou ArC⁷<u>H</u> ou ArC⁸<u>H</u> ou ArC⁹<u>H</u>), 6.94 (1H, *J*=11.6, C¹⁰<u>H</u> ou C¹¹<u>H</u>), 6.90 (1H, m, ArC³<u>H</u>), 6.86 (1H, *J*=11.6, C¹⁰<u>H</u> ou C¹¹<u>H</u>), 6.84 (1H, m, ArC¹<u>H</u>) ¹³**C-NMR** (400 MHz, acetona- d_6) δ : 157.3



(C¹²=O), 157.0 (ArC²), 149.8-127.3 (ArC), 117.0 (C¹⁰ ou C¹¹), 115.4 (C¹⁰ ou C¹¹) **MS** (ESI+) *m/z*: 253 [M+H]⁺, 236 [M-NH₃]⁺, 210 [M+H-HNCO]⁺, 180 [210-CO]⁺.

III.2.1.4. Síntese de dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído (9-AL, 88)

O composto 9-AL (88) foi preparado de acordo com um procedimento descrito na literatura [298] . A uma solução de IM (86) (0.5 g, 2.5 mmol, 1.25 eq.) em 1,4-dioxano (10 mL) adicionou-se *m*-CPBA (0.36 g, 2.0 mmol, 1.0 eq.). A solução laranja foi deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 16 h. Adicionou-se novamente *m*-CPBA (0.36 g, 2.0 mmol, 1.0 eq.) e deixou-se em agitação por mais 90 min. Após este tempo, foi adicionada água (10 mL) e extraiu-se com clorofórmio (3x20 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com *brine*. A fase orgânica total foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada por destilação a pressão reduzida. A mistura bruta foi purificada por c.c. (clorofórmio) tendo-se obtido para além do material de partida o Dibenzo[*b*,*e*]piridina-9-carboxaldeído (9-AL, 88) (107 mg, 20 %) na forma de sólido amarelo apresentando a mesma caracterização estrutural descrita em **III.2.1.3.1.A.**

III.2.2. Preparação da 10,11-Dihydro-5-aminocarbonil-dibenzo[*b,f*]azepina10-one, oxcarbazepina (OXCBZ, 63) e dos seus derivados electrófilos III.2.2.1. Síntese da oxcarbazepina (63)

A oxcarbazepina (OXCBZ, **63**) foi preparada segundo procedimentos adaptados da literatura [300, 331] e de acordo com a estratégia sintética observada em Esquema III.3. A preparação de todos os precursores bem como a descrição da síntese de **63** encontra-se descrita nas alíneas seguintes estando as respectivas caracterizações estruturais de acordo com o descrito na literatura.O rendimento global da reacção foi de 1%.



Esquema III.3. Estatégia sintética utilizada para a preparação da OXCBZ (**63**); Reagentes e condições: **a)** TsCl, piridina, CH₂Cl₂,16h **b)** 1,2-dibromobenzeno (**158**), Pd (OAc)₂, xantphos, Cs₂CO₃, tolueno/H₂O, refluxo, 72 h **c)** H₂SO₄ conc., 16 h **d)** Pd (OAc)₂, BINAP, K₃PO₄, tolueno/H₂O, refluxo, refluxo, 24 h **e)** 1. CISO₂NCO, CH₂Cl₂ seco,16 h; 2. H₂O, rt, 24 h.

A. Preparação N-(4-toluenossulfonilo)-2'-amino-acetofenona (159)

A uma solução de 2'-aminoacetofenoa (**157**) (1.0 g, 7.4 mmol, 1.0 eq.) em diclorometano (10 mL) foi adicionado cloreto de 4-toluenossulfonilo (4.0 g, 20.7 mmol, 2.8 eq.) e piridina (358 μ L, 4.5 mmol, 0.5 eq.). A solução ficou em agitação durante 16 h. A mistura reaccional foi lavada com uma solução sat. de sulfato de cobre (2x10 mL) e água (10 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. [*n*-hexano/acetato de etilo (8:2)] e o composto *N*-(2-acetil-fenil)-4-metil-benzenosulfonamida (**164**) (1.01 g, 47%) foi obtido na forma de cristais brancos. ¹H-

NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.45 (1H, s, N<u>H</u>), 7.79 (1H, dd, *J*=8.0 e 1.2, ArC⁶'<u>H</u>), 7.73 (2H, d, *J*=8.0, ArC²'<u>H</u> e ArC⁶'<u>H</u>), 7.68 (1H, dd, *J*=8.0 e 1.0, ArC³'<u>H</u>), 7.44 (1H, dd, *J*=1.0 e 8.6, ArC⁵'<u>H</u>), 7.22 (2H, d, *J*=8.0, ArC³'<u>H</u> e ArC⁵'<u>H</u>), 7.05 (1H, dd, *J*=1.0 e 8.6, ArC⁴'<u>H</u>), 2.56 (3H, s, C²<u>H</u>), 2.36 (3H, s, C⁷'<u>H</u>) ¹³**C-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ : 202.3 (C¹=O), 143.8 (ArC⁴''), 140.1 (ArC²'), 136.6 (ArC^{1''}), 134.9 (ArC⁵'), 131.8 (ArC⁶'), 129.6 (ArC^{3''} e ArC^{5''}), 127.3 (ArC^{2''} e ArC^{6''}),



122.5 (ArC⁴), 122.3 (ArC¹), 119.1 (ArC³), 28.1 (C²), 21.5 (C^{7"}) **MS** (ESI+) *m/z*: 290 [M+H]⁺, 248 [M+H-COCH₃]⁺.

B. Preparação da 2-(2-bromofenilo)-1-[2-*N*-(4-metilbenzeno sulfonamido) fenil] etanona (160)

A uma mistura de sulfonamida **159** (0.5 g, 1.73 mmol, 1.0 eq.) em tolueno/água (8:2) (10 mL) adicionou-se Pd (OAc)₂ (20 mg. 10% mmol), xantphos (100 mg. 20 % mmol) seguido de 1,2-dibromobenzeno (**158**) (500 μ L, 4.1 mmol, 2.4 eq.) e carbonato de césio (0.79 g, 2.4 mmol, 1.4 eq.). A mistura reaccional foi deixada em agitação e refluxo vigoroso e foi seguida por c.c.f. (CH₂Cl₂). Embora não se tenha verificado o consumo total do material de partida, a reacção foi terminada após 72 h. Foi adicionada água (20 mL) e as fases separadas. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada por destilação a pressão reduzida. A

mistura bruta foi purificada por c.c (diclorometano) tendo-se obtido, para além do material de partida, 2-(2-bromofenilo)-1-[2-*N*-(4-metilbenzeno sulfonamida) fenil] etanona (**160**) (0.54 g, 71%). ¹**H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.30 (1H, s, N<u>H</u>), 7.98 (1H, d, *J*=8.0, ArC⁶'<u>H</u>), 7.80-7.74 (3H, m, ArC^{2"'}<u>H</u>, ArC^{6"''}<u>H</u> e ArC^{3"}<u>H</u>), 7.64 (1H, d, *J*=8.0, ArC^{3'}<u>H</u>), 7.51 (1H, t,



J=8.0, ArC⁵<u>H</u>), 7.35-7.12 (6H, m, ArC⁴<u>H</u>, ArC¹<u>H</u>, ArC⁴<u>H</u>, ArC⁵<u>H</u>, ArC³<u>H</u> e ArC⁵<u>H</u>), 4.43 (2H, s, C²H), 2.40 (3H, s, C²H), 2.36 (3H, s, C⁷"H) ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 200.52 (C¹=O), 144.0 (ArC⁴), 140.6 (ArC²), 136.9 (ArC²), 135.2 (ArC⁵), 134.5 (ArC¹), 133.0 (ArC3'), 131.2 (ArC6'), 129.8 (ArC3''' e ArC5'''), 127.5 (ArC2''' e ArC6'''), 125.2 (ArC¹"), 122.8 (ArC⁴"), 119.6 (ArC³"), 46.9 (C²), 21.67 (C⁷") **MS** (ESI+) *m/z*. 446 [M+H]⁺, 444 [M+H]⁺, 290 [M+H-Ts]⁺, 274 [M+H-C₇H₆Br]⁺, 272 [M+H-TsNH]⁺, 248 [M+H-C₈H₆BrO]⁺.

C. Preparação da 1-(2-aminofenil)-2-(2-bromofenil) etanona (161)

Uma mistura de 160 (0.74 g, 1.67 mmol) em ácido sulfúrico concentrado (15 mL) foi deixada em agitação, à temperatura, até dissolução completa. De seguida, adicionou-se lentamente água gelada (15 mL) e deixou-se a suspensão branca formada em agitação durante 16 h. A mistura resultante foi extraída com éter etílico (3x50 mL). A fase aquosa foi tratada com uma solução aquosa 1 M KOH, e extraída novamente com éter etílico (5x30 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de magnésio anidro e filtradas. O solvente orgânico foi removido por destilação a pressão reduzida tendo-se obtido a amina 1-(2-aminofenil)-2-(2bromofenil) etanona (**161**) (0.43 g, 89%). ¹**H-NMR** (400, CDCl₃) δ: 7.89 (1H, d, *J*=8.0, ArC⁶'H), 7.63 (1H, d, J=8.0, ArC³''H), 7.33-7.29 (3H, m, ArC³'H, ArC⁴'H e ArC⁴''H), 7.26-7.24 (1H, m, ArC⁶"H), 7.20-7.15 (1H, m, ArC⁵"H), 6.72-6.67 (2H, m, ArC³H e ArC⁵H), 6.28 (2H, sl, N<u>H</u>), 4.46 (2H, s, C²<u>H</u>) ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 198.5 (C¹=O), 150.8 (ArC^{2'}), 135.8 (ArC^{1"}), 134.7 3" (ArC⁴), 132.9 (ArC³), 131.9 (ArC⁶), 131.2 (ArC⁶), 128.7

(ArC^{5"}), 127.6 (ArC^{4"}), 125.4 (ArC2"), 117.6 (ArC^{1'}), 117.6 $(ArC^{5'})$, 116.0 $(ArC^{3'})$, 46.4 (C^{2}) **MS** (ESI+) m/z. 292 [M+H]⁺, 290 [M+H]⁺, 272 [M-NH₃]⁺.



D. Preparação da 10,11-di-hidro-5*H*-dibenzo [*b*,*f*]azepina-10-ona (162)

A uma solução da amina 161 (0.24g, 0.84 mmol, 1.0 eq.) em touleno/água (4:1) (10 mL), adicionou-se os ligandos BINAP (37 mg, 7% mol) e acetato de paládio (9 mg, 5% mol) e K₃PO₄ (0.35 g, 1.7 mmol, 2.0 eq.). A mistura reaccional foi deixada em agitação, a 130 °C. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. [diclorometano/éter etílico (1%)] e ao fim de 24h parou-se a reacção. Adicionou-se água (15 mL) e diclorometano (20 mL) e separou-se fases. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e o solvente destilado a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c.f.p. [CH2Cl2/éter etílico (1%)] e o composto 10,11-di-hidro-5H-

dibenzo [*b,f*]azepina-10-ona (**162**) (0.15 mg, 85%) obtido na forma de sólido amarelo. **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.03 (1H, dd, *J*=8.0, 1.4, ArC¹<u>H</u>), 7.44-7.40 (1H, m,

ArC³<u>H</u>), 7.32 (1H, d, *J*=8.0, ArC⁹<u>H</u>), 7.22 (1H, dt, *J*=7.6, 1.6, ArC⁷<u>H</u>), 7.15 (1H, dt, *J*=7.6, 1.2, ArC²<u>H</u>), 7.03 (2H, m, ArC⁴<u>H</u> e ArC⁶<u>H</u>), 6.94 (1H, m, ArC⁸<u>H</u>), 6.59 (1H, sl, N⁵<u>H</u>), 3.83 (2H, s, C¹⁰<u>H</u>) ¹³**C-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ : 189.5 (C¹⁰=O), 146.6 (ArC^{4a}), 141.5 (ArC^{6a}), 133.7 (ArC³), 130.7 (ArC¹), 130.1 (ArC⁹), 127.76 (ArC⁷), 125.0 (ArC⁴), 124.6 (ArC^{9a}) 124.2 (ArC^{1a}), 119.3



(ArC⁶ ou ArC⁸), 119.0 (ArC⁶ ou ArC⁸), 49.4 (C¹⁰) **MS** (ESI+) *m/z*: 210 [M+H]⁺, 180 [210-H₂CO]⁺.

E. Preparação da oxcarbazepina (63)

A uma solução de **162** (0.15 g, 0.71 mmol, 1.0 eq.) em CH₂Cl₂ anidro (5 mL) foi adicionado clorosulfonilo isocianato (CISO₂NCO) (0.248 mL, 2.83 mmol, 4.0 eq.). A solução ficou em agitação, em atmosfera inerte, durante 16 h. Adicionou-se lentamente água gelada (10 mL), e a mistura reaccional ficou em agitação por mais 24h. Adicionou-se diclorometano (20 mL) e separaram-se as fases. A fase aquosa foi tratada com uma solução aquosa NaOH 1M e extraída com CH₂Cl₂. As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de magnésio e filtradas. Após destilação a pressão reduzida do solvente, o resíduo obtido foi purificado por c.c.f.p. [CH₂Cl₂/metanol (10%)]. Para além do material de partida, obteve-se 10,11-dihidro-5-

aminocarbonil-dibenzo[*b*,*f*]azepina-10-one (OXCBZ, **63**) (24 mg, 13%) na forma de sólido branco. ¹**H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.10 (1H, dd, *J*=8.0 e 1.6, ArC¹<u>H</u>), 7.66 (1H, dd, *J*=8.0 e1.0, ArC⁹<u>H</u>), 7.60-7.58 (1H, m, ArC³<u>H</u>), 7.51-7.48 (1H, m, ArC⁴<u>H</u>), 7.40-7.37 (1H, m, ArC⁶<u>H</u>), 7.37-7.31 (3H, m, ArC²<u>H</u>, ArC⁷<u>H</u> e ArC⁸<u>H</u>), 4.93 (2H, sl, N<u>H</u>), 4.45 (1H, d, *J*=16.0, C¹¹<u>H</u>_a),



3.84 (1H, d, J=16.0, $C^{1i}H_b$) ¹³**C-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ : 191.9 ($C^{10}=O$), 155.9 ($C^{12}=O$), 143.2 (ArC^{4a}), 141.5 (ArC^{9a}), 134.2 (ArC^{1a}), 138.1 (ArC³), 130.8 (ArC¹), 130.4 (ArC⁶), 130.1 (ArC^{6a}), 129.5 (ArC⁹), 129.2 (ArC²), 128.9 (ArC⁸), 128.0 (ArC⁴), 127.5 (ArC⁷), 49.2 (C^{10}) **MS** (ESI+) *m/z*: 253 [M+H]⁺, 236 [M-NH₃]⁺, 210 [M+H-HNCO]⁺, 180 [210-H₂CO]⁺.

III.2.2.2. Síntese de 10-hidroxi-10,11-di-hidro-5*H*-dibenzo [*b,f*]azepina-5carboxamida, metabolito proveniente da redução da oxcarbazepina (MHD, 105)

O derivado mono-hidroxilado (MHD, **105**) foi preparado segundo o procedimento adaptado da literatura [301]. A uma suspensão de OXCBZ (**63**) (500 mg, 1.98 mmol, 1.5 eq.) em água (2 mL) e etanol (3.5 mL) foi adicionado boro-hidreto de sódio (50 mg, 1.30 mmol, 1.0 eq.). A mistura reaccional ficou em agitação e refluxo por 2 h. De seguida, adicionou-se lentamente (400 µL) de acetona e evaporou-se, por pressão reduzida, a mistura reaccional, até obter um volume mais reduzido. Adicionou-se gota-à-gota água fria, até a solução ficar turva e deixou-se em gelo, por 16h. A mistura reaccional foi centrifugada e o sobrenadante removido. O precipitado foi seco por destilação a pressão reduzida e o composto 10-hidroxi-10,11-di-hidro-5*H*-dibenzo

[*b*,*f*]azepina-5-carboxamida (MHD, **102**), obtido na forma de sólido branco, com um rendimento de 85 % (429 mg). ¹H-NMR (300 MHz, acetona-*d*₆) δ : 7.60-7.19 (8H, m, ArC<u>H</u>), 5.34 (2H, sl, N⁵<u>H</u>), 4.72 (1H, sl, O<u>H</u>), 3.35 (2H, sl, C¹⁰<u>H</u> e C¹¹<u>H</u>_a), 2.88 (6H, sl, C¹¹<u>H</u>_b e H₂O), ¹³C-NMR (300 MHz, acetona-*d*₆) δ : 156.5 (C¹²=O),



140.3-127.2 (ArC), 73.8 (C¹⁰), 40.8 (C¹¹) **EM** (ESI+) *m/z*. 255 [M+H]⁺, 277 [M+Na]⁺, 237 [M-H₂O]⁺.

III.2.2.3. Tentativas de síntese do 10,11-di-hidro-10-sulfoximetil-5*H*dibenzo [*b,f*] azepina-5-carboxamida (10-Ms-MHD, 176) III.2.2.3.1. Reacção do MHD (105) com cloreto de metanossulfonilo (MsCI)

Procedimento Geral

A uma solução de MHD (**102**) seco (1.0 eq.) em THF anidro ou piridina anidra foi adicionada uma base (excepto no ensaio 4, ver Tabela III.2). De seguida, adicionou-se cloreto de metanossulfonilo (MsCl), em banho de gelo. A mistura reaccional foi mantida em atmosfera inerte, à temperatura ambiente. As condições reaccionais utilizadas nos ensaios realizados encontram-se descritas na Tabela III.2.

Enegio	105 (mmol)	Solvente (ml.)	base (eq.)	McCL (og.)	Tempo de
LIISalu	105 (1111101)	Solvente (IIIL)	base (eq.)		reacção (h)
1	0.18	THF (5)	Et ₃ N (1.2)	4.8	16
2 ^a	0.04	THF (1)	Et ₃ N (1.2)	1.2	0.5
3ª	0.26	THF (5)	Et₃N (1.2)	1.2	24
4 ^a	0.02	THF (0.5)	-	1.2	1
5ª	0,02	THF (0.5)	NaHCO ₃ (1.2)	1.2	1
6	0.02	THF (0.5)	Na	1.2	3
7	0.04	piridina (0.04)	piridina (12)	5.0	0.5

 Tabela III.2. Condições experimentais usadas nos ensaios para a tentativa de formação do derivado electrófilo 168 por reacção do MHD (105) e MsCl.

^aNeste ensaio, o MHD (**105**), a Et₃N e o cloreto de metanossulfonilo usados foram previamente seco e destilado, respectivamente, de acordo com os procedimentos descritos.

A evolução das reacções foi seguida por c.c.f. [*n*-hexano/AcEt (1:1)] ou por HPLC-DAD analítico. Todos os ensaios foram analisados por LC-ESI(+)-MS. O Ensaio 1 (Tabela III.2) foi promovido em maior escala, tendo-se partido de MHD (105) seco (0.045 g, 0.18 mmol, 1.0 eq.) em THF anidro e trietilamina (30 µL, 0.21 mmol, 1.2 eq.) na presença de MsCI (66 µL, 0.85 mmol, 4.8 eq.). Após purificação da mistura reaccional por c.c.f.p [n-hexano/AcEt (1:1)] obteve-se a CBZ (62) como produto maioritário (26 mg, 16%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.49-7-32 (8H, m, ArC<u>H</u>), 6.94 (2H, s, C¹⁰<u>H</u> e C¹¹<u>H</u>), 4.45 (1H, sl, N⁵<u>H</u>) **MS** (ESI+) *m/z*: 473 [2M+H]⁺, 237 [M+H]⁺, 220 [M-NH₃]⁺, 194 [M+H-HNCO]⁺.

III.2.2.4. Síntese de 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b,f*] azepina-5carboxamida (10-SO₃-MHD, 110)

III.2.2.4.1. Reacção do MHD (105) com o complexo de trióxido de enxofre e piridina (Py.SO₃)

A.Ensaios para a optimização das condições reaccionais da reacção do MHD (105) com trióxido de enxofre e piridina

A uma solução de MHD (105) previamente seco (1.0 eq.) em piridina seca (0.5 mL), adicionou-se trióxido de enxofre e piridina (Py.SO₃) (5.0 eq.). A mistura reaccional foi deixada em agiação, sob atmosfera inerte, a uma temperatura variável (Tabela III.3).

Ensaio	105 (µmol)	Py.SO₃ (µmol)	Temperatura (ºC)	Tempo de reacção (h)
1	9.8	49.2	40	72h
2	9.8	49.2	60	72h

Tabela III.3. Condições experimentais usadas nos ensaios para a tantativa de formação do derivado electrófilo, MHD-SO₃⁻ (**110**) por reacção com Py.SO₃.

As misturas reaccionais foram seguidas por HPLC-DAD analítico ao longo de 72 h. Em ambos os ensaios, as misturas reaccionais foram tratadas com éter etílico (1mL) e a suspensão formada foi centrifugada. Após remoção do sobrenadante, o precipitado branco foi lavado com éter etílico (3x1mL).

B. Preparação do metabolito 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b,f*] azepina-5-carboxamida (110)

A uma solução de MHD (**105**), previamente seco (10.0 mg, 0.04 mmol, 1.0 eq.), em piridina anidra (1 mL), adicionou-se Py.SO₃ (31 mg, 0.2 mmol, 5.0 eq.). A mistura reaccional foi deixada em agitação, por 16h a 40 °C, sob atmosfera inerte. A mistura reaccional foi tratada com éter etílico (1mL) e a suspensão formada foi centrifugada. O sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado com éter etílico (3x1mL). De seguida,

o precipitado branco foi purificado por SPE-RP-18 [o precipitado foi redissolvido em DMF (1 mL) e introduzido no cartucho, fez-se uma primeira eluição com água (2 mL) seguido de acetonitrilo (4 mL). A fracção de acetonitrilo foi concentrada e analisada por LC-ESI(-)-MS tendo se identificado o composto 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5H-dibenzo[b,f]azepina-5- carboxamida (MHD-SO₃⁻, **110**) **MS** (ESI-) *m/z*: 333 [M]⁻, 290 [M-H-HNCO]⁻, 97 [SO₄H]⁻.



III.3. Ensaios para a formação de adutos com aminoácidos livres e glutationa

Procedimento Geral

A uma solução de um aminoácido ou glutationa (4.0 a 50 eq.) em água ou tampão fosfato com concentração variável, a pH 7.4, foi adicionada uma solução de electrófilo (1.0 eq.) em THF, MeCN ou DMF. A mistura reaccional ficou em agitação por um período variável (2 a 72 h), a 37 °C. A evolução da reacção foi seguida por HPLC-DAD analítico e a mistura reaccional final foi analisada por LC-ESI(+)-MS.

III.3.1. A partir da carbamazepina (62) e seus derivados electrófilos III.3.1.1. A partir de produtos obtidos por oxidação da carbamazepina (62) com o complexo [Fe^{II} (bpmen)(Otf)₂] (111)

Para cada um dos ensaios seguintes **III.3.3.1.1** e **III.3.3.1.2**, o electrófilo usado foi gerado por oxidação da CBZ (**62**) (1.0 eq.) e de acordo com o procedimento descrito em **III.2.1.1**. Após 1 h de reacção, a mistura reaccional foi extraída com AcEt (2x1 mL), a fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida e o resíduo obtido foi redissolvido em MeCN ou THF (200 µL).

III.3.1.1.1. Reacção com NAC

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, na presença dos derivados electrófilos gerados a partir de uma solução de **62** (50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) em MeCN e uma solução de NAC (115.2 mg, 0.85 mmol, 4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (800 μ L). A mistura reaccional ficou em agitação por 72 h, a 37 °C e foi purificada por HPLC-DAD semi-preparativo. O aduto 1-(N^{α} -acetilcisteína-S-il)-2-hidroxi-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-OHCBZ, **118**) (0.7 mg, 1%) foi isolado apresentando ¹**H-NMR** (CDCl₃, 500 MHz) δ : 9.95 (1H, s,

CO₂<u>H</u>), 8.40 (1H, sl, N⁵<u>H</u>), 8.25 (1H, dd, *J*=1.2, 8 Hz, ArC⁴<u>H</u>), 8.12-8.10 (1H, m, ArC⁶<u>H</u> ou ArC⁹<u>H</u>), 7.88-7.84 (1H, m, ArC⁷<u>H</u> ou ArC⁸<u>H</u>), 7.79-7.76 (1H, m, ArC⁷<u>H</u> ou ArC⁸<u>H</u>), 7.49-7.43 (2H, m, ArC⁶<u>H</u> ou ArC⁹<u>H</u> e C¹¹<u>H</u>), 7.28 (1H, d, *J*= 8 Hz, ArC³<u>H</u>) 4.42 (1H, sl, N⁵<u>H</u>), 6.41 (1H, d, *J*= 8.5 Hz, C¹⁰<u>H</u>), 4.81 (1H, sl, N<u>H</u>), 4.46 (1H, d, J=14.5, C<u>H</u>_{2a}), 3.76 (1H, d, J=14.5, C<u>H</u>_{2b}), 1.26 (3H, m, C<u>H</u>₃) ¹³**C** NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 135.8 (ArC⁷ ou ArC⁸), 135.4 (C¹¹), 133.3 (ArC⁶



ou ArC⁹) 131.1 (ArC⁶ ou ArC⁹) 130. (ArC⁷ ou ArC⁸), 128.5 (ArC⁴), 123.5 (ArC³), 114.9

(C¹⁰) 13.6 (CH₃) **MS** (ESI+) *m/z*: 414 [M+H]⁺, 396 [M+H-H₂O]⁺, 372 [M+H-COCH₂]⁺, 371 [M+H-HNCO]⁺, 368 [M+H-HCOOH]⁺ 326 [368-H₂C₂O]⁺, 253 [M+H-NAC]⁺ **HRMS** (ESI+) m/z: 414.1123 calculado para [M+H]+ C₂₀H₁₉N₃O₅S, 414.1118 (1.2).

III.3.1.1.2. Reacção com ValOEt

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **procedimento geral** descrito em **III.3.**, na presença dos derivados electrófilos gerados a partir de uma solução de CBZ (**62**) (20 mg, 84.6 μ mol, 1.0 eq.) e uma solução de hidrocloreto de ValOEt (49.0 mg, 33.9 μ mol, 4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (800 μ L), previamente tratada com carbonato de potássio (46.9 mg, 33.9 μ mol, 4.0 eq.). Após 1 h, a mistura reaccional inicial foi dividida em duas. A uma delas foi adicionado NaBH₃CN (10.6 mg, 84.6 μ mol, 4.0 eq.) (ver Tabela III.4). As misturas reaccionais ficaram em agitação durante 72 h, a 37^aC.

Tabela III.4. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre derivados oxidados gerados a partir da CBZ (62) e ValOEt (ValOEt).

Ensaio	62 (µmol)	ValOEt (eq.)	NaBH₃CN (eq.)	Tempo de reacção (h)
1	42.3	4.0	-	72
2	42.3	4.0	4.0	72

Todos os ensaios foram analisados por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(+)-HRMS tendose observado a formação da dos seguintes adutos:

10-hidroxi-11-(valinato de etilo- N^{α} -il)-10,11-di-hidro-5*H*-dibenzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-EPCBZ, **124**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 398 [M+H]⁺, 380 [M+H-H₂O]⁺, 253 [M+H-ValOEt]⁺, 210 [253-HNCO]⁺, 146 [ValOEt+H]⁺ **HRMS** (ESI+) *m/z*: 398.2085, calculado para [M+H]+ C₂₂H₂₇N₃O₄, 398.2074 (2.8).



Aduto **125** apresentando **MS** (ESI+) m/z: 396 [M+H]⁺, 322 [M+H-H₆C₃]⁺, 253 [M+H-ValOEt]⁺, 208 [253-HNCO]⁺, 146 [ValOEt+H]⁺ **HRMS** (ESI+) m/z: 396.1934 calculado para [M+H]+ C₂₂H₂₅N₃O₄, 396.1918 (3.5).



III.3.1.1.2.1. Preparação do aduto de Edman padrão a partir da carbamazepina (62) modificada com ValOEt

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **Método Geral I** descrito em **III.9.1.1.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.5. Para cada ensaio, os adutos com o ValOEt foram previamente gerados de acordo com o precedimento descrito em **III.3.1.1.2.**, a partir de uma solução de CBZ (**62**) (10 mg, 42.3 µmol, 1.0 eq.) em MeCN/AcEt (1:1) (400 µL) e hidrocloreto de ValOEt (24.5 mg, 16.95 µmol, 4.0 eq.) previamente neutralizado com carbonato de potássio (23.5 mg, 16.95 µmol, 4.0 eq.). No Ensaio 2 (Tabela II.5) foi adicionado NaBH₃CN (4.0 eq.) após 1h do inicio da reacção.

Tabela III.5. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de preparação dos adutos deEdman, a partir da CBZ (62) modificada com ValOEt.

Ensaio	62 (µmol)	NaBH₃CN (eq.)	DMF (μL)	NaOH 5M (μL)	PITC (μL)
1	42.3	-	125	5	0.75
2	42.3	4.0	125	5	0.75

Após o tratamento das misturas reaccionais, a análise por LC-ESI(+)-MS dos ensaios acima descritos mostrou a formação dos seguintes adutos:

10-(1-feniltiohidantoína- N^{α} -il)-11-hidroxi-10,11-di-hidro-5*H*-di-benzo-[*b,f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-EPCBZ-Ed-1, **171**), apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 487 [M+H]⁺, 470 [M-NH₃]⁺, 469 [M+H-H₂O]⁺, 444 [M+H- HNCO]⁺, 253 [M+Hfeniltiohidantoína]⁺, 235 [feniltiohidantoína + H]⁺.



10-(1-feniltiohidantoína- N^{α} -il)-11-hidroxi-10,11-dihidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-EPCBZ-Ed-2, **183**), apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 485 [M+H]⁺, 467 [M+H-H₂O]⁺, 251 [M-feniltiohidantoína]⁺, 208 [M+H-feniltiohidantoína-CONH]⁺.



III.3.1.2. Por reacção directa com a carbamazepina (62) III.3.1.2.1. Reacção com NAC

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.6. A evolução das reacções foi seguida por HPLC-DAD analítico.

Tabela III.6. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre CBZ (62) e NAC.

Ensaio	62 (µmol)	NAC (eq.)	Solvente (1 mL)	t. de reacção (h)
1	4.2	5.0	Tampão fosfato 50mM/THF (4:1)	48
2	4.2	50.0	Tampão fosfato 50mM/THF (4:1)	48
3	4.2	50.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (4:1)) 2

Todos os ensaios foram analisados por LC-ESI(+)-MS tendo-se observado a formação da dos seguintes adutos:

 $10-(N^{\alpha}-acetil-cisteína-S-il)-11-hidroxi-10,11-di-hidro-5H-di$ benzo-[*b,f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-EPCBZ,**119**)apresentando**MS**(ESI+) 380 [398-H₂O], 356 [398-H₂C₂O], 310 [356-HCOOH]⁺, 253 [M+H-NAC]⁺, 236 [253-NH₃]⁺, 210 [253-HNCO]⁺, 164[NAC+H]⁺**HRMS**(ESI+)*m/z*: 416.1281 calculado para [M+H]⁺C₂₀H₂₁N₃O₅S, 416.1275 (1.2)



 $10-(N^{\alpha}-acetil-cisteína-S-il)-11-hidroxi-5H-di-benzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida (NAC-CBZ,$ **127**) apresentando a caracterização descrita em**III.3.1.2.1.A**

A. Preparação do aduto 10-(*N*^α-acetil-cisteína-S-il)-11-hidroxi-5*H*-di-benzo-[*b,f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-CBZ, 134)

A uma solução de CBZ (62) (50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) em THF (0.5 mL)

adicionou-se uma solução de N^{α} -acetil-cisteína (178 mg, 1.1 mmol, 5.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (2.0 mL). A mistura reaccional ficou em agitação por 48 h, a 37 °C. A suspensão amarela foi centrifugada e o sobrenadante purificado por HPLC semi-preparativo [Método A] tendo-se isolado o aduto 10-(N^{α} -acetil-cisteína-S-il)-11-hidroxi-5*H*-dibenzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-CBZ, **127**). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.53-7.16 (8H, m, ArC²<u>H</u>, ArC³<u>H</u>, ArC⁴<u>H</u>, ArC⁶<u>H</u>,



ArC⁷<u>H</u> e ArC⁸<u>H</u>), 5.92 (2H, sl, C¹²N<u>H</u>), 4.35 (1H, s, C²'<u>H</u>), 3.27-2.71 (4H, m, C¹'<u>H</u>a e C¹'<u>H</u>b) 1.83 (3H,s, C⁵'<u>H</u>) ¹³**C-NMR** (DMSO- d_6) δ : 173.6 (C¹²=O), 173.2 (C⁴'=O), 130.0-128.0 (ArC², ArC³, ArC⁴, ArC⁶, ArC⁷ e ArC⁸), 22.4 (C⁵') **MS** (ESI+) *m/z*: 414 [M+H]⁺, 396 [M+H-H₂O]⁺; 372 [M+H-H₂C₂O]⁺, 368 [M+H-HCOOH]⁺, 326 [368-H₂C₂O]⁺, 253 [M+H-NAC]⁺

III.3.1.2.2. Reacção com NAL

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução de CBZ (**62**) (1 mg, 4.2 µmol, 1.0) em THF (200 µL) e N^{α} -acetil-lisina (3.2 mg, 16.9 µmol, 4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (800 µL). A mistura reaccional ficou em agitação por 72 h, a 37 °C. A evolução da reacção foi seguida por HPLC-DAD analítico.

III.3.1.2.3. Reacção com ValOEt

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução de hidrocloreto de ValOEt (ValOEt) (19.0 mg, 0.1 mmol, 5.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (1 mL), previamente tratada com carbonato de potássio (14.6 mg, 0.1 mmol, 5.0 eq.) e uma solução de CBZ (**1**) (5.0 mg, 21.2 μ mol, 1.0 eq.) em THF (0.25 mL). A mistura ficou em agitação por 72 h, a 37 °C, e foi seguida por HPLC-DAD analítico.

III.3.1.2.4. Reacção com GSH

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.7. A evolução das reacções foi analisada por HPLC-DAD analítico.

Encoio	62 (umol)		Solvente (1 ml.)	Tempo de
Elisaiu	ος (μποι)	ОЗП (eq.)	Solvente (1 mL)	reacção (h)
1	4.2	5.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (4:1)	2
2	4.2	50.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (4:1)	48
3	4.2	5.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (4:1)	2
4	4.2	50.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (4:1)	48

Tabela III.7. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre CBZ (62) e a GSH.

Todos os ensaios foram analisados por LC-ESI(+)-MS tendo-se observado a formação da dos seguintes adutos:

10-(γ-glutamilcisteinilglicina-*S*-il)-11-hidroxi-10,11-dihidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (GSH-EPCBZ, **94**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 560 [M+H]⁺, 542 [M+H-H₂O]⁺, 485 [M+H-CO₂CH₂NH₂]⁺, 467 [485-H₂O]⁺, 431 [M-C₅H₈O₃N]⁺, 413 [431-H₂O]⁺, 253 [M+H-GSH]⁺ **HRMS** (ESI+) *m/z*: 560.1810 calculado para [M+H]⁺ C₂₅H₂₉N₅O₈S, 560.1816 (1.1)





10-(γ-glutamilcisteinilglicina-*S*-il)-11-hidroxi-5*H*-dibenzo-[*b,f*]-azepina-5-carboxamida (GSH-CBZ, **128**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 558 [M+H]⁺, 486 [M-C₂H₅NO₂]⁺, 429 [M+H-C₅H₇NO₃]⁺, 411 [429-H₂O]⁺, 325 [M+H-C₈H₁₂N₂O₆]⁺, 283 [M+H-C₁₀H₁₅N₃O₆]⁺, 253 [M+H-GSH]⁺, 308 [GSH+H]⁺ **HRMS** (ESI+) *m/z*: 558.1653 calculado para [M+H]⁺ C₂₅H₂₇N₅O₈S, 558.1658 (0.9).

III.3.2. A partir de uma mistura de carbamazepina (62) e epoxicarbamazepina (79)

III.3.2.1. Reacção com NAC

O ensaio foi efectuado de acordo com o procedimento geral descrito em III.3, utilizando uma solução contendo uma mistura de CBZ (**62**) e EPCBZ (**79**) (15.9 mg, 39.6 µmol, 1.0 eq.) em THF (0.5 mL) e uma solução de N^{α} -acetil-cisteína (64.7 mg, 396 µmol, 10.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (2.0 mL). A mistura reaccional foi deixada reagir por 48 h, a 37 °C. O número de equivalentes foi calculado em função da quantidade de EPCBZ (**79**) presente na mistura, determinada previamente por ¹H-NMR. A mistura reaccional foi analisada por LC-ESI(+)-MS tendo-se observado a formação dos adutos 10-(N^{α} -acetil-cisteína-*S*-il)-11-hidroxi-10,11-di-hidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-EPCBZ, **119**) e 10-(N^{α} -acetil-cisteína-*S*-il)-11-hidroxi-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-CBZ, **127**) apresentando a mesma caracterização descrita em **III.3.1.2.1.**.

III.3.2.2. Reacção com ValOEt

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **procedimento geral** descrito em **III.3.**, a partir de uma mistura de CBZ (**62**) e EPCBZ (**79**) e utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.8. Em cada ensaio foi usada uma solução de hidrocloreto de ValOEt em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (800 µL) previamente neutralizado com carbonato de potássio e uma solução de mistura de **62** e **79** em THF (200 µL). O número de equivalentes foi calculado em função da quantidade de EPCBZ (**79**) presente na mistura, determinada previamente por ¹H-NMR. A evolução das reacções foi seguida por HPLC-DAD analítico.

Tabela III.8. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre EPCBZ (62) e o ValOEt.

Ensaio	EPCBZ (79)* (µmol)	ValOEt (eq.)	K ₂ CO ₃ (eq.)	Tempo de Reacção (h)
1	119	10.0	10.0	72
2	277	5.0	5.0	72

*Ensaios efectuados a partir de uma mistura de CBZ (62) e EPCBZ (79).

A análise por LC-ESI(+)-MS revelou a formação do aduto 10-(valinato de etilo- N^{α} -il)-10-hidroxi-10,11-di-hidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-EPCBZ, **124**) apresentando a mesma caracterização descrita em **III.3.1.1.2**.

A. Preparação do aduto 10-(valinato de etilo- N^{α} -il)-10,11-di-hidro-5*H*-dibenzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (124)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, presença de uma solução de hidrocloreto de ValOEt (139 mg, 749 μ mol, 10 eq,) previamente tratada com carbonato de potássio (104 mg, 749 μ mol, 10.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (2.0 mL) e uma solução de uma mistura de CBZ (**62**) e EPCBZ (**79**) em THF (500 μ L). O número de equivalentes foi calculado em função da quantidade de EPCBZ (**79**) presente na mistura, determinada previamente por ¹H-NMR. A mistura reaccional ficou em agitação por 72 h, a 37 °C, e foi purificada por HPLC-DAD semi-preparativo.

B. Ensaios para a preparação do aduto de Edman padrão

Os ensaios foram efectuados de acordo com os **Métodos Gerais I** e **II** descritos em **III.9.1.1.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.9., na presença do aduto ValOEt-EPCBZ (**124**). O aduto **124** foi previamente gerado de acordo com o procedimento descrito em **III.3.2.2.**, a partir do EPCBZ (**79**) (1.0 eq.) e o ValOEt (4.0 eq.). Paralelamente foi efectuado um ensaio em branco, em tudo semelhante excepto na presença de **79**.

Tabela III.9. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de preparação dos adutos deEdman, a partir do EPCBZ (79) modificada com ValOEt

Ensaio	79 (µmol)	Método	solvente (μL)	Base (μL)	PITC (μL)
1	59.45		125	5	0.75
2	3.96	П	90	5	0.5

A análise das misturas reaccionais finais por LC-ESI(+)-MS do ensaio acima referido mostrou a formação do aduto ValOEt-EPCBZ (124), apresentando a mesma caracterização descrita em III.3.1.1.2. e ainda o aduto de Edman ValOEt-EPCBZ-Ed-1 (171) apresentando a mesma caracterização descrita em III.3.1.1.2.1.

III.3.3. A partir da epoxi-carbamazepina (79) comercial

III.3.3.1. Reacção com NAC

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **procedimento geral** descrito em **III.3.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.10. A evolução das reacções foi analisada por HPLC-DAD analítico.

Tabela III.10. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre o EPCBZ (**79**) e NAC.

Encoio	saio 79 (umol) NAC (eq.) Solvente (4:1) (ml.)		Solvente $(4:1)$ (ml.)	Tempo de
Elisaiu	79 (μποι)	NAC (eq.)	Solvente (4.1) (IIIL)	reacção (h)
1	3.9	5.0	Tampão fosfato 50 mM/THF (1.0)	48
2	0.08	50.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (1.0)	2
3	3.9	50.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (1.0)	48
4	40.0	50.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (1.0)	48

Para o Ensaio 4 (Tabela II.10), no final da reacção, a suspensão amarela foi centrifugada e o sobrenadante purificado por HPLC-DAD semi-preparativo.

Todos os ensaios foram analisados por LC-ESI(+)-MS tendo-se observado a formação do aduto $10-(N^{\alpha}-acetil-cisteína-S-il)-11-hidroxi-10,11-di-hidro-5H-di-benzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida (NAC-EPCBZ,$ **119**) apresentando a mesma caracterização descrita em**III.3.1.2.1**.

III.3.3.2. Reacção com NAL

A reacção foi efectuada de acordo com o **procedimento geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução de N^{α} -acetil-lisina (2.9 mg, 15.8 µmol, 4.0 eq) em tampão

fosfato 50 mM, pH 7.4 (400 μ L) e uma solução de EPCBZ (**2**) (10.0 mg, 39.6 μ mol, 1.0 eq.) em acetonitrilo (100 μ L). A mistura ficou em incubação por 72 h, a 37 °C. A evolução da reacção foi seguida por HPLC-DAD analítico [Método B]. A mistura final foi analisada por LC-MS tendo-se observado a formação do aduto 10-(*N*^a-acetil-lisina-*N*-il)-11-hidroxi-10,11-di-hidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAL-EPCBZ, **126**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 441 [M+H]⁺, 423 [M+H-H₂O]⁺, 253 [M+H-NAL]⁺, 380 [423-HNCO]⁺, 236 [253-NH₃]⁺, 210 [253-CONH₂]⁺,189 [NAL+H]⁺.



III.3.3.3. Reacção com ValOEt

A reacção foi efectuada de acordo com o **procedimento geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução hidrocloreto de ValOEt (18.9 mg, 132 μ mol, 50.0 eq,) previamente tratada com carbonato de potássio (18.2 mg, 132 μ mol, 50.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (800 μ L) e uma solução de uma mistura de EPCBZ (**79**) (0.6 mg, 2.6 μ mol, 1.0 eq.) em THF (200 μ L). A mistura reaccional ficou em agitação durante 72 h, a 37 °C, tendo sido seguida por HPLC-DAD analítico.

A análise por LC-ESI(+)-MS revelou a formação do aduto 10-(valinato de etilo- N^{α} -il)-10-hidroxi-10,11-di-hidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-EPCBZ, **124**) apresentando a mesma caracterização descrita em **III.3.1.1.2**.

III.3.3.4. Reacção com GSH

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.11. A evolução das reacções foi seguida por HPLC-DAD analítico e as misturas finais analisadas por LC-ESI(+)-MS.

Ensaio 79 (umol)		GSH (eq.)	Solvente (1 mL)	Tempo de
	(p)	••••• (• q .)	······	reacção (h)
1	4.0	5.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (4:1)	2
2	4.0	50.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (4:1)	48
3	4.0	5.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (4:1)	2
4	4.0	50.0	Tampão fosfato 100 mM/THF (4:1)	48

Tabela III.11. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre EPCBZ (**79**) e a GSH.

A análise por LC-ESI(+)-MS de todos os ensaios mostrou a formação do aduto 10-(γ-glutamilcisteinilglicina-S-il)-10,11-di-hidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-

carboxamida (GSH-EPCBZ, 94) apresentando a mesma caracterização estrutural descrita em III.3.1.2.4.

III.3.4. A partir da 2-hidroxi-carbazepina (82) III.3.4.1. Reacção com NAC

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução de N^{α} -acetil-cisteína (1.3 mg, 7.90 µmol, 4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH7.4 (200 µL) e o electrófilo (1.0 eq.) em THF (50 µL). A mistura reaccional ficou em agitação por 72 h, a 37 °C. Para este ensaio, o electrófilo foi previamente gerado, de acordo com um procedimento adaptado da literatura, a partir de uma solução de 2-OHCBZ (68) (0.5 mg, 1.97 µmol, 1.0 eq.) em THF (100 µL) a que foi adicionada uma solução de sal de Frëmy (0.7 mg, 2.4 µmol, 1.2 eq.) em tampão fosfato 100 mM, pH 7.4 (200 µL). A mistura reaccional ficou em agitação por 30 min., a 37 °C. Após a extracção com diclorometano (2 x 1 mL), a fase orgânica foi evaporada com fio de azoto. O número de moles de NAC foi calculado considerando que ocorreu 100% de conversão de 82.

A mistura reaccional foi analisada por LC-ESI(+)-MS evidenciando a formação dos seguintes adutos:

1-(*N*^a-acetil-cisteína-S-il)-2-hidroxi-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-OHCBZ, **118**) apresentando a mesma caracterização estrutural descrita em **III.3.1.1.1.A.**. 2-hidroxi-10-(N^{α} -acetil-cisteína-S-il)-10,11-dihidro-5*H*di-benzo-[*b,f*]-azepina-5-carboxamida (10NAC-2OHCBZ, **146**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 416 [M+H]⁺, 398 [M+H-H₂O]⁺, 356 [398-H₂C₂O]⁺, 253 [M+H-NAC]⁺, 164 [NAC+H]⁺.



III.3.5. A partir da dibenzo[*b*,*e*]piridina-9-carboxaldeído (88) III.3.5.1. Reacção com ValOEt

A. Ensaios para a optimização das condições reaccionais da reacção com ValOEt

Os ensaios foram efectuados acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução de 9-AL (**88**) (1.0 mg, 4.8 µmol, 1.0 eq.) em THF (100 µL) e uma solução de solução de hidrocloreto de ValOEt (3.5 mg, 19.3 µmol, 4.0 eq.), previamente tratada com carbonato de potássio (2.6 mg, 19.3 µmol, 4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 (400 µL). Aos ensaios 3 e 4 (ver Tabela III.12) foi adicionado cianoborohidreto de sódio (1.0 eq.), a tempos distintos. Em todos os ensaios, a mistura reaccional foi deixada em agitação durante12 h, a 37 °C. As misturas reaccionais foram seguidas por HPLC-DAD analítico e analisadas por LC-ESI(+)-MS.

Ensaio	88 (µmol)	ValOEt (eq.)	Tempo de reacçãoª (h)	NaBH₃CN (eq.)
1	4.8	4.0	-	-
2	4.8	4.0	-	-
3	4.8	4.0	1	1.0
4	4.8	4.0	24	1.0

Tabela III.12. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre o 9-AL (88) e oValOEt na presença ou na ausência de redutor.

^a Para a adição de redutor, após o inicio da reacção.

As misturas reaccionais foram seguidas por HPLC-DAD analítico e analisadas por LC-ESI(+)-MS tendo se obtido os seguintes adutos:

9-metil-(valinato de etilo-Na-il)-acridina (ValOEt-9-AL-1, 152) apresentando a caracterização descrita em III.3.5.1.B.;

9,10-di-hidrometil-9-(valinato (ValOEt-9AL-2, de etilo-*N*^a-il)-acridina 153) apresentando a caracterização descrita em III.3.5.1.B.;

9,10-di-hidrometil-9-(valinato de etilo-*N*^α-il)-acridina (VALOEt-9-AL-3, 154) apresentando MS (ESI+) m/z: 339 [M+H]⁺, 265 [M+H-CO₂CH₂CH₃]⁺, 194 [M+H-ValOEt]⁺.



B. Preparação dos adutos 152 e 153

O ensaio foi efectuado de acordo com o Procedimento Geral descrito em III.3., na presença de uma solução de 9-AL (88) (20.0 mg, 97.0 µmol, 1.0 eq.) em THF (0.4 mL) à qual foi adicionado uma solução de solução de hidrocloreto de ValOEt (70.0 mg, 386.0 µmol, 4.0 eq.), previamente tratada com carbonato de potássio (53.2 mg, 386.0 µmol, 4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 (1.6 mL). Após 1 h de agitação a 37 °C, adicionou-se cianoborohidreto de sódio (24.4 mg, 386.0 µmol, 4.0 eq.) continuando em agitação por 12h. A mistura reaccional foi extraída com diclorometano (3 x 2 mL) e após concentração da fase orgânica, purificou-se por HPLC-DAD semi-preparativo. A fracção maioritária contendo os adutos foi repurificada por c.c.f.p de alumina [nhexano/Acetato de etilo (9:1)], tendo-se obtido dois tautómeros de cor amarela:

9-metil-(valinato de etilo- N^{α} -il)-acridina (ValOEt-9-AL-1, **152**) apresentando ¹H **NMR** (500 MHz, acetona- d_6) δ : 8.51 (2H, d, J= 9, ArC¹H e ArC⁸H), 8.16 (2H, d, *J*= 9, ArC⁴H e ArC⁵H), 7.82-7.79 (2H, m, ArC²<u>H</u> e ArC⁷<u>H</u>), 7.64-7.61 (2H, m, ArC³<u>H</u> e ArC⁶<u>H</u>), 4.76 (1H, d, J=15, C¹¹<u>H</u>_a), 4.62 (1H, d, J=15, C¹¹<u>H</u>_b), 4.29-4.26 (2H, m, -OC<u>H</u>₂CH₃), 3.32 (1H, d, *J*=5, C²<u>H</u>), 1.96-1.94 (1H, m, C³<u>H</u>), 1.33-1.30 (3H, m, -OCH₂C<u>H</u>₃), 0.92-0.83 (6H, m, -CH(C<u>H</u>₃)₂) ¹³C NMR (500 MHz, acetona-*d*₆) δ: 170.3 (C¹'=O), 149.9



(ArC^{4a} e ArC^{5a}), 143.4 (ArC⁹), 131.1 (ArC⁴ e ArC⁵), 130.6 (ArC³ e ArC⁶), 126.8 (ArC² e ArC⁷), 126.0 (ArC¹ e ArC⁸) 126.3 (ArC^{1a} e ArC^{8a}), 68.1 (C²), 61.2 (-OCH₂CH₃), 44.8 (C¹¹), 32.5 (C³), 19.9 (-CH(<u>C</u>H₃)₂), 18.5 (-CH(<u>C</u>H₃)₂), 14.8 (-OCH₂<u>C</u>H₃) **MS** (ESI+) m/z. 337 [M+H]⁺, 291 [M-OCH₂CH₃]⁺, 265 [M+H-CO₂CH₂CH₃]⁺, 208 [M+H-C₇H₁₃O₂]⁺, 192 [M+H-ValOEt]⁺.

9-metileno-(valinato de etilo-N^α-il)-acridina (ValOEt-9AL-2, 153) apresentando ¹H

NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.39 (1H, s, C¹¹<u>H</u>), 8.50 (2H, d, J= 9, ArC¹<u>H</u> e ArC⁸<u>H</u>), 8.27 (2H, d, J= 9, ArC⁴<u>H</u> e ArC⁵<u>H</u>), 7.82-7.79 (2H, m, ArC²<u>H</u> e ArC⁷<u>H</u>), 7.62-7.59 (2H, m, ArC³<u>H</u> e ArC⁶<u>H</u>), 4.36-4.34 (2H, m, -OC<u>H</u>₂CH₃), 4.07 (1H, d, J=6, C²<u>H</u>), 2.64-2.58 (1H, m, C³<u>H</u>), 1.41-1.39 (3H, m, -OCH₂C<u>H</u>₃), 1.15-1.11 (6H, m, -CH(C<u>H</u>₃)₂) ¹³**C NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ : 148.8 (ArC^{4a} e ArC^{5a}), 136.9 (C⁹), 130.3



 $(ArC^{4} e ArC^{5})$, 130.0 $(ArC^{3} e ArC^{6})$, 127.1 $(ArC^{2} e ArC^{7})$, 125.0 $(ArC^{1} e ArC^{8})$ 123.6 $(ArC^{1a} e ArC^{8a})$, 81.7 $(C^{2'})$, 61.4 $(-O\underline{C}H_{2}CH_{3})$, 31.7 $(C^{3'})$, 19.9 $(-CH(\underline{C}H_{3})_{2})$, 18.8 $(-CH(\underline{C}H_{3})_{2})$, 14.5 $(-OCH_{2}\underline{C}H_{3})$ **MS** (ESI+) m/z: 337 $[M+H]^{+}$, 291 $[M-OCH_{2}CH_{3}]^{+}$, 265 $[M+H-CO_{2}CH_{2}CH_{3}]^{+}$.

C. Preparação do aduto de Edman padrão

O ensaio foi efectuado de acordo com o **Método Geral II** descritos em **III.9.1.1.**, na presença de uma solução dos tautómeros ValOEt-9-AL-1 (**152-1**) e ValOEt-9-AL-2 (**152-2**) e o aduto ValOEt-9-AL-3 (**153**) em água/2-propanol 40% (450 μ L), solução aquosa 5M de acetato de potássio (25 μ L) e fenilisotiocianato (PITC) (2,5 μ L). Os adutos referidos foram previamente gerados de acordo com o procedimento descrito em **III.3.5.1.**, a partir de uma solução de 9-AL (**88**) (2.0 mg, 9.6 μ mol, 1.0 eq.) em THF (200 μ L) e uma solução de hidrocloreto de ValOEt (7.0 mg, 38.6 μ mol, 4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (800 μ L), previamente neutralizado com carbonato de potássio (5.3 mg, 38.6 μ mol, 4.0 eq.), na presença de NaBH₃CN (2.4 mg, 38.6 μ mol,

4.0 eq.) (adicionado 1h após o inicio da reacção). Paralelamente foi efectuado um ensaio em branco, em tudo semelhante excepto na presença de 9-AL (**88**). A análise da mistura reaccional final por LC-ESI(+)-MS mostrou a formação do aduto de Edman, 9-metil-(1-feniltiohidantoína-*N*^a-il)-acridina (ValOEt-9-AL-Ed-1, **173**), apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 426 [M+H]⁺, 384 [M+H-CH(CH₃)₂]⁺, 263 [M+H-



 C_8H_5NOS]⁺,192 [M+H-feniltiohidantoína]⁺, 180 [M+H-C_{13}H_{15}N_2OS]⁺.
III.3.6. A partir da oxcarbazepina (63) e os seus derivados electrófilos III.3.6.1. Por reacção directa com a oxcarbazepina (63) III.3.6.1.1. Reacção com ValOEt

A. Ensaios para a optimização das condições reaccionais da reacção com ValOEt

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.13. Em cada ensaio foi usada uma solução de OXCBZ (**63**) (0.8 mg, 3.17 µmol, 1.0 eq.) em DMF e uma solução de hidrocloreto de ValOEt (1.8 mg, 12.7 µmol, 4.0 eq.), previamente tratada com carbonato de potássio (1.3 mg, 12.7 µmol, 4.0 eq.), em solvente adequado (ver Tabela III.13). Relativamente aos ensaios 1 a 4 (Tabela III.13), as misturas reaccionais ficaram em agitação por quatro tempos distintos 0.5, 1, 2 e 24 h. Nos ensaios 6 a 10 (Tabela III.13) foi também adicionado cianoborohidreto de sódio (2.0 mg, 3.17 µmol 1.0 eq.), após o inicio da reacção, aos mesmos tempos, tendo cada mistura reaccional sido deixada reagir por mais 24 h, a 37 °C. Nos ensaios 5 e 10 (Tabela III.13), efectuou-se a reacção na presença de uma quantidade catalítica de ácido fórmico. Paralelamente foram efectuados ensaios em branco, na ausência de aminoácido, com e sem redutor. A evolução das reacções foi seguida por HPLC analítico.

Ensaio	Solvente (1.0 mL)	NaBH₃CN (eq.)	Tempo de Reacção (h)
1	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	0.5
2	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	1
3	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	2
4	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	24
5	DMF/água/HCOOH, pH 4	-	24
6	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	0.5 ^a + 24
7	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	1ª + 24
8	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	2ª + 24
9	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	24 ^a + 24
10	DMF/água/HCOOH, pH 4 (1:4)	1.0	24
Branco 1	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	24
Branco 2	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	24

Tabela III.13. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre OXCBZ (**63**) e ValOEt na presença ou na ausência de redutor (NaBH₃CN).

^a Adição de redutor, após o inicio da reacção.

A análise das misturas reaccionais finais por LC-ESI(+)-MS dos ensaios acima descritos mostrou a formação dos seguintes adutos:

10-(valinato de etilo-*N*-il)-10,11-dihidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-OXCBZ, **163**) apresentando **MS** (ESI+) m/z: 382 [M+H]⁺, 365 [M-NH₃]⁺, 339 [M+H-HNCO]⁺, 237 [M+H-ValOEt]⁺, 194 [M+H-HNCO-ValOEt]⁺, 146 [ValOEt+H]⁺.



10-(valinato de etilo-N-il)-5H-di-benzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-CBZ,

164) apresentando MS (ESI+) *m/z*: 380 [M+H]⁺, 363 [M-NH₃]⁺,
337 [M+H-HNCO]⁺, 235 [M+H-ValOEt]⁺, 192 [M+H-HNCO-ValOEt]⁺, 146 [ValOEt+H]⁺.



A. Ensaios para a preparação do aduto de Edman padrão.

Os ensaios foram efectuados de acordo com os **Métodos Geral I e II** descritos em **III.9.1.1.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela II.14 na presença de uma solução dos adutos ValOEt-OXCBZ (**163**) e ValOEt-CBZ (**164**) no solvente adequado. Os adutos referidos foram previamente gerados de acordo com o procedimento descrito em **III.3.6.1.1.**, a partir de uma solução de OXCBZ (**63**) (0.87 mg, 3.57 µmol, 1.0 eq.) em DMF (200 µL) e uma solução de hidrocloreto de ValOEt (2.07 mg, 14.3 µmol, 4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (800 µL), previamente neutralizado com carbonato de potássio (1.97 mg, 14.3 µmol, 4.0 eq.). Estes ensaios foram realizados na presença ou ausência de NaBH₃CN (Tabela III.27).

Tabela III.14. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de preparação do aduto de Edman, a partir da OXCBZ (**63**) modificada com ValOEt.

Ensaio	63 (µmol)	NaBH₃CN (eq.)	Método	Solvente (µL)	Base (μL)	PITC (μL)
1	3.57	-	I	125	5	0.75
2	3.57	4.0	I	125	5	0.75
3	3.57	-	П	90	5	0.5
4	3.57	4.0	П	90	5	0.5

A análise das misturas reaccionais finais por LC-ESI(+)-MS dos ensaios mostrou a formação dos adutos:

10-(1-feniltiohidantoína- N^{α} -il)-10,11-dihidro-5*H*-di-benzo-[*b,f*]-azepina-5-carboxamida (ValOEt-OXCBZ-Ed-1, **174**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 471 [M+H]⁺, 454 [M-NH₃]⁺, 428 [M+H-CONH]⁺, 237 [M+H-feniltiohidantoína]⁺, 235 [feniltiohidantoína + H]⁺, 194 [M+H-HNCO-feniltiohidantoína]⁺.



10-(1-feniltiohidantoína- N^{α} -il)-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5carboxamida (ValOEt-CBZ-Ed-2, **175**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 469 [M+H]⁺, 452 [M-NH₃]⁺, 426 [M+H-HNCO]⁺, 235 [feniltiohidantoína + H]⁺, 192 [M+H-CONH-feniltiohidantoína]⁺.



III.3.6.1.2. Reacção com NAL

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.15. Em cada ensaio foi usada uma solução de OXCBZ (**63**) (0.8 mg, 3.17 µmol, 1.0 eq.) em DMF e uma solução de NAL (2.3 mg, 12.7 µmol, 4.0 eq.) num solvente adequado (ver Tabela III.15). Relativamente aos ensaios 1 a 4 (Tabela III.15), as misturas reaccionais ficaram em agitação por quatro tempos distintos 0.5, 1, 2 e 24 h. Nos ensaios 6 a 10 (Tabela III.15) foi também adicionado cianoborohidreto de sódio (2.0 mg, 3.17 µmol 1.0 eq.), após o inicio da reacção, aos mesmos tempos, tendo cada mistura reaccional sido deixada reagir por mais 24 h, a 37 °C. Nos ensaios 5 e 10 (Tabela III.15), efectuou-se a reacção na presença de uma quantidade catalítica de ácido fórmico. Paralelamente foram efectuados ensaios em branco, na ausência de aminoácido, com e sem redutor. A evolução das reacções foi seguida por HPLC-DAD analítico.

Ensaio	Solvente (1.0 mL)	NaBH₃CN (eq.)	Tempo de Reacção (h)
1	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	0.5
2	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	1
3	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	2
4	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	24
5	DMF/água/HCOOH, pH 4	-	24
6	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	0.5 ^a + 24
7	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	1ª + 24
8	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	2 ^a + 24
9	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	24 ^a + 24
10	DMF/água/HCOOH, pH 4 (1:4)	1.0	24
Branco 1	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	-	24
Branco 2	DMF/ Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4	1.0	24

Tabela III.15. Condições reaccionais utilizadas nos ensaios da reacção entre OXCBZ (**63**) e NAL presença ou na ausência de redutor (NaBH₃CN).

^aPara a adição de redutor, após o inicio da reacção

A análise das misturas reaccionais finais por LC-ESI(+)-MS dos ensaios acima descritos mostrou a formação dos seguintes adutos:

 $10-(N^{\alpha}-acetil-lisina-N-il)-10,11-dihidro-5H-di-benzo-[b,f]$ azepina-5-carboxamida (**174**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 425 [M+H]⁺, 383 [M+H-COCH₃]⁺, 382 [M+H- HNCO]⁺, 253 [M+H-C₇H₁₄O₃N]⁺, 237 [M+H-NAL]⁺, 189 [NAL+H]⁺, 194 [M+H-HNCO-NAL]⁺.



 $10-(N^{\alpha}-acetil-lisina-N-il)-5H-di-benzo-[b,f]-azepina-5$ carboxamida (**175**) apresentando**MS**(ESI+)*m/z*: 423 [M+H]⁺,381 [M+H-COCH₃]⁺, 380 [M+H-HNCO]⁺, 318 [M+H-C₃H₅O₃N]⁺,252 [M+H-C₇H₁₄O₃N]⁺, 235 [M+H-NAL]⁺, 189 [NAL+H]⁺, 192 [MH-HNCO-NAL]⁺.



III.3.6.2. A partir de 10,11-di-hidro-10-sulfoximetil-5H-dibenzo [b,f] azepina-5-carboxamida (10OMs-MHD, 168) gerada *in situ* III.3.6.2.1. Reacção com NAC

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.16. A tentativa de gerar o electrófilo 10OMs-MHD (**168**) *in situ* a partir de uma solução de MHD (**105**) (1.0 eq.) previamente seco em solvente adequado (ver Tabela III.16) foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.2.2.3.1.**. Após 30 min. do inicio da reacção adicionou-se uma solução de NAC (4.0 eq.) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4. As misturas reaccionais foram deixadas em agitação por 16 h, a 37 °C. O número de equivalentes apresentado para o nucleófilo tem em conta o pressuposto de que a reacção correspondente à formação do electrófilo apresenta um rendimento de 100%. A evolução das reacções foi seguida por HPLC-DAD analítico e as misturas reaccionais finais foram analisadas por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(-)-MS.

Tabela III.16. Condições experimentais usadas nos ensaios para a tentativa de formação do aduto entre a NAC e o derivado electrófilo, 10,11-di-hidro-10-sulfoximetil-5H-dibenzo [*b*,*f*] azepina-5-carboxamida (**168**) gerado *in situ* a partir de MHD (**105**).

Ensaio	105 (µmol)	Solvente	Base (eq.)	MsCl (eq.)	NAC (eq.)	
1	19.7	THF anidro	Et₃N (1.4)	1.4	4.0	
3	19.7	piridina anidra	-	5.0	4.0	

^{III.3.6.3. A partir 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5}*H*-dibenzo [*b,f*]azepina-5-carboxamida (110) gerada *in situ*III.3.6.3.1. Reacção com NAC

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução de NAC (12.9 mg, 78.7 μmol, 4.0 eq.) em água (200 μL)

que foi adicionada a uma solução de MHD (**105**) (5.0 mg, 19.6 µmol, 1.0 eq.) em DMF (800 µL) gerada a partir do de acordo com o procedimento descrito em **III.2.2.4.1.**, após 30 min. do inicio da reacção. O número de equivalentes apresentado para o nucleófilo tem em conta o pressuposto de que a reacção de formação do electrófilo apresenta um rendimento de 100%. A mistura



reaccional foi deixada em agitação por 16h, a 37 ºC e a sua evolução foi seguida por

HPLC analítico. Paralelamente, foi também efectuado um ensaio em tudo igual ao descrito mas onde não foi adicionada a solução aquosa contendo a NAC. A análise da mistura reaccional final por LC-ESI(+)-MS mostrou a formação do aduto $10-(N^{\alpha}-acetil-cisteína-N-il)-10,11$ -dihidro-5*H*-di-benzo-[*b*,*f*]-azepina-5-carboxamida (NAC-OXCBZ, **131 a**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*: 400 [M+H]⁺, 382 [M+H-H₂O]⁺, 354 [M+H-HCOOH]⁺, 237 [M+H-NAC]⁺, 194 [237-HNCO]⁺.

III.3.6.4. A partir 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b,f*]azepina-5carboxamida (110)

III.3.6.4.1. Reacção com NAC

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução de NAC (3.9 mg, 24.0 μmol, 4.0 eq.) em água (200 μL) e uma solução de **110** em DMF (200 μL) gerada a partir do MHD (**105**) (2.0 mg, 6.0 μmol, 1.0 eq.) de acordo com o procedimento descrito em **III.2.2.4.1.** mas apenas com purificação por SPE-RP-18 (a fracção orgânica obtida foi destilada a pressão reduzida). O número de equivalentes apresentado para o nucleófilo tem em conta o pressuposto de que a reacção de sulfonação de MHD (**105**) apresenta um rendimento de 100%. A mistura reaccional foi deixada em agitação por 72 h, a 37 °C e a sua evolução foi seguida por HPLC-DAD analítico. A mistura reaccional foi analisada por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(-)-MS tendo se observado a formação do aduto NAC-OXCBZ (**131 a**) apresentando a mesma caracterização descrita em **III.3.6.3.1.**.

III.3.6.4.2. Reacção com NAL

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução de NAL (4.5 mg, 24.0 μ mol, 4.0 eq.). em água (200 μ L) e uma solução de **110** em DMF (200 μ L) gerada a partir do MHD (**105**) (2.0 mg, 6.0 μ mol, 1.0 eq.) de acordo com o procedimento descrito em **III.2.2.4.1.** mas apenas com purificação por SPE-RP-18 (a fracção orgânica obtida foi destilada a pressão reduzida). O número de equivalentes apresentado para o nucleófilo tem em conta o pressuposto de que a reacção de sulfonação de MHD (**102**) apresenta um rendimento de 100%. A mistura reaccional foi deixada em agitação por 72 h, a 37 °C e a sua evolução foi seguida por HPLC-DAD analítico A mistura reaccional foi também analisada por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(-)-MS.

III.3.6.4.3. Reacção com ValOEt

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.3.**, na presença de uma solução de hidrocloreto de ValOEt (3.5 mg, 24.0 μmol, 4.0 eq.), previamente tratada com carbonato de potássio (3.3 mg, 24.0 μmol, 4.0 eq.) em água (200 μL) e uma solução de **110** em DMF (200 μL) gerada a partir do MHD (**105**) (2.0 mg, 6.0 μmol, 1.0 eq.) de acordo com o procedimento descrito em **III.2.2.4.1.** mas apenas com purificação por SPE-RP-18 (a fracção orgânica obtida foi destilada a pressão reduzida). O número de equivalentes apresentado para o nucleófilo tem em conta o pressuposto de que a reacção de sulfonação de MHD (**102**) apresenta um rendimento de 100%. A mistura reaccional foi deixada em agitação por 72h, a 37 °C e a sua evolução foi seguida por HPLC-DAD analítico. A mistura reaccional foi também analisada por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(-)-MS.

III.4. Avaliação da reactividade da carbamazepina (62) vs. epoxicarbamazepina (79) com bionucleófilos

III.4.1. Ensaios realizados para a avaliação da reactividade da carbamazepina (62) com bionucleófilos e controlo da atmosfera do meio reaccional

Procedimento Geral

A uma solução 4.2 mM de CBZ (**62**) (1.0 eq.) em acetonitrilo (118 μ L) foi adicionada uma solução 66.8 mM de nucleófilo (50.0 eq.) em acetato de amónio 10 mM, pH 7.5 (374 μ L), num volume final de 0.5 mL. A mistura reaccional ficou em agitação a 37 °C, por 24 h sob azoto ou oxigénio, em ensaios independentes. A tempos distintos (Tabela III.17) foram retiradas duas aliquotas de 80 μ L e a uma delas adicionou-se uma solução 3.8 mM de NVP (3) em acetato de amónio 10 mM, pH 7.5 (20 μ L) como padrão interno. Paralelamente foram também realizados ensaios em branco) na ausência de nucleófilo (Tabela III.17).

			Observação de aduto	s entre nucleófilo e a
Ensaio	Nucleófilo	Atmosfera	CBZ (62)	
		-	2 h	24 h
1	NAC	O ₂	+	+
2	NAC	N_2	+	+
3	NAL	O ₂	-	-
4	NAL	N ₂	-	-
5	GSH	O ₂	-	+
6	GSH	N_2	-	+
Branco 1	-	O ₂	-	-
Branco 2	-	N_2	-	-

Tabela III.17. Condições experimentais usadas nos ensaios para a formação de adutos entre diferentes nucleófilos e a CBZ (**62**).

Todos os ensaios foram analisados por LC-ESI(+)-MS e sempre que necessário também por HRMS-ESI(+), tendo-se observado a formação de vários adutos dependendo do nucleófilo utilizado. A caracterização de todos os compostos observados pode ser encontrada no **capítulo II**, secção **2.1.3.**

III.4.2. Ensaios realizados para a avaliação da reactividade da carbamazepina (62) com bionucleófilos em água marcada isotópicamente com ¹⁸O

Procedimento Geral

A uma solução de CBZ (62) (1.0 eq.) em acetonitrilo adicionou-se uma solução de GSH (50.0 eq.) em solvente adequado (Tabela III.18). A mistura reaccional foi deixada em agitação a 37 °C, durante 24 h. Em alguns ensaios a mistura reaccional foi mantida sob azoto ou oxigénio em ensaios independentes (Tabela III.18).

Tabela III.18. Condições experimentais usadas no estudo da reactividade da CBZ (**62**) e a GSH com controlo de solvente. ^a Neste ensaio foi usado acetonitrilo previamente seco.

Ensaio	CBZ (62) (mmol)	Solvente (4:1) (µL)	Atmosfera
1	0.5	H ₂ O/acetonitrilo (500)	Sem controlo
2	0.5	H ₂ O ¹⁸ /acetonitrilo (500)	Sem controlo
3	0.42	H ₂ O ¹⁸ /acetonitrilo ^a (50)	N ₂
4	0.42	H ₂ O ¹⁸ /acetonitrilo ^a (50)	O ₂

Todos os ensaios foram analisados por LC-ESI(+)-MS e sempre que necessário também por HRMS-ESI(+), tendo-se observado a formação de vários adutos (Tabela III.15). A caracterização de todos os compostos observados pode ser encontrada no **capítulo II**, secção **2.1.3.**

III.4.3. Ensaios realizados para a avaliação da reactividade da epoxicarbamazepina (79) com bionuclófilos

Procedimento Geral

A uma solução 4.2 mM de EPCBZ (**79**) (1.0 eq.) em acetonitrilo (126.15 μ L) foi adicionada uma solução 66.8 mM de nucleófilo (50.0 eq.) em acetato de amónio 10 mM, pH 7.5 (373.85 μ L), num volume final de 0.5 mL. A mistura reaccional ficou em agitação a 37 °C, durante 24 h. A tempos distintos (Tabela III.19) foram retiradas duas aliquotas de 80 μ L e a uma delas adicionou-se uma solução de 20 μ L de uma solução 3.8 mM de NVP (**3**) em acetato de amónio 10 mM, pH 7.5, como padrão interno. Paralelamente foram também realizados ensaios em branco na ausência de nucleófilo (Tabela III.19).

Tabela III.19. Condições experimentais usadas nos ensaios de reactividade do EPCBZ (**79**) com diferentes nucleófilos. ^a Neste ensaio não foi adicionado electrófilo; ^b Neste ensaio não foi adicionado nucleófilo.

Ensaio	Nucleófilo	Observação de adutos com o				o EPCBZ (79)	
LIISalo	Nucleonio	0.5 h	2 h	4h	6h	24h	
1	NAC	-	-	-	+	+	
2	NAL	-	-	-	-	-	
3	GSH	-	-	-	+	+	
Branco 1ª	NAC	-	-	-	-	-	
Branco 2ª	NAL	-	-	-	-	-	
Branco 3ª	GSH	-	-	-	-	-	
Branco 4 ^b	-	-	-	-	-	-	

Todos os ensaios foram analisados por LC-ESI(+)-MS e sempre que necessário também por HRMS-ESI(+), tendo-se observado a formação de vários adutos (Tabela III.16). A caracterização de todos os compostos observados pode ser encontrada no **capítulo II**, secção **2.1.3.**

III.5. Ensaios para a formação de aductos com o péptido LQQCPF

Procedimento geral

A uma solução de electrófilo em acetonitrilo (100 µL) adicionou-se lentamente uma solução do péptido LQQCPF em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (400 µL), numa proporção mássica 2:1 (electrófilo:péptido). A mistura reaccional foi deixada em agitação a 37 °C por 48h. Ao fim deste tempo fez-se uma extracção com acetato de etilo (3x 500µL) e a fase aquosa foi analisada por HPLC-DAD e LC-HRMS-ESI (+).

III.5.1. Por reacção com a carbamazepina (62)

A reacção foi efectuada de acordo com o **procedimento geral** descrito em **III.5.** na presença do electrófilo CBZ (**62**) (1.0 mg, 4.23 μmol).

III.5.2. Por reacção com epoxi-carbamazepina (79)

A reacção foi efectuada de acordo com o **procedimento geral** descrito em **III.5.** na presença do electrófilo EPCBZ (**79**) (1.0 mg, 3.97 μmol).

III.5.3. Por reacção com a IAA

A reacção foi efectuada de acordo com o **procedimento geral** descrito em **III.5.** na presença do electrófilo IAA (1.0 mg, 5.41 μmol). A mistura reaccional foi deixada em agitação a 37 °C, por 48h, ao abrigo da luz.

III.6. Ensaios para a formação de adutos com 2'-desoxinucleósidos

Método I

A uma solução de electrófilo (1.0 eq.) em DMF (150 μL) foi adicionada uma solução de nucleósido (1.0 eq.) em água/DMF (1:1) (300 μL). A mistura reaccional ficou em agitação, a 37 °C, por 48 h. Paralelamente, fez-se um ensaio em branco onde apenas se colocou uma solução de electrófilo nas mesmas condições.

Método II

A uma solução de electrófilo (1.0 eq.) em DMF (150 μ L) foi adicionada uma solução de nucleósido (1.0 eq.) em água/DMF (1:1) (300 μ L). A mistura reaccional ficou em agitação, a 37 °C, por 30 min. De seguida, foi adicionado cianoborohidreto de sódio (4.0 eq.) e deixou-se em agitação por 48h, a 37 °C. Paralelamente, fez-se um

ensaio em branco onde apenas se colocou uma solução de electrófilo nas mesmas condições, incluindo a adição do redutor.

III.6.1. A partir da oxcarbazepina (63)III.6.1.1. Reacção com a 2'-desoxiguanosina (48)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Método I** e **II** descrito em **III.5.1.**, na presença de uma solução de OXCBZ (**63**) (2.0 mg, 8.2 μ mol, 1.0 eq.) e uma solução de 2'-desoxiguanosina (**48**, 2'-dG) (2.25 mg, 8.2 μ mol, 1.0 eq.). Relativamente à reacção efectuada de acordo com o **método II**, adicionou-se o redutor (2 mg, 3.1 μ mol, 4.0eq.) após 30 min. do inicio da reacção. As misturas reaccionais finais foram analisadas por LC-ESI(+)-MS.

III.6.1.2. Reacção com a 2'-desoxiadenina (49)

A reacção foi efectuada de acordo com o **método I** e **II** descrito em **III.5.1.**, na presença de uma solução de OXCBZ (**63**) (2.0 mg, 8.2 μmol, 1.0 eq.) e uma solução de 2'-desoxiadenina (**49**, 2'-dA) (3.9 mg, 8.2 μmol, 1.0 eq.). Relativamente à reacção efectuada de acordo com o **método II**, adicionou-se o redutor (2 mg, 3.1 μmol, 4.0eq.) após 30 min. do início da reacção. As misturas reaccionais finais foram analisadas por LC-ESI(+)-MS.

III.6.2. A partir do 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b,f*]azepina-5carboxamida (110)

III.6.2.1. Reacção com a 2'-desoxiguanosina (48)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Método I** descrito em **III.5.**, na presença de uma solução de MHD-SO₃⁻ (**110**) (2.0 mg, 6.0 μ mol, 1.0 eq.) e uma solução de 2'-dG (**48**) (1.7 mg, 6.0 μ mol, 1.0 eq.). A mistura reaccional final foi analisada por LC-ESI(+)-MS.

III.6.2.2. Reacção com a 2'-desoxiadenina (49)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Método I** descrito em **III.5.**, na presença de uma solução de MHD- SO_3^{-} (**110**) (2.5 mg, 7.5 µmol, 1.0 eq.) e uma solução de 2'-dA (**49**) (2.0 mg, 6.0 µmol, 1.0 eq.). A análise da mistura reaccional final por LC-ESI(+)-MS mostrou a formação do aduto 10-(desoxiadenina-*N*-il)-10,11-dihidro-



5*H*-di-benzo-[*b,f*]-azepina-5-carboxamida (10-dA-OXCBZ, **176**) apresentando **MS** (ESI+) *m/z*. 488 [M+H]⁺, 372 [M+H-dR]⁺, 252 [dA+H]⁺, 237 [M+H-dA]⁺.

III.7. Modificação de proteinas do sangue

III.7.1. Modificação da hemoglobina humana (Hb)

Procedimento Geral

A uma solução de Hb em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 foi adicionado uma solução de um electrófilo em MeCN, THF ou DMF (em 10% do volume relativamente à fase aquosa), numa proporção proteina:metabolito 1:1 (m/m). A mistura reaccional foi deixada em agitação a 37 °C, durante 48 h. Após este tempo, a mistura reaccional foi extraída com AcEt (2x o volume final da reacção) e a fase orgânica evaporada à secura. Paralelamente foi efectuado um ensaio em branco em tudo igual ao descrito anteriormente, excepto a presença do electrófilo.

III.7.1.1. Reacção com epoxi-carbamazepina (79)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.1.**, na presença de uma solução de EPCBZ (**79**) (1.0 mg, 3.97 μ mol) em acetonitrilo (100 μ l). O resíduo sólido obtido foi redissolvido no solvente adequado e submetido a hidrólise como descrito em **III.9.1.1.2.B.** e alíneas subsequentes.

III.7.1.2. Reacção com dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído (88)

Os ensaios foram efectuados de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.1.**, utilizando as condições reaccionais descritas no Tabela III.20. Cada ensaio foi efectuado na presença de uma solução de 9AL (**88**) (2.0 mg, 9.66 μmol, 1.0 eq.) em THF (200 μl). No ensaio 2 (Tabela III.20), a mistura reaccional foi deixada reagir por 1h e adicionou-se NaBH₃CN (1.2 mg, 19.3 μmol, 2.0 eq), continuando em agitação a 37 °C, durante 48 h. Os resíduos sólidos obtidos foram redissolvidos no solvente adequado e submetidos a hidrólise como descrito **III.9.1.1.3.B.** e alíneas subsequentes.

Ensaio	9-AL (88) (mg)	NaBH₃CN (eq.)
1	2.0	-
2	2.0	2.0

Tabela III.20. Condições experimentais utilizadas nos ensaios para a modificação da Hb com 9-AL (**88**), na presença ou ausência de redutor.

III.7.1.3. Reacção com oxcarbazepina (63)

Os ensaios foram efectuados de acordo o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.1**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.21. Cada ensaio foi efectuada na presença de OXCBZ (**63**) (1.0 mg, 3.97 µmol, 1.0 eq.) em DMF (100 µL). No ensaio 2 (Tabela III.21), após 16 h em agitação, a 37 °C, foi adicionado NaBH₃CN de sódio (1.0 mg, 15.9 µmol, 4.0 eq.) e deixou-se em agitação à mesma temperatura, até às 48 h. Os resíduos sólidos obtidos foram redissolvidos no solvente adequado e submetidos a hidrólise como descrito em **III.9.1.1.4.B.** e alíneas subsequentes.

Tabela III.21. Condições experimentais utilizadas nos ensaios para a modificação da Hb com OXCBZ (**63**), na presença ou ausência de redutor.

Ensaio	OXCBZ (63) (mg)	NaBH₃CN (eq.)
1	1.0	-
2	1.0	4.0

III.7.2 Modificação da albumina do soro humano (HSA)

Procedimento geral

A uma solução de HSA em tampão fosfato 50 mM, pH7.4 foi adicionada uma solução de um electrófilo em MeCN, THF ou DMF (até 10% do volume relativamente à fase aquosa), numa proporção mássica (proteína:electrófilo) variável. A solução foi deixada em agitação lenta a 37 °C, por 48 h. Após este tempo, a mistura reaccional foi submetida ao tratamento adequado e subsequentemente a uma digestão como descrito em **III.9.2.** e alíneas seguintes. Paralelamente foi efectuado um ensaio em branco em tudo igual ao descrito anteriormente, excepto na presença do electrófilo.

III.7.2.1. Reacção com carbamazepina (62)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.2.**, na presença de uma solução de CBZ (**62**) em THF ou MeCN e utilizando as condições descritas na Tabela III.22. Para cada ensaio foi efectuada uma digestão descrita em **III.9.2.1.**

Tabela III.22. Condições experimentais utilizadas para a tentativa de formação dos adutos entre o HSA e CBZ (62).

Ensaio	HSA (mg)	62 (mg)	Solvente (mL)
1	1.0	1.0	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF (1.0/0.1)
2	1.0	0.5	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF (1.0/0.1)
3	1.0	0.1	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/ THF (1.0/0.1)
4	1.0	1.0	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/MeCN (1.0/0.1)

III.7.2.2. Reacção com epoxi-carbamazepina (79)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.2.**, na presença de uma solução de EPCBZ (**79**) em THF ou MeCN e utilizando as condições descritas na Tabela III.23. Para cada ensaio foi efectuada uma digestão descrita em **III.9.2.2.**.

Tabela III.23. Condições experimentais utilizadas para a tentativa de formação dos adutos entre o HSA e EPCBZ (**79**).

Ensaio	HSA (mg)	79 (mg)	Solvente (mL)
1	1.0	1.0	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF (1.0/0.1)
2	1.0	0.5	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/THF (1.0/0.1)
3	1.0	0.1	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/ THF (1.0/0.1)
4	1.0	1.0	Tampão fosfato 50 mM, pH 7.4/MeCN (1.0/0.1)

III.7.2.3. Reacção dibenzo[b,e]piridina-9-carboxaldeído (88)

As reacções foram efectuadas de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.2.**, na presença de uma solução de 9AL (**88**) em THF (100 μ L) e utilizando as condições descritas na Tabela III.24. No Ensaio 2 (Tabela III.24) foi adicionado NaBH₃CN (2.0 eq.) após 16 h do inicio da reacção. Em todos os ensaios a mistura

reaccional ficou em agitação por 48 h, a 37 °C. O número de equivalentes apresentado para o redutor tem em conta o pressuposto que **88** foi consumido na sua totalidade. Para cada ensaio foi efectuada uma digestão descrita em **III.9.2.4.**

 Tabela III.24.
 Condições experimentais utilizadas para a tentativa de formação dos adutos entre o HSA e 9-AL (88).

Ensaio	HSA (mg)	9-AL (88) (mg)	NaBH₃CN
1	1.0	1.0	-
2	1.0	1.0	+

III.7.2.4. Reacção com 2-hidroxi-carbamazepina (82)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.2.**, na presença de um electrófilo gerado previamente. A uma solução de 2-OHCBZ (82) (0.5 mg, 1.97 μ mol, 1.0 eq.) em THF (100 μ L) foi adicionada uma solução de sal de Frémy (0.7 mg, 2.4 μ mol, 1.2 eq.) em tampão fosfato 100 mM, pH 7.4 (200 μ L). A mistura reaccional ficou em agitação por 30 min., a 37 °C. Após a extracção com diclorometano (2 x 1 mL), a fase orgânica foi evaporada com fio de azoto e redissolvida em THF (50 μ L). A esta solução foi adicionada uma solução de HSA (0.5 mg) em tampão fosfato (500 μ L) ficando em agitação por 48 h, a 37 °C. Para este ensaio foi efectuada uma digestão descrita em **III.9.2.3.**

III.7.2.5. Reacção com oxcarbazepina (63)

As reacções foram efectuadas de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.1.**, na presença de uma solução de OXCBZ (**63**) em MeCN ou DMF (50 μL) e utilizando as condições descritas na Tabela III.25. Em todos os ensaios a mistura reaccional ficou em agitação por 48 h, a 37 °C. Nos ensaios 3 e 4 foi adicionado um redutor (2.5 a 4.0 eq.) (ver Tabela II.25). Nos ensaios 1 e 3 a mistura reaccional ficou em agitação a 37 °C por mais 16h, após a adição do redutor enquanto que nos ensaios 2 e 4, a mistura reacional ficou em agitação por 1 h. O número de equivalentes apresentado para o redutor tem em conta o pressuposto que **63** foi consumido na sua totalidade. Para cada ensaio foi efectuada uma digestão descrita em **III.9.2.5.**.

Ensaio	HSA (mg)	63 (mg)	Solvente (550 μL)	Redutor (eq.)
1	0.5	0.5	tampão fosfato 50 mM, pH7.4/MeCN	-
2	0.5	0.5	tampão fosfato 50 mM, pH7.4/DMF	-
3	0.5	0.5	tampão fosfato 50 mM, pH7.4/MeCN	NaBH₃CN (4.0)
4	0.5	0.5	tampão fosfato 50 mM, pH7.4/DMF	NaBH4 (2.5)

Tabela III.25. Condições experimentais utilizadas para a tentativa de formação dos adutos entre o HSA e OXCBZ (63).

III.7.1.6 Reacção com 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b,f*]azepina-5carboxamida (110)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.1.**, na presença de uma solução de MHD-SO₃⁻ (**110**) (1.0 mg) em DMF (100 μ L) e uma solução de HSA (1.0 mg) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (900 μ L). Para este ensaio foi efectuada uma digestão descrita em **III.9.2.6.**

III.8. Ensaios para a formação de adutos com ácido desoxirribonucleico.

Procedimento Geral

A uma solução stock de ácido desoxirribonucleico (DNA) em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 adicionou-se uma solução de electrófilo [razão mássica DNA:electrófilo (1:1)] em acetonitrilo ou DMF. A mistura reaccional ficou em agitação, a 37 °C por 48h, com uma agitação lenta (300 rpm). Após a remoção do electrófilo não ligado covalentemente ao DNA, com acetato de etilo (2 x 1mL), o DNA foi precipitado com a adição de 5 M NaCl e etanol, num banho de acetona/azoto liquido (-21 °C). A mistura reaccional foi centrifugada e o pellet obtido, lavado com 70 % etanol frio. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi redissolvido em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 para posterior hidrólise (ver **III.9.1**). Paralelamente fez-se um ensaio em branco semelhante ao descrito na ausência de electrófilo. Todos os passos subsequentes foram também realizados.

III.8.1. A partir da epoxi-carbamazepina (79)

Os ensaios foram efectuados de acordo o **Procedimento Geral** descrito em **III.8.**, a partir de uma solução stock de DNA (2.0 mg/mL) em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (1 mL) e uma solução de EPCBZ (**79**) (2 mg, 19.8 µmol) em acetonitrilo

(200 μ L). A precipitação do DNA foi realizada com a adição de 5 M NaCl (45 μ L) e etanol (1.5 mL), num banho de acetona/azoto liquido (-21 °C). A mistura reaccional foi centrifugada e o pellet obtido, lavado com 70 % etanol frio (1.5 mL). O sobrenadante foi retirado e o pellet foi redissolvido em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (2 mL) tendo sido submetido às hidrólises térmica e enzimática descritas em **III.9.1.1.1** e **III.9.1.2.1.**, respectivamente.

III.8.2. A partir da oxcarbazepina (63)

Os ensaios foram efectuados de acordo o **Procedimento Geral** descrito em **III.8.**, utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.26. Cada ensaio foi preparado a partir de uma solução stock de DNA (2.0 mg/mL) em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA. No Ensaio 2 (Tabela III.26), após as 48h em agitação a 37 °C foi adicionado NaBH₃CN (4 mg, 63.5 µmol, 4.0 eq.) e deixou-se em agitação à mesma temperatura, por 1h. A precipitação do DNA para todos os ensaios foi realizada com a adição 5 M NaCl (90 µL) e etanol (3.0 mL), num banho de acetona/azoto liquido (-21 °C). A mistura reaccional foi centrifugada e o pellet obtido, lavado com 70 % etanol frio (3.0 mL). O sobrenadante foi retirado e o pellet foi redissolvido em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (2.5 mL para o Ensaio 1 e 2.0 mL para o Ensaio 2) tendo sido submetido às hidrólises térmica e enzimática descritas em **III.9.1.1.2.** e **III.9.1.2.2.**, respectivamente. Paralelamente fizeram-se ensaios em branco semelhantes ao descrito na ausência de electrófilo e/ou presença de redutor. Todos os passos subsequentes foram igualmente realizados.

Tabela III.26.	Condições ex	xperimentais	utilizadas	nos ensaio	s para a	tentativa de	e formação	dos
adutos entre	o DNA e OXC	BZ (63).						

Ensaio	Sol. stock DNA (2.0 mg/mL) (mL)	OXCBZ (63) (µmol)	NaBH₃CN
1	2.5	19.7	-
2	2.0	15.8	+

III.8.3. A partir da 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b,f*]azepina-5carboxamida (110)

Os ensaios foram efectuados de acordo o **Procedimento Geral** descrito em **III.8.**, a partir de uma solução stock de DNA (1.0 mg/mL) em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (4 mL) e uma solução de MHD-SO₃⁻ (**108**) (4 mg, 19.8 µmol) em DMF (400 µL). A precipitação do DNA foi realizada com a adição de 5 M NaCl (45 µL) e

etanol (1.5 mL), num banho de acetona/azoto liquido (-21 °C). A mistura reaccional foi centrifugada e o pellet obtido, lavado com 70 % etanol frio (1.5 mL). O sobrenadante foi retirado e o pellet foi redissolvido em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (2 mL) tendo sido submetido às hidrólises térmica e enzimática descritas em **III.9.1.1.3.** e **III.9.1.2.3.**, respectivamente.

III.9. Hidrólise de proteínas e DNA modificados com electrófilos reactivos da carbamazepina (62) e oxcarbamazepina (63)
III.9.1. Hidrólise da hemoglobina humana (Hb) modificada
III.9.1.1. Método de degradação de Edman

Método Geral I

Procedimento efectuado de acordo com o descrito na literatura [332, 333]. Para uma solução de 1.0 mg de hemoglobina ou aminoácido modificados, em DMF (125 μ L) foi adicionada uma solução 1M de hidróxido de sódio (NaOH) (5 μ L) e fenilisotiocianato (PITC) (0.75 μ L). A solução foi deixada em agitação lenta a 37 °C por 2h, seguida de 1h a 45 °C. À mistura reaccional foi adicidionado água (1.0 mL) seguida de uma extracção com acetato de etilo (2 x 1 mL). A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida. A mistura obtida foi analisada por LC-ESI(+)-MS.

Método Geral II

Para uma solução de 1.0 mg de hemoglobina ou aminoácido modificado, em água/2-propanol 40% (45 μ L) foi adicionada uma solução 5M acetato de potássio (2.5 μ L) e fenilisotiocianato (PITC) (0.25 μ L). A solução foi deixada em agitação lenta, à temperatura ambiente por 16h, seguida de 2h a 45 °C. Após remoção do 2-propanol por evaporação a pressão reduzida, a mistura reaccional foi extraída com acetato de etilo (2 x 1mL). A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida e a mistura obtida foi analisada por LC-ESI(+)-MS.

III.9.1.1.1. Hemoglobina modificada com epoxi-carbazepina (79)A. Preparação do aduto de Edman a partir da hemoglobina modificada.

A reacção foi efectuada de acordo com o **Método Geral I e II** descrito em **III.9.1.1.**, a partir de uma solução de Hb modificada, previamente gerada segundo o procedimento descrito em **III.7.1.1.**, e utilizando as condições desritas na Tabela III.27. Paralelamente foi efectuado um ensaio em branco, em tudo semelhante excepto na presença do EPCBZ (**79**).

Ensaio	Hb modificada (mg)	Método	solvente (μL)	Base (μL)	PITC (μL)
1	8.4	Ι	125	5	0.75
2	1	П	190	10	1

Tabela III.27. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de destacamento da valina N-terminal da Hb modificada com EPCBZ (**79**).

A análise da mistura reaccional final por LC-ESI(+)-MS de cada ensaio mostrou a formação do aduto ValOEt-EPCBZ-Ed-1 (**171**), apresentando as mesmas características apresentadas em **III.3.1.1.2.1.**

III.9.1.1.2. Hemoglobina modificada com dibenzo[*b*,*e*]piridina-9carboxaldeído (88)

A. Preparação do aduto de Edman a partir da hemoglobina modificada

A reacção foi efectuada de acordo com o **Método Geral II** descrito em **III.9.1.1.**, a partir de uma solução de Hb (2.0 mg) modificada em água/2-propanol 40% (190 μ L), previamente gerada segundo o procedimento descrito em **III.7.1.2.**, e utilizando uma solução 5 M de acetato de potássio (10 μ L) e fenilisotiocianato (PITC) (1 μ L). Paralelamente foi efectuado um ensaio em branco, em tudo semelhante excepto na presença do 9-AL (**88**). A análise da mistura reaccional final por LC-ESI(+)-MS de cada ensaio mostrou a formação do aduto ValOEt-9-AL-Ed-1 (**184**), apresentando as mesmas características apresentadas em **III.3.5.1.**

III.9.1.1.4. Hemoglobina modificada com oxcarbazepina (63)B. Preparação do aduto de Edman a partir da hemoglobina modificada

Os ensaios foram efectuadas de acordo com os **Método Geral I e II** descrito em **III.9.1.1.**, a partir de uma solução de Hb modificada previamente e gerada segundo o procedimento descrito em **III.7.1.3.**, e utilizando as condições reaccionais descritas na Tabela III.28. Paralelamente a cada ensaio, efectuado um ensaio em branco, em tudo semelhante excepto na presença de **63**.

Ensaio	Hb (mg)	NaBH₃CN (eq.)	Método	Solvente (µL)	Base (μL)	PITC (μL)
1	1	-		125	5	0.75
2	1	4.0	I	125	5	0.75
3	1	-	II	190	10	1
4	1	4.0	П	190	10	1

Tabela III.28. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de destacamento da valina *N*-terminal da Hb modificada com OXCBZ (**63**).

III.9.2. Digestão da albumina de soro humano (HSA) modificada

Todas as misturas reaccionais de HSA modificadas com os vários electrófilos considerados, obtidas de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.7.2.** e alíneas seguintes, foram digeridas após o tratamento adequado da mistura reaccional. As misturas reaccionais correspondentes a cada um dos ensaios sofreram um ou mais dos tratamentos descritos na Tabela III.29, sendo de seguida evaporadas à secura a pressão reduzida.

HSA modificada	HSA modificada com vários electrófilos.					
Tratamento	Descrição					
Α	Precipitação da proteína com acetona (4 x volume total da mistura reaccional) por 3 h, a 0°C. Após este tempo, o sobrenadante foi removido.					
В	Filtração da mistura reaccional em tubos de filtração Amicon® Ultra, com cut-off 10 kDa (Millipore). A solução retida no filtro foi lavada com água (2 x 200 µL).					
С	Remoção do electrófilo não ligado covalentemente à HSA, por extracção com CH ₂ Cl ₂ ou AcEt (2 x 1 mL) seguido de precipitação da proteína nas mesmas condições descritas em A.					
D	Remoção do electrófilo não ligado covalentemente à HSA, por extracção com AcEt (3x 1mL)					

Tabela III.29. Condições experimentais utilizadas no tratamento das misturas reaccionais deHSA modificada com vários electrófilos.

Os métodos de digestão utilizados foram os seguintes:

Método Geral I

Para cada ensaio, a HSA modificada previamente seca (0.25-2.0 mg) foi dissolvida numa solução de 6 M de ureia em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.5 (100 µL). De seguida, diluiu-se lentamente esta solução, com uma solução 50 mM de bicarbonato de amónio, pH 8.5, até uma concentração final de 1 M de ureia (500 µL). A esta nova mistura diluída, adicionou-se uma solução 200 mM de DTT em 50 mM de tampão Tris-HCI, pH 8.5 (30 µL, Cf~10 mM) e deixou-se em agitação lenta por 30 min. à temperatura ambiente. Após este tempo, adicionou-se uma solução 200 mM de IAA em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.5 (30 µL, Cf~10 mM) e deixou-se em agitação lenta à temperatura ambiente durante mais 30 min.. Foi adicionada à mistura reaccional uma solução 1 M de CaCl₂ (1 µL, Cf~1.0 mM) seguida de uma solução de 1.0 mg/mL de tripsina em 50 mM de bicarbonato de amónia, pH 8.5 (100 μL) e numa proporção protease:proteína 1:20 (m/m). A mistura reaccional ficou em agitação por 16 h, a 37 °C e ao fim deste tempo adicionou-se nova carga de protease. A mistura reaccional ficou em agitação por mais 16 h. Para terminar a actividade da protease, adicionou-se ácido fórmico (10% do volume final) e centrifugou-se a 5000 rpm por 5 min.. A mistura de péptidos obtida foi analisada por HRMS-ESI(+).

Método Geral II

O procedimento foi adaptado da literatura [334]. Para cada ensaio, a HSA modificada (0.25-2.0 mg) previamente seca foi dissolvida numa solução de 6 M de ureia em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.5 (100 μ L). De seguida, diluiu-se lentamente esta solução, com uma solução 50 mM de bicarbonato de amónio, pH 8.5, até uma concentração final de 1 M de ureia (500 μ L). A esta nova mistura diluída, adicionou-se uma solução 200 mM de DTT em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.5 (30 μ L, Cf~10 mM) e deixou-se em agitação lenta por 30 min. à temperatura ambiente. Após este tempo, adicionou-se uma solução 200 mM de JAA em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.5 (30 μ L, Cf~10 mM) e deixou-se em agitação lenta por 30 min. à temperatura ambiente durante mais 30 min.. À mistura reaccional foi adicionada uma solução 1.0 M de CaCl₂ (1 μ L, Cf~1.0 mM) seguida de uma solução 1.0 mg/mL de cada protease, tripsina e quimotripsina (100 μ L cada) numa proporção proteína:protease 1:20 (m/m). A mistura reaccional ficou em agitação por 16 h, a 37 °C e ao fim deste tempo adicionou-se nova carga das duas proteases. A mistura reaccional ficou em agitação por mais 16 h. Para terminar a actividade da protease, adicionou-se ácido fórmico

(10% do volume final) e centrifugou-se a 5000 *rpm* por 5 min.. A mistura de péptidos obtida foi analisada por HRMS-ESI(+).

Método Geral III

Este procedimento foi adaptado do Método I. Para cada ensaio, a HSA modificada previamente seca (0.25-2.0 mg) foi dissolvida numa solução de 50 mM de bicarbonato de amónia pH 8.5, (600 μ L). De seguida, adicionou-se uma solução 200 mM de DTT em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.5 (30 μ L, Cf~10 mM) e deixou-se em agitação lenta por 30 min. à temperatura ambiente. Após este tempo, adicionou-se uma solução 200 mM de IAA em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.5 (30 μ L, Cf~10 mM) e deixou-se em agitação lenta à temperatura ambiente durante mais 30 min.. Foi adicionada à mistura reaccional uma solução 1 M de CaCl₂ (1 μ L, Cf~1.0 mM) seguida de uma solução de 1.0 mg/mL de tripsina em 50 mM de bicarbonato de amónio, pH 8.5 (100 μ L) e numa proporção proteína:protease 1:20 (m/m). A mistura reaccional ficou em agitação por 16 h, a 37 °C e ao fim deste tempo adicionou-se nova carga de protease. A mistura reaccional ficou em agitação por 16 h. Para terminar a actividade da protease, adicionou-se ácido fórmico (10% do volume final) e centrifugou-se a 5000 *rpm* por 5 min.. A mistura de péptidos obtida foi analisada por HRMS-ESI(+).

Método Geral IV

Este procedimento foi adaptado do Método I. Para cada ensaio, por cada 100 µg de HSA modificada previamente seca foi dissolvida numa solução 6 M de Ureia em 50 mM bicarbonato de amónia, pH 8.5 (100 µL). De seguida, adicionou-se uma solução 200 mM de DTT (5 µL, C_f:10 mM) e deixou-se em agitação por 1 h, a 37 °C. Após este tempo, adicionou-se uma solução 200 mM IAA (29 µL, C_f:55 mM) e deixou-se à temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 30 min.. A mistura reaccional foi diluída com uma solução 50 mM de bicarbonato de amónia, pH 8.5 (500 µL) até obter 1 M de ureia e adicionou-se uma solução 1.0 mg/mL de Tripsina (5 µL) numa proporção protease:proteina de 1:20 (m/m). A mistura reaccional ficou em agitação por 16 h, a 37 °C. Para terminar a actividade da protease, adicionou-se ácido fórmico (10% do volume final) e centrifugou-se a 5000 *rpm* por 5 min.. A mistura de péptidos obtida foi analisada por HRMS-ESI(+).

Método Geral V

Para cada ensaio, por cada 100 μ g de HSA modificada previamente seca foi dissolvida numa solução 6 M de ureia em 50 mM bicarbonato de amónio, pH 8.5 (100 μ L). De seguida, adicionou-se uma solução 200 mM de DTT (5 μ L, C_f:10 mM) e deixou-se em agitação por 1 h, a 37 °C. Após este tempo, adicionou-se uma solução 200 mM IAA (29 μ L, C_f:55 mM) e deixou-se à temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 30 min.. A mistura reaccional foi diluída com uma solução 50 mM de bicarbonato de amónio, pH 8.5 (500 μ L) até obter 1 M de ureia e adicionou-se uma solução 1.0 mg/mL de Tripsina (5 μ L) numa proporção protease:proteina de 1:20 (m/m). A mistura reaccional ficou em agitação por 16 h, a 37 °C. Ao fim deste tempo, adicionou-se uma solução 1.0 mg/mL de Quimotripsina e deixou-se em agitação a 37 °C por mais 6 h. Para terminar a actividade das proteases, adicionou-se ácido fórmico (10% do volume final) e centrifugou-se a 5000 *rpm* por 5 min.. A mistura de péptidos obtida foi analisada por por HRMS-ESI(+).

Método Geral VI

O procedimento usado foi adaptado da literatura [36]. Para cada ensaio, por cada 1.0 mg de HSA modificada em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 (350 µL) foi adicionada uma solução aquosa de Pronase E (19 µL, 530 µg/mL) e uma solução aquosa de leucina aminopeptidase M (8 µL, 130 µg/mL). A mistura reccional foi incubada por 24 h, a 37 °C. A mistura de aminoácidos obtida foi analisada por LC-ESI(+)-MS sem qualquer tratamento adicional.

III.9.2.1. Albumina do soro humana modificada com carbamazepina (62)

As digestões foram efectuadas de acordo com os **Métodos Gerais I a V** descrito em **III.9.2.**, na presença de HSA modificada com CBZ (**62**) como descrito em **III.7.2.1.**. As condições utilizadas bem como o tratamento prévio, à mistura reaccional, encontram-se na Tabela III.30.

Free ie	Condições	de Modificação	Tratamento	Método de	
Ensalo	HSA (µg)	CBZ (62) (µg)	pós-modificação	digestão	
1	250	250	А	I	
2	250	250	А	II	
3	125	250	А	I	
4	125	250	А	П	
5	250	250	А	III	
6	250	250	А	IV	
7	100	100	В	IV	
8	100	100	В	V	
9	100	100	С	IV	
10	1000	1000	D	VI	
Branco 1	250	-	А	I	
Branco 2	250	-	А	П	
Branco 3	250	250	А	111	
Branco 4	250	-	А	IV	
Branco 5	100	-	В	IV	
Branco 6	100	-	В	V	
Branco 7	100	-	С	IV	
Branco 8	1000	-	D	VI	

Tabela III.30. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com CBZ (62).

III.9.2.2. Albumina do soro humano modificada com epoxi-carbamazepina (79)

As digestões foram efectuadas de acordo com os **Métodos Gerais I a V** descrito em **III.9.2.**, na presença de HSA modificada com EPCBZ (**79**) como descrito em **III.7.2.2.** As condições utilizadas bem como o tratamento prévio, à mistura reaccional, encontram-se na Tabela III.31.

Fracia	Condiçõe	s de modificação	Tratamento	Método de	
Ensaio	HSA (µg)	EPCBZ (79) (µg)	pós-modificação	digestão	
1	250	250	А	I	
2	250	250	А	II	
3	125	250	А	I	
4	125	250	А	II	
5	250	250	А	III	
6	250	250	А	IV	
7	100	100	В	IV	
8	100	100	В	V	
9	100	100	С	IV	
10	1000	1000	D	VI	
Branco 1	250	-	А	I	
Branco 2	250	-	А	П	
Branco 3	250	-	А	III	
Branco 4	250	-	А	IV	
Branco 5	100	-	В	IV	
Branco 6	100	-	В	V	
Branco 7	100	-	С	IV	
Branco 8	1000	-	D	VI	

Tabela III.31. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com EPCBZ (**79**).

III.9.2.3. Albumina do soro humano modificada 2-hidroxi-carbamazepina (82)

As digestões foram efectuadas de acordo com o Método Geral IV descrito em III.9.2., na presença de HSA modificada com 2-OHCBZ (82) como descrito em III.7.2.3.. As condições utilizadas para a modificação e a digestão bem como o tratamento prévio que antecedeu à digestão, encontram-se na Tabela III.32.

Freeie	Condiçõ	es de modificação	Tratamento	Método de digestão	
Ensaio	HSA (µg)	2-OHCBZ (88) (µg)	pós-modificação		
1	500	500	А	IV	
Branco 1	500	500	Α	IV	

Tabela III.32. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com 2-OHCBZ (82).

III.9.2.4. Albumina do soro humano modificada com dibenzo[*b,e*]piridina-9-carboxaldeído (88)

As digestões foram efectuadas de acordo com o **Método Geral IV** descrito em **III.9.2.**, na presença de HSA modificada com 9-AL (**88**) como descrito em **III.7.2.4.** As condições utilizadas bem como o tratamento prévio, à mistura reaccional, encontramse na Tabela III.33.

Tabela III.33. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com 9-AL (88).

Fracia	Cond	ições de modifio	Tratamento nós-	Método de	
Ensaio	HSA (µg)	9-AL (88) (µg)	NaBH₃CN	modificação	digestão
1	500	500	1	А	IV
2	500	500	• -	А	IV
Branco 1	500	-		А	IV
Branco 2	500	-	-	А	IV

III.9.2.5. Albumina do soro humano modificada oxcarbazepina (63)

As digestões foram efectuadas de acordo com o **Método Geral IV** descrito em **III.9.2.**, na presença de HSA modificada com OXCBZ (**63**) como descrito em **III.7.2.5.**. As condições utilizadas bem como o tratamento prévio, à mistura reaccional, encontram-se na Tabela III.34.

	Co	ndições de modific	Trotomonto néo	Mátodo do	
Ensaio	HSA (µg)	OXCBZ (63) (µg)	Redutor	modificação	digestão
1	100	100	NaBH₃CN	В	IV
2	100	100	-	В	IV
3	100	100	NaBH ₄	В	IV
4	100	100	-	В	IV
Branco 1	100	-	NaBH₃CN	В	IV
Branco 2	100	-	NaBH ₄	В	IV
Branco 3	100	-	-	В	IV

Tabela III.34. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com OXCBZ (63).

III.9.2.6. Albumina do soro humano modificada 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b*,*f*]azepina-5-carboxamida (110)

As digestões foram efectuadas de acordo com o **Método Geral IV** descrito em **III.9.2.**, na presença de HSA modificada com MHD-SO₃⁻ (**110**) como descrito em **III.7.2.6.** As condições utilizadas na digestão bem como o tratamento que a antecede, à mistura reaccional, encontram-se na Tabela III.35.

Tabela III.35. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de digestão da HSA modificada com MHD-SO₃- (**110**).

Ensaio	Condiçõ	es de modificação	Tratamento	Método de
	HSA (µg)	MHD-SO₃⁻ (110) (µg)	pós-modificação	digestão
1	200	200	А	IV
Branco 1	200	200	А	IV

III.9.3. Hidrólise do DNA modificado com oxcarbazepina (63) e electrófilos derivados da carbamazepina (62) e oxcarbazepina (63).III.9.1.1. Hidrólise térmica

Procedimento geral

Uma solução de DNA modificada com um electrófilo, obtida como o descrito em **III.8.** e alíneas subsequentes foi hidrolisada termicamente (adaptado de [327]). A solução de DNA foi aquecida a 100 °C durante 10 min. e subsequentemente deixada arrefecer até a temperatura ambiente, lentamente. A mistura reaccional foi centrifugada por 10 min. a 15500*g* em tubos de filtração Amicon® Ultra, com cut-off 3 kDa (Millipore). As fracções resultantes da filtração foram evaporadas à secura, redissolvidas em água e analisadas por LC-ESI(+)-MS. O mesmo procedimento foi aplicado aos ensaios em branco (efectuados na ausência de electrófilo).

III.9.1.1.1. DNA modificado com EPCBZ (79)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.9.1.1.**, na presença de uma solução de DNA modificado com EPCBZ (**79**), obtida como descrito em **III.8.1**. em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (1 mL). O mesmo procedimento foi aplicado ao ensaio em branco.

III.9.1.1.2. DNA modificado com OXCBZ (63)

As reacções foram efectuadas de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.9.1.1.**, na presença de uma solução de DNA modificado com OXCBZ (**63**) com ou sem redutor, em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (Tabela III.36) As soluções utilizadas foram obtidas como descrito em **III.8.2.**. O mesmo procedimento foi aplicado aos ensaios em branco (efectuados na ausência de electrófilo).

Tabela III.36. Condições experimentais utilizadas nos ensaios onde se investigou a formação de adutos com DNA com a OXCBZ (**63**).

Ensaio	Sol. DNA modificada com 8 (mL)	Tratamento prévio com NaBH₃CN
1	2.5	-
2	2.0	\checkmark

III.9.1.1.3. DNA modificado com 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b,f*]azepina-5-carboxamida (108)

A reacção foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.9.1.1.**, na presença de uma solução de DNA modificado com MHD-SO₃⁻ (**108**), obtida como descrito em **III.8.3**. em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (1 mL). O mesmo procedimento foi aplicado ao ensaio em branco (efectuado na ausência de electrófilo).

III.9.1.2. Hidrólise enzimática

Procedimento geral

Uma solução de DNA modificada com um electrófilo em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (volume variável), obtida como o descrito em **III.8.** e alíneas subsequentes foi hidrolisada enzimaticamente (adaptado de [326]). A cada solução adicionou-se 1M MgCl₂ (10 μ L/mg DNA), DNase I (0.1 mg/mg DNA) dissolvido numa solução de 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ (100 μ L/mg DNA). A mistura reaccional ficou em agitação durante 3 h, a 37 °C. De seguida, adicionou-se 1M Tris-HCl, pH 8 (10 μ L/mg DNA), fosfodiesterease I (10 μ L/mg DNA) e fosfatase alcalina (4 μ L/mg DNA). A mistura reaccional ficou a incubar por 16h, a 37 °C. O hidrolisado resultante foi extraído com *n*-butanol pré-saturado com água (3x). As fracções orgânicas foram combinadas e lavadas com água pré-saturada com *n*-butanol (3x) e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi redissolvido água e analisadas por LC-ESI(+)-MS. O mesmo procedimento foi aplicado aos ensaios em branco.

III.9.1.2.1. DNA modificado com EPCBZ (79)

A digestão foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.9.2.1.**, na presença de uma solução de DNA modificado com EPCBZ (**79**) (1 mg/mL), obtida como descrito em **III.8.1**. em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (1 mL). O mesmo procedimento foi aplicado ao ensaio em branco.

III.9.1.2.2. DNA modificado com OXCBZ (63)

As digestões foram efectuadas de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.9.2.1.**, na presença de uma solução de DNA modificado com OXCBZ (63) (1.0 mg/mL) com redutor ou sem redutor, em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (ver

Tabela III.37). As soluções utilizadas foram obtidas como descrito em **III.8.2.**. O mesmo procedimento foi aplicado aos ensaios em branco.

Tabela III.37. Condições experimentais utilizadas nos ensaios para a tentativa de formação de adutos com DNA e OXCBZ (63).

Ensaio	Sol. DNA modificada com 8 (mL)	Tratamento prévio com NaBH₃CN
1	2.5	-
2	2.0	\checkmark

III.9.1.2.3. DNA modificado com 10,11-di-hidro-10-sulfoxi-5*H*-dibenzo [*b,f*]azepina-5-carboxamida (110)

A digestão foi efectuada de acordo com o **Procedimento Geral** descrito em **III.9.2.1.**, na presença de uma solução de DNA modificado com MHD-SO₃⁻ (**110**) (2 mg/mL), obtida como descrito em **III.8.3**. em 5 mM Bis-Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0 (1 mL). O mesmo procedimento foi aplicado ao ensaio em branco.

III.10. Incubações *in vitro* com a fracção sub-celular S9 de fígado de Humano e Rato

Os ensaios foram realizados com uma *pool* de fracções sub-celulares S9 de rato e humano. As incubações foram efectuadas em eppendorfs de 2 mL, com 1 mL de solução cada e todas as soluções foram preparadas no momento do ensaio. Salvo indicação contraria, todas as solução foram preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7.4. Como controlo positivo, foi utilizado o fármaco NVP (**3**), tendo sido submetido exactamente ao mesmo procedimentos que o fármaco em estudo. Todas as incubações foram efectuadas em duplicado.

Utilizou-se na incubação 100 µL da fracção S9 de fígado (com concentração final de 2 mg.mL⁻¹) a que foi adicionado 800 µL de tampão fosfato 100 mM (pH 7.4), 20 µL de uma solução 5 mM de OXCBZ (**63**) em DMSO, 10 µL do sistema de regeneração NADPH 100x (em tampão fosfato 100 mM, pH 8), 50 µL de uma solução 20 mM de GSH seguido da incubação a 37 °C por 5 min. A reacção de Fase I foi iniciada pela adição de 10 µL de uma solução 100 mM de NADPH seguida de uma incubação a 37 °C por 5 min.. De seguida, o metabolismo de Fase II foi iniciado com a adição de 10 µL uma solução 100 mM de PAPS em tampão fosfato 100 mM (pH 8), MgCl₂ 5 mM. Os ensaios ficaram em incubação a 37 °C por 24 h. Aliquotas de 50 µL foram recolhidas aos tempos de 1h, 3h, 6h e 24h às quais se adicionou 150 µL de acetonitrilo frio, de

forma a parar a reacção. As amostras foram centrifugadas durante 15 min. (10000*g*) e o sobrenadante recolhido e analisado por LC-ESI(+)-MS e LC-ESI(-)-MS. Paralelamente foram efectuadas incubações em branco onde se fez variar a ausência do fármaco (OXCBZ (**63**) ou NVP (**3**)), co-factores de Fase I e II (NADPH e PAPS) e ainda a fracção S9 (procedeu-se à sua desnaturação previa, colocando-a a 90 °C durante 15 min.). Os principais compostos obtidos encontram-se descritos nas Tabelas II.38 e II.39.

Encolo 60mix roto	Metabolitos de Fase I		Metabolitos de Fase II		
Elisalo – Spillix rato	MHD (105)	12OH-NVP	MHD-SO ₃ ⁻ (110)	O-Sulfonato (107)	12SO ₃ ⁻ -NVP (26)
1.OXCBZ					
1 h	\checkmark		-	\checkmark	
3 h	\checkmark		-	\checkmark	
6 h	\checkmark		-	\checkmark	
24 h	\checkmark		-	\checkmark	
2. NVP				•	
1 h		\checkmark			-
3 h		\checkmark			-
6 h		\checkmark			-
24 h		\checkmark			-

Tabela III.38. Metabolitos de Fase I e II da OXCBZ (63) obtidos por incubação da fracção S9 de fígado de rato e o respectivo controlo positivo (NVP (3)).

Tabela III.39. Metabolitos de Fase I e II da OXCBZ (63) obtidos por incubação da fracção S9 de fígado humano e o respectivo controlo positivo (NVP (3)).

Encolo S0mix humana	Metabolitos de Fase I		Metabolitos de Fase II		
Ensaio – Semix numano	MHD (105)	120H-NVP	MHD-SO ₃ ⁻ (110)	O-Sulfonato (107)	12-SO ₃ ⁻ -NVP (26)
1.OXCBZ					
1 h	-		-	-	
3 h	\checkmark		-	-	
6 h	\checkmark		-	-	
24 h	\checkmark		-	\checkmark	
2. NVP	×			*	
1 h		\checkmark			-
3 h		\checkmark			-
6 h		\checkmark			-
24 h		\checkmark			-

Capítulo IV • Bibliografia

- 1. World Health Organization (WHO). *Definitions*. 2013 [cited 2016 07/10]; Available from: <u>http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/trainingcours</u> <u>es/definitions.pdf</u>.
- Lasser, K. E.;Allen, P. D.;Woolhandler, S. J.;Himmelstein, D. U.;Wolfe, S. M. e Bor, D. H., *Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications*. Journal of American Medical Association (JAMA), **2002**. 287(17): p. 2215-2220.
- 3. European Commission. Proposal for a regulation amending, as regards pharmacovigilance of medicinal products for human use. Regulation (EC) No 726/2004. Impact assessment. 2008 [cited 2016 07/10]; Available from: http://ec.europa.eu/health/files/pharmacos/pharmpack_12_2008/pharmacovigila nce-ia-vol1_en.pdf.
- Bouvy, J. C.; De Bruin, M. L. e Koopmanschap, M. A., *Epidemiology of Adverse Drug Reactions in Europe: A Review of Recent Observational Studies.* Drug Safety, **2015**. 38(5): p. 437-453.
- 5. Narum, S.;Solhaug, V.;Myhr, K.;Johansen, P. W. e Kringen, M. K., *Warfarin*associated bleeding events and concomitant use of potentially interacting medicines reported to the Norwegian spontaneous reporting system. British Journal of Clinical Pharmacology, **2011**. 71(2): p. 254-262.
- 6. Bray, G. P., *Liver failure induced by paracetamol.* British Medical Journal, **1993**. 306(6871): p. 157-158.
- 7. Pirmohamed, M.;Breckenridge, A. M.;Kitteringham, N. R. e Park, B. K., *Adverse drug reactions.* British Medical Journal, **1998**. 316(7140): p. 1295.
- 8. Knowles, S. R.;Uetrecht, J. e Shear, N. H., *Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes.* The Lancet, **2000**. 356: p. 1587-1591.
- 9. Baillie, T. A. e Rettie, A. E., *Role of Biotransformation in Drug-Induced Toxicity: Influence of Intra- and Inter-Species Differences in Drug Metabolism.* Drug metabolism and pharmacokinetics, **2011**. 26(1): p. 15-29.
- 10. Uetrecht, J., *Idiosyncratic Drug Reactions: Current Understanding.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology, **2007**. 47(1): p. 513-539.
- 11. Naisbitt, D. J.;Gordon, S. F.;Pirmohamed, M. e Park, B. K., *Immunological principles of adverse drug reactions: the initiation and propagation of immune responses elicited by drug treatment.* Drug Safety, **2000**. 23(6): p. 483-507.
- 12. Miller, E. C. e Miller, J. A., *Mechanisms of chemical carcinogenesis.* Cancer, **1981**. 47(5): p. 1055-1064.
- 13. Park, B. K.;Kitteringham, N. R.;Maggs, J. L.;Pirmohamed, M. e Williams, D. P., *The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology, **2005**. 45: p. 177–202.
- Tang, W. e Lu, A. Y., Metabolic bioactivation and drug-related adverse effects: current status and future directions from a pharmaceutical research perspective. Drug Metabolism Reviews, **2010**. 42(2): p. 225–249.
- 15. Kalgutkar, A. S., *Role of Bioactivation in Idiosyncratic Drug Toxicity: Structure– Toxicity Relationships*, in *Advances in Bioactivation Research*, Elfarra, A., Editor. 2008, Springer New York: New York, NY. p. 1-29.
- 16. Gonzalez, F. J. e Tukey, R. H., *Drug Metabolism*, in *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, Brunton, L., Editor. 2011, McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, NY 10022. p. 123-144.
- 17. Walsh, J. S. e Miwa, G. T., *Bioactivation of drugs: risk and drug design.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology, **2011**. 51: p. 145-167.
- Rundle, A., Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2006. 600(1–2): p. 23-36.

- 19. Tornqvist, M.;Fred, C.;Haglund, J.;Helleberg, H.;Paulsson, B. e Rydberg, P., Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. Journal of Chromatography B, **2002**. 778(1-2): p. 279-308.
- 20. Attia, S. M., *Deleterious effects of reactive metabolites*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, **2010**. 3(4): p. 238-253.
- 21. Laine, J. E.; Auriola, S.; Pasanen, M. eJuvonen, R. O., *Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes.* Xenobiotica, **2009**. 39(1): p. 11-21.
- 22. Mazaleuskaya, L. L.;Sangkuhl, K.;Thorn, C. F.;FitzGerald, G. A.;Altman, R. B. eKlein, T. E., *PharmGKB summary: Pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses.* Pharmacogenetics and genomics, **2015**. 25(8): p. 416-426.
- 23. Hinson, J. A., *Reactive metabolites of phenacetin and acetaminophen: a review.* Environmental Health Perspectives, **1983**. 49: p. 71-79.
- 24. Mahadevan, S. B. K.;McKiernan, P. J.;Davies, P. eKelly, D. A., *Paracetamol induced hepatotoxicity.* Archives of Disease in Childhood, **2006**. 91(7): p. 598-603.
- 25. James, L. P.;Mayeux, P. R. e Hinson, J. A., *Acetaminophen-induced Hepatoxicity* Drug Metabolism and Disposition, **2003**. 31(12): p. 1499-1506.
- 26. Makin, A. J.; Wendon, J. e Williams, R., *A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987-1993).* Gastroenterology, **1995**. 109(6): p. 1907-1916.
- Faletto, M. B.;Miller, W. H.;Garvey, E. P.;St Clair, M. H.;Daluge, S. A. e Good, S. S., Unique intracellular activation of the potent anti-human immunodeficiency virus agent 1592U89. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997. 41(7): p. 1099 - 1107.
- 28. Walsh, J. S.;Reese, M. J. e Thurmond, L. M., *The metabolic activation of abacavir by human liver cytosol and expressed human alcohol dehydrogenase isozymes.* Chemico-Biological Interactions, **2002**. 142(1–2): p. 135-154.
- Charneira, C.;Godinho, A. L. A.;Oliveira, M. C.;Pereira, S. A.;Monteiro, E. C.;Marques, M. M. e Antunes, A. M. M., *Reactive Aldehyde Metabolites from the Anti-HIV Drug Abacavir: Amino Acid Adducts as Possible Factors in Abacavir Toxicity.* Chemical Research in Toxicology, **2011**. 24(12): p. 2129-2141.
- Grilo, N. M.;Antunes, A. M. M.;Caixas, U.;Marinho, A. T.;Charneira,
 C.;Conceição Oliveira, M.;Monteiro, E. C.;Matilde Marques, M. e Pereira, S. A.,
 Monitoring abacavir bioactivation in humans: Screening for an aldehyde metabolite. Toxicology Letters, 2013. 219(1): p. 59-64.
- Charneira, C.;Grilo, N. M.;Pereira, S. A.;Godinho, A. L. A.;Monteiro, E. C.;Marques, M. M. e Antunes, A. M. M., *N-terminal valine adduct from the anti-HIV drug abacavir in rat haemoglobin as evidence for abacavir metabolism to a reactive aldehyde in vivo.* British Journal of Pharmacology, **2012**. 167(6): p. 1353-1361.
- Grilo, N. M.; Charneira, C.; Pereira, S. A.; Monteiro, E. C.; Marques, M. M. e Antunes, A. M. M., *Bioactivation to an aldehyde metabolite—Possible role in the onset of toxicity induced by the anti-HIV drug abacavir.* Toxicology Letters, 2014. 224(3): p. 416-423.
- 33. Van Bladeren, P. J., *Glutathione conjugation as a bioactivation reaction.* Chemico-Biological Interactions, **2000**. 129(1–2): p. 61-76.
- 34. Riska, P. S.; Joseph, D. P.; Dinallo, R. M.; Davidson, W. C.; Keirns, J. J. e Hattox, S. E., *Biotransformation of Nevirapine, a Non-nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor, in Mice, Rats, Rabbits, Dogs, Monkeys, and Chimpanzees.* Drug Metabolism and Disposition, **1999**. 27(12): p. 1434-1447.

- 35. Riska, P.;Lamson, M.;MacGregor, T.;Sabo, J.;Hattox, S.;Pav, J. e Keirns, J., Disposition and Biotransformation of the Antiretroviral Drug Nevirapine in Humans. Drug Metabolism and Disposition, **1999**. 27(8): p. 895-901.
- Antunes, A. M. M.;Godinho, A. L. A.;Martins, I. L.;Oliveira, M. C.;Gomes, R. A.;Coelho, A. V.;Beland, F. A. e Marques, M. M., *Protein Adducts As Prospective Biomarkers of Nevirapine Toxicity.* Chemical Research in Toxicology, **2010**. 23(11): p. 1714-1725.
- 37. Antunes, A. M. M.;Godinho, A. L. A.;Martins, I. L.;Justino, G. C.;Beland, F. A. e Marques, M. M., *Amino Acid Adduct Formation by the Nevirapine Metabolite, 12-Hydroxynevirapine—A Possible Factor in Nevirapine Toxicity.* Chemical Research in Toxicology, **2010**. 23(5): p. 888-899.
- Pinheiro, P. F.; Pereira, S. A.; Harjivan, S. G.; Martins, I. L.; Marinho, A. T.; Cipriano, M.; Jacob, C. C.; Oliveira, N. G.; Castro, M. F.; Marques, M. M.; Antunes, A. M. M. e Miranda, J. P., *Hepatocyte spheroids as a competent in vitro system for drug biotransformation studies: nevirapine as a bioactivation case study.* Archives of Toxicology, **2016**: p. 1-13.
- Shenton, J. M.;Teranishi, M.;Abu-Asab, M. S.;Yager, J. A. e Uetrecht, J. P., Characterization of a Potential Animal Model of an Idiosyncratic Drug Reaction: Nevirapine-Induced Skin Rash in the Rat. Chemical Research in Toxicology, 2003. 16(9): p. 1078-1089.
- 40. Chen, J.;Mannargudi, B. M.;Xu, L. e Uetrecht, J., *Demonstration of the Metabolic Pathway Responsible for Nevirapine-Induced Skin Rash.* Chemical Research in Toxicology, **2008**. 21(9): p. 1862-1870.
- Caixas, U.;Antunes, A. M. M.;Marinho, A. T.;Godinho, A. L. A.;Grilo, N. M.;Marques, M. M.;Oliveira, M. C.;Branco, T.;Monteiro, E. C. e Pereira, S. A., *Evidence for nevirapine bioactivation in man: Searching for the first step in the mechanism of nevirapine toxicity.* Toxicology, **2012**. 301(1–3): p. 33-39.
- 42. Sharma, A. M.;Novalen, M.;Tanino, T. e Uetrecht, J. P., *12-OH-Nevirapine Sulfate, Formed in the Skin, Is Responsible for Nevirapine-Induced Skin Rash.* Chemical Research in Toxicology, **2013**. 26(5): p. 817-827.
- 43. Sharma, A. M.;Li, Y.;Novalen, M.;Hayes, M. A. e Uetrecht, J., *Bioactivation of Nevirapine to a Reactive Quinone Methide: Implications for Liver Injury.* Chemical Research in Toxicology, **2012**. 25(8): p. 1708-1719.
- 44. Landsteiner, K. e Jacobs, J., *Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds* The Journal of Experimental Medicine, **1935**. 61(5): p. 643-656.
- 45. Cho, T. e Uetrecht, J., *How Reactive Metabolites Induce an Immune Response That Sometimes Leads to an Idiosyncratic Drug Reaction.* Chemical Research in Toxicology, **2017**. 30(1): p. 295-314.
- 46. Uetrecht, J., *Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future.* Chemical Research in Toxicology, **2008**. 21: p. 96-102.
- 47. Pichler, W. J., *The p-i Concept: Pharmacological Interaction of Drugs With Immune Receptors.* World Allergy Organ Journal, **2008**. 21: p. 96-102.
- 48. Pirmohamed, M.;Naisbitt, D.;Gordon, F. e Park, B. K., *The danger hypothesis-potential role in idiosyncratic drug reactions.* Toxicology, **2002**. 181: p. 55-62.
- Ostrov, D. A.;Grant, B.;Pompeu, Y. A.;Sidney, J.;Harndahl, M.;Southwood, S.;Oseroff, C.;Lu, S.;Jakoncic, J.;de Oliveira, C. A. F.;Yang, L.;Mei, H.;Shi, L.;Shabanowitz, J.;English, A. M.;Wriston, A.;Lucas, A.;Phillips, E.;Mallal, S.;Grey, H. M.;Sette, A.;Hunt, D. F.;Buus, S. e Peters, B., *Drug hypersensitivity* caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire. Proceedings of the National Academy of Sciences, **2012**. 109(25): p. 9956-9964.
- 50. Pelkonen, O. e Raunio, H., *In vitro screening of drug metabolism during drug development: can we trust the predictions?* Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, **2005**. 1(1): p. 49-59.
- 51. Kaplowitz, N., *Idiosyncratic drug hepatotoxicity.* Nature Reviews Drug Discovery, **2005**. 4(6): p. 489-499.
- 52. Sonu, S. S., *Preclinical Pharmacokinetics: An Approach Towards Safer and Efficacious Drugs.* Current Drug Metabolism, **2006**. 7(2): p. 165-182.
- 53. Uetrecht, J., *Evaluation of Which Reactive Metabolite, If Any, Is Responsible for a Specific Idiosyncratic Reaction.* Drug Metabolism Reviews, **2006**. 38(4): p. 745-753.
- 54. Bale, S. S.;Moore, L.;Yarmush, M. e Jindal, R., *Emerging In Vitro Liver Technologies for Drug Metabolism and Inter-Organ Interactions.* Tissue Engineering Part B: Reviews, **2016**. 22(5): p. 383-394.
- 55. Brandon, E. F. A.;Raap, C. D.;Meijerman, I.;Beijnen, J. H. e Schellens, J. H. M., An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. Toxicology and Applied Pharmacology, **2003**. 189(3): p. 233-246.
- 56. Pius, F.;Patrick, J. B. e Bernd, R., *Liver-Based In Vitro Technologies for Drug Biotransformation Studies A Review.* Current Drug Metabolism, **2012**. 13(2): p. 215-224.
- 57. Soldatow, V. Y.;LeCluyse, E. L.;Griffith, L. G. e Rusyn, I., *In vitro models for liver toxicity testing.* Toxicology Research, **2013**. 2(1): p. 23-39.
- 58. Hariparsad, N.;Sane, R. S.;Strom, S. C. eDesai, P. B., *In vitro methods in human drug biotransformation research: Implications for cancer chemotherapy.* Toxicology in Vitro, **2006**. 20(2): p. 135-153.
- 59. Pelkonen, O.;Turpeinen, M.;Uusitalo, J.;Rautio, A. e Raunio, H., *Prediction of Drug Metabolism and Interactions on the Basis of in vitro Investigations.* Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, **2005**. 96(3): p. 167-175.
- 60. Bakhtiar, R., *Biomarkers in drug discovery and development.* Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, **2008**. 57(2): p. 85-91.
- 61. Gupta, R. C., *Introduction*, in *Biomarkers in Toxicology*, Gupta, R. C., Editor. 2014, Academic Press (Elsevier): London, UK. p. 3-5.
- 62. Anadón, A.;Castellano, V. e Martínez-Larrañaga, M. R., *Biomarkers in drug* safety evaluation, in *Biomarkers in Toxicology*, Gupta, R. C., Editor. 2014, Academic Press (Elsevier): London, UK. p. 923-945.
- 63. World Health Organization (WHO). *Biomarkers and Risk assessment: Concepts and Principles* Environmental Health Criteria 155 1993 [cited 2017 03/01]; Available from: <u>http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39037/1/9241571551-eng.pdf</u>.
- 64. Timbrell, J. A., *Biomarkers in toxicology*. Toxicology, **1998**. 129(1): p. 1-12.
- 65. Poblete-Naredo, I. e Albores, A., *Molecular biomarkers to assess health risks due to environmental contaminants exposure.* Biomédica, **2016**. 36: p. 309-335.
- 66. Thomas, C. E.;Sexton, W.;Benson, K.;Sutphen, R. e Koomen, J., *Urine Collection and Processing for Protein Biomarker Discovery and Quantification.* Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, **2010**. 19(4): p. 953-959.
- 67. Jakoby, W. B. e Ziegler, D. M., *The enzymes of detoxication.* Journal of Biological Chemistry, **1990**. 265(34): p. 20715-20718.
- 68. Commandeur, J. N.; Stijntjes, G. J. e Vermeulen, N. P., *Enzymes and transport* systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. Pharmacological Reviews, **1995**. 47(2): p. 271-330.
- 69. De Rooij, M.;Jan, N. M.;Commandeur, N. P. E. e Vermeulen, B. E. N., Mercapturic acids as biomarkers of exposure to electrophilic chemicals:applications to environmental and industrial chemicals. Biomarkers, **1998**. 3(4-5): p. 239-303.
- 70. Haufroid, V. e Lison, D., *Mercapturic acids revisited as biomarkers of exposure to reactive chemicals in occupational toxicology: a minireview.* International Archives of Occupational and Environmental Health, **2005**. 78(5): p. 343-354.

- 71. Blair, I. A., *Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites.* Biomedical chromatography, **2010**. 24(1): p. 29-38.
- 72. Wen, B. e Zhu, M., *Applications of mass spectrometry in drug metabolism: 50 years of progress.* Drug Metabolism Reviews, **2015**. 47(1): p. 71-87.
- 73. Rathahao-Paris, E.;Alves, S.;Junot, C. e Tabet, J.-C., *High resolution mass spectrometry for structural identification of metabolites in metabolomics.* Metabolomics, **2015**. 12(1): p. 10.
- 74. Srivastava, A.;Lian, L.-Y.;Maggs, J. L.;Chaponda, M.;Pirmohamed, M.;Williams, D. P. e Park, B. K., *Quantifying the Metabolic Activation of Nevirapine in Patients by Integrated Applications of NMR and Mass Spectrometries.* Drug Metabolism and Disposition, **2010**. 38(1): p. 122-132.
- Tang, W.;Stearns, R. A.;Bandiera, S. M.;Zhang, Y.;Raab, C.;Braun, M. P.;Dean, D. C.;Pang, J.;Leung, K. H.;Doss, G. A.;Strauss, J. R.;Kwei, G. Y.;Rushmore, T. H.;Chiu, S.-H. L. e Baillie, T. A., *Studies on Cytochrome P-450-Mediated Bioactivation of Diclofenac in Rats and in Human Hepatocytes: Identification of Glutathione Conjugated Metabolites.* Drug Metabolism and Disposition, **1999**. 27(3): p. 365-372.
- Poon, G. K.;Chen, Q.;Teffera, Y.;Ngui, J. S.;Griffin, P. R.;Braun, M. P.;Doss, G. A.;Freeden, C.;Stearns, R. A.;Evans, D. C.;Baillie, T. A. e Tang, W., Bioactivation of Diclofenac via Benzoquinone Imine Intermediates— Identification of Urinary Mercapturic Acid Derivatives in Rats and Humans. Drug Metabolism and Disposition, 2001. 29(12): p. 1608-1613.
- 77. Tailor, A.;Waddington, J. C.;Meng, X. e Park, B. K., *Mass Spectrometric and Functional Aspects of Drug–Protein Conjugation.* Chemical Research in Toxicology, **2016**. 29(12): p. 1912-1935.
- 78. Rappaport, S. M.;Li, H.;Grigoryan, H.;Funk, W. E. e Williams, E. R., Adductomics: Characterizing exposures to reactive electrophiles. Toxicology Letters, **2012**. 213(1): p. 83-90.
- 79. Sabbioni, G. eTuresky, R. J., *Biomonitoring Human Albumin Adducts: The Past, the Present, and the Future.* Chemical Research in Toxicology, **2016**.
- 80. Sabbioni, G.;Skipper, P. L.;Büchi, G. e Tannenbaum, S. R., *Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vivo in rats.* Carcinogenesis, **1987**. 8(6): p. 819-824.
- Dingley, K. H.; Curtis, K. D.; Nowell, S.; Felton, J. S.; Lang, N. P. e Turteltaub, K. W., DNA and Protein Adduct Formation in the Colon and Blood of Humans after Exposure to a Dietary-relevant Dose of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 1999. 8(6): p. 507-512.
- Cook, S. F.;King, A. D.;Chang, Y.;Murray, G. J.;Norris, H.-R. K.;Dart, R. C.;Green, J. L.;Curry, S. C.;Rollins, D. E. e Wilkins, D. G., *Quantification of a biomarker of acetaminophen protein adducts in human serum by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Clinical and animal model applications.* Journal of Chromatography B, **2015**. 985: p. 131-141.
- 83. Jenkins, R. E.; Meng, X.; Elliott, V. L.; Kitteringham, N. R.; Pirmohamed, M. e Park, B. K., *Characterisation of flucloxacillin and 5-hydroxymethyl flucloxacillin haptenated HSA in vitro and in vivo.* PROTEOMICS – Clinical Applications, **2009**. 3(6): p. 720-729.
- 84. Singh, R. e Farmer, P. B., *Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection.* Carcinogenesis, **2006**. 27(2): p. 178-196.
- Beland, F. A.; Churchwell, M. I.; Von Tungeln, L. S.; Chen, S.; Fu, P. P.; Culp, S. J.; Schoket, B.; Győrffy, E.; Minárovits, J.; Poirier, M. C.; Bowman, E. D.; Weston, A. e Doerge, D. R., *High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for the Detection and Quantitation of*

Benzo[a]pyrene–DNA Adducts. Chemical Research in Toxicology, **2005**. 18(8): p. 1306-1315.

- Poirier, M. C.;Santella Rm Fau Weston, A. e Weston, A., *Carcinogen macromolecular adducts and their measurement.* Carcinogenesis, **2000**. 21(3): p. 353-359.
- 87. International Agengy for Research of Cancer (IARC), Outdoor air pollution in IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 2013, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France.
- Santella, R. F.;Lin, C. D.;Cleveland, W. L. e Weinstein, I. B., *Monoclonal antibodies to DNA modified by a benzo[a]pyrene diol epoxide.* Carcinogenesis, 1984. 5(3): p. 373-377.
- 89. Santella, R. F.;Lin, C. D. e Dharmaraja, N., *Monoclonal antibodies to a benzo[a]pyrene diolepoxide modified protein.* Carcinogenesis, **1986**. 7(3): p. 441-444.
- 90. Sherson, D.;Sabro, P.;Sigsgaard, T.;Johansen, F. e Autrup, H., *Biological monitoring of foundry workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons.* British Journal of Industrial Medicine, **1990**. 47(7): p. 448-453.
- 91. Santella, R. M. e Zhang, Y., *Immunologic Detection of Benzo(a)pyrene–DNA Adducts*, in *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo: Methods and Protocols*, Didenko, V. V., Editor. 2011, Humana Press - Springer Science: Houston, Texas. p. 271-278.
- 92. Rydberg, P.;von Stedingk, H.;Magnér, J. e Björklund, J., *LC/MS/MS Analysis of N-Terminal Protein Adducts with Improved Sensitivity: A Comparison of Selected Edman Isothiocyanate Reagents.* International Journal of Analytical Chemistry, **2009**. 2009: p. 1-13.
- Carlsson, H.;von Stedingk, H.;Nilsson, U. e Törnqvist, M., *LC–MS/MS* Screening Strategy for Unknown Adducts to N-Terminal Valine in Hemoglobin Applied to Smokers and Nonsmokers. Chemical Research in Toxicology, **2014**. 27(12): p. 2062-2070.
- 94. Zhang, H. e Ge, Y., *Comprehensive Analysis of Protein Modifications by Topdown Mass Spectrometry.* Circulation. Cardiovascular Genetics, **2011**. 4(6): p. 711-711.
- 95. Switzar, L.;Giera, M. e Niessen, W. M. A., *Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments.* Journal of Proteome Research, **2013**. 12(3): p. 1067-1077.
- 96. Sidoli, S.;Cheng, L. e Jensen, O. N., *Proteomics in chromatin biology and epigenetics: Elucidation of post-translational modifications of histone proteins by mass spectrometry*, in *J. Proteomics*. 2012. p. 3419-3433.
- 97. Han, X.;Aslanian, A. e Yates, J. R., *Mass Spectrometry for Proteomics.* Current opinion in chemical biology, **2008**. 12(5): p. 483-490.
- 98. Eng, J. K.;Searle, B. C.;Clauser, K. R. e Tabb, D. L., *A Face in the Crowd: Recognizing Peptides Through Database Search.* Molecular & Cellular Proteomics, **2011**. 10(11): p. 1-9.
- 99. Tabb, D. L.; Fernando, C. G. e Chambers, M. C., *MyriMatch: highly accurate tandem mass spectral peptide identification by multivariate hypergeometric analysis.* Journal of Proteome Research, **2007**. 6(2): p. 654-661.
- Dasari, S.;Chambers, M. C.;Codreanu, S. G.;Liebler, D. C.;Collins, B. C.;Pennington, S. R.;Gallagher, W. M. e Tabb, D. L., *Sequence Tagging Reveals Unexpected Modifications in Toxicoproteomics*. Chemical Research in Toxicology, **2011**. 24(2): p. 204-216.
- Bjornson, R. D.;Carriero, N. J.;Colangelo, C.;Shifman, M.;Cheung, K.-H.;Miller, P. L. e Williams, K., X!!Tandem, an Improved Method for Running X!Tandem in Parallel on Collections of Commodity Computers. Journal of Proteome Research, 2008. 7(1): p. 293-299.

- 102. Tyanova, S.;Temu, T. e Cox, J., *The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics.* Nature Protocols, **2016**. 11: p. 2301.
- 103. Nesvizhskii, A. I., *Protein Identification by Tandem Mass Spectrometry and Sequence Database Searching*, in *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics. Methods in Molecular Biology*, Matthiesen, R., Editor. 2007, Humana Press: Houston, Texas. p. 87-119.
- 104. Graves, J. e Roboz, J., *Mass Spectrometry for the Novice*. 2013, Boca Raton, Flórida: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Meng, X.;Lawrenson, A. S.;Berry, N. G.;Maggs, J. L.;French, N. S.;Back, D. J.;Khoo, S. H.;Naisbitt, D. J. e Park, B. K., *Abacavir Forms Novel Cross-Linking Abacavir Protein Adducts in Patients.* Chemical Research in Toxicology, **2014**. 27(4): p. 524-535.
- 106. Hammond, T. G.;Meng, X.;Jenkins, R. E.;Maggs, J. L.;Castelazo, A. S.;Regan, S. L.;Bennett, S. N. L.;Earnshaw, C. J.;Aithal, G. P.;Pande, I.;Kenna, J. G.;Stachulski, A. V.;Park, B. K. e Williams, D. P., *Mass Spectrometric Characterization of Circulating Covalent Protein Adducts Derived from a Drug Acyl Glucuronide Metabolite: Multiple Albumin Adductions in Diclofenac Patients.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **2014**. 350(2): p. 387-402.
- 107. Yip, V.;Maggs, J.;Meng, X.;Marson, A.;Park, K. e Pirmohamed, M., Covalent adduction of carbamazepine 10, 11-epoxide with human serum albumin and glutathione S-transferase pi: implications for carbamazepine hypersensitivity. The Lancet, **2014**. 383(Supplement 1): p. S114.
- Meng, X.;Howarth, A.;Earnshaw, C. J.;Jenkins, R. E.;French, N. S.;Back, D. J.;Naisbitt, D. J. e Park, B. K., *Detection of Drug Bioactivation in Vivo: Mechanism of Nevirapine–Albumin Conjugate Formation in Patients.* Chemical Research in Toxicology, **2013**. 26(4): p. 575-583.
- 109. Zhang, H.;Gan, J.;Shu, Y.-Z. e Humphreys, W. G., High-Resolution Mass Spectrometry-Based Background Subtraction for Identifying Protein Modifications in a Complex Biological System: Detection of Acetaminophen-Bound Microsomal Proteins Including Argininosuccinate Synthetase. Chemical Research in Toxicology, **2015**. 28(4): p. 775-781.
- World Health Organization (WHO). *Epilepsy Fact Sheet*. Updated February 2017 [cited 2016 01/10]; Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/.
- 111. Banerjee, P. N.;Filippi, D. e Hauser, W. A., *The descriptive epidemiology of epilepsy-a review.* Epilepsy research, **2009**. 85(1): p. 31-45.
- 112. Sperling, M. R., *Sudden Unexplained Death in Epilepsy.* Epilepsy Currents, **2001**. 1(1): p. 21-23.
- 113. International League Against Epilepsy International Bureau for Epilepsy -World Health Organization (ILAE-IBE-WHO), *Epilepsy in the WHO European Region - Fostering Epilepsy Care in Europe*. 2010: Porto, Portugal.
- Forsgren, L.;Beghi, E.;Õun, A. eSillanpää, M., *The epidemiology of epilepsy in Europe a systematic review.* European Journal of Neurology, **2005**. 12(4): p. 245-253.
- 115. Perucca, E., *An Introduction to Antiepileptic Drugs.* Epilepsia, **2005**. 46: p. 31-37.
- 116. LaRoche, S. M. e Helmers, S. L., *The new antiepileptic drugs: Scientific review.* Journal of American Medical Association (JAMA), **2004**. 291(5): p. 605-614.
- 117. Mula, M., *Third generation antiepileptic drug monotherapies in adults with epilepsy.* Expert Review of Neurotherapeutics, **2016**. 16(9): p. 1087-1092.
- 118. Patsalos, P. N. B., D. J., *Pharmacotherapy of the third-generation AEDs: lacosamide, retigabine and eslicarbazepine acetate.* Expert Opinion on Pharmacotherapy, **2012**. 13(5): p. 699-715.

- 119. Kwan, P. e Brodie, M. J., *Early Identification of Refractory Epilepsy.* New England Journal of Medicine, **2000**. 342(5): p. 314-319.
- 120. Kwan, P.;Schachter, S. C. e Brodie, M. J., *Drug-Resistant Epilepsy.* New England Journal of Medicine, **2011**. 365(10): p. 919-926.
- Sills, G. J., Mechanisms of action of antiepileptic drugs, in Epilepsy 2011 From Science to Society - A pratical guide to Epilepsy, Rugg-Gunn, F. J., Sander, J. W.e Smalls, J. E., Editors. 2011, International League against Epilepsy (ILAE).
- Sirven, J. I.; Noe, K.; Hoerth, M. eDrazkowski, J., Antiepileptic Drugs 2012: Recent Advances and Trends. Mayo Clinic Proceedings, 2012. 87(9): p. 879-889.
- 123. Bialer, M. e White, H. S., *Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs.* Nature Reviews Drug Discovery, **2010**. 9(1): p. 68-82.
- 124. Rogawski, M. A. e Cavazos, J. E., *Mechanisms of action of antiepileptic drugs*, in *Wyllie's treatment of epilepsy: principles and practice*, Wyllie, E., Editor. 2015, Elsevier. p. 1-8.
- 125. Shih, J. J.;Tatum, W. O. e Rudzinski, L. A., *New drug classes for the treatment of partial onset epilepsy: focus on perampanel.* Therapeutics and Clinical Risk Management, **2013**. 9: p. 285-293.
- 126. Lason, W.;Chlebicka, M. eRejdak, K., *Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action.* Pharmacological Reports, **2013**. 65: p. 787-801.
- 127. Mantegazza, M.;Curia, G.;Biagini, G.;Ragsdale, D. S. e Avoli, M., Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. The Lancet Neurology, **2010**. 9(4): p. 413-424.
- 128. Zaccara, G.; Franciotta, D. e Perucca, E., *Idiosyncratic Adverse Reactions to Antiepileptic Drugs.* Epilepsia, **2007**. 48(7): p. 1223-1244.
- 129. Ye, Y.-M.; Thong, B. Y.-H. e Park, H.-S., *Hypersensitivity to Antiepileptic Drugs.* Immunology and Allergy Clinics, **2014**. 34(3): p. 633-643.
- 130. Rzany, B.;Correia, O.;Kelly, J. P.;Naldi, L.;Auquier, A. e Stern, R., *Risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epider mal necrolysis during first weeks of antiepileptic therapy: a case-control study.* The Lancet, **1999**. 353(9171): p. 2190-2194.
- 131. Trivedi, B. S.;Darji, N. H.;Malhotra, S. D. e Patel, P. R., *Antiepileptic Drugs-induced Stevens–Johnson syndrome: A case Series.* Journal of Basic and Clinical Pharmacy, **2016**. 8(1): p. 42-44.
- 132. Criado, P. R.;Criado, R. F. J.;Avancini, J. d. M. e Santi, C. G., *Drug reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) / Drug-induced Hypersensitivity Syndrome (DIHS): a review of current concepts.* Anais Brasileiros de Dermatologia, **2012**. 87: p. 435-449.
- Choudhary, S.;McLeod, M.;Torchia, D. eRomanelli, P., *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome.* The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology, **2013**. 6(6): p. 31-37.
- Oliveira, A. S., M.; Selores, M., O Espectro clínico Síndrome de Stevens-Johnson e Necrólise Epidérmica Tóxica. Acta Médica Portuguesa, 2011. 24(S4): p. 995-1002.
- 135. Hsu, D. Y.;Brieva, J.;Silverberg, N. B. e Silverberg, J. I., *Morbidity and Mortality of Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in United States Adults.* Journal of Investigative Dermatology, **2016**. 136(7): p. 1387-1397.
- 136. Sekula, P.;Dunant, A.;Mockenhaupt, M.;Naldi, L.;Bouwes Bavinck, J. N.;Halevy, S.;Kardaun, S.;Sidoroff, A.;Liss, Y.;Schumacher, M. e Roujeau, J.-C., *Comprehensive Survival Analysis of a Cohort of Patients with Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis.* Journal of Investigative Dermatology, **2013**. 133(5): p. 1197-1204.

- 137. Borchers, A. T.;Lee, J. L.;Naguwa, S. M.;Cheema, G. S. e Gershwin, M. E., *Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis.* Autoimmunity Reviews, **2008**. 7(8): p. 598-605.
- 138. Baker, M. G.; Ameri, M.; Martin, A. A.; Patterson, J. W. e Kimpel, D. L., Systemic lupus erythematosus presenting as Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. Journal of Clinical Rheumatology, **2014**. 20(3): p. 167-171.
- Chung, W.-H. eHung, S.-I., Genetic Markers and Danger Signals in Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis. Allergology International, 2010. 59(4): p. 325-332.
- Fiszenson-Albala, F.;Auzerie, V.;Mahe, E.;Farinotti, R.;Durand-Stocco, C.;Crickx, B. e Descamps, V., A 6-month prospective survey of cutaneous drug reactions in a hospital setting. British Journal of Dermatology, 2003. 149(5): p. 1018-1022.
- 141. Loiseau, P. J., *Clinical experience with new antiepileptic drugs: antiepileptic drugs in Europe.* Epilepsia, **1999**. 40(Suppl. 6): p. S3-S8.
- 142. Eisenberg, E.;River, Y.;Shifrin, A. eKrivoy, N., *Antiepileptic Drugs in the Treatment of Neuropathic Pain.* Drugs, **2007**. 67(9): p. 1265-1289.
- 143. Ettinger, A. B. e Argoff, C. E., Use of Antiepileptic Drugs for Nonepileptic Conditions: Psychiatric Disorders and Chronic Pain. Neurotherapeutics, 2007. 4(1): p. 75-83.
- 144. Ambrósio, A. F.;Soares-da-Silva, P.;Carvalho, C. M. e Carvalho, A. P., Mechanisms of Action of Carbamazepine and Its Derivatives, Oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. Neurochemical Research, **2002**. 27(1): p. 121-130.
- 145. Tolou-Ghamari, Z.;Zare, M.;Habibabadi, J. M. e Najafi, M. R., *A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012.* Journal of Research in Medical Sciences, **2013**. 18(Suppl 1): p. S81-S85.
- 146. Graves, N. M.;Brundage, R. C.;Wen, Y.;Cascino, G.;So, E.;Ahman, P.;Rarick, J.;Krause, S. e Leppik, I. E., *Population Pharmacokinetics of Carbamazepine in Adults with Epilepsy.* Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, **1998**. 18(2): p. 273-281.
- 147. Levy, R. H.; Pitlick, W. H.; Troupin, A. S.; Green, J. R. e Neal, J. M., *Pharmacokinetics of carbamazepine in normal man.* Clinical Pharmacology & Therapeutics, **1975**. 17(6): p. 657-668.
- 148. Kudriakova, T. B.;Sirota, L. A.;Rozova, G. I. eGorkov, V. A., *Autoinduction and steady-state pharmacokinetics of carbamazepine and its major metabolites.* British Journal of Clinical Pharmacology, **1992**. 33(6): p. 611-615.
- 149. Pirmohamed, M.;Kitteringham, N. R.;Breckenridge, A. M. e Park, B. K., *The effect of enzyme induction on the cytochrome P450-mediated bioactivation of carbamazepine by mouse liver microsomes.* Biochemical Pharmacology, **1992**. 44(12): p. 2307-2314.
- 150. Bertilsson, L., *Clinical Pharmacokinetics of Carbamazepine.* Clinical Pharmacokinetics, **1978**. 3(2): p. 128-143.
- 151. Morselli, P. L. F., A., *Metabolism and Pharmacokinetics of Carbamazepine*. Drug Metabolism Reviews, **1975**. 4(1): p. 97-113.
- 152. Lertratanangkoon, K. e Horning, M. G., *Metabolism of carbamazepine*. Drug Metabolism and Disposition, **1982**. 10(1): p. 1-10.
- 153. Eichelbaum, M.;Tomson, T.;Tybring, G. eBertilsson, L., *Carbamazepine Metabolism in Man.* Clinical Pharmacokinetics, **1985**. 10(1): p. 80-90.
- 154. Maggs, J. L.; Pirmohamed, M.; Kitteringham, N. R. ePark, B. K., *Characterization of the Metabolites of Carbamazepine in Patient Urine by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry.* Drug Metabolism and Disposition, **1997**. 25(3): p. 275-280.
- 155. Breton, H.;Cociglio, M.;Bressolle, F.;Peyriere, H.;Blayac, J. P. e Hillaire-Buys, D., *Liquid chromatography–electrospray mass spectrometry determination of*

carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. Journal of Chromatography B, **2005**. 828(1–2): p. 80-90.

- 156. Baker, K.;Csetenyi, J.;Frigerio, A.;Morselli, P. L.;Parravicini, F. e Pifferi, G., 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-5H-dibenz(b,f)azepine-5-carboxamide, a metabolite of carbamazepine isolated from human and rat urine. Journal of Medicinal Chemistry, **1973**. 16(6): p. 703-705.
- 157. Bourgeois, B. F. e Wad, N., Individual and combined antiepileptic and neurotoxic activity of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **1984**. 231(2): p. 411-415.
- Tomson, T.;Almkvist, O.;Nilsson, B. Y.;Svensson, J. e Bertilsson, L., *Carbamazepine-10,11-epoxide in epilepsy a pilot study.* Archives of Neurology, 1990. 47(8): p. 888-892.
- 159. Kerr, B. M.;Thummel, K.;Wurden, C. J.;Klein, S. M.;Kroetz, D. L.;Gonzalez, F. J. e Levy, R. H., *Human liver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation.* Biochemical Pharmacology, **1994**. 47(11): p. 1969-1979.
- 160. Huang, W.;Lin, Y. S.;McConn, D. J.;Calamia, J. C.;Totah, R. A.;Isoherranen, N.;Glodowski, M. e Thummel, K. E., *Evidence od significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism* Drug Metabolism and Disposition, **2004**. 32(12): p. 1434-1445.
- 161. Tybring, G.;von Bahr, C.;Bertilsson, L.;Collste, H.;Glaumann, H. e Solbrand, M., *Metabolism of carbamazepine and its epoxide metabolite in human and rat liver in vitro.* Drug Metabolism and Disposition, **1981**. 9(6): p. 561-564.
- Gibson, D. T.;Cardini, G. E.;Maseles, F. C. e Kallio, R. E., Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. IV. Incorporation of oxygen-18 into benzene by Pseudomonas putida. Biochemistry, **1970**. 9(7): p. 1631-1635.
- 163. Horning, M. G.; Stillwell, W. G.; Griffin, G. W. e Tsang, W. S., *Epoxide intermediates in the metabolism of naphthalene by the rat.* Drug Metabolism and Disposition, **1980**. 8(6): p. 404-414.
- Moody, J. D.; Freeman, J. P.; Fu, P. P. e Cerniglia, C. E., *Degradation of Benzo[a]pyrene by Mycobacterium vanbaalenii PYR-1*. Applied and Environmental Microbiology, **2004**. 70(1): p. 340-345.
- 165. Wad, N.;Guenat, C. e Krämer, G., *Carbamazepine: Detection of Another Metabolite in Serum, 9 Hydroxymethyl-10-carbamoyl Acridan.* Therapeutic Drug Monitoring, **1997**. 19(3).
- Myllynen, P.;Pienimäki, P.;Raunio, H. e Vähäkangas, K., *Microsomal metabolism of carbamazepine and oxcarbazepine in liver and placenta.* Human & Experimental Toxicology, **1998**. 17(12): p. 668-676.
- 167. Lynn, R. K.;Smith, R. G.;Thompson, R. M.;Deinzer, M. L.;Griffin, D. eGerber, N., Characterization of glucuronide metabolites of carbamazepine in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. Drug Metabolism and Disposition, **1978**. 6(4): p. 494.
- Pirmohamed, M.; Kitteringham, N. R.; Guenthner, T. M.; Breckenridge, A. M. e Park, B. K., An investigation of the formation of cytotoxic, protein-reactive and stable metabolites from carbamazepine in vitro. Biochemical Pharmacology, 1992. 43(8): p. 1675-1682.
- Lillibridge, J. H.; Amore Bm Fau Slattery, J. T.; Slattery Jt Fau Kalhorn, T. F.; Kalhorn Tf Fau Nelson, S. D.; Nelson Sd Fau Finnell, R. H.; Finnell Rh Fau Bennett, G. D. e Bennett, G. D., *Protein-reactive metabolites of carbamazepine in mouse liver microsomes.* Drug Metabolism and Disposition, 1996. 24(5): p. 509-514.

- 170. Spielberg, S. P.;Gordon, G. B.;Blake, D. A.;Mellits, E. D. e Bross, D. S., *Anticonvulsant toxicity in vitro: possible role of arene oxides.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **1981**. 217(2): p. 386.
- 171. Pearce, R. E.;Lu, W.;Wang, Y.;Uetrecht, J. P.;Correia, M. A. e Leeder, J. S., Pathways of Carbamazepine Bioactivation In Vitro III. The Role of Human Cytochrome P450 Enzymes in the Formation of 2,3-Dihydroxycarbamazepine. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, **2008**. 36(8): p. 1637-1649.
- 172. Pearce, R. E.;Uetrecht, J. P. e Leeder, J. S., *Pathways of Carbamazepine bioactivation in vitro: II. The role of Human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2-hydroxyiminostilbene* Drug Metabolism and Disposition, **2005**. 33(12): p. 1819-1826.
- 173. Ju, C. e Uetrecht, J. P., *Detection of 2-Hydroxyiminostilbene in the Urine of Patients Taking Carbamazepine and Its Oxidation to a Reactive Iminoquinone Intermediate*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **1999**. 288(1): p. 51-56.
- 174. Staines, A. G.; Coughtrie, M. W. H. e Burchell, B., *N-Glucuronidation of Carbamazepine in Human Tissues Is Mediated by UGT2B7*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **2004**. 311(3): p. 1131.
- 175. Furst, S. M. e Uetrecht, J. P., *The effect of carbamazepine and its reactive metabolite, 9-acridine carboxaldehyde, on immune cell function in vitro.* International Journal of Immunopharmacology, **1995**. 17(5): p. 445-452.
- 176. Furst, S. M.;Sukhai, P.;McClelland, R. A. e Uetrecht, J. P., *Covalent binding of carbamazepine oxidative metabolites to neutrophils.* Drug Metabolism and Disposition, **1995**. 23(5): p. 590-594.
- 177. Furst, S. M. e Uetrecht, J. P., Carbamazepine metabolism to a reactive intermediate by the myeloperoxidase system of activated neutrophils. Biochemical Pharmacology, **1993**. 45(6): p. 1267-1275.
- 178. Mathieu, O.;Dereure, O. e Hillaire-Buys, D., *Presence and ex vivo formation of acridone in blood of patients routinely treated with carbamazepine: exploration of the 9-acridinecarboxaldehyde pathway.* Xenobiotica, **2011**. 41(2): p. 91-100.
- 179. Perucca, E. e Meador, K. J., *Adverse effects of antiepileptic drugs.* Acta Neurologica Scandinavica, **2005**. 112(suppl 181): p. 30-35.
- 180. Pellock, J. M., *Carbamazepine Side Effects in Children and Adults.* Epilepsia, **1987**. 28(suppl 3): p. S64-S70.
- 181. Askmark, H. e Wiholm, B.-E., *Epidemiology of adverse reactions to carbamazepine as seen in a spontaneous reporting system.* Acta Neurologica Scandinavica, **1990**. 81(2): p. 131-140.
- 182. Błaszczyk, B.;Lasoń, W. e Czuczwar, S. J., *Antiepileptic drugs and adverse skin reactions: An update.* Pharmacological Reports, **2015**. 67(3): p. 426-434.
- 183. Ficarra, S.;Misiti, F.;Russo, A.;Carelli-Alinovi, C.;Bellocco, E.;Barreca, D.;Laganà, G.;Leuzzi, U.;Toscano, G.;Giardina, B.;Galtieri, A. e Tellone, E., Antiepileptic carbamazepine drug treatment induces alteration of membrane in red blood cells: Possible positive effects on metabolism and oxidative stress. Biochimie, **2013**. 95(4): p. 833-841.
- Devi, K.;George, S.;Criton, S.;Suja, V. e Sridevi, P., Carbamazepine The commonest cause of toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome: A study of 7 years. Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology, 2005. 71(5): p. 325-328.
- 185. Czajkowski, R.;Weiss-Rostkowska, V.;Wankiewicz, A.;Drewa, T.;Placek, W.;Biedka, M. e Zegarska, B., *Stevens-Johnson syndrome induced by carbamazepine*. Acta Poloniae Pharmaceutica., **2007**. 64(1): p. 89-92.
- 186. Bae, H. M.;Park, Y. J.;Kim, Y. H. e Moon, D. E., *Stevens-Johnson Syndrome Induced by Carbamazepine Treatment in a Patient Who Previously Had*

Carbamazepine Induced Pruritus - A Case Report. The Korean Journal of Pain, **2013**. 26(1): p. 80-83.

- 187. Huang, L. Y.;Liao Wc Fau Chiou, C.-C.;Chiou Cc Fau Lou, J.-P.;Lou Jp Fau -Hu, P.;Hu P Fau - Ko, F.-C. e Ko, F. C., *Fatal toxic epidermal necrolysis induced by carbamazepine treatment in a patient who previously had carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome.* J Formos Med Assoc, 2007. 106(12): p. 1032-1037.
- Garcia, J. B. S.; Ferro, L. S. G.; Carvalho, A. B.; da Rocha, R. M. e de Souza, L. M. L., Severe Carbamazepine-Induced Cutaneous Reaction in the Treatment of Post-herpetic Neuralgia. Case Report. Brazilian Journal of Anesthesiology, 2010. 60(4): p. 429-437.
- 189. Syn, W. K.;Naisbitt, D. J.;Holt, A. P.;Pirmohamed, M. e Mutimer, D. J., *Carbamazepine-induced acute liver failure as part of the DRESS syndrome.* International Journal of Clinical Practice, **2005**. 59(8): p. 988-991.
- 190. Ganeva, M.;Gancheva, T.;Lazarova, R.;Troeva, J.;Baldaranov, I.;Vassilev, I.;Hristakieva, E. e Tzaneva, V., *Carbamazepine-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome: report of four cases and brief review.* International Journal of Dermatology, **2008**. 47(8): p. 853-860.
- Cacoub, P.;Musette, P.;Descamps, V.;Meyer, O.;Speirs, C.;Finzi, L. e Roujeau, J. C., *The DRESS Syndrome: A Literature Review.* The American Journal of Medicine, **2011**. 124(7): p. 588-597.
- El Omairi, N.;Abourazzak, S.;Chaouki, S.;Atmani, S. e Hida, M., Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptom (DRESS) induced by carbamazepine: a case report and literature review. The Pan African Medical Journal, 2014. 18: p. 9.
- 193. Chung, W.-H.;Hung, S.-I.;Hong, H.-S.;Hsih, M.-S.;Yang, L.-C.;Ho, H.-C.;Wu, J.-Y. e Chen, Y.-T., *Medical genetics: A marker for Stevens-Johnson syndrome.* Nature, **2004**. 428(6982): p. 486-486.
- 194. Van Nguyen, D.;Chu, H. C.;Vidal, C.;Nguyen, N. N.;Quynh Do, N. T.;Linh Tran, T. T.;Chu, H. H.;Thu Nguyen, H. T.;Thuc, H. T.;Minh Le, H. T.;Fulton, R. B. e Fernando, S. L., *Genetic Susceptibility to Carbamazepine and Allopurinol -Induced Severe Cutaneous Adverse Reactions in Vietnamese.* Journal of Allergy and Clinical Immunology, **2017**. 139(2): p. AB118.
- 195. Chong, K. W.;Chan, D. W. S.;Cheung, Y. B.;Ching, L. K.;Hie, S. L.;Thomas, T.;Ling, S. e Tan, E. C., Association of carbamazepine-induced severe cutaneous drug reactions and HLA-B*1502 allele status, and dose and treatment duration in paediatric neurology patients in Singapore. Archives of Disease in Childhood, **2014**. 99(6): p. 581.
- 196. Kaniwa, N. eSaito, Y., *Pharmacogenomics of severe cutaneous adverse reactions and drug-induced liver injury.* J Hum Genet, **2013**. 58(6): p. 317-326.
- 197. Food and Drug Administration (FDA). Information for Healthcare Professionals: Dangerous or Even Fatal Skin Reactions - Carbamazepine (marketed as Carbatrol, Equetro, Tegretol, and generics). 2007 [cited 2016 15/05]; Available from:

https://www.fda.gov/drugs/drugsafety/postmarketdrugsafetyinformationforpatien tsandproviders/ucm124718.htm.

 McCormack, M.;Alfirevic, A.;Bourgeois, S.;Farrell, J. J.;Kasperavičiūtė, D.;Carrington, M.;Sills, G. J.;Marson, T.;Jia, X.;de Bakker, P. I. W.;Chinthapalli, K.;Molokhia, M.;Johnson, M. R.;O'Connor, G. D.;Chaila, E.;Alhusaini, S.;Shianna, K. V.;Radtke, R. A.;Heinzen, E. L.;Walley, N.;Pandolfo, M.;Pichler, W.;Park, B. K.;Depondt, C.;Sisodiya, S. M.;Goldstein, D. B.;Deloukas, P.;Delanty, N.;Cavalleri, G. L. e Pirmohamed, M., *HLA-A*3101 and Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions in Europeans*. New England Journal of Medicine, **2011**. 364(12): p. 1134-1143.

- 199. Yip, V. L. M. e Pirmohamed, M., *The HLA-A*31:01 allele: influence on carbamazepine treatment.* Pharmacogenomics and Personalized Medicine, **2017**. 10: p. 29-38.
- Bateman, D. E., Carbamazepine induced systemic lupus eruthematosus: a case report. British Medical Journal (Clinical research ed.), **1985**. 291(6496): p. 632-633.
- 201. Pelizza, L.;De Luca, P.;La Pesa, M. e Minervino, A., *Drug-induced systemic lupus erythematosus after 7 years of treatment with carbamazepine.* Acta Biomédica, **2006**. 77: p. 17-19.
- 202. Motta, E.;Kazibutowska, Z.;Lorek, A.;Januszewski, K.;Golba, A. e Wianecka, A., *Carbamazepine-induced systemic lupus erythematosus--a case report.* Neurologia i neurochiruugia polska, **2006**. 40(2): p. 151-155.
- Schoonen, W. M.; Thomas, S. L.; Somers, E. C.; Smeeth, L.; Kim, J.; Evans, S. e Hall, A. J., *Do selected drugs increase the risk of lupus? A matched casecontrol study.* British Journal of Clinical Pharmacology, **2010**. 70(4): p. 588-596.
- 204. Tomson, T. e Battino, D., *Teratogenic effects of antiepileptic drugs*. The Lancet Neurology, **2012**. 11(9): p. 803-813.
- 205. Matalon, S.;Schechtman, S.;Goldzweig, G. e Ornoy, A., *The teratogenic effect* of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. Reproductive Toxicology, **2002**. 16(1): p. 9-17.
- Hill, D. S.; Wlodarczyk, B. J.; Palacios, A. M. e Finnell, R. H., *Teratogenic effects of antiepileptic drugs.* Expert Review of Neurotherapeutics, **2010**. 10(6): p. 943-959.
- Hari, Y.;Frutig-Schnyder, K.;Hurni, M.;Yawalkar, N.;Zanni, M. P.;Schnyder, B.;Kappeler, A.;Von Greyerz, S.;Braathen, L. R. e Pichler, W. J., *T cell involvement in cutaneous drug eruptions.* Clinical & Experimental Allergy, **2001**. 31(9): p. 1398-1408.
- Zakrzewska, J. M. e Ivanyi, L., In vitro lymphocyte proliferation by carbamazepine, carbamazepine-10, 11-epoxide, and oxcarbazepine in the diagnosis of drug-induced hypersensitivity. Journal of Allergy and Clinical Immunology, **1988**. 82: p. 110-115.
- Naisbitt, D. J.;Britschgi, M.;Wong, G.;Farrell, J.;Depta, J. P. H.;Chadwick, D. W.;Pichler, W. J.;Pirmohamed, M. e Park, B. K., *Hypersensitivity Reactions to Carbamazepine: Characterization of the Specificity, Phenotype, and Cytokine Profile of Drug-Specific T Cell Clones.* Molecular Pharmacology, **2003**. 63(3): p. 732.
- 210. Wei, C.-Y.;Chung, W.-H.;Huang, H.-W.;Chen, Y.-T. e Hung, S.-I., *Direct interaction between HLA-B and carbamazepine activates T cells in patients with Stevens-Johnson syndrome.* Journal of Allergy and Clinical Immunology, **2012**. 129(6): p. 1562-1569.e1565.
- 211. Peng Zhou, S. Z., Yewang Wang, Chao Yang, Jian Huang, *Structural modeling* of *HLA-B*1502/peptide/carbamazepine/T-cell receptor complex architecture: implication for the molecular mechanism of carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis.* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, **2016**. 34(8): p. 1806-1817.
- Illing, P. T.; Vivian, J. P.; Dudek, N. L.; Kostenko, L.; Chen, Z.; Bharadwaj, M.; Miles, J. J.; Kjer-Nielsen, L.; Gras, S.; Williamson, N. A.; Burrows, S. R.; Purcell, A. W.; Rossjohn, J. e McCluskey, J., *Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire*. Nature, **2012**. 486(7404): p. 554-558.
- Mallal, S. ePhillips, E., *Abacavir and the altered peptide repertoire model: clinical implications.* Journal of the International AIDS Society, **2012**. 15 (Suppl 4): p. 18119.
- 214. Bu, H. Z.;Kang, P.;Deese, A. J.;Zhao, P. e Pool, W. F., *Human in vitro glutathionyl and protein adducts of carbamazepine-10,11-epoxide, a stable and*

pharmacologically active metabolite of carbamazepine. Drug Metabolism and Disposition, **2005**. 33(12): p. 1920-1924.

- 215. Yip, V. L. M.;Meng, X.;Maggs, J. L.;Jenkins, R.;Marlot, P.;Marson, A.;Park, B. K. e Pirmohamed, M., *Mass Spectrometric Characterization of Circulating Covalent Protein Adducts Derived from Epoxide Metabolites of Carbamazepine in Patients.* Chemical Research in Toxicology, **2017**.
- 216. Bellucci, G.;Berti, G.;Chiappe, C.;Lippi, A. e Marioni, F., *The metabolism of carbamazepine in humans: steric course of the enzymatic hydrolysis of the 10,11-epoxide.* Journal of Medicinal Chemistry, **1987**. 30: p. 768-773.
- 217. Gaedigk, A.; Spielberg, S. P. e Grant, D. M., *Characterization of the microsomal epoxide hydrolase gene in patients with anticonvulsant adverse drug reactions.* Pharmacogenetics, **1994**. 4(3): p. 142-153.
- Yoo;Kang;Chun e Lee, Anticonvulsant hypersensitivity syndrome with an epoxide hydrolase defect. British Journal of Dermatology, **1999**. 140(1): p. 181-183.
- 219. Stark, A. A.; Essigmann, J. M.; Demain, A. L.; Skopek, T. R. e Wogan, G. N., *Aflatoxin B1 mutagenesis, DNA binding, and adduct formation in Salmonella typhimurium.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1979**. 76(3): p. 1343-1347.
- Bolton, J. L.; Trush, M. A.; Penning, T. M.; Dryhurst, G. e Monks, T. J., *Role of Quinones in Toxicology*. Chemical Research in Toxicology, **2000**. 13(3): p. 135-160.
- 221. Terrence, J. M. e Douglas, C. J., *The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers.* Current Drug Metabolism, **2002**. 3(4): p. 425-438.
- 222. Munns, A. J.;De Voss, J. J.;Hooper, W. D.;Dickinson, R. G. e Gillam, E. M. J., Bioactivation of Phenytoin by Human Cytochrome P450: Characterization of the Mechanism and Targets of Covalent Adduct Formation. Chemical Research in Toxicology, **1997**. 10(9): p. 1049-1058.
- Cuttle, L.;Munns, A. J.;Hogg, N. A.;Scott, J. R.;Hooper, W. D.;Dickinson, R. G. e Gillam, E. M. J., *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, **2000**. 28(8): p. 945-950.
- 224. Bu, H. Z.;Zhao, P.;Dalvie, D. K. e Pool, W. F., *Identification of primary and* sequential bioactivation pathways of carbamazepine in human liver microsomes using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2007**. 21(20): p. 3317-3322.
- 225. Pearce, R. E.; Vakkalagadda, G. R. e Leeder, J. S., Pathways of Carbamazepine Bioactivation in Vitro I. Characterization of Human Cytochromes P450 Responsible for the Formation of 2- and 3-Hydroxylated Metabolites. Drug Metabolism and Disposition, **2002**. 30(11): p. 1170-1179.
- 226. Tecoma, E. S., Oxcarbazepine. Epilepsia, **1999**. 40(Suppl. 5): p. s37-s46.
- 227. Schwabe, S., Oxcarbazepine: Clinical Development Program. Epilepsia, **1994**. 35(Suppl. 5): p. S51-S53.
- Corporation, N. P. *Trileptal.* 01.02.2017]; Available from: https://www.pharma.us.novartis.com/sites/www.pharma.us.novartis.com/files/tril eptal.pdf.
- 229. May, T. W.;Korn-Merker, E. e Rambeck, B., *Clinical Pharmacokinetics of Oxcarbazepine.* Clinical Pharmacokinetics, **2003**. 42(12): p. 1023-1042.
- Schutz, H.;Feldmann, K. F.;Faigle, J. W.;Kriemler, H. P. eWinkler, T., *The metabolism of 14C-oxcarbazepine in man.* Xenobiotica, **1986**. 16(8): p. 769-778.
- 231. Flesch, G.; Francotte E Fau Hell, F.; Hell F Fau Degen, P. H. e Degen, P. H., Determination of the R-(-) and S-(+) enantiomers of the monohydroxylated

metabolite of oxcarbazepine in human plasma by enantioselective highperformance liquid chromatography. Journal of Chromatography, **1992** 581(1): p. 147-151.

- 232. Flesch, G.;Czendlik, C.;Renard, D. e Lloyd, P., *Pharmacokinetics of the Monohydroxy Derivative of Oxcarbazepine and Its Enantiomers after a Single Intravenous Dose Given as Racemate Compared with a Single Oral Dose of Oxcarbazepine.* Drug Metabolism and Disposition, **2011**. 39(6): p. 1103.
- 233. Lin, L. C.;Lai Pc Fau Yang, S.-F.;Yang Sf Fau Yang, R.-C. e Yang, R. C., Oxcarbazepine-induced Stevens-Johnson syndrome: a case report. Kaohsiung Journal of Medical Science, **2009**. 25(2): p. 82-86.
- Sharma, S.; Sharma, N. e Yeolekar, M., Oxcarbazepine-induced Stevens Johnson syndrome: A rare case report. Indian Dermatology Online Journal, 2011. 2(1): p. 13-15.
- 235. Poletti-Jabbour, J.;Wiegering-Rospigliosi, A.;Pereyra-Elías, R. e Elías-Barrera, C. C., *Carbamazepine and oxcarbazepine: reflections after an oxcarbazepineinduced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis overlap.* European Journal of Clinical Pharmacology, **2016**. 72(8): p. 1031-1032.
- 236. D'orazio, J., Oxcarbazepine-induced Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS). Clinical Toxicology, **2008**. 46(10): p. 1093-1094.
- 237. Saha, M.;Gorai, S. e Madhab, V., Oxcarbazepine-induced drug rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome presenting as exfoliative dermatitis. Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics, **2016**. 7(3): p. 142-145.
- 238. Castrén, K.;Pienimäki, P.;Arvela, P. e Vähäkangas, K., *Metabolites and DNAbinding of carbamazepine and oxcarbazepine in vitro by rat liver microsomes.* Human & Experimental Toxicology, **1996**. 15(7): p. 577-582.
- 239. Surh, Y.-J. e Tannenbaum, S. R., *Sulfotransferase-Mediated Activation of* 7,8,9,10-Tetrahydro-7-ol, 7,8-Dihydrodiol, and 7,8,9,10-Tetraol Derivatives of *Benzo[a]pyrene.* Chemical Research in Toxicology, **1995**. 8(5): p. 693-698.
- 240. Sharma, A. M. e Uetrecht, J., *Bioactivation of drugs in the skin: relationship to cutaneous adverse drug reactions.* Drug Metabolism Reviews, **2014**. 46(1): p. 1-18.
- Green, V. J.;Pirmohamed, M.;Kitteringham, N. R.;Gaedigk, A.;Grant, D. M.;Boxer, M.;Burchell, B. e Park, B. K., *Genetic analysis of microsomal epoxide hydrolase in patients with carbamazepine hypersensitivity.* Biochemical Pharmacology, **1995**. 50(9): p. 1353-1359.
- 242. Jerina, D. M.;Kaubisch, N. e Daly, J. W., Arene Oxides as Intermediates in the Metabolism of Aromatic Substrates: Alkyl and Oxygen Migrations during Isomerization of Alkylated Arene Oxides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1971**. 68(10): p. 2545-2548.
- 243. Uetrecht, J., *Drug Metabolism by Leukocytes and Its Role in Drug-Induced Lupus and Other Idiosyncratic Drug Reactions.* Critical Reviews in Toxicology, **1990**. 20(4): p. 213-235.
- 244. Chang, V. H. T., Synthesis of 2-hydroxycarbamazepine. A metabolite of carbamazepine. Journal of Heterocyclic Chemistry, **1983**. 20(1): p. 237-238.
- 245. Jørgensen, T. K.;Andersen, K. E.;Lau, J.;Madsen, P. e Huusfeldt, P. O., Synthesis of substituted 10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepines; key synthons in syntheses of pharmaceutically active compounds. Journal of Heterocyclic Chemistry, **1999**. 36(1): p. 57-64.
- 246. Lu, W. e Uetrecht, J. P., *Peroxidase-Mediated Bioactivation of Hydroxylated Metabolites of Carbamazepine and Phenytoin.* Drug Metabolism and Disposition, **2008**. 36(8): p. 1624-1636.
- 247. Learmonth, D. A.; Weingartner, G. e Kraemer, M., *Method for preparations of 10,11-dihidro-10-hidroxy-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide*, in *European*

Patent Office, Bial - Portela & C^a, S. A., Editor. 2010, Bial - Portela & C^a, S.A: Portugal. p. 1-8.

- 248. Neves, C. M. B.;Simões, M. M. Q.;Domingues, F. M. J.;Neves, M. G. P. M. S. e Cavaleiro, J. A. S., *Biomimetic oxidation of carbamazepine with hydrogen peroxide catalyzed by a manganese porphyrin.* Química Nova, **2012**. 35: p. 1477-1481.
- Olivo, G.;Lanzalunga, O. e Di Stefano, S., Non-Heme Imine-Based Iron Complexes as Catalysts for Oxidative Processes. Advanced Synthesis & Catalysis, 2016. 358(6): p. 843-863.
- 250. Oloo, W. N. a. L., Q. Jr., *Bioinspired Nonheme Iron Catalysts for C–H and C=C Bond Oxidation: Insights into the Nature of the Metal-Based Oxidants.* Accounts of chemical research, **2015**. 48(9): p. 2612-2621.
- 251. Wanke, R.;Novais, D. A.;Harjivan, S. G.;Marques, M. M. e Antunes, A. M. M., Biomimetic oxidation of aromatic xenobiotics: synthesis of the phenolic metabolites from the anti-HIV drug efavirenz. Organic & Biomolecular Chemistry, **2012**. 10(23): p. 4554-4561.
- Lindhorst, A. C.; Haslinger, S. e Kuhn, F. E., *Molecular iron complexes as catalysts for selective C-H bond oxygenation reactions.* Chemical Communications, **2015**. 51(97): p. 17193-17212.
- Cusso, O.; Ribas, X. eCostas, M., Biologically inspired non-heme iron-catalysts for asymmetric epoxidation; design principles and perspectives. Chemical Communications, 2015. 51(76): p. 14285-14298.
- 254. Taktak, S.;Flook, M.;Foxman, B. M.;Que, J. L. e Rybak-Akimova, E. V., ortho-Hydroxylation of benzoic acids with hydrogen peroxide at a non-heme iron center. Chemical Communications, **2005**(42): p. 5301-5303.
- 255. Javis, M. e Moritz, A., *Inter-ring proton couplings in naphthalene.* Australian Journal of Chemistry, **1971**. 24(1): p. 89-92.
- Reich, H. J. Structure Determination Using NMR Proton-proton coupling data.
 2005 [cited 2017 09/03]; Available from: http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/chem605/index.htm.
- 257. Becke, A. D., *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange.* The Journal of Chemical Physics, **1993**. 98(7): p. 5648-5652.
- 258. Lee, C.;Yang, W. e Parr, R. G., *Development of the Colle-Salvetti correlationenergy formula into a functional of the electron density.* Physical Review B, **1988**. 37(2): p. 785-789.
- 259. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B. e Fox, D. J., *Gaussian 09.* 2017, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- 260. Israelachvili, J. N., *Van der Waals Forces*, in *Intermolecular and Surface Forces* Israelachvili, J. N., Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 107-132.
- Zeegers-Huyskens, T. e Huyskens, P., Intermolecular Forces, in Intermolecular Forces: An Introduction to Modern Methods and Results, Huyskens, P. L., Luck, W. A. P.eZeegers-Huyskens, T., Editors. 1991, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-30.

- 262. Mohan, J., *Organic Spectroscopy Principles and Applications*. 2nd Edition ed. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 2002, Harrow, UK: Alpha Science International Ltd.
- 263. Schaefer, T.;Reynolds, W. F. e Yonemoto, T., *Possible intramolecular van der Waals constributions to proton and carbon-13 shifts in aliphatic and aromatic halogen compounds.* Canadian Journal of Chemistry, **1963**. 41(12): p. 2969-2976.
- 264. Li, S. e Chesnut, D. B., Intramolecular van der waals interactions and chemical shifts: A model for β and γ -effects. Magnetic Resonance in Chemistry, **1985**. 23(8): p. 625-638.
- 265. Kolocouris, A.;Koch, A.;Kleinpeter, E. eStylianakis, I., 2-Substituted and 2,2disubstituted adamantane derivatives as models for studying substituent chemical shifts and C–Hax···Yax cyclohexane contacts—results from experimental and theoretical NMR spectroscopic chemical shifts and DFT structures. Tetrahedron, 2015. 71(16): p. 2463-2481.
- 266. Heckendorn, R., *Synthesis of trans-10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide, a Major Metabolite of Carbamazepine.* Helvetica Chimica Acta, **1987**. 70(7): p. 1955-1962.
- 267. Dash, S.;Patel, S. e Mishra, B. K., *Oxidation by permanganate: synthetic and mechanistic aspects.* Tetrahedron, **2009**. 65(4): p. 707-739.
- 268. Strassner, T. e Busold, M., *A Density Functional Theory Study on the Mechanism of the Permanganate Oxidation of Substituted Alkenes.* The Journal of Organic Chemistry, **2001**. 66(3): p. 672-676.
- Hu, L.;Martin, H. M.;Arce-Bulted, O.;Sugihara, M. N.;Keating, K. A. e Strathmann, T. J., Oxidation of Carbamazepine by Mn(VII) and Fe(VI): Reaction Kinetics and Mechanism. Environmental Science & Technology, 2009. 43(2): p. 509-515.
- Garnayak, S. e Patel, S., Oxidation of Carbamazepine by Lipopathic Mn(VII), Cetyltrimethylammonium Permanganate: A Mechanistic Study. International Journal of Chemical Kinetics, 2015. 47(7): p. 429-438.
- 271. Miao, X.-S. e Metcalfe, C. D., *Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry.* Analytical Chemistry, **2003**. 75(15): p. 3731-3738.
- 272. Misra, H. P., *Generation of Superoxide Free Radical during the Autoxidation of Thiols.* Journal of Biological Chemistry, **1974**. 249(7): p. 2151-2155.
- Dénès, F.;Pichowicz, M.;Povie, G. e Renaud, P., *Thiyl Radicals in Organic Synthesis.* Chemical Reviews, **2014**. 114(5): p. 2587-2693.
- 274. Sigma. L-Glutathione oxidized disodium salt Product Information. 12.03.17]; Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/g6654pis.pdf.
- 275. Tsuyoshi Shimiose, Y. e Hideki Murata, Y., *Crystals of oxidized glutathione and process for producing the same*, Kyowa Hakko Kogyo Co., L., Editor. 2004.
- 276. Schöneich, C. eAsmus, K.-D., *Reaction of thiyl radicals with alcohols, ethers and polyunsaturated fatty acids: A possible role of thiyl free radicals in thiol mutagenesis?* Radiation and Environmental Biophysics, **1990**. 29(4): p. 263-271.
- Ferreri, C.;Kratzsch, S.;Landi, L. e Brede, O., *Thiyl radicals in biosystems:* effects on lipid structures and metabolisms. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, **2005**. 62(7): p. 834-847.
- 278. Hoyle, C. E. e Bowman, C. N., *Thiol–Ene Click Chemistry.* Angewandte Chemie International Edition, **2010**. 49(9): p. 1540-1573.
- 279. Yin, H.;Xu, L. e Porter, N. A., *Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis.* Chemical Reviews, **2011**. 111(10): p. 5944-5972.
- 280. Kharasch, M. S.;Nudenberg, W. eMantell, G. J., *Reactions of atoms and free radicals in solution. XXV. The reactions of olefins with mercaptans in the*

presence of oxygen. . The Journal of Organic Chemistry, **1951**. 16(4): p. 524-532.

- 281. Ford, J. F.; Pitkethly, R. C. e Young, V. O., *Stereochemistry of the co-oxidation products of indene and thiophenol.* Tetrahedron, **1958**. 4(3): p. 325-336.
- D'Souza, V. T.;Nanjundiah, R.;Baeza, H. J. e Szmant, H. H., *Thiol-olefin cooxidation (TOCO) reaction. 9. A self-consistent mechanism under nonradical-inducing conditions.* The Journal of Organic Chemistry, **1987**. 52(9): p. 1729-1740.
- 283. Wang, W.-L.;Wu, Q.-Y.;Huang, N.;Wang, T. e Hu, H.-Y., *Synergistic effect* between UV and chlorine (UV/chlorine) on the degradation of carbamazepine: Influence factors and radical species. Water Research, **2016**. 98: p. 190-198.
- 284. Sun, S.-P.;Zeng, X. e Lemley, A. T., *Kinetics and mechanism of carbamazepine degradation by a modified Fenton-like reaction with ferric-nitrilotriacetate complexes.* Journal of Hazardous Materials, **2013**. 252–253: p. 155-165.
- 285. Chatgilialoglu, C. e O'Neill, P., *Free radicals associated with DNA damage.* Experimental Gerontology, **2001**. 36(9): p. 1459-1471.
- 286. Dias, R. M. B. e Vieira, A. J. S. C., Substituent effect on superoxide elimination from peroxyl radicals of adenine and methylated derivatives. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, **1998**. 117(3): p. 217-222.
- Emanuel, C. J.;Newcomb, M.;Ferreri, C. e Chatgilialoglu, C., *Kinetics of 2'-Deoxyuridin-1'-yl Radical Reactions*. Journal of the American Chemical Society, 1999. 121(12): p. 2927-2928.
- Faizul, A.; Prasad, M. V. V. e Neelaveni, T., *Targeting Oxidative Stress Component in the Therapeutics of Epilepsy.* Current Topics in Medicinal Chemistry, **2012**. 12(9): p. 994-1007.
- Shin, E.-J.; Jeong, J. H.; Chung, Y. H.; Kim, W.-K.; Ko, K.-H.; Bach, J.-H.; Hong, J.-S.; Yoneda, Y. eKim, H.-C., *Role of oxidative stress in epileptic seizures*. Neurochemistry international, **2011**. 59(2): p. 122-137.
- Tutanc, M.;Aras, M.;Dokuyucu, R.;Altas, M.;Zeren, C.;Arica, V.;Ozturk, O. H.;Motor, S. e Yilmaz, C., *Oxidative Status in Epileptic Children Using Carbamazepine.* Iranian Journal of Pediatrics, **2015**. 25(6): p. e3885.
- 291. Niketic, V.;Ristic, S.;Saicic, Z.;Spasic, M.;Buzadzic, B. eStojkovic, M., Activities of antioxidant enzymes and formation of the glutathione adduct of hemoglobin (Hb ASSG) in epileptic patients with long-term antiepileptic therapy. **1995** 150(11): p. 811-813.
- 292. Hamed, S. A.; Abdellah, M. M. e El-Melegy, N., *Blood Levels of Trace Elements, Electrolytes, and Oxidative Stress/Antioxidant Systems in Epileptic Patients.* Journal of Pharmacological Sciences, **2004**. 96(4): p. 465-473.
- 293. Rosowsky, A.;Fu, H.;Chan, D. C. M. e Queener, S. F., Synthesis of 2,4-Diamino-6-[2'-O-(ω-carboxyalkyl)oxydibenz[b,f]azepin-5-yl]methylpteridines as Potent and Selective Inhibitors of Pneumocystis carinii, Toxoplasma gondii, and Mycobacterium avium Dihydrofolate Reductase. Journal of Medicinal Chemistry, **2004**. 47(10): p. 2475-2485.
- Zimmer, H.;Lankin, D. C. e Horgan, S. W., Oxidations with potassium nitrosodisulfonate (Fremy's radical). Teuber reaction. Chemical Reviews, 1971. 71(2): p. 229-246.
- Antunes, A. M. M.;Sidarus, M.;Novais, D. A.;Harjivan, S. G.;Santos, P. P.;Ferreira da Silva, J. L.;Beland, F. A. eMarques, M. M., Oxidation of 2-Hydroxynevirapine, a Phenolic Metabolite of the Anti-HIV Drug Nevirapine: Evidence for an Unusual Pyridine Ring Contraction. Molecules, 2012. 17(3): p. 2616.
- 296. Harjivan, S. G.;Pinheiro, P. F.;Martins, I. L.;Godinho, A. L.;Wanke, R.;Santos, P. P.;Pereira, S. A.;Beland, F. A.;Marques, M. M. eAntunes, A. M. M., *Quinoid derivatives of the nevirapine metabolites 2-hydroxy- and 3-hydroxy-nevirapine:*

activation pathway to amino acid adducts. Toxicology Research, **2015**. 4(6): p. 1565-1577.

- Zielonka, J.;Zhao, H.;Xu, Y. e Kalyanaraman, B., Mechanistic similarities between oxidation of hydroethidine by Fremy's salt and superoxide: Stoppedflow optical and EPR studies. Free Radical Biology and Medicine, 2005. 39(7): p. 853-863.
- 298. Kawashima, K. elshiguro, T., *On the Reactions of Dibenz [b, f] oxireno [d] azepine Derivatives.* CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, **1978**. 26(3): p. 951-955.
- 299. Glatt, H., *Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics.* Chemico-Biological Interactions, **2000**. 129(1): p. 141-170.
- Carril, M.;SanMartin, R.;Churruca, F.;Tellitu, I. e Domínguez, E., An Advantageous Route to Oxcarbazepine (Trileptal) Based on Palladium-Catalyzed Arylations Free of Transmetallating Agents. Organic Letters, 2005. 7(22): p. 4787-4789.
- 301. Benes, J.;Parada, A.;Figueiredo, A. A.;Alves, P. C.;Freitas, A. P.;Learmonth, D. A.;Cunha, R. A.;Garrett, J. eSoares-da-Silva, P., Anticonvulsant and Sodium Channel-Blocking Properties of Novel 10,11-Dihydro-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide Derivatives. Journal of Medicinal Chemistry, 1999. 42(14): p. 2582-2587.
- 302. Dusza, J. P.; Joseph, J. P. e Bernstein, S., *The preparation of estradiol-17β* sulfates with triethylamine-sulfur trioxide. Steroids, **1985**. 45(3): p. 303-315.
- 303. Yi, L.;Dratter, J.;Wang, C.;Tunge, J. A. e Desaire, H., *Identification of sulfation sites of metabolites and prediction of the compounds' biological effects.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2006**. 386(3): p. 666-674.
- Soares, R.;Pires, E.;Almeida, A. M.;Santos, R.;Gomes, R.;Koči, K.;Franco, C. F. e Coelho, A. V., *Tandem Mass Spectrometry of Peptides*, in *Tandem Mass Spectrometry Applications and Principles*, Prasain, D. J., Editor. 2012, interch. p. 35-56.
- Roepstorff, P. e Fohlman, J., Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomedical mass spectrometry, 1984. 11(11): p. 601.
- 306. Graves, J. e Roboz, J., *Mass Spectrometry for the Novice*, ed. Group, T. a. F. 2014: CRC Press.
- 307. Tomson, T.;Xue, H. eBattino, D., *Major congenital malformations in children of women with epilepsy.* Seizure, **2015**. 28: p. 46-50.
- 308. Tomson, T.;Battino, D.;Bonizzoni, E.;Craig, J.;Lindhout, D.;Sabers, A.;Perucca, E. e Vajda, F., Dose-dependent risk of malformations with antiepileptic drugs: an analysis of data from the EURAP epilepsy and pregnancy registry. The Lancet Neurology, **2011**. 10(7): p. 609-617.
- 309. Jentink, J.;Dolk, H.;Loane, M. A.;Morris, J. K.;Wellesley, D.;Garne, E. ede Jongvan den Berg, L., *Intrauterine exposure to carbamazepine and specific congenital malformations: systematic review and case-control study.* British Medical Journal, **2010**. 341: p. c6581.
- 310. Finnell, R. H.;Bennett, G.;Slattery, J. T.;Amore, B. F.;Bajpai, M. e Levy, R. H., Effect of treatment with phenobarbital and stiripentol on carbamazepineinduced teratogenicity and reactive metabolite formation. Teratology, **1995**. 52(6): p. 324-332.
- 311. Rosa, F. W., Spina Bifida in Infants of Women Treated with Carbamazepine during Pregnancy. New England Journal of Medicine, **1991**. 324(10): p. 674-677.
- Thomas, S. V.;Ajaykumar, B.;Sindhu, K.;Francis, E.;Namboodiri, N.;Sivasankaran, S.;Tharakan, J. A. e Sarma, P. S., *Cardiac Malformations Are Increased in Infants of Mothers with Epilepsy.* Pediatric Cardiology, **2008**. 29(3): p. 604-608.

- 313. Matlow, J. e Koren, G., *Is carbamazepine safe to take during pregnancy?* Canadian Family Physician, **2012**. 58(2): p. 163-164.
- Bennett, G. D.; Amore, B. M.; Finnell, R. H.; Wlodarczyk, B.; Kalhorn, T. F.; Skiles, G. L.; Nelson, S. D. e Slattery, J. T., *Teratogenicity of carbamazepine-10, 11-epoxide and oxcarbazepine in the SWV mouse*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **1996**. 279(3): p. 1237.
- 315. van Gelder, M. M. H. J.;van Rooij, I. A. L. M.;Miller, R. K.;Zielhuis, G. A.;de Jong-van den Berg, L. T. W. eRoeleveld, N., *Teratogenic mechanisms of medical drugs*. Human Reproduction Update, **2010**. 16(4): p. 378-394.
- 316. Bochert, G.; Platzek, T.; Rahm, U. eNeubert, D., *Embryotoxicity induced by alkylating agents: 6. DNA adduct formation induced by methylnitrosourea in mouse embryos.* Archives of Toxicology, **1991**. 65(5): p. 390-395.
- Königstein, M.; Larisch, M. e Obe, G., *Mutagenicity of antieleptic drugs I. Carbamazepine and some of its metabolites.* Mutation Research Letters, **1984**. 139(2): p. 83-86.
- 318. Schaumann, B.;Satish, J.;Johnson, S. B.;Moore, K. e Cervenka, J., *Effects of Carbamazepine on Human Chromosomes*. Epilepsia, **1985**. 26(4): p. 346-352.
- Glatt, H. R.;Oesch, F.;Frigerio, A. e Garattini, S., *Epoxides metabolically produced from some known carcinogens and from some clinically used drugs. I. Differences in mutagenicity.* International Journal of Cancer, **1975**. 16(5): p. 787-797.
- Çelik, A., The Assessment of Genotoxicity of Carbamazepine Using Cytokinesis-Block (CB) Micronucleus Assay in Cultured Human Blood Lymphocytes. Drug and Chemical Toxicology, 2006. 29(2): p. 227-236.
- 321. Awara, W. M.;El-Gohary, M.;El-Nabi, S. H. eFadel, W. A., *In vivo and in vitro evaluation of the mutagenic potential of carbamazepine: Does melatonin have anti-mutagenic activity*? Toxicology, **1998**. 125(1): p. 45-52.
- 322. Rocco, L.;Izzo, A.;Zito, G.;Peluso, C. eStingo, V., *Genotoxicity in Zebrafish* (*Danio rerio*) *Exposed to two Pharmacological Products from an Impacted Italian* Journal of Environmental & Analytical Toxicology, **2011**. 1(2): p. 1-7.
- 323. Atlı Şekeroğlu, Z.;Kefelioğlu, H.;Kontaş Yedier, S.;Şekeroğlu, V. e Delmecioğlu, B., Oxcarbazepine-induced cytotoxicity and genotoxicity in human lymphocyte cultures with or without metabolic activation. Toxicology Mechanisms and Methods, **2017**. 27(3): p. 201-206.
- 324. Akbar, H.;Khan, A.;Mohammadzai, I.;Khisroon, M. e Begum, I., *The genotoxic effect of oxcarbazepine on mice blood lymphocytes.* Drug and Chemical Toxicology, **2017**: p. 1-6.
- 325. Gamboa da Costa, G.;Hamilton, L. P.;Beland, F. A. e Marques, M. M., Characterization of the Major DNA Adduct Formed by α-Hydroxy-Ndesmethyltamoxifen in Vitro and in Vivo. Chemical Research in Toxicology, 2000. 13(3): p. 200-207.
- 326. Heflich, R. H.;Morris, S. M.;Beranek, D. T.;McGarrity, L. J.;Chen, J. J. e Beland, F. A., *Relationships between the DNA adducts and the mutations and sisterchromatid exchanges produced in Chinese hamster ovary cells by N-hydroxy-2aminofluorene, N-hydroxy-N'-acetylbenzidine and 1-nitrosopyrene.* Mutagenesis, **1986**. 1(3): p. 201-206.
- 327. Gamboa da Costa, G.;Churchwell, M. I.;Hamilton, L. P.;Von Tungeln, L. S.;Beland, F. A.;Marques, M. M. e Doerge, D. R., DNA Adduct Formation from Acrylamide via Conversion To Glycidamide in Adult and Neonatal Mice. Chemical Research in Toxicology, **2003**. 16(10): p. 1328-1337.
- 328. Kishi, T.;Fujita, N.;Eguchi, T.-a. e Ueda, K., *Mechanism for reduction of serum folate by antiepileptic drugs during prolonged therapy.* Journal of the Neurological Sciences. 145(1): p. 109-112.
- 329. Fenech, M. e Crott, J. W., *Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds* induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage-

fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, **2002**. 504(1): p. 131-136.

- 330. Armarego, W. L. F. e Perrin, D. D., *Purification of laboratory chemicals* 4th ed. 1997, Oxford ; Boston Butterworth Heinemann.
- 331. Sugasawa, T.;Toyoda, T.;Adachi, M. e Sasakura, K., *Aminohaloborane in organic synthesis. 1. Specific ortho substitution reaction of anilines.* Journal of the American Chemical Society, **1978**. 100(15): p. 4842-4852.
- 332. Chevolleau, S.;Jacques, C.;Canlet, C.;Tulliez, J. e Debrauwer, L., *Analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, as exposure biomarkers in French population.* Journal of Chromatography A, **2007**. 1167(2): p. 125-134.
- 333. Tornqvist, M., *Epoxide adducts to N-terminal valine of hemoglobin*, in *Methods in Enzymology*. 1994, Academic Press. p. 650-657.
- 334. Aldini, G.;Vistoli, G.;Regazzoni, L.;Gamberoni, L.;Facino, R. M.;Yamaguchi, S.;Uchida, K. e Carini, M., *Albumin Is the Main Nucleophilic Target of Human Plasma: A Protective Role Against Pro-atherogenic Electrophilic Reactive Carbonyl Species?* Chemical Research in Toxicology, **2008**. 21(4): p. 824-835.

Este trabalho deu origem às seguintes publicações:

Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica

1. **Martins IL**, Nunes JP, Charneira C, Telo JP, Marques MM, Antunes AMM, "Reaction of the antiepileptic drug carbazepine with bionucleophiles: Is bioactivation really needed?" (submetido ao European Journal of Medicinal Chemistry)

Conferências com Proceedings

2. **Martins IL**, Marques MM, Antunes AMM, "Proteinadductsfromcarbamazepine-10,11epoxide, the major metabolite of the antiepileptic drug carbamazepine: possible biomarkers of toxicity", 51st *Congress of the European Societies of Toxicology EUROTOX,* Poster P47, **2015**, Porto, Portugal. *Toxicology Letters* **2015**, 238 (2) S359;

Este trabalho deu origem às seguintes apresentações em conferências nacionais e internacionais:

Apresentações Orais

1. **Martins IL**, Marques MM, Antunes AMM, "Reactivity of the antiepileptic drug carbamazepine and its metabolite carbamazepine-10,11- epoxide towards bionucleophiles", XLVI Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, XXXIV Reunião de Farmacologia Clínicae XV Reunião de Toxicologia (S12C80), Porto, Portugal, 4-6 Fevereiro, **2016**;

Apresentações em Poster

1. **Martins IL**, Marques MM, Antunes AMM, "Protein adducts from carbamazepine-10,11epoxide,the major metabolite of the antiepileptic drug carbamazepine: possible biomarkersoftoxicity", 51st Congress of the European Societies of Toxicology – EUROTOX, Poster P47, **2015**, Porto Portugal.

2. **Martins IL**, MArtques MM, Antunes AMM, "Carbamazepine metabolism to reactive aldehyde intermediate: A plausible pathaway of toxicity" *XXIIII nternational Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC- XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC ISMC)*, poster Y031, **2014**, Lisboa, Portugal;

3. Martins IL, Marques MM, Antunes AMM, "Protein Adducts from the antiepileptic drug carbamazepine: possible biomarkers of toxicity" *3º Encontro Nacional de Química Terapêutica*, poster P061, **2012**, Aveiro (Portugal);

4. Martins IL, Marques MM, Antunes AMM "The antiepileptic drug carbamazepine: blood protein dducts as possible biomarkers of toxicity" *XXII International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC)*, poster P077, **2012**, Berlin,Germany;