

Sara d'Avó Neto

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Saúl Campos Pereira Costa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sara d'Avó Neto

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Saúl Campos Pereira Costa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Sara d'Avó Neto, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010677, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de Julho de 2015.

(Sara d'Avó Neto)

O Tutor

(Professor Doutor Saúl Campos Pereira da Costa)

A Aluna

(Sara d'Avó Neto)

Agradecimentos

Quero agradecer aos meus Pais, porque sem eles esta etapa da minha vida jamais teria sido possível. Obrigada por fazerem este sonho acontecer, por nunca terem duvidado das minhas capacidades, por todas as semanas sem me verem e por serem os melhores de sempre. À minha irmã, por ter sido sempre compreensiva e por toda a força que me deu quando mais precisava. À minha tia, pelo carinho e dedicação que sempre teve para comigo. Ao Simão, que mesmo sem ainda saber me transmitiu uma energia e alegria enormes.

Não podia deixar de dar um especial agradecimento à Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra, por estes anos maravilhosos e por me ter dado o melhor que Coimbra me poderia dar, os meus grandes amigos. A eles, que sabem bem quem são, o meu grande obrigada por todos os momentos partilhados e toda a atenção e carinho que sempre me deram. Ao Pedro, por todo o amor e compreensão que me deu nesta etapa.

Quero ainda agradecer ao Professor Doutor Saúl Campos Pereira da Costa pela orientação desta monografia e por toda a paciência que teve para comigo, principalmente na escolha do tema. À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela grande instituição que é e por me ter dado a oportunidade de ter aulas e aprender com excelentes professores e profissionais.

A todos, obrigada por terem feito de mim o que sou hoje. Sem vocês jamais conseguiria alcançar o que tenho hoje.

Índice

Siglas e acrónimos	2
Resumo	3
Abstract	3
1 – Introdução	4
2 – Reações adversas idiossincráticas a Fármacos	4
2.1 Mecanismos de formação de Reações Adversas Idiossincráticas a Fármacos	5
2.1.1 Formação de haptenos	6
2.1.2 “Teoria do Perigo” (<i>The danger theory</i>)	6
2.1.3 Interação farmacológica.....	7
2.1.4 Teoria dos alelos raros	7
2.1.5 Modelo inflamagénico (<i>The inflammagen model</i>).....	7
2.2 Tipos de Reações Adversas Idiossincráticas a Fármacos	7
3 – Formação de metabolitos reativos	8
3.1 Metabolismo de fármacos	8
3.2 Reações Idiossincráticas a Fármacos como uma consequência da formação de Metabolitos Reativos	9
3.3 Alertas estruturais – Relação entre estrutura e Toxicidade	10
3.4 Formação de metabolitos reativos. Exemplos ilustrativos.	10
3.4.1 Aminas aromáticas/Anilinas	11
3.4.2 Anilidas (<i>derivados de anilinas</i>) e <i>para</i> -aminofenóis	12
3.4.3 Nitrobenzenos	13
3.4.4 Hidrazinas	14
3.4.5 Compostos heteroaromáticos de cinco membros	14
Furanos	15
Tiofeno	15
Tiazol e 2-Aminotiazol	16
Derivados 3-alquil Pirrol	17
Derivados 3-alquil Indol	17
1,3-Benzodioxol (Metilendioxifenil)	17
3.4.6 Alcenos terminais e Alcinos.	18
3.4.7 Ácidos carboxílicos	19
3.5 O problema da formação de Metabolitos Reativos no desenvolvimento de novos fármacos	20
3.5.1 Estratégias para evitar a formação de Metabolitos Reativos	20

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

4 – Conclusões	21
Bibliografia	23
Anexos	26
Anexo 1	26
Anexo 2	27
Anexo 3	29
Anexo 4	31
Anexo 5	32
Anexo 6	33
Anexo 7	34
Anexo 8	35
Anexo 9	37
Anexo 10	39
Anexo 11	39
Anexo 12	40
Anexo 13	41
Anexo 14	42

Siglas e acrónimos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico;

AE – Alertas Estruturais;

AINE – Anti-Inflamatório Não Esteróide;

CYP – Enzimas do citocromo P450;

GF – Grupo Funcional;

GSH – Glutatião;

I&D – Investigação e Desenvolvimento de novos fármacos;

IF – Indústria Farmacêutica;

MAO - Monoamina Oxidases;

MFH – Microssomas de Fígado Humano;

MR – Metabolitos Reativos;

OMS – Organização Mundial de Saúde;

RAIM – Reação Adversa Idiossincrática a Medicamentos;

RAM – Reação Adversa a Medicamentos;

Resumo

As reações adversas a fármacos (RAF) são um dos problemas que levam à rejeição de cerca de um terço das moléculas candidatas a fármacos. As reações idiossincráticas a fármacos, RAF do tipo B, são imprevisíveis e maioritariamente independentes da dose de fármaco administrada, sendo causas significantes de morbidade e mortalidade de pacientes. Os seus mecanismos patológicos ainda não estão bem definidos, mas pensa-se que estão associados à formação de metabolitos reativos (MR) por processos de bioativação dos fármacos. Estes MRs têm potencial para reagir com proteínas ou outras moléculas biológicas, como ADN e enzimas, e formar aductos metabolito-proteína que podem ser detetados pelo sistema imunitário e desencadear uma resposta imunológica. Esta é a teoria mais aceite para a formação de reações idiossincráticas, mas não é a única em estudo. Alertas estruturais (AE) são os grupos funcionais que sofrem bioativação e levam à formação dos MRs. Vários exemplos de fármacos que contêm estes alertas já estão estudados e os seus mecanismos descritos. Com base nestes conhecimentos, são feitos estudos rotineiramente nas moléculas candidatas a fármacos para avaliar o risco de ocorrência de reações idiossincráticas pela formação de MRs, evitando-se a inserção de AEs nas moléculas em desenvolvimento.

Abstract

Adverse drug reactions (ADR) are one of the problems that leads to rejection of about one third of candidate drug molecules. The idiosyncratic drug reactions (IDR), type B ADRs, are unpredictable and mostly dose-independent, being a significant cause of morbidity and mortality among patients. Their pathological mechanisms are not well defined, but it is thought to be associated with the formation of reactive metabolites (RM) by processes of drug bioactivation. These RMs have the potential to react with proteins and other biological molecules, such as enzymes and DNA, and form adducts metabolite-protein that can be detected by the immune system and trigger an immune response. This is the most accepted theory for the formation of idiosyncratic reactions, but is not the only one in study. Structural alerts (SA) are functional groups that suffers bioactivation and lead to the formation of the RMs. Several examples of drugs containing these alerts are already studied and their mechanisms described. Based on this knowledge, studies are done routinely in the candidates to drug for assessing the risk of idiosyncratic reactions by forming MRs, avoiding the inclusion of structural alerts in molecules.

I – Introdução

A Investigação e o Desenvolvimento de novos fármacos (I&D) têm custos cada vez mais elevados, estimando-se que a Indústria Farmacêutica (IF) gaste mais de 75 biliões de euros em I&D. (Ifpma, 2011)

O número de compostos considerados no desenvolvimento de um novo fármaco encontra-se entre 10 000 e 25 000. Este número vai diminuindo progressivamente ao longo dos estudos efetuados uma vez que, antes dos ensaios clínicos com seres humanos, um composto candidato a fármaco deve satisfazer critérios específicos e exigentes como (1) ligar-se seletivamente ao recetor no alvo pretendido e provocar a resposta farmacológica desejada, (2) ter biodisponibilidade e distribuição suficientes e adequadas e (3) passar por uma avaliação de toxicidade em animais, para garantir que os seres humanos que participam nos ensaios clínicos estão expostos apenas a riscos mínimos. Estes critérios, juntamente com a toxicidade detetada nos ensaios clínicos, diminuem drasticamente as moléculas consideradas para o desenvolvimento do fármaco. (Hefti, 2008)

A avaliação da toxicidade e segurança de um medicamento é efetuada durante todo o processo de I&D, mas existem reações adversas que só são descobertas aquando da sua larga utilização, como é o caso das reações adversas idiossincráticas a fármacos (RAIFs), que não são previsíveis na fase pré-clínica da I&D e podem levar a que a IF perca muito dinheiro e anos de pesquisa. (Guengerich, 2011)

Para evitar o desperdício de tempo e dinheiro, os investigadores foram desenvolvendo ferramentas preditivas para identificar problemas de segurança no início do processo de I&D que podem levar ao desenho e seleção de melhores candidatos a fármacos. A formação de metabolitos reativos (MRs) é um dos fatores indesejáveis no desenvolvimento de um novo fármaco devido à sua associação com a ocorrência de RAIFs, pelo que os investigadores evitam a utilização de grupos funcionais (GFs) que levam à sua formação, na estrutura da molécula.

2 – Reações adversas idiossincráticas a Fármacos

Uma reação adversa a fármacos (RAF), segundo a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), é qualquer resposta prejudicial ou indesejável e não intencional que ocorre com

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

medicamentos em doses normalmente utilizadas no homem para profilaxia, diagnóstico, tratamento de doença ou para modificação de funções fisiológicas. (Silva, Soares e Martins, [s.d.]

Existem vários tipos de RAFs e estas podem ser classificadas de acordo com conceitos químicos, farmacológicos e clínicos. Assim, as RAFs podem dividir-se em dois tipos: o tipo A, correspondente a reações previsíveis e dose dependentes; e o tipo B, que são as reações adversas idiossincráticas a fármacos, normalmente sem relação com a dose administrada, exceto em indivíduos suscetíveis, e não são previstas durante o desenvolvimento do fármaco. (Aronson e Ferner, 2003)

As RAIFs, não tendo uma definição clara, são consideradas as reações que ocorrem num pequeno grupo de pacientes tratados com um determinado fármaco e que não envolvem o efeito terapêutico deste, sendo muitas vezes fatais. (Utrecht e Naisbitt, 2013) (Kalgutkar, Amit S., 2011) A previsão da ocorrência de uma RAIF na fase pré-clínica do desenvolvimento de fármacos não é possível uma vez que não existem modelos animais adequados e o conhecimento que existe sobre os mecanismos toxicológicos envolvidos não é suficiente para a realização de testes. (Park, B K *et al.*, 2000)

A tendência para um fármaco causar uma RAIF depende não só das suas características químicas, mas também da suscetibilidade de determinados fatores do paciente, em particular os fatores imunológicos. As reações idiossincráticas podem lesar qualquer órgão, sendo a pele, o fígado e as células sanguíneas os mais afetados. A disparidade entre o começo da toma do medicamento e o início dos sintomas da reação sugere que os mecanismos prováveis destas reações sejam do tipo imunológico, existindo, no entanto, exceções. As RAIFs estão também frequentemente ligadas à reatividade química da molécula, mais concretamente à formação de MRs. Desde que Landsteiner e Jacobs, em 1935, descobriram que há uma associação direta entre a tendência de químicos se ligarem covalentemente a proteínas e a sensibilização imunológica, que se presume que a formação de metabolitos reativos seja o primeiro passo para o desenvolvimento de uma RAIF. (Utrecht e Naisbitt, 2013)

2.1 Mecanismos de formação de Reações Adversas Idiossincráticas a Fármacos

A baixa incidência de reações idiossincráticas e o facto de os seus mecanismos não envolverem o efeito terapêutico do fármaco levam a pensar que o medicamento por si só não é capaz de despoletar uma reação deste tipo, tendo que muitas vezes ser ativado

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

metabolicamente para formar um MR que interaja com macromoléculas para desencadear uma resposta. (Park, B K *et al.*, 2000)

Existem cinco hipóteses a ser estudadas para os mecanismos de formação das RAIFs: a hipótese da formação de haptenos; a teoria do “perigo”; a hipótese da interação farmacológica; a teoria dos alelos raros; e o modelo “inflamagénico” (*inflammagen model*). Estas teorias não ocorrem isoladamente, podendo a reatividade do fármaco ser devido a mais do que uma. (Guengerich, 2011)

2.1.1 Formação de haptenos

Um hapteno é uma substância não proteica e de baixo peso molecular que não consegue induzir uma resposta imunológica por si só, pelo que os fármacos e resultantes metabolitos são exemplos. O passo crucial desta teoria é a formação de aductos, isto é, conjugados proteína-hapteno. Esta conjugação ocorre entre um MR de peso molecular inferior a 1000 Da e uma proteína endógena de peso molecular superior a 50 000 Da e a ligação entre eles é do tipo covalente. A formação dos aductos pode ocorrer por duas vias: reação química direta entre os compostos e geração de metabolitos eletrofilicos que reagem com os grupos nucleofílicos das proteínas. (Park, B K *et al.*, 2000) Existe um pequeno número de fármacos quimicamente reativos, como a penicilina, que reagem diretamente com as proteínas em condições fisiológicas. (Naisbitt *et al.*, 2001) No entanto, a grande maioria de fármacos associados a RAIFs são quimicamente inertes, necessitando de bioativação para se tornarem espécies reativas. (Park, B K *et al.*, 2000)

O contacto do aducto formado com o sistema imunológico é feito pelas células imunológicas, que pode resultar na ativação tanto dos linfócitos B como dos linfócitos T, e desencadear assim numa resposta imunológica. (Park, B K *et al.*, 2000)

2.1.2 “Teoria do Perigo” (*The danger theory*)

A “teoria do perigo” foi desenvolvida por Matzinger em 1994. Esta teoria é baseada no princípio de que os sinais que controlam a resposta imune são endógenos e que os sinais de alarme são formados pelo tecido lesado ou sob stress. (Pirmohamed *et al.*, 2002)

A célula danificada envia os sinais de perigo para as células apresentadoras de antigénios que capturam os antigénios e regulam as moléculas que vão estimular a ativação dos linfócitos

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

T. Contudo, a natureza destes sinais ainda não está bem definida. (Pirmohamed *et al.*, 2002) (Park, B K *et al.*, 2000)

O aspeto essencial desta teoria é que a simples apresentação do antigénio por uma célula alvo sem sinal de alarme deve resultar em tolerância enquanto que na presença de sinais de perigo resulta em resposta imunológica. (Park, B K *et al.*, 2000)

2.1.3 Interação farmacológica

Esta hipótese baseia-se na interação reversível entre o fármaco e o recetor de histocompatibilidade maior do linfócito T, e induz uma resposta imune contra o fármaco, sem que sejam formados MRs. (Utrecht, 2006) (Guengerich, 2011)

2.1.4 Teoria dos alelos raros

Certos indivíduos podem possuir alelos raros que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo dos fármacos. As reações de sensibilidade são formadas devido à deficiente metabolização de um fármaco, a qual resulta de uma alteração ou deficiência da enzima que o biotransforma, podendo, dessa forma, conduzir a uma insuficiente ou inexistente detoxificação e causar uma reação de sensibilidade. (Guengerich, 2011)

2.1.5 Modelo inflamagénico (*The inflammagen model*)

Este modelo defende que os processos inflamatórios, ou outros episódios predisponentes, são significativos apenas em indivíduos que são suscetíveis a reações de sensibilidade. (Guengerich, 2011)

2.2 Tipos de Reações Adversas Idiossincráticas a Fármacos

As RAIFs podem apresentar características comuns entre si, assim como os diferentes fármacos podem originar padrões semelhantes de reações idiossincráticas. Contudo, existem sempre diferenças que vão variar consoante a molécula em causa. Alguns medicamentos causam reações em apenas um órgão, mas outros afetam vários órgãos e, em alguns casos, simultaneamente. (Utrecht e Naisbitt, 2013)

Existem vários tipos de RAIFs, nomeadamente: erupções cutâneas; lesões hepáticas; reações adversas hematológicas; e a autoimunidade. As erupções cutâneas são as mais comuns,

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

as mais visíveis e a sua presença é mais detetada porque a pele é um órgão muito ativo imunologicamente, sendo, por conseguinte, um bom alvo para a ocorrência de reações adversas. As reações epidérmicas adversas mais significativas são a erupção maculopapular, a urticária, a erupção causada somente por fármacos, a síndrome de hipersensibilidade causada por fármacos, a síndrome de Stevens-Johnson e a necrólise epidérmica tóxica. As lesões hepáticas podem dividir-se em dois tipos, as lesões hepatocelulares, nas quais há morte dos hepatócitos, e as lesões hepáticas colestatas, que envolvem o aumento da fosfatase alcalina e da bilirrubina relativamente à alanina transaminase. Por sua vez, as reações do tipo hematológico podem ocorrer devido à destruição das células sanguíneas ou por perturbações na sua produção, e incluem patologias como agranulocitose, trombocitopenia, anemia e anemia aplásica. Por fim, a autoimunidade induzida por fármacos divide-se em síndrome autoimune similar ao lúpus, autoimunidade específica de um órgão e lúpus cutâneo induzido por fármacos. (Utrecht e Naisbitt, 2013)

3 – Formação de metabolitos reativos

3.1 Metabolismo de fármacos

Muitos xenobióticos, incluindo os fármacos, apresentam características lipofílicas que promovem a sua passagem através das membranas biológicas mas dificultam a sua excreção do organismo. Deste modo, é essencial a existência de um processo que aumente a sua hidrofília para a facilitar a sua eliminação do corpo humano. O metabolismo dos fármacos envolve a conversão enzimática de uma entidade química em outra e é dividido em duas etapas: as reações de fase I ou funcionalização e as reações de fase II ou conjugação, que geralmente acontecem sequencialmente. Muitas das reações de fase I e fase II podem ocorrer no mesmo composto e há a possibilidade de interação de várias vias metabólicas competirem pelo mesmo substrato. Ambas as fases ocorrem maioritariamente no fígado, local onde se encontram os maiores sistemas enzimáticos, embora possam ocorrer noutros locais com atividade metabólica relevante, nomeadamente nos rins, pulmões e pele. (Brunton, 2003)(Kalgutkar, Amit S. e Didiuk, 2009)

As reações de fase I introduzem ou expõem um grupo funcional (OH, SH, NH₂, COOH) por reações oxidativas, redutoras ou hidrolíticas, levando geralmente à perda de atividade farmacológica e aumentando ligeiramente a solubilidade da molécula em água. É necessário referenciar que em alguns casos as reações de fase I podem levar à manutenção ou

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

até a um aumento de atividade e que noutros casos, como nos pró-fármacos, levam à alteração da sua atividade farmacológica. (Brunton, 2003)(Kalgutkar, Amit S. e Didiuk, 2009)

As reações de fase II conjugam os grupos OH, SH, NH₂ ou COOH do fármaco com ácido glucorónico, sulfatos, glutatião (GSH), aminoácidos ou acetatos endógenos, formando conjugados altamente polares que, regra geral, são rapidamente excretados na urina ou nas fezes. (Kalgutkar, Amit S. e Didiuk, 2009)(Brunton, 2003) Dependendo das características estruturais presentes em determinados compostos, estes mesmos eventos metabólicos podem originar, em determinadas condições, metabolitos reativos e eletrofílicos, denominando-se então o processo de bioativação.

No fígado, as reações de bioativação oxidativas são catalisadas maioritariamente pelas enzimas do citocromo P450 (CYP), contudo, em certos casos podem estar envolvidas outras enzimas como as monoamina oxidases (MAO), as peroxidases, a aldeído oxidase e a álcool desidrogenase. Os MRs formados podem então reagir com proteínas celulares, lípidos e ácidos nucleicos, levando à disfunção das proteínas, peroxidação dos lípidos, danos no ácido desoxirribonucleico (ADN) e stress oxidativo. Estes metabolitos podem ainda induzir a rutura de gradientes iónicos e reservas intracelulares de cálcio, resultando em disfunções nas mitocôndrias e na produção de energia, que por sua vez podem levar á morte celular. (Park, B. K. *et al.*, 2011)

3.2 Reações Idiossincráticas a Fármacos como uma consequência da formação de Metabolitos Reativos

A formação de MRs é considerada indesejada em candidatos a fármacos, uma vez que há evidências que associam a formação destes metabolitos com a inativação de isoformas do CYP, o que pode resultar em interações clínicas fármaco-fármaco e/ou modificação de cadeias do ADN que, por sua vez, podem resultar em mutagenese. É ainda aceite que os MRs são também responsáveis pela etiologia de algumas RAIFs, processo este que ainda não é bem compreendido. (Kalgutkar, Amit S. e Dalvie, 2015) Os maiores problemas detetados na relação dos MRs com as RAIFs são que nem todos os compostos formados possuem o mesmo risco de originar uma reação deste tipo, e o facto de que o mecanismo de formação destas reações ainda não estar completamente elucidado. Deste modo, não é possível saber que propriedades dos MRs estão relacionadas com a sua aptidão para formar este tipo de RAFs. (Utrecht, 2006)

Como já foi referido, a hipótese mais aceite que liga a formação de MRs com as RAIFs é a do processo de haptenação, na qual os MRs de baixo peso molecular (<1 kDa) são convertidos em imunogénicos pela sua ligação a proteínas de alto peso molecular, resultando numa resposta imunológica por apresentação do aducto resultante a células do sistema imunológico.

3.3 Alertas estruturais – Relação entre estrutura e Toxicidade

A toxicidade de fármacos está intimamente ligada com os GFs presentes nas suas moléculas, que podem reagir/interagir diretamente com proteínas e/ou ADN ou levar à formação de MRs que, por sua vez, podem desencadear uma reação imune. São os grupos funcionais que levam à formação de MRs que são denominados de alertas estruturais (AE). Estes grupos presentes nas moléculas podem ser identificados pelo uso do *software* DEREK, sendo este um sistema baseado em conhecimento adquirido por estudos já efetuados noutras moléculas. (Stepan *et al.*, 2011)(Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

É importante referir que nem todos os compostos que contêm AE são metabolizados em MRs. A probabilidade da formação destes compostos reativos depende do posicionamento do alerta estrutural no centro ativo da enzima. O metabolismo pode ocorrer noutra local do composto que não seja um alerta estrutural e levar à formação de metabolitos não reativos. Por exemplo, os fármacos sudoxicam e meloxicam contêm ambos o AE 2-aminotiazol, mas apenas o sudoxicam forma o MR acil-tiourea responsável pela sua toxicidade. (Figura I, Anexo I) (Kalgutkar, Amit S. e Dalvie, 2015) (Kalgutkar, Amit S. e Didiuk, 2009) Outro fator que pode influenciar a formação de metabolitos reativos em moléculas que contêm AEs é a existência de vias metabólicas que eliminem eficazmente os compostos formados e/ou os seus precursores. (Kalgutkar, Amit S. e Dalvie, 2015)

3.4 Formação de metabolitos reativos. Exemplos ilustrativos.

A formação de MRs ocorre maioritariamente por reações de oxidação, mas reações de redução e conjugação também podem levar à formação de espécies reativas. Os AEs mais conhecidos são as aminas aromáticas ou anilinas, os aminofenóis, os nitrobenzenos, as hidrazinas, os compostos heteroaromáticos de cinco membros (furanos, tiofeno, tiazol, derivados do pirrol), os ácidos carboxílicos, os alcinos e alcenos terminais, sendo os seus mecanismos descritos na secção seguinte, onde serão também demonstrados fármacos que,

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

ao conterem o AE originam RAI Fs. (Kalgutkar, Amit S. et al., 2012) A estrutura destes grupos funcionais pode ser verificada nas figuras 2 a 15, no anexo 2.

3.4.1 Aminas aromáticas/Anilinas

As aminas aromáticas/anilinas (Figura 1, anexo 2) estão presentes em vários fármacos associados a RAI Fs e encontram-se também relacionadas com propriedades carcinogénicas, mutagénicas e citotóxicas. (Kalgutkar, Amit S et al., 2005)

A bioativação destes grupos funcionais tem como passo obrigatório uma *N*-hidroxilação no azoto da amina primária, catalisada pelo CYP2D6, levando à formação de derivados *N*-hidroxilamina. Estes derivados podem passar por duas vias: serem oxidados a metabolitos de nitrobenzeno estáveis, que são eletrofilicos e podem reagir com proteínas e/ou GSH ou podem sofrer conjugações de fase II formando-se conjugados *N*-*O*-sulfato e/ou *N*-*O*-acetil. (Kalgutkar, A S, 2015) A excelente tendência dos grupos sulfato e acetato de abandonar os derivados previamente obtidos leva à formação do ião nitrénio que, por sua vez, pode estar envolvido na formação de aductos com o ADN ou proteínas (Figura 16, Anexo 3). (Kalgutkar, Amit S. et al., 2012) (Kalgutkar, Amit S et al., 2005)

São exemplos de fármacos que contém este AE a procainamida, um agente antiarrítmico do tipo IA, o sulfametoxazol quando em associação com o trimetoprim, usado para o tratamento da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* em doentes infetados concomitantemente com o vírus HIV, e a dapsona, que é usada no tratamento da lepra. (Kalgutkar, Amit S et al., 2005) (Figura 17, Anexo 3)

As RAI Fs associadas à procainamida e ao sulfametoxazol são desordens hematológicas, reações cutâneas e hepatotoxicidade e estão associadas à bioativação oxidativa do grupo anilina destes fármacos, resultando nos metabolitos intermediários hidroxilamina e nitroso. Estes últimos ligam-se covalentemente a proteínas microssomais, neutrófilos e/ou GSH formando derivados sulfinamida. O sulfametaxol pode também ser oxidado nos queratinócitos. No entanto, a principal via de metabolização ocorre por acetilação do seu grupo amina primário, reação catalisada pela enzima *N*-acetiltransferase polimórfica. (Figura 18, anexo 3) (Stepan et al., 2011)

Inicialmente pensava-se que as reações de hipersensibilidade da associação sulfametoxazol e trimetoprim eram devidas ao primeiro fármaco, mas estudos recentes

demonstram que o trimetoprim apresenta suscetibilidade para formar metabolitos reativos. (Stepan *et al.*, 2011)

A carbamazepina é um anticonvulsivo que pode provocar erupções cutâneas, anemia aplástica, hepatite e reações de hipersensibilidade. Este fármaco é extensamente metabolizado, tendo sido já detetados cerca de 30 metabolitos na urina de pacientes tratados com este agente anticonvulsivo. Uma das vias de biotransformação é a *N*-glucuronidação do grupo carbamoilo, e também a formação do metabolito ativo carbamazepina-10,11-epóxido e hidroxilação para formar 2- e 3- hidroxycarbamazepina que, por sua vez, resultam nos metabolitos quinona-imina e *o*-quinona, respetivamente. (Figura 19, anexo 3) (Stepan *et al.*, 2011)

3.4.2 Anilidas (derivados de anilinas) e para-aminofenóis

Compostos contendo *p*-aminofenóis (Figura 4, anexo 2) sofrem, geralmente, uma oxidação formando um intermediário quinona-imina que vai reagir com proteínas microssomais ou conjugar-se com a *N*-acetilcisteína formando-se proteínas alteradas ou aductos sulfidriolo. (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005)

Um dos exemplos de fármacos que contêm este GF é a amodiaquina (Figura 20, anexo 4), um agente antimalárico eficaz contra isolados do *P. falciparum*, que está relacionado com casos de agranulocitose e hepatotoxicidade. (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005) Sendo um composto que contem um grupo *p*-aminofenol na sua constituição, a amodiaquina sofre uma auto-oxidação ou uma oxidação de 2 eletrões catalisada pela peroxidase formando-se o intermediário quinona-imina. (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

Compostos que contêm anilidas (Figura 3, anexo 2), derivados das anilinas, sofrem reações de hidroxilação aromática originando o metabolito *p*-aminofenol. Estes metabolitos sofrem também reações de oxidação originando intermediários reativos, as quinona-iminas. O diclofenac, um anti-inflamatório não esteroide, representa um derivado de anilina que sofre uma biotransformação do género acima descrito. (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005) Também a atorvastatina contém um grupo derivado da anilina na sua constituição, originando metabolitos reativos do tipo *p*-aminofenol. (Figura 20, anexo 4) (Kalgutkar, Amit S. e Didiuk, 2009)

A clozapina, fármaco usado no tratamento de psicoses e depressão, é outro exemplo que contém derivados de anilina. Contudo, existem diferenças entre a sua bioativação e a do diclofenac. A clozapina sofre uma oxidação por 2 eletrões, formando um intermediário iminio

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

que pode tautomerizar originando um ião nitrénio. Este metabolito reativo está relacionado com a ocorrência de hepatotoxicidade e agranulocitose. (Figura 21, anexo 4) (Kalgutkar, Amit S. et al., 2012)

A Flutamida é um fármaco antiandrogénico não esteroide que está relacionado com casos de hepatotoxicidade e eosinofilia. Este composto sofre extensa metabolização principalmente por hidroxilação do grupo isopropil resultando na 2-hidroxiflutamida. No entanto, também sofre hidrólise da amida formando-se a 4-nitro-3-trifluorometilanilina e um derivado hidroxilamina. (Figura 22, anexo 4) (Stepan et al., 2011)

3.4.3 Nitrobenzenos

A maioria dos compostos nitroaromáticos é metabolizada por uma reação de redução de seis eletrões formando uma anilina que, por sua vez, é catalisada por um conjunto de enzimas que incluem o CYP, uma xantina oxidase, aldeído oxidase e quinona redutase. A bioativação dos nitrobenzenos (Figura 5, anexo 2) pode ainda acontecer pelo metabolismo do grupo nitro formando-se o metabolito reativo nitroso. (Kalgutkar, Amit S. et al., 2012) O primeiro intermediário desta reação de redução do grupo nitro é o anião nitro radical que, após a sua formação, sofre reoxidação pelo oxigénio molecular formando-se outro composto nitro e um anião superóxido. Ocorre então redução do último composto nitro formado originando-se *N*-hidroxilamina, sendo este o último passo da sua bioativação (Figura 23, anexo 5). (Kalgutkar, Amit S et al., 2005)

A toxicidade destes compostos está associada à formação de aductos covalentes por metabolitos como a *N*-hidroxilamina e *O*-derivados esterificados que resultam da sulfatação enzimática do primeiro. São ainda formadas várias espécies reativas ao longo da bioativação dos nitrobenzenos que também estão associadas a estragos no ADN. (Kalgutkar, Amit S et al., 2005)

Vários são os exemplos de fármacos que contêm este grupo funcional e estão associados a RAIFs. Entre eles temos o agente antibacteriano nitrofurantoina, que está associado a fibrose pulmonar e outros tipos de RAIFs, o cloranfenicol, também um antibiótico associado a anemia aplástica, e o tolcapone, um anti-Parkinsoniano ligado à ocorrência de hepatotoxicidade. (Figura 24, anexo 5) (Kalgutkar, Amit S et al., 2005)

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

O tolcapone, para além da glucuronidação do grupo catecol, pode sofrer redução do grupo nitrocatecol formando-se derivados anilina e N-acetilnilina que podem ser oxidados à espécie quinona-imina. (Stepan *et al.*, 2011)

O cloranfenicol sofre uma redução no nitrobenzeno resultando no metabolito nitroso, que pode estar associado às suas reações adversas na medula óssea pela ligação covalente a células hematopoiéticas. (Figura 25, anexo 5) (Stepan *et al.*, 2011)

3.4.4 Hidrazinas

O grupo hidrazina (Figura 6, anexo 2) tem sido utilizado frequentemente como intermediário na síntese de vários fármacos. Os compostos que contêm este alerta estrutural são potentes inibidores do CYP, das peroxidases e das monoamina oxidases e a sua bioativação ocorre pela formação de intermediários diazo ou diazónio e também radicais, como se pode verificar no caso da fenilhidrazina (Figura 26, anexo 6). (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

As hidrazinas estão presentes em fármacos como a hidralazina, um anti-hipertensor associado ao aparecimento de síndrome clínica e biologicamente semelhante ao lúpus eritematoso sistémico, a isoniazida, antituberculoso que pode originar hepatite, a procarbazina, um citotóxico, e aminopirina, um analgésico. (Figura 27, anexo 6) (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005) Este último fármaco foi um dos primeiros a ser relacionado com agranulocitose. A sua bioativação ocorre por oxidação através de um ácido hipocloroso derivado de neutrófilos, que é um subproduto gerado da mieloperoxidase, resultando num dicatión reativo que se pensa ser responsável pela RAIF. (Figura 28, anexo 6) (Stepan *et al.*, 2011)

3.4.5 Compostos heteroaromáticos de cinco membros

Os compostos heteroaromáticos de cinco membros encontram-se distribuídos na natureza, desempenhando muitas vezes papéis importantes nos processos biológicos. Na indústria farmacêutica são usados como bio-isosteros de ácidos carboxílicos ou anéis fenilo, aumentando a atividade farmacêutica dos compostos resultantes da substituição. (Dalvie *et al.*, 2002)

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Furanos

A maioria dos compostos que contêm o anel furano (Figura 7, anexo 2) são nefro e hepatotóxicos e são considerados potenciais carcinogênicos para o ser humano. (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005)

O CYP é o complexo de enzimas maioritariamente responsável pelo metabolismo oxidativo dos furanos. A principal via de bioativação dos furanos envolve a cisão do seu anel para formar metabolitos α,β -dicarbonilo insaturados. Estes metabolitos reagem com moléculas biológicas pela reação de Michael, que é uma adição conjugada nucleofílica ou adição 1,4-nucleofílica, ou via adição 1,2-nucleofílica ao aldeído. (Figura 29, anexo 7) (Dalvie *et al.*, 2002)

Pensa-se que o mecanismo de abertura do anel furano ocorre pela formação de um intermediário epóxido, originando depois os metabolitos α,β -dicarbonilo insaturado ou o γ -cetoácido. Este intermediário sofre uma reorganização dando origem a um hidroxifurano, que existe predominantemente na forma do tautómero lactona. A hidrólise deste último composto leva à formação do γ -cetoácido carboxílico. A abertura do intermediário epóxido pode ainda originar a formação de um γ -cetoenal. (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

Exemplos de fármacos que contêm este grupo funcional são a furosemida, um diurético da ança, o mentofurano, constituinte do óleo essencial da *Mentha x piperita L.* e o metoxaleno, um psoraleno usado em conjunto com a radiação UVA para tratar vitiligo idiopático e psoríase severa. (Figura 30, anexo 7).

Tiofeno

O núcleo tiofeno (Figura 8, anexo 2) pode ser encontrado em vários fármacos em investigação ou até mesmo no mercado. A presença deste AE e consequente formação de MRs já foi a causa de remoção de alguns fármacos do mercado, nomeadamente do ácido tienilico (diurético) e dos anti-inflamatórios não esteroides tenoxicam e suprofen. (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005) No entanto, o tiofeno também já provou ser um bom substituto isostérico para os anéis fenilo no que toca a uma melhor potência e seletividade. (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

O metabolismo dos tiofenos, à semelhança do que acontece com os furanos, é principalmente mediado pelo CYP2C9. A formação de hidroxitiofenos ocorre pela formação

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

do intermediário epóxido do tiofeno inicial. O anel deste GF sofre ainda uma S-oxidação pelo CYP para formar um óxido do tiofeno, que por sua vez pode formar aductos com os resíduos sulfidrilo nas proteínas através de uma adição 1,4 de Michael. (Figura 31, anexo 8). (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

O clopidogrel é um antiagregante plaquetar que contém o tiofeno como parte da sua estrutura. Este AE sofre uma metabolização pelo CYP originando um metabolito reativo, o ácido sulfénico eletrofílico. Este composto forma uma ligação covalente dissulfeto com o resíduo de cisteína do recetor purinérgico P2Y₂ nas plaquetas inibindo a sua agregação. Este é um exemplo de que a bioativação é necessária para o fármaco exercer a sua atividade farmacológica, pelo que a presença do AE é fundamental no clopidogrel. (Kalgutkar, Amit S. e Dalvie, 2015)

A bioativação do ácido tienílico, um diurético, é catalisada pelo CYP2C9 e ocorre por uma hidroxilação do carbono 5 do anel tiofeno. Um dos MRs formados é o S-óxido eletrofílico que pode reagir com água e formar um ácido 5-hidroxitienílico estável ou com nucleófilos biológicos. Outra via de bioativação do ácido tienílico é através da formação de um epóxido eletrofílico do anel tiofeno que sofre cisão e forma um intermediário aldeído. Semelhante a este mecanismo é o da bioativação da ticlodipina, um antiagregante plaquetar que causa discrasias sanguíneas e anemia aplástica. (Figura 33, anexo 8) (Stepan *et al.*, 2011)

Tiazol e 2-Aminotiazol

Os grupos tiazol (Figura 9, anexo 2) e 2-aminotiazol sofrem uma cisão oxidativa do seu anel pela epoxidação da dupla ligação da posição 4,5, catalisada pelo CYP. Seguidamente ocorre a hidrólise do epóxido formado, levando então à formação do intermediário que vai sofrer um rearranjo, originando os metabolitos reativos α -dicarbonilo e tioamidas/tiourea (Figura 34, anexo 8). As propriedades tóxicas destes metabolitos levam a pensar que a toxicidade do grupo tiazol é atribuída aos metabolitos tioamidas pela clivagem dos heterocíclicos.

Os efeitos adversos das tioaminas são atribuídos à sua bioativação pelo CYP e pela flavina monooxigenase que resulta no ácido sulfínico, através da formação do intermediário ácido sulfénico. Este metabolito pode modificar proteínas pela sua decomposição em acilo ou radical iminio ou por acilação dos resíduos de lisina nas proteínas. (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Os compostos que contêm este grupo funcional são o tiabendazol, composto que funciona como fungicida e anti-helmíntico, o propiltiouracilo e o sudoxicam, um AINE que já foi retirado do mercado devido à sua hepatotoxicidade. Este último fármaco sofre a cisão do anel tiazol formando-se o metabolito acil-tiourea que tem a capacidade de oxidar a GSH e proteínas. (Stepan *et al.*, 2011)

O propiltiouracilo é usado no tratamento do hipertireoidismo e na doença de Graves. Este fármaco pode, no entanto, pode causar RAIAs como discrasias sanguíneas, hepatite e lupus. A sua bioativação envolve a oxidação da tiourea presente na sua molécula por neutrófilos e mieloperoxidase formando-se propiltiouracil-dissulfeto, propiltiouracil-2-sulfonato e propiltiouracil-2-sulfonato. (Figura 36, anexo 9) (Stepan *et al.*, 2011)

Derivados 3-alkil Pirrol

Os compostos que contêm um grupo alquilo substituído na posição C3 por um pirrol são suscetíveis a bioativação. Por exemplo, análogos do 1,3,4-trimetilpirrol são bioativados pelo CYP na presença de NADPH a um intermediário *methide iminium* pela desidratação de um álcool primário (Figura 37, Anexo 10). Este metabolito liga-se covalentemente a proteínas ou ao DNA. (Dalvie *et al.*, 2002)

Derivados 3-alkil Indol

O anel do Indol é sujeito a extensa bioativação oxidativa pelo CYP, por duas vias diferentes. Pode ocorrer uma oxidação por dois eletrões através da eliminação de um hidrogénio do grupo alquilo seguida de uma oxidação por um único eletrão formando-se então um intermediário *methide iminium*. Tal como acontece com o pirrol, este intermediário liga-se covalentemente a proteínas ou ao DNA. A outra via ocorre por epoxidação do alquil-indol formando-se o intermediário 2,3-epoxi-metilindol que também pode reagir covalentemente com biomoléculas (Figura 38, anexo 11). (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

1,3-Benzodioxol (Metilendioxifenil)

Este grupo funcional (Figura 12, anexo 2) é um substituinte comum encontrado em fármacos sintéticos, sendo considerado um bio-isóstero do di-alcoxifenil e providenciando um anel aromático rico em eletrões mais resistente à oxidação que os compostos de catecol. Como consequência da sua lipofilia, o 1,3-benzodioxol é comumente um substrato do CYP,

formando-se um catecol. Este metabolito é rapidamente oxidado a uma orto-quinona que pode sofrer reações de ciclização formando espécies reativas de oxigênio ou ligar-se irreversivelmente com proteínas e DNA. Antes da formação do catecol ocorre a síntese de um intermediário reativo, o carbeno, pela abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno ou por eliminação de água do intermediário hidroximetileno. Os compostos contendo 1,3-benzodioxol têm a capacidade de inativar enzimas do CYP através da formação de um complexo metabólico com a enzima. (Figura 39, anexo 12) (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

O estiripentol, receptor muscarínico M3 usado concomitantemente com outros fármacos no tratamento da epilepsia, e a paroxetina, um anti-depressivo, são exemplos de fármacos que têm este grupo funcional na sua constituição. (Figura 40, anexo 12)

3.4.6 Alcenos terminais e Alcinos.

Fármacos contendo alcenos terminais e alcinos são suscetíveis de bioativação pelo CYP e têm sido relacionados com casos de porfíria. A oxidação, catalisada pelo CYP, destes compostos leva à destruição do grupo prostético da heme com formação de um pigmento verde. (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

O metabolismo de alcenos (Figura 13, anexo 2) leva à partição do substrato entre a N-alquilação do grupo prostético da heme e a alquilação da apoproteína, mas também pode resultar na formação de metabolitos reativos que podem modificar covalentemente a proteína, resultando na sua inativação. (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

Compostos que contêm alcenos terminais são o 2-alil-isopropil-acetamida, um composto sedativo-hipnótico, o secobarbital, um fármaco sedativo, hipnótico e anestésico, e o alclofenac, um AINE. (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

Quanto aos alcinos (Figura 14, anexo 2), o mecanismo de bioativação envolve uma porção das moléculas de modo a formar espécies reativas que podem alquilar o grupo prostético do heme ou a apoproteína, à semelhança do que acontece com os alcenos. No entanto, existem dois processos descritos para os alcinos, dependendo da sua posição. No caso de alcinos terminais, ocorre a oxigenação do carbono terminal seguida de um deslocamento do hidrogênio terminal para o carbono vicinal dando origem a um intermediário reativo, o ceteno. Este intermediário pode acilar resíduos nucleofílicos do local ativo do CYP

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

resultando numa inativação da enzima ou sofrer hidrólise a um metabolito de ácido acético. (Figura 41, anexo 13) (Kalgutkar, Amit S. *et al.*, 2012)

O 17α -etinilestradiol, composto estrogénico usado nos contraceptivos orais, e o mifepristone ou RU-486, pílula usada na interrupção da gravidez no primeiro trimestre de gestação, são exemplos de fármacos com alcinos terminais. (Figura 42, anexo 13) O metabolismo do 17α -etinilestradiol ocorre pelo CYP3A4 e o processo resulta na inativação desta enzima. O mifepristone também inibe a CYP3A4 e alquila a apoproteína, mas não o grupo prostético da heme. Apesar de inativar a enzima, é de notar que não existem casos de reações idiossincráticas relacionadas com o 17α -etinilestradiol, provavelmente devido à ingestão de uma baixa dose deste fármaco. (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005)

No caso dos alcinos no interior da estrutura molecular, ocorre oxidação do carbono interno seguida de rearranjo do intermediário formado, originando um oxireno que leva à alquilação do heme ou da apoproteína. (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005)

O efavirenz é um fármaco inibidor da transcriptase reversa não-análogo dos nucleósidos que se administra como parte da terapêutica antirretroviral de elevada eficácia no tratamento da infeção pelo vírus VIH-1. Este fármaco, e a terbinafina, que é um antifúngico, são exemplos de compostos que contêm alcinos internos. (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005)

3.4.7 Ácidos carboxílicos

Os ácidos carboxílicos (Figura 15, anexo 2) são grupos funcionais presentes nos AINEs que sofrem glucuronidação, um processo metabólico de fase II. A sua conjugação com o ácido glucurónico, mediada pela UDP-glucuronil-transferase (UDPGT), forma um acil-glucuronido. Este metabolito pode formar diretamente aductos com proteínas por uma acilação trans. Pode também, pela perda do grupo acilo, formar hidroxialdeídos que se ligam a resíduos de lisina das proteínas ou ao grupo amina terminal das proteínas formando-se conjugados glicosilados e levar a toxicidade. (Figura 43, anexo 14) (Kalgutkar, Amit S *et al.*, 2005) (Stepan *et al.*, 2011)

Embora a formação de acil-glucuronidos seja associada à maioria das RAFs causadas pelos AINEs, a bioativação de outros grupos funcionais também pode causar outras reações adversas, como é o caso do diclofenac e do lumiracoxib.

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

O ácido valpróico, um antiepilético, possui também cadeias de ácidos carboxílicos e está relacionado com hepatotoxicidade. Este fármaco sofre uma reação mediada pelo CYP formando-se o Δ^4 -ácido valpróico que, por sua vez, é convertido pela Coenzima A (CoA) a um derivado que sofre sucessivas β -oxidações e forma o 3-oxo-4-pentenoilo-CoA, metabolito reativo e eletrofílico que inativa a enzima 3-cetoacil-CoA-tiolase. (Figura 45, anexo 14) (Stepan *et al.*, 2011)

3.5 O problema da formação de Metabolitos Reativos no desenvolvimento de novos fármacos

A incapacidade de prever e quantificar o risco de RAIFs por um fármaco específico e a relação da formação de MRs com este tipo de reações adversas, levou à implementação por parte das indústrias farmacêuticas de técnicas e procedimentos que detetem a capacidade de um candidato a fármaco formar MRs. Com estes métodos, os investigadores esperam conseguir eliminar os AEs que os originam ou minimizar a sua formação por modificação estrutural. (Kalgutkar, Amit S., 2011) (Kalgutkar, Amit S. e Didiuk, 2009)

A avaliação qualitativa *in vitro* de formação de MRs pelo CYP envolve estudos conduzidos pelo isolamento de microssomas de fígado humano (MFH) com suplemento de NADPH na presença de GSH, derivados de amina e/ou iões cianeto. Para avaliar a formação de MRs formados por outras enzimas usam-se vetores de metabolismo em vez dos MFH, como hepatócitos, citosol do fígado ou neutrófilos, entre outros. A análise dos resultados é feita por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS/MS) que deteta e caracteriza os conjugados estáveis formados com os nucleófilos adicionados. No caso de o resultado ser positivo, isto é, de existir formação de MRs, a caracterização da estrutura do conjugado fornece uma visão da composição do MR e o mecanismo para a sua formação. Assim, de acordo com os resultados obtidos, os investigadores podem proceder a uma mudança da estrutura da molécula de modo a eliminar ou diminuir a suscetibilidade desta formar MRs. (Kalgutkar, Amit S., 2011) (Kalgutkar, Amit S., 2008)

3.5.1 Estratégias para evitar a formação de Metabolitos Reativos

Existem várias estratégias que podem ser utilizadas para eliminar a potencial bioativação de uma molécula líder no desenvolvimento de um novo fármaco. Porém, na prática, as modificações são difíceis de fazer, pois várias tentativas têm que ser feitas para não

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

serem afetadas as características farmacológicas e farmacocinéticas da molécula. (Kalgutkar, Amit S., 2008)

Pode ser usada uma estratégia de substituição direta do potencial alerta estrutural com substituintes que são geralmente resistentes ao metabolismo ou com grupos que sofrem metabolização para metabolitos não reativos. Outra estratégia usada para evitar a formação de MRs é pelo bloqueio dos locais de bioativação. Este método é particularmente efetivo quando o processo de bioativação, enzimático ou não enzimático, ocorre passo-a-passo. No entanto, os grupos funcionais vizinhos podem participar no processo de metabolismo sequencial conduzindo à formação de metabolitos reativos. Os investigadores podem também introduzir pontos fracos metabólicos para direcionar o metabolismo do fármaco para outro local da molécula. A incorporação de substituintes diretamente no alerta estrutural ou na sua vizinhança imediata, de modo a proporcionar impedimento estereoquímico e/ou modular as suas propriedades eletrónicas para minimizar a bioativação é também uma estratégia adotada. (Kalgutkar, Amit S., 2008)

4 – Conclusões

Os metabolitos reativos parecem ser responsáveis por muitas, mas não todas, as reações idiossincráticas a fármacos (RAIFs). Alertas estruturais são os grupos funcionais presentes numa molécula que vão originar estes MRs através da sua ativação metabólica, sendo alguns tipos mais "perigosos" do que outros. A dose é também é um fator importante. As reações idiossincráticas são imprevisíveis e o risco de acontecerem é incalculável pelo que é a formação destas espécies reativas que poderá fornecer informações sobre a sua potencial formação. No entanto, é difícil produzir evidências definitivas sobre qual a espécie química e mecanismo pelo qual uma RAIF é induzida; modelos animais válidos representam uma ferramenta poderosa para tais estudos, mas são difíceis de estabelecer. Com exceção da toxicidade hepática, a evidência é convincente de que as RAIFs são imuno-mediadas, e é minha opinião de que a toxicidade hepática idiossincrática também é imuno-mediada, e em alguns casos com uma componente auto-imune.

No decorrer do avanço dos estudos de I&D são efetuados testes rotineiros para avaliar a formação de MRs a partir da molécula selecionada numa tentativa de tentar perceber a probabilidade da geração de RAIFs. Existem indícios fortes que ligam a toxicidade de um fármaco à sua constituição molecular, observados pela realização de estudos de relação

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

estrutura-atividade. Um facto que apoia esta ligação é a ausência da formação de MRs ser consistente com um melhor perfil de segurança de novos fármacos. Deste modo, a estratégia mais escolhida pelos investigadores no desenvolvimento de um novo fármaco é evitar a inserção de AE nas moléculas, independentemente dos benefícios farmacológicos e/ou farmacocinéticos que estes possam trazer à molécula.

Muitas dúvidas pairam sobre o conceito de AE e a sua aplicabilidade na I&D de novos fármacos. Os fármacos causam alterações que podem representar biomarcadores, o que torna possível prever o risco de que um candidato a fármaco causará RAIFs; no entanto, parece que os biomarcadores serão diferentes para diferentes drogas. O facto de ser evitada a inserção de AE numa nova molécula não é sinal de segurança, pois o uso de novos grupos funcionais para os substituir pode levar também à formação de MRs. Existem compostos que têm AE na sua estrutura que não levam à formação de RAIFs, uma vez que o metabolismo pode ocorrer noutra local da molécula e levar à formação de metabolitos não reativos. Distinguir claramente quando um grupo funcional é considerado alerta estrutural gera alguma controvérsia, pois existem muitos fármacos que contêm GF que são considerados AE mas que não são susceptíveis de serem retirados da molécula, como é o caso do anel fenilo.

Alguns alertas estruturais são muito rigorosos e eliminá-los limita severamente a diversidade química necessária para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade farmacológica. Cerca de metade dos novos fármacos possuem pelo menos um AE e os medicamentos mais vendidos em todo o mundo têm também alertas na sua constituição, pelo que se se eliminassem todos os AE das moléculas não existiriam metade dos medicamentos que se encontram no mercado.

Os AE devem ser usados na estrutura de um composto com prudência, principalmente na fase de seleção de uma molécula durante os estudos de I&D. É obrigatória a demonstração experimental de que esse GF realmente leva à formação de MRs, identificando o mecanismo e as enzimas responsáveis pela sua bioativação, para então serem usados os resultados na modificação da estrutura do fármaco. A previsão da capacidade de um fármaco causar uma RAIF depende da compreensão dos mecanismos patológicos destas reações de metabolismo assim como dos próprios mecanismos de formação das reações idiossincráticas. Até que tenhamos uma melhor compreensão de como exatamente as drogas causam RAIFs (induzir uma resposta imune), as mesmas irão, provavelmente, permanecer imprevisíveis.

Bibliografia

4-Aminofenol – Wikipédia, a enciclopédia livre - [Em linha] [Consult. 2 jul. 2015]. Disponível em WWW:URL:<https://pt.wikipedia.org/wiki/4-Aminofenol>.

Alceno – Wikipédia, a enciclopédia livre - [Em linha] [Consult. 2 jul. 2015]. Disponível em WWW:URL:<https://pt.wikipedia.org/wiki/Alceno>.

Alcino – Wikipédia, a enciclopédia livre - [Em linha] [Consult. 2 jul. 2015]. Disponível em WWW:URL:<https://pt.wikipedia.org/wiki/Alcino>.

ARONSON, J. K.; FERNER, R. E. - Joining the DoTS: new approach to classifying adverse drug reactions. **BMJ : British Medical Journal**. . ISSN 0959-8138. 327:7425 (2003) 1222–1225. doi: 10.1136/bmj.327.7425.1222.

BRUNTON, L. - Goodman & Gilman ' s The Pharmacological Basis of Therapeutics. Em **Goodman & Gilman' s The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10. ed. ISBN 0071624422. p. 9–10.

CARL N. WEBB; WEBB, C. N. - Benzanilide. **[[Organic Syntheses|Org. Synth.]]**. 1941).

DALVIE, D. K. *et al.* - Biotransformation reactions of five-membered aromatic heterocyclic rings. **Chemical Research in Toxicology**. . ISSN 0893228X. 15:3 (2002) 269–299. doi: 10.1021/tx015574b.

DJERASSI, C. - Chemical birth of the pill. 1992. **American journal of obstetrics and gynecology**. . ISSN 1097-6868. 194:1 (2006) 290–8. doi: 10.1016/j.ajog.2005.06.010.

EICHER, T.; HAUPTMANN, S.; EICHER, T. . H. - **The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications**. [S.l.] : Wiley-VCH, 2003. ISBN 3-527-30720-6.

FUJITA, H.; YAMASHITA, M. - The Methylenation of Several Allylbenzene-1,2-diol Derivatives in Aprotic Polar Solvents. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**. . ISSN 0009-2673. 46:11 (1973) 3553–3554. doi: 10.1246/bcsj.46.3553.

Furosemida – Wikipédia, a enciclopédia livre - [Em linha] [Consult. 2 jul. 2015]. Disponível em WWW:URL:<https://pt.wikipedia.org/wiki/Furosemida>.

G. H. COLEMAN, C. M. MCCLOSKEY, F. A. STUART; G. H. COLEMAN, C. M. M. - Nitrosobenzene. **[[Organic Syntheses|Org. Synth.]]**. [s.d.]).

GUENGERICH, F. P. - Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. **Drug metabolism and pharmacokinetics**. . ISSN 1347-4367. 26:1 (2011) 3–14. doi: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-062.

HEFTI, F. F. - Requirements for a lead compound to become a clinical candidate. **BMC neuroscience**. . ISSN 1471-2202. 9 Suppl 3:2008) S7. doi: 10.1186/1471-2202-9-S3-S7.

Hydrazine: Chemical product info - [Em linha]. [S.l.] : chemindustry.ru, [s.d.] [Consult. 2 jul. 2015]. Disponível em WWW:URL:<http://chemindustry.ru/Hydrazine.php>.

IFPMA - The Pharmaceutical Industry and Global Health : Facts and Figures. 2011).

IUPAC Gold Book - anilides - [Em linha] [Consult. 2 jul. 2015]. Disponível em WWW:URL:<http://goldbook.iupac.org/A00356.html>.

KALGUTKAR, A. S. *et al.* - A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. **Current drug metabolism**. . ISSN 13892002. 6:3 (2005) 161–225. doi: 10.2174/1389200054021799.

KALGUTKAR, A. S. - Role of Bioactivation in Idiosyncratic Drug Toxicity: Structure–Toxicity Relationships. **Advances in Bioactivation Research**. 8:2008) 27–55.

KALGUTKAR, A. S. - Handling reactive metabolite positives in drug discovery: What has retrospective structure-toxicity analyses taught us? **Chemico-Biological Interactions**. . ISSN 00092797. 192:1-2 (2011) 46–55. doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.003.

KALGUTKAR, A. S. *et al.* - Pathways of Reactive Metabolite Formation with Toxicophores / - Structural Alerts. 2012).

KALGUTKAR, A. S. - Should the Incorporation of Structural Alerts be Restricted in Drug Design ? An Analysis of Structure-Toxicity Trends with Aniline-Based Drugs. 29:2015) 438–464.

KALGUTKAR, A. S.; DALVIE, D. - Predicting Toxicities of Reactive Metabolite–Positive Drug Candidates. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. . ISSN 0362-1642. 55:1 (2015) 35–54. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124720.

KALGUTKAR, A. S.; DIDIUK, M. T. - Structural alerts, reactive metabolites, and protein covalent binding: How reliable are these attributes as predictors of drug toxicity? **Chemistry and Biodiversity**. . ISSN 16121872. 6:11 (2009) 2115–2137. doi: 10.1002/cbdv.200900055.

NAISBITT, D. J. *et al.* - Reactive metabolites and their role in drug reactions. **Current opinion in allergy and clinical immunology**. . ISSN 1528-4050. 1:4 (2001) 317–325.

PARK, B. K. *et al.* - Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. **Toxicology**. . ISSN 0300483X. 153:1-3 (2000) 39–60. doi: 10.1016/S0300-483X(00)00303-6.

PARK, B. K. *et al.* - Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity. **Chemico-Biological Interactions**. . ISSN 00092797. 192:1-2 (2011) 30–36. doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.011.

PIRMOHAMED, M. *et al.* - The danger hypothesis--potential role in idiosyncratic drug reactions. **Toxicology**. . ISSN 0300483X. 181-182:2002) 55–63. doi: 10.1016/S0300-483X(02)00255-X.

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

SILVA, J. C. Da; SOARES, M. A.; MARTINS, S. De O. - **Reações Adversas a Medicamentos - Análise da base de dados do Sistema Nacional de Farmacovigilância (SVIG)** [Em linha] [Consult. 10 jun. 2015]. Disponível em WWW:URL:https://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/FARMACOVIGILANCIA/Relatorio_analise_dados_SVIG_2009_2011.pdf.

STEPAN, A. F. *et al.* - in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States The Structural Alert / Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxic. **Chemical Research in Toxicology**. 2011) 1345–1410. doi: 10.1021/tx200168d.

UETRECHT, J. - Evaluation of which reactive metabolite, if any, is responsible for a specific idiosyncratic reaction. **Drug metabolism reviews**. . ISSN 0360-2532. 38:4 (2006) 745–753. doi: 10.1080/03602530600959615.

UETRECHT, J.; NAISBITT, D. J. - Idiosyncratic adverse drug reactions: current concepts. **Pharmacological reviews**. . ISSN 1521-0081. 65:2 (2013) 779–808. doi: 10.1124/pr.113.007450.

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexos

Anexo I – Meloxicam como fármaco que tem AE mas não forma MR.

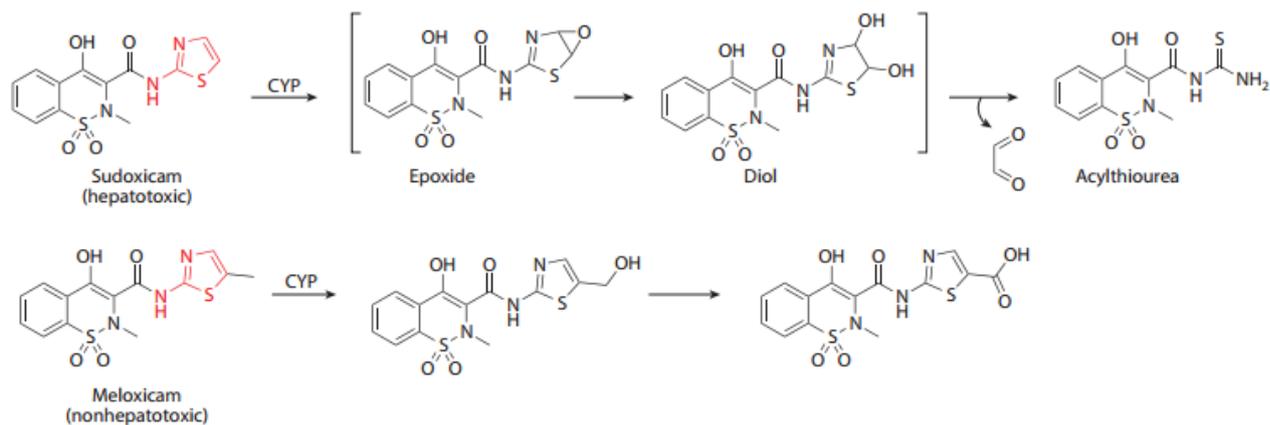


Figura 1 Meloxicam como fármaco que tem o mesmo AE que o sudoxicam mas não forma MR. (Kalgutkar e Dalvie, 2015)

Anexo 2 – Estrutura dos Alertas estruturais

Anilina

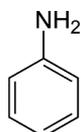


Figura 2 Estrutura das anilinas. (Carl N. Webb e Webb, 1941)

Anilida

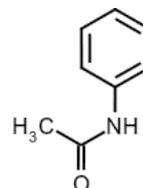


Figura 3 Estrutura química das anilidas. (IUPAC Gold Book - anilides, [s.d.])

p-aminofenol

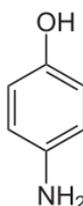


Figura 4 Estrutura do p-aminofenol. (4-Aminofenol – Wikipédia, a enciclopédia livre, [s.d.])

Nitrobenzeno

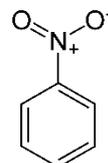


Figura 5 estrutura do Nitrobenzeno. (G. H. Coleman, C. M. McCloskey, F. A. Stuart e G. H. Coleman, [s.d.])

Hidrazina

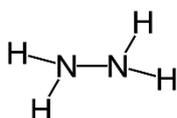


Figura 6 Estrutura da Hidrazina. (Hydrazine: Chemical product info, [s.d.])

Anel Furano

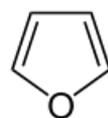


Figura 7 Estrutura do anel furano. (Eicher, T.; Hauptmann, S. e Eicher, 2003)

Anel Tiofeno



Figura 8 Estrutura do anel Tiofeno. (Eicher, T.; Hauptmann, S. e Eicher, 2003)

Anel Tiazol

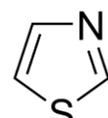


Figura 9 Estrutura do anel Tiazol. (Eicher, T.; Hauptmann, S. e Eicher, 2003)

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anel Pirrol

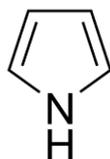


Figura 10 Estrutura do Anel Pirrol.
(Eicher, T.; Hauptmann, S. e Eicher, 2003)

Anel Indol

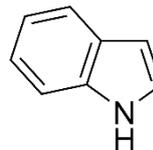


Figura 11 Estrutura do Anel Indol.
(Eicher, T.; Hauptmann, S. e Eicher, 2003)

1,3 – Benzodioxol

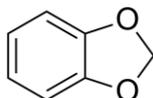


Figura 12- Estrutura do 1,3 - Benzodioxol.
(Fujita e Yamashita, 1973)

Alceno

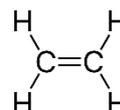


Figura 13 Estrutura de um alceno.
(Alceno – Wikipédia, a enciclopédia livre, [s.d.])

Alcino



Figura 14 Estrutura de um Alcino.
(Alcino – Wikipédia, a enciclopédia livre, [s.d.])

Acido Carboxílico

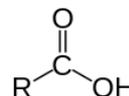


Figura 15 Estrutura de um Ácido Carboxílico.
(Ácido carboxílico - Wikipedia, la enciclopedia libre, [s.d.])

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexo 3 – Bioativação de aminas aromáticas. Fármacos que contêm este grupo funcional.

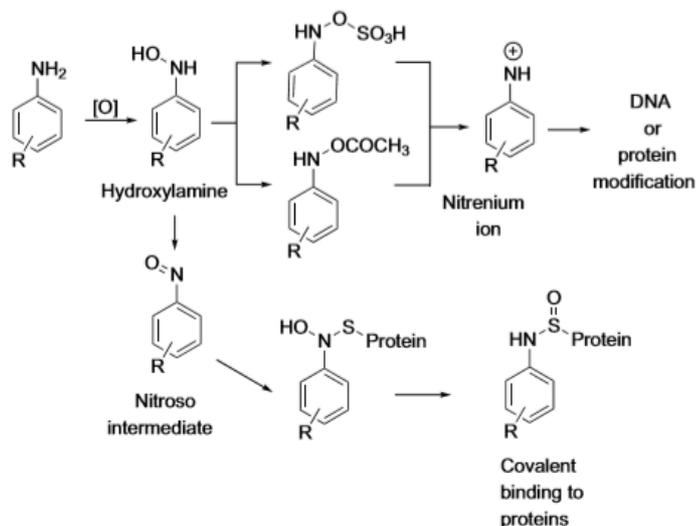


Figura 16 Bioativação das aminas aromáticas (Kalgutkar et al., 2012)

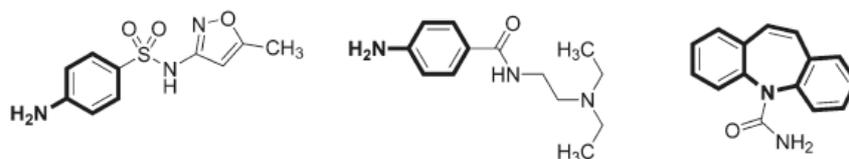


Figura 17 Estrutura da molécula de sulfametoxazol, procainamida e carbamazepina, respectivamente. (Stepan et al., 2011)

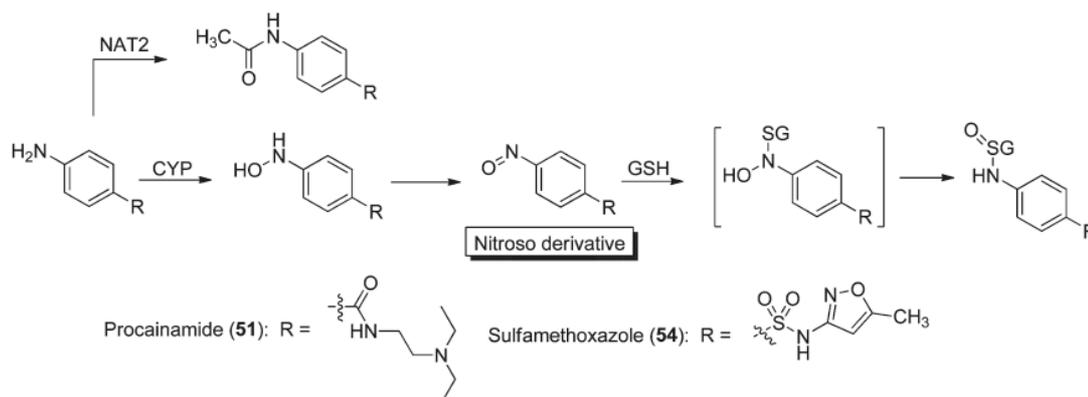


Figura 18 Vias de formação de MR da procainamida e do sulfametoxazol. (Stepan et al., 2011)

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

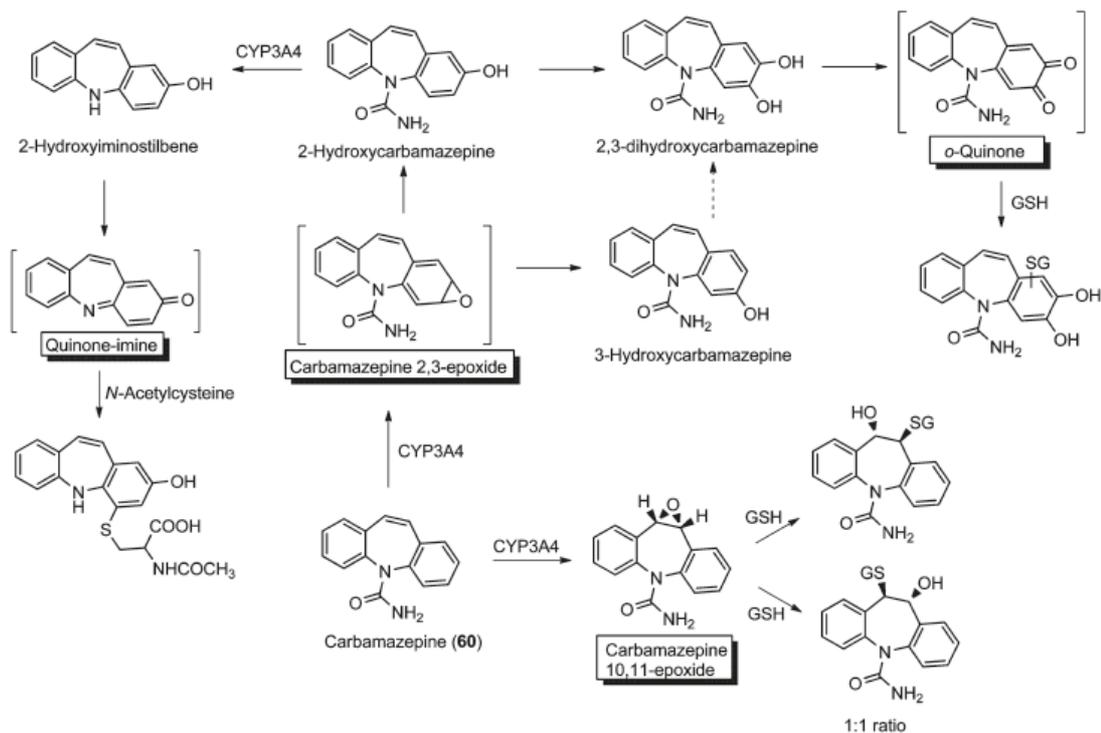


Figura 19 Vias de bioativação da carbamazepina em humanos. (Stepan et al., 2011)

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexo 4 – Fármacos que contêm o alerta estrutural Anilida e *para*-aminofenol.

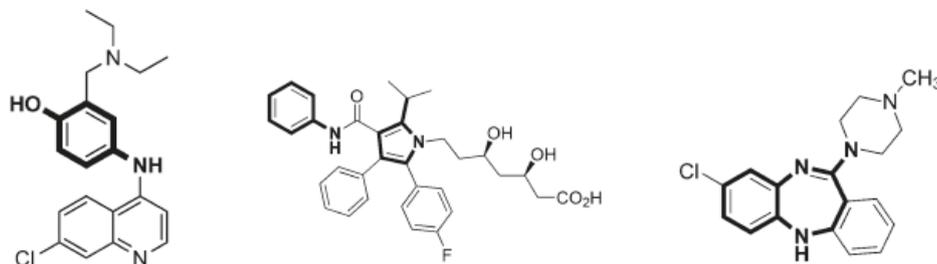


Figura 20 Amodiaquina, atorvastatina e clozapina, respectivamente. Na sua estrutura estão assinalados os alertas estruturais a negro. (Stepan *et al.*, 2011)

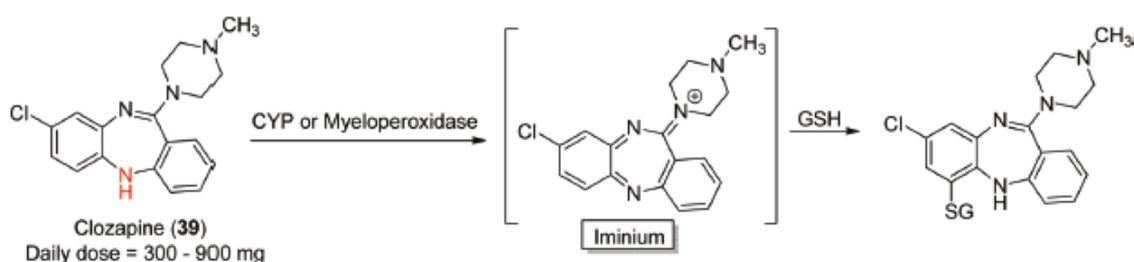


Figura 21 Bioativação da clozapina. (Stepan *et al.*, 2011)

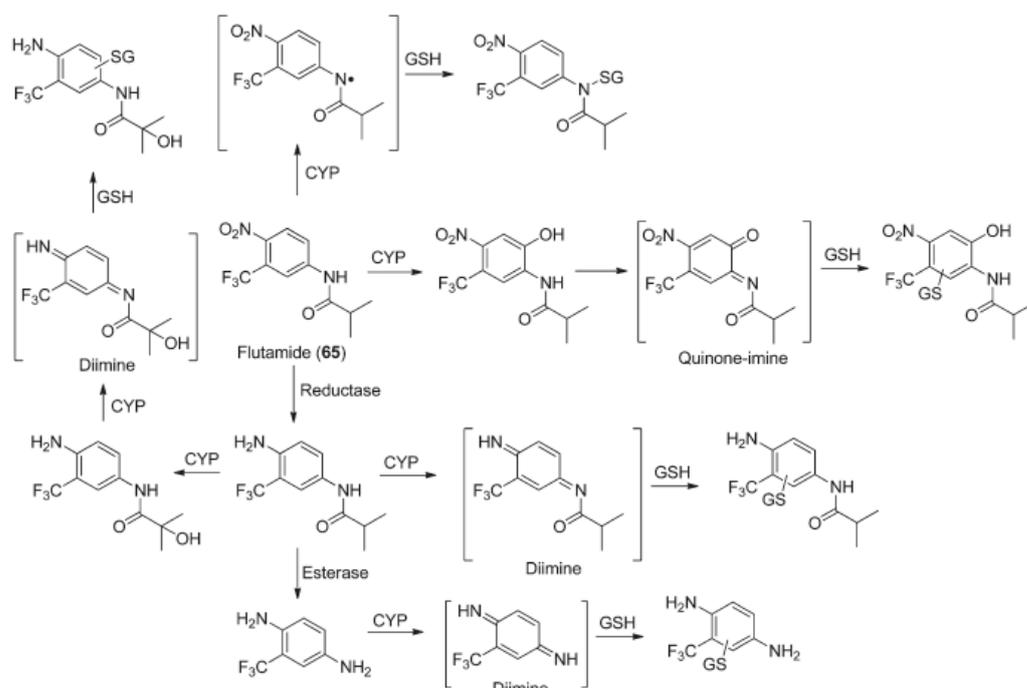


Figura 22 Via de bioativação da flutamida. (Stepan *et al.*, 2011)

Anexo 5 – Bioativação de Nitrobenzenos. Fármacos que contêm este grupo funcional.

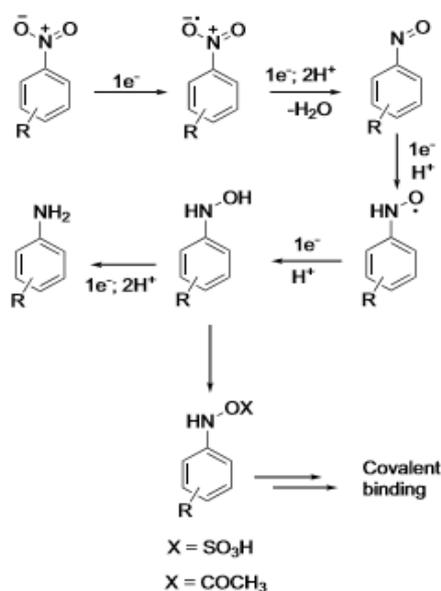


Figura 23 Bioativação dos Nitrobenzenos. (Kalgutkar et al., 2012)

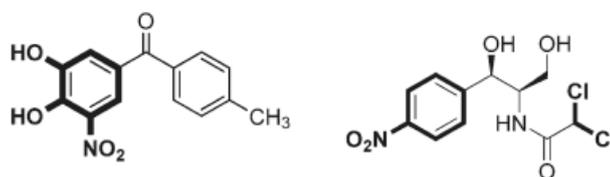


Figura 24 Tolcapone e cloranfenicol como exemplos de fármacos que contêm nitrobenzenos na sua constituição. Os alertas estruturais destas moléculas encontram-se a negrito. (Stepan et al., 2011)

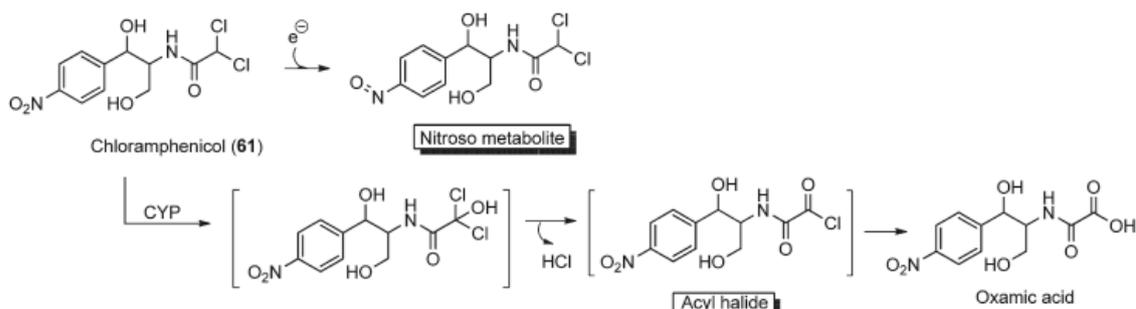


Figura 25 Bioativação do cloranfenicol. (Stepan et al., 2011)

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexo 6 – Bioativação de Hidrazinas. Fármacos que contêm este alerta estrutural.

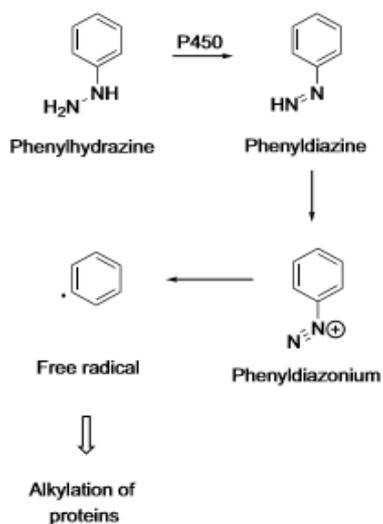


Figura 26 Bioativação de uma fenilhidrazina. (Kalgutkar et al., 2012)

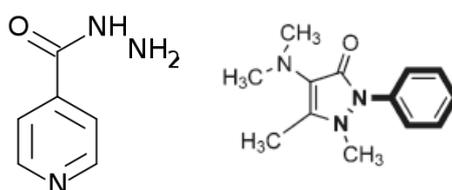


Figura 27 Exemplos de fármacos que contêm hidrazinas: isoniazida e aminopirina, respectivamente. (Stepan et al., 2011)

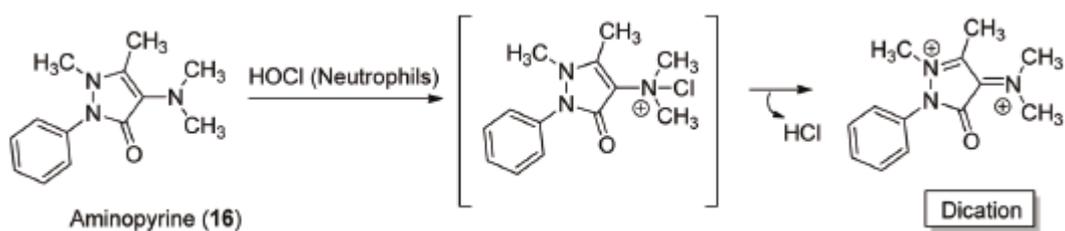


Figura 28 Bioativação da aminopirina. (Stepan et al., 2011)

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexo 7 – Bioativação de Furanos. Fármacos que contêm este alerta estrutural.

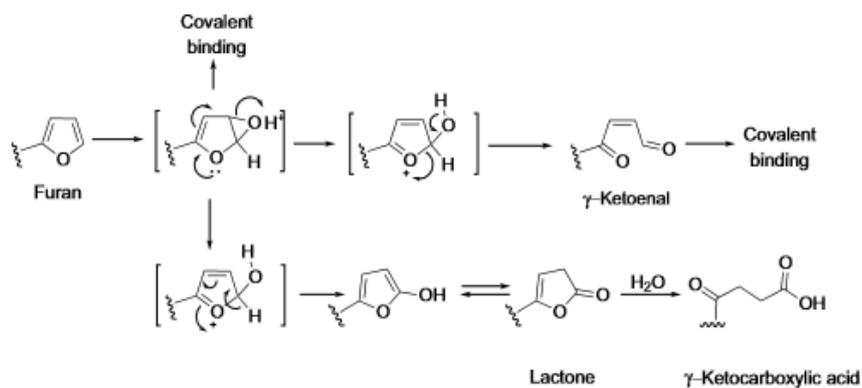


Figura 29 Biotransformação de furanos.(Kalgutkar et al., 2012)

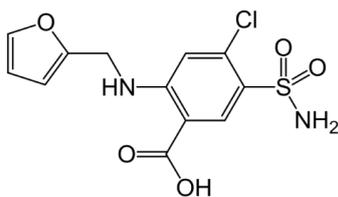


Figura 30 A Furosemida contém o anel furano na sua constituição. (Furosemida – Wikipédia, a enciclopédia livre, [s.d.]

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexo 8 – Bioativação do Anel Tiofeno. Fármacos que contêm este alerta estrutural.

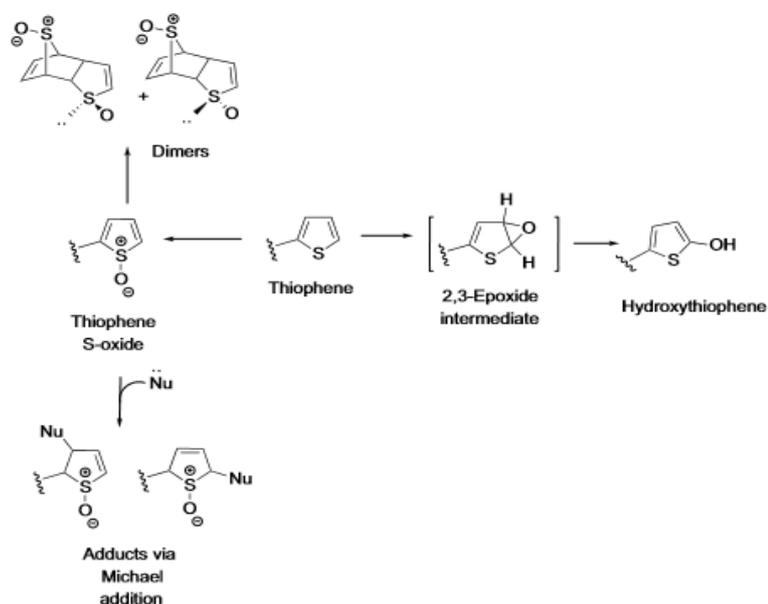


Figura 31 Bioativação do tiofeno.(Kalgutkar et al., 2012)

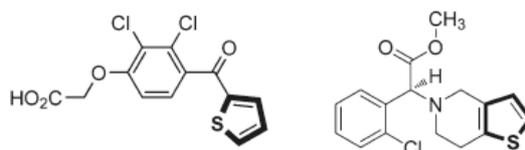


Figura 32 Estruturas moleculares do ácido tienílico e clopidogrel, respetivamente. O anel de tiofeno encontra-se assinalado a negrito. (Stepan et al., 2011)

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

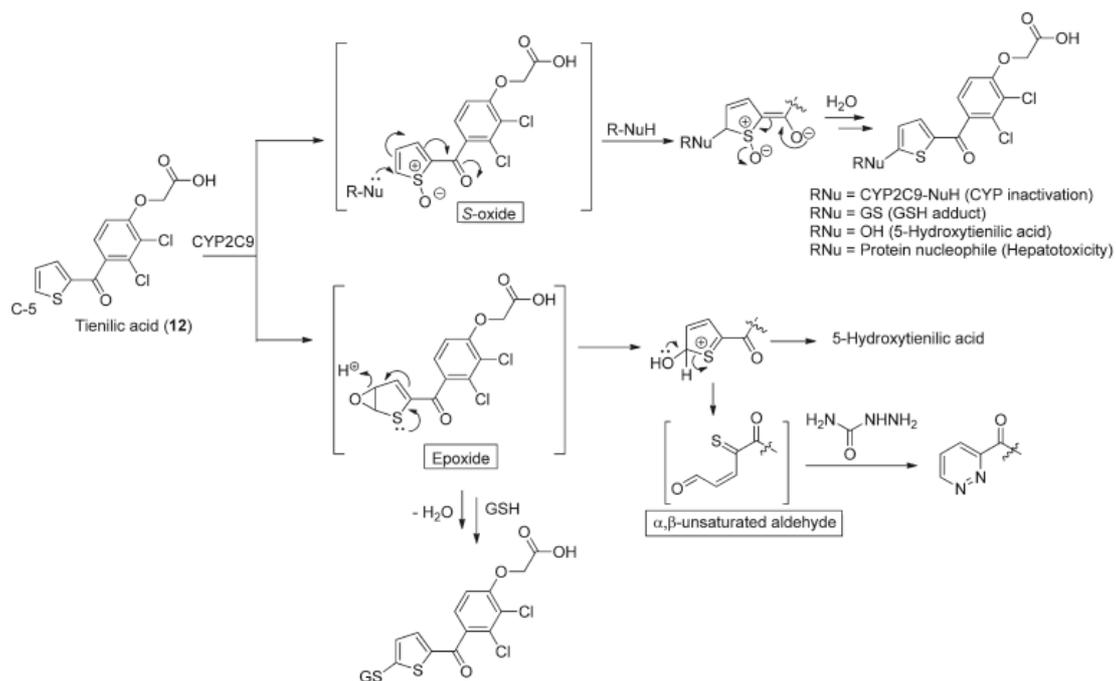


Figura 33 Bioativação do Ácido tienílico. (Stepan *et al.*, 2011)

Anexo 9 – Bioativação do Anel Tiazol.

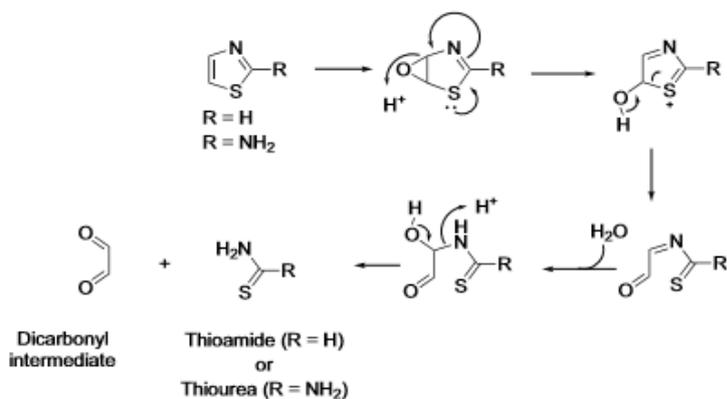


Figura 34 Cisão oxidativa do anel tiazol. (Kalgutkar, Amit S. et al., 2012)

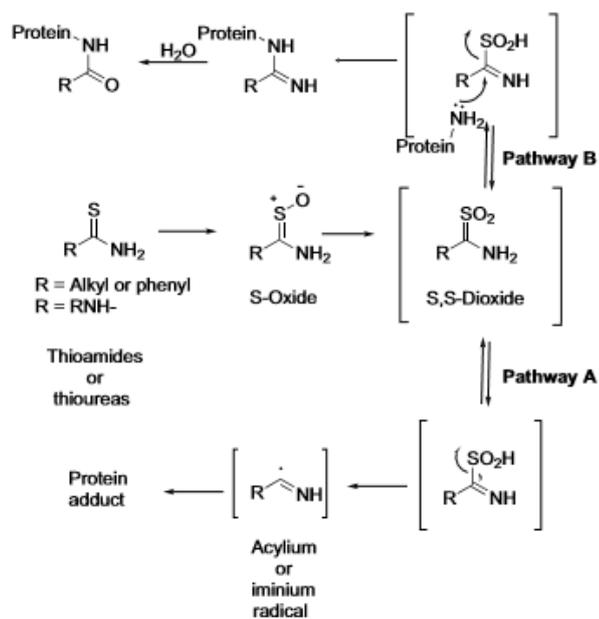


Figura 35 Bioativação das tioaminas e tioureias. (Kalgutkar, Amit S. et al., 2012)

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

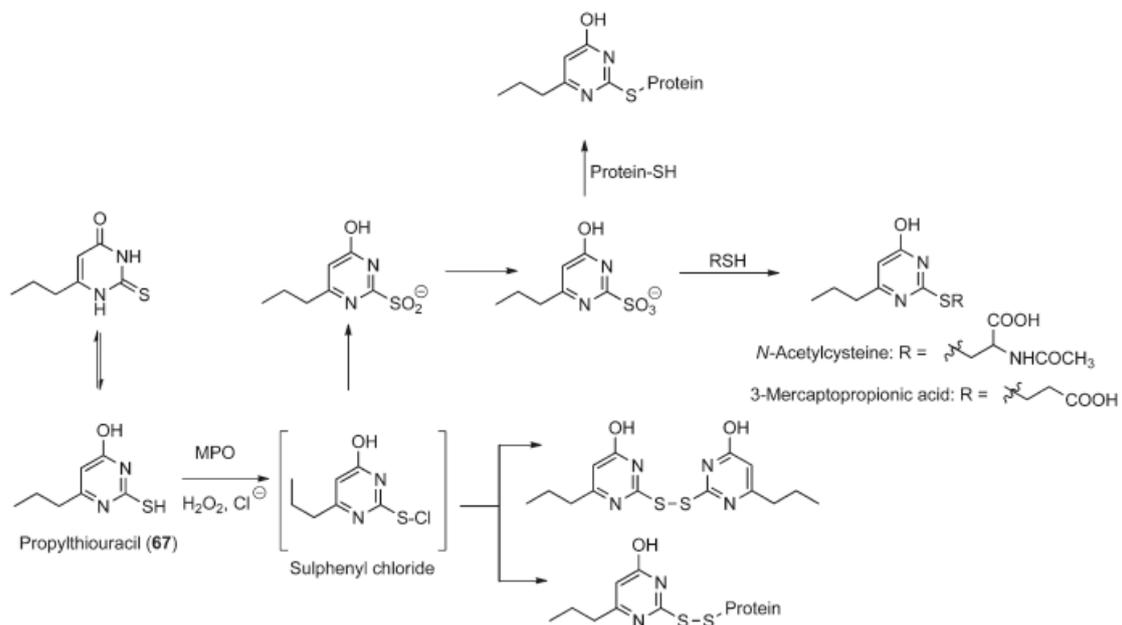


Figura 36 Bioativação do Propiluracilo. (Stepan *et al.*, 2011)

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexo 10 – Bioativação do Anel Pirrol.

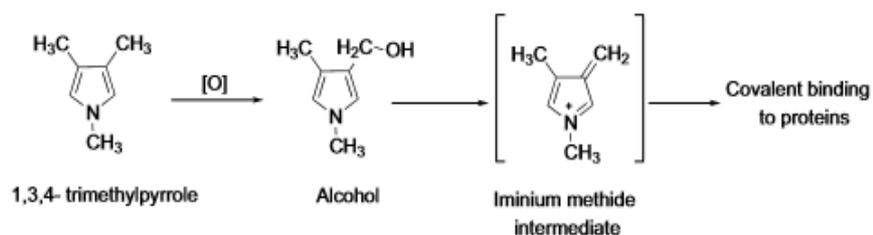


Figura 37 Bioativação do grupo 3-alkilpirrol. (Kalgutkar, Amit S. et al., 2012)

Anexo 11 – Bioativação do Anel Indol.

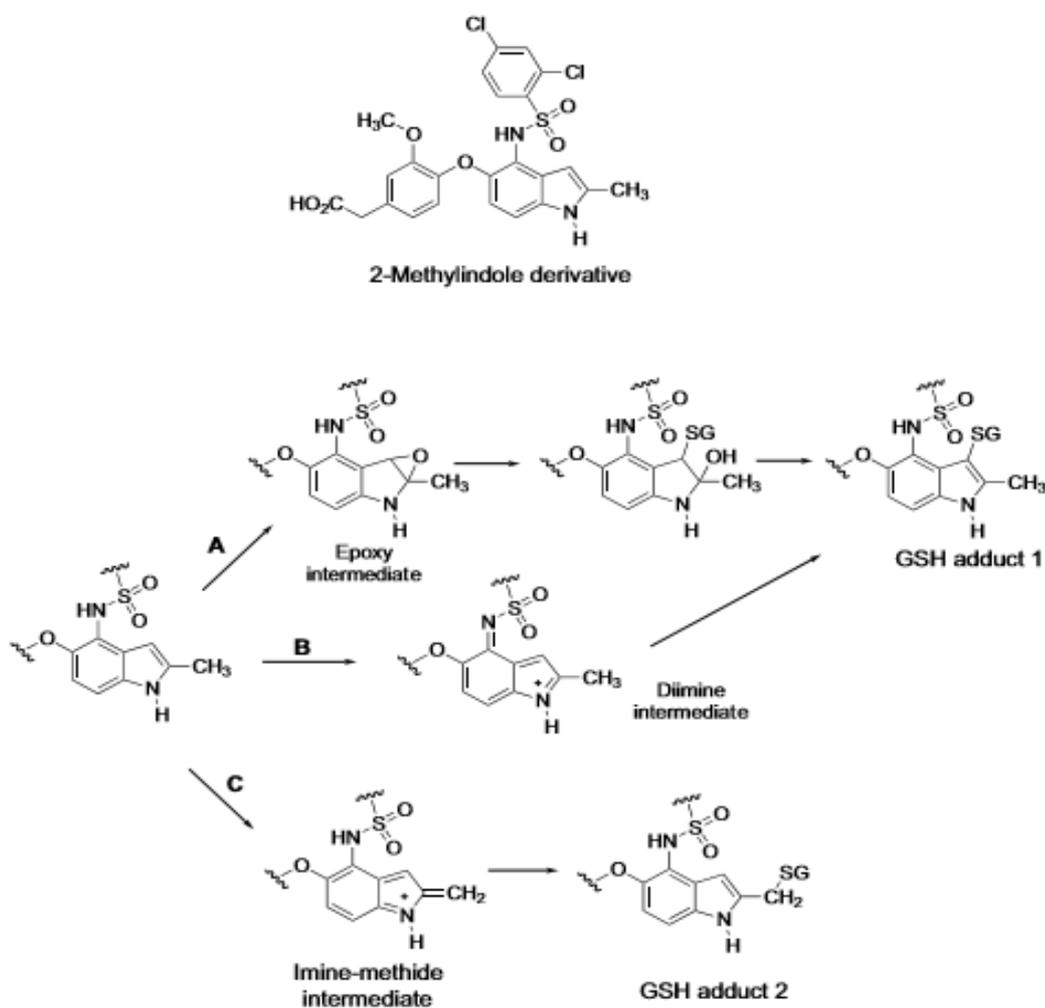


Figura 38 Bioativação de um grupo Indol. (Kalgutkar, Amit S. et al., 2012)

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexo 12 – Bioativação do grupo 1,3-benzodioxol. Estrutura da paroxetina.

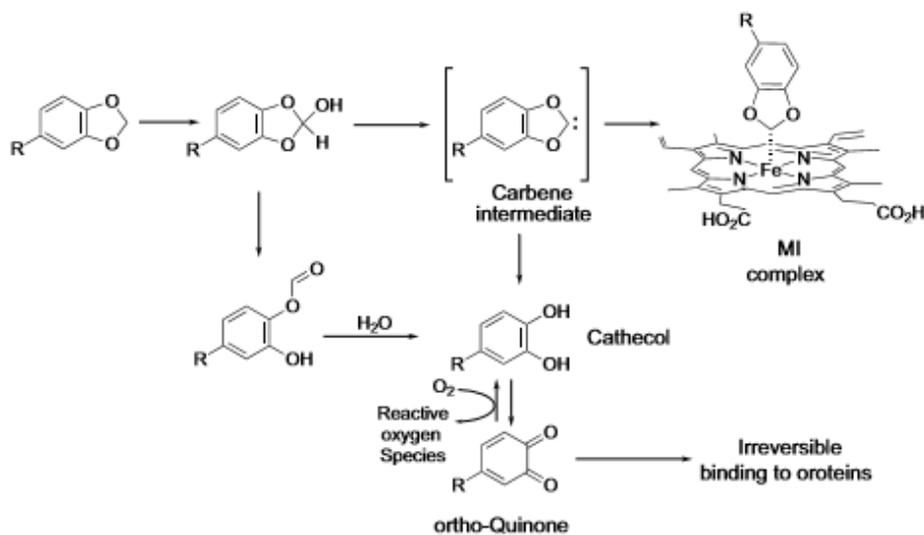


Figura 39 Bioativação do grupo 1,3-benzodioxol (Kalgutkar *et al.*, 2012)

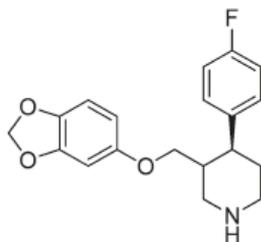


Figura 40 Paroxetina, um exemplo de fármaco que contém o alerta estrutural 1,3-benzodioxol. (Stepan *et al.*, 2011)

Formação de metabólitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexo I3 – Bioativação dos alcinos terminais.

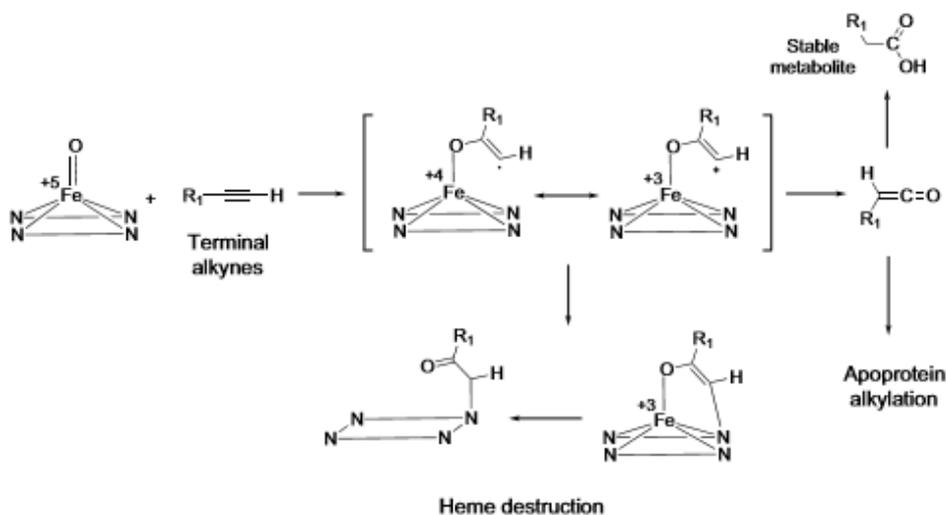


Figura 41 Bioativação do alcinos terminais e consequente destruição da heme. (Kalgutkar et al., 2012)

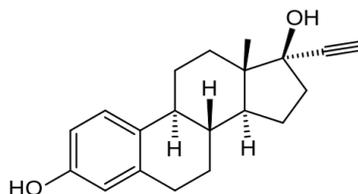


Figura 42 O 17 α -etinilestradiol contem um alcino terminal na sua constituição. (Djerassi, 2006)

Formação de metabolitos reativos envolvidos em reações adversas idiossincráticas a fármacos. O conceito de alertas estruturais: exemplos ilustrativos.

Anexo I4 – Bioativação dos ácidos carboxílicos. Estrutura do ácido valpróico.

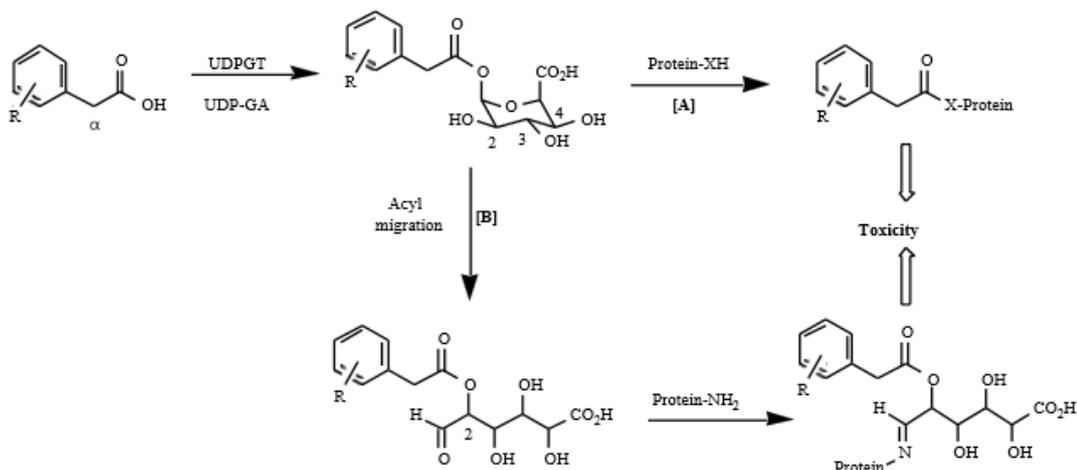


Figura 43 Bioativação dos ácidos carboxílicos. (Kalgutkar et al., 2005)

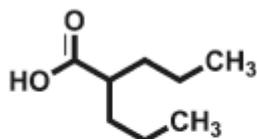


Figura 44 Estrutura química do ácido valpróico. (Stepan et al., 2011)

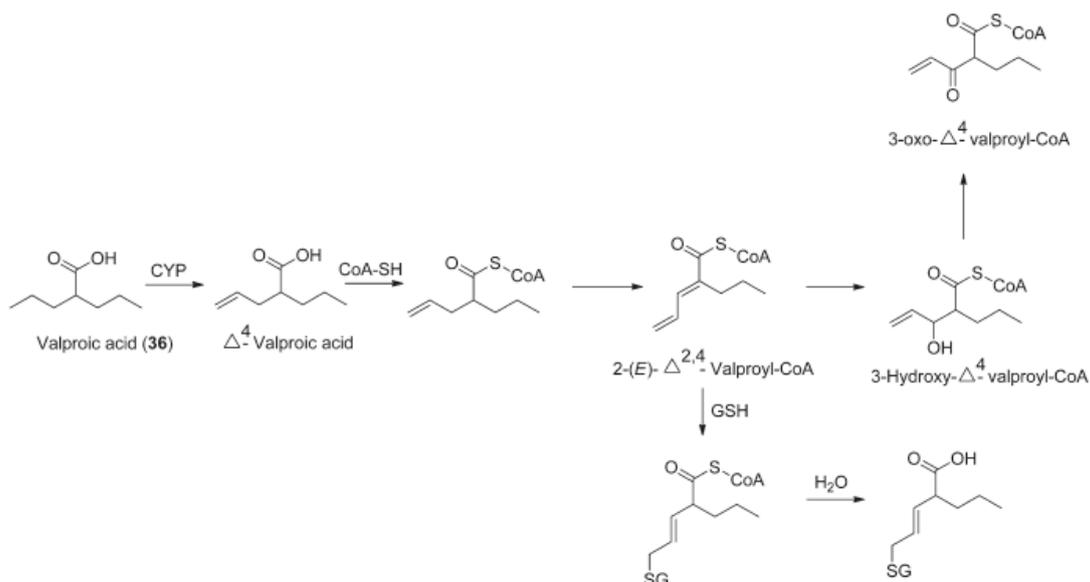


Figura 45 Bioativação do ácido valpróico. (Stepan et al., 2011)