

ROSIVALDO DOS SANTOS BORGES

**Planejamento, Síntese e Avaliação Antioxidante de
Inibidores Fenólicos da PGES Derivados da
Associação *p*-Aminofenol e Salicilatos**

BELÉM

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROSIVALDO DOS SANTOS BORGES

**Planejamento, Síntese e Avaliação Antioxidante de
Inibidores Fenólicos da PGES Derivados da
Associação *p*-Aminofenol e Salicilatos**

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Orientadores:

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves

ROSIVALDO DOS SANTOS BORGES

Planejamento, Síntese e Avaliação Antioxidante de Inibidores Fenólicos da PGES Derivados da Associação *p*-Aminofenol e Salicilatos

Belém-PA, 12 de julho de 2007

Conceito: 9,3 (EXCELENTE)

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento – Orientador
Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular – UFPA

Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves – Orientador
Pós-Graduação em Química – UFPA

Profa. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro – Membro
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos – Membro
Instituto de Ciências Exatas e Naturais – UFPA

Prof. Dr. Jofre Jacob da Silva Freitas – Membro
Centro de Ciências Biológicas – UEPA

Prof. Dr. Albérico Borges Ferreira da Silva – Membro
Instituto de Química de São Carlos – USP

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos – Suplente
Instituto de Ciências Exatas e Naturais – UFPA

*“...é por meio das coisas pequenas e simples que as grandes são realizadas;
e pequenos meios muitas vezes confundem os sábios”.*

Alma 37: 6 – O Livro de Mórmon: Outro Testamento de Jesus Cristo

AGRADECIMENTOS

- Aos meus orientadores Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento e Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves, por acreditarem neste projeto, suas orientações, conselhos e sugestões, mas principalmente pela amizade e confiança desenvolvida durante este trabalho.
- Ao Profs. Dr. Lourivaldo da Silva Santos e Dr. Alberdan Silva Santos pelo incentivo e auxílio no Departamento de Química.
- Aos Profs. Dra. Maria Elena Crespo e Dr. Anderson Manuel Herculano por seu acompanhamento, dicas experimentais e principalmente o companheirismo no laboratório.
- Ao Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira por suas correções, questionamentos relevantes e apoio laboratorial.
- Ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pará por ter acreditado em meu potencial como professor.
- Aos amigos dos laboratórios de Neuroquímica Luiz Antonio Loureiro Maués e Barbarella de Matos Macchi e Modelagem Molecular e Departamento de Química Jerônimo Lameira, Isaque Gemaque, Davi do Socorro Barros Brasil, Iselino Jardim e Mauro Reis.
- Aos alunos da Universidade Federal do Pará Aurielson Noronha Queiroz, Ellen Gurrão e Wanda Costa e do Centro Universitário do Pará Agatha Silva, Doriane Muniz, Sâmara Farripas, Wagner Brito pela ajuda e trabalhos de conclusão de curso desenvolvidos.
- Aos funcionários do Departamento de Química e do Laboratório de Análises Clínicas pelo apoio.
- Agradecimentos a Mestranda do NMT Glaécia Aparecida do Nascimento Pereira por sua ajuda.
- *In memoriam* aos Amigos MSc. Rafael Yasunori Okada Moreira, Dr. José Carlos da Silva Rocha e Pedro Nazareno Nunes. Saudades dos bons tempos!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Aos meus Pais Benedito Ferreira Borges e Marivalda dos Santos Borges, por seus sacrifícios, incentivo e confiança.

- A minha querida Esposa Edileusa dos Santos Borges, por ter compartilhado parte de sua vida ao meu lado e nossos filhos Amanda Flávia, Bruna Luise, Caio Marcelo e Denise Mara, a luz de nossas vidas e a razão de nossas maiores expectativas.

- Aos meus irmãos Elane, Ronaldo, Marinete, Vancley e Benedito, por tudo o que convivemos juntos e pela ajuda nos estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTAS DE ESQUEMAS	12
LISTAS DE FIGURAS E GRÁFICOS	13
LISTAS DE TABELAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO:	17
1.1. DERIVADOS DO <i>p</i> -AMINOFENOL:.....	17
1.1.1. Farmacocinética do Paracetamol:	17
1.1.2. Farmacodinâmica do Paracetamol:	20
1.1.3. Metabolismo de Drogas Via Citocromo P-450:	21
1.1.4. Mecanismos de Toxicidade do Paracetamol:	27
1.1.5. Quimioproteção contra a Toxicidade do Paracetamol:	30
1.1.6. Modificações Químicas do Paracetamol:	31
1.2. DERIVADOS DE SALICILATOS:	32
1.2.1. Farmacocinética dos Salicilatos:	32
1.2.2. Inibição da Ciclooxygenase pela Aspirina:	33
1.2.3. Acetilação de Proteína Mediada pela Aspirina:	34
1.2.4. Inibição Seletiva da PGES por Ésteres de Cadeia Longa:	35
1.2.5. Atividade Antiagregante Plaquetária dos Salicilatos:	35
1.2.6. Resistência ao Tratamento com Salicilatos:	37
1.2.7. Atividade Anti-Radicalar de Salicilatos e Derivados do <i>p</i> - Aminofenol:	38
1.3. ESTRESSE OXIDATIVO:	39
1.3.1. Radicais Livres:	39
1.3.2. Peroxidação Lipídica:	39
1.3.3. Sistema de Defesa Antioxidante:	41
1.3.4. Atividade Antioxidante de Derivados Fenólicos:	45
1.4. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA:	46
1.5. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS:	51

1.6.	OBJETIVOS:	52
1.6.1.	Geral:	52
1.6.2.	Específicos:	52
2.	MATERIAL E MÉTODOS:	53
2.1.	MODELAGEM MOLECULAR:	53
2.1.1.	Energia dos Orbitais de Fronteira (HOMO e LUMO):	54
2.1.2.	Logaritmo do Coeficiente de Partição (log P):	54
2.1.3.	Energia de Hidratação (EH):	55
2.2.	CONJUNTO DE COMPOSTOS ESTUDADOS:	55
2.3.	SÍNTESE DE DERIVADOS FENÓLICOS:	56
2.3.1.	Compostos Sintetizados:	56
2.3.2.	Metodologia Sintética:	57
2.3.3.	Identificação e caracterização físico-química dos derivados:	58
2.3.4.	Materiais, Equipamentos e Vidrarias:	58
2.4.	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE:	59
2.4.1.	Avaliação Biológica:	59
2.4.2.	Avaliação Química:	60
2.4.3.	Metodologia de Determinação da Atividade Antioxidante:	63
2.4.3.1.	Difenilpicril-hidrazil radical (DPPH):	63
2.4.4.	Avaliação <i>in silico</i> :	63
2.4.5.	Métodos para o Cálculo do Potencial de Ionização (PI):	64
2.5.	ESTRESSE OXIDATIVO EM ERITRÓCITOS HUMANOS:	65
2.5.1.	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos:	65
2.5.2.	Amostras Biológicas:	65
2.5.3.	Indução do Estresse em Eritrócitos com H ₂ O ₂ :	65
2.5.4.	Indução do Estresse em Eritrócitos pelo sistema Ferro-Ascorbato:	66
2.5.5.	Indução do Estresse em Eritrócitos pelo sistema AAPH:	66
2.5.6.	Avaliação do grau de Hemólise:	66
2.5.7.	Nível de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico:	66
2.6.	INIBIÇÃO DA PGES EM PLAQUETAS:	67
2.6.1.	Avaliação da Atividade Antiinflamatória em Plaquetas:	67
2.6.2.	Contagem de plaquetas:	68

2.6.3. Inibição da Prostaglandina-Endoperóxido Sintase:	68
2.6.4. Equipamentos e Reagentes:	68
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA:	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:	70
3.1. MODELAGEM MOLECULAR:	70
3.1.1. Modelagem Molecular de Derivados Monometilados:	70
3.1.2. Modelagem Molecular de Derivados Fluorados:	72
3.1.3. Modelagem Molecular de Derivados 3,5-Dissubstituídos:	75
3.1.4. Modelagem Molecular de Derivados Alquil e Éter:	78
3.1.5. Modelagem Molecular de Derivados <i>p</i> -Aminofenol e Ácido Salicílico:	81
3.2. ESTUDO DO METABOLISMO DO ÁCIDO SALICÍLICO:	82
3.3. SINTESE DE DERIVADOS FENÓLICOS:	86
3.3.1. Preparação do <i>p</i> -benzamidafenol (S3):	86
3.3.2. Preparação do ácido 5-acetamidosalicílico (S4):	87
3.3.3. Preparação do ácido 5-benzamidosalicílico (S5):	89
3.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE:	91
3.4.1. Reatividade com a 1,1-difenil-2-picrilhidrazil radical (DPPH):	91
3.4.2. Relação Estrutura e Atividade Antioxidante:	93
3.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM ERITRÓCITOS HUMANOS:	97
3.5.1. Estresse oxidativo Induzido pelo H ₂ O ₂ :	97
3.5.2. Estresse oxidativo Induzido pelo Sistema Fe/Ascorbato/H ₂ O ₂ :	102
3.5.3. Avaliação do Grau de Hemólise:	109
3.6. ATIVIDADE ANTI-PGES:	117
4. CONCLUSÃO:	120
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	121
ANEXO 1 - Comitê de Ética em Pesquisa	140

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
AA	Ácido araquidônico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
2,3-DHBA	Ácido 2,3-dihidroxibenzóico
2,5-DHBA	Ácido 2,5-dihidroxibenzóico
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
CAT	Catalase
PBQ	<i>p</i> -benzoquinona
COX	Ciclooxigenase
Cit P-450	Citocromo P-450
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
eV	Elétron-volt
EH	Energia de hidratação
ER•	Espécie reativa
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
PAPS	Fosfoadenosil-fosfosulfato
GSSG	Glutaciona oxidada
GSP	Glutaciona-peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
PGG ₂	Hidroperóxido-endoperóxido
LOOH	Hidroperóxido lipídico
PAR-OH	3-hidroxiacetamol
kcal/mol	Kilocalorias por mol
LogP	Logaritmo do coeficiente de partição óleo/água
MDA	Malondialdeído
NAPQI	<i>N</i> -acetil- <i>p</i> -benzoquinona imina
NAPSQI	<i>N</i> -acetil- <i>p</i> -benzosemiquinona imina
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia

LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energia
PAR	Paracetamol
PAR-S	Paracetamol-sulfato
PAR-Glc	Paracetamol-glucuronídeo
UDPGA	Uridina difosfato do ácido glucurônico
NAPQI	<i>N</i> -acetil- <i>p</i> -benzoquinona imina
PAR-Cis	Paracetamol-cisteína
PAR-M	Paracetamol-mercapturato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
PGES	Prostaglandina endoperóxido sintase
HO•	Radical hidroxil
L•	Radical lipídico de carbono
LOO•	Radical peroxila
LO•	Radical lipídico alcoxil
SOD	Superóxido-dismutase
PM3	Terceira Parametrização
TFD	Teoria do funcional de densidade
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LISTAS DE ESQUEMAS

Esquema 1: Principais vias de biotransformação do paracetamol.....	18
Esquema 2: Formação do paracetamol-cisteína e paracetamol-mercaptopurato.....	19
Esquema 3: Mecanismo catalítico da monooxigenação via P-450 microsomal.....	23
Esquema 4: Mecanismo catalítico da monooxigenação via Cit P-450 microsomal do paracetamol.....	26
Esquema 5: Mecanismo de formação de radical livre semiquinona do paracetamol via P-450.	28
Esquema 6: Redução de NAPQI / NAPSQI e geração do ânion $O_2^{\bullet -}$	29
Esquema 7: Reação de hidrólise do ácido acetil-salicílico.....	32
Esquema 8: Principais vias de biotransformação dos salicilatos.....	33
Esquema 9: Reação de transacilação entre aspirina-tritriada e serina 530 da PGES.....	35
Esquema 10: Reações de peroxidação lipídica com espécies reativas.....	40
Esquema 11: Mecanismo de hepatotoxicidade de drogas e sistema de defesa antioxidante....	42
Esquema 12: Formação dos Intermediários via oxidação enzimática do ácido araquidônico...	47
Esquema 13: Enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico.....	48
Esquema 14: Formação das prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina.....	49
Esquema 15: Numeração do ácido araquidônico e formação dos leucotrienos.....	50
Esquema 16: Metodologia sintética para a preparação do p-benzmidafenol.....	57
Esquema 17: Metodologia sintética para a preparação de derivados da associação.....	58
Esquema 18: Reação do malondialdeído com ácido tiobarbitúrico.....	60
Esquema 19: Reação da 2,2-difenil-1-picrilhidrazil com derivados fenólicos.....	61
Esquema 20: Reação da 2,2-azobis -amidinopropano -dihidrocloridrato com derivados fenólicos.....	61
Esquema 21: Reação da 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio (ABTS) com persulfato de potássio e formação do $ABTS^{1+}$ e $ABTS^{2+}$	62
Esquema 22: Síntese do derivado <i>p</i> -acetamidafenol.....	86
Esquema 23: Síntese do derivado ácido 5-acetamidosalicílico	88
Esquema 24: Síntese do derivado ácido 5-benzamidosalicílico	89
Esquema 25: Formação do radical hidroxil e oxidação da vitamina C pelo sistema Fe/ H_2O_2 ...	105
Esquema 26: Mecanismo redox detoxificador das vitaminas E e C.....	106
Esquema 27: Mecanismo redox da vitamina C.....	106
Esquema 28: Mecanismo de oxidação do ácido salicílico.....	108
Esquema 29: Mecanismo de formação e seqüestro de radicais gerados pelo AAPH.....	113
Esquema 30: Mecanismo de inibição da ciclooxigenase e peroxidase.....	119

LISTAS DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Estrutura do Cpd I modelo simplificado do Citocromo P-450.....	25
Figura 2: Estrutura dos complexos ferro-hidrato (I), ferro-peroxil (II), ferro-peroxila (II), ferro-hidroperóxido (IV), ferroxeno (V) e ferro-hidroxil (VI).....	25
Figura 3: Modelo para o sítio ativo da prostaglandina endoperóxido sintase.....	34
Figura 4: Reação de transacilação entre derivados acílicos da aspirina e serina 530 da PGES...	35
Figura 5: Estruturas químicas do paracetamol, ácido salicílico e ácido 5-amino-salicílico.....	38
Figura 6: Derivados utilizados nos estudos de modelagem molecular.....	55
Figura 6: Derivados utilizados nos estudos de modelagem molecular (continuação).....	56
Figura 7: Derivados do paracetamol e ácido salicílico selecionados.....	57
Figura 8: Paracetamol e derivados monometilados.....	70
Figura 9: Paracetamol e derivados fluorados.....	72
Figura 10: Paracetamol e derivados 3,5-dissubstituídos.....	75
Figura 11: Gráficos de HOMO para derivados do paracetamol 3,5-dissubstituídos obtidos com o método semiempírico PM3.....	77
Figura 12: Estrutura de derivados fenóis-éteres do paracetamol.....	78
Figura 13: Derivados do <i>p</i> -aminofenol e ácido salicílico selecionados por modelagem molecular.....	81
Figura 14: Proposta de estrutura, reações e formação de derivados hidroxilados do ácido salicílico.....	82
Figura 15: Estrutura, numeração e cálculo de densidade de spin para o ácido salicílico e seus derivados.....	83
Figura 16: Estrutura química dos derivados fenólicos.....	91
Figura 17: Orbital molecular ocupado de mais baixa energia de nove derivados fenólicos (S1-S9) obtidos pelo método semiempírico PM3.....	96
Figura 18: Compostos fenólicos usados no estresse induzido pelo sistema Fe/H ₂ O ₂	102
Gráfico 1: Avaliação seqüestrante de radicais livres	92
Gráfico 2: Estresse Oxidativo em Eritrócitos Humanos Induzido pelo peróxido de hidrogênio.....	98
Gráfico 3: Estresse Oxidativo em Eritrócitos Humanos.....	103
Gráfico 4: Níveis de Hemólise Induzida por AAPH.....	110
Gráfico 5: Níveis de Hemólise Induzida por AAPH.....	111
Gráfico 6: Inibição dos Níveis de TBARS em Plaquetas Humanas.....	117

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades dos derivados monometilados do paracetamol.....	71
Tabela 2: Propriedades dos derivados fluorados do paracetamol.....	73
Tabela 3: Matriz de correlação entre atividade analgésica e propriedades físico-químicas de derivados fluorados do paracetamol.....	74
Tabela 4: Matriz de correlação entre hepatotoxicidade e propriedades físico-químicas de derivados fluorados do paracetamol.....	74
Tabela 5: Propriedades de derivados 3,5-dissubstituídos do paracetamol.....	76
Tabela 6: Propriedades dos derivados éteres e fenóis do paracetamol.....	79
Tabela 7: Matriz de correlação entre atividade analgésica e propriedades físico-químicas de derivados derivados éteres e fenóis do paracetamol.....	80
Tabela 8: Propriedades físico-químicas teóricas dos derivados do <i>p</i> -aminofenol e ácido salicílico.....	81
Tabela 9: Deslocamento químico de hidrogênios e carbonos do composto S3 no RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C (300 MHz e 75 MHz; Acetona).....	87
Tabela 10: Deslocamento químico de hidrogênios e carbonos do composto ácido 5-acetamidosalicílico S5 no RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C (300 MHz e 75 MHz; DMSO).....	88
Tabela 11: Deslocamento químico de hidrogênios e carbonos do composto S5 no RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C (300 MHz e 75 MHz; DMSO).....	90
Tabela 12: Capacidade antioxidante, HOMO e potencial de ionização de derivados fenólicos.....	93
Tabela 13: Atividade antioxidante, capacidade antioxidante e propriedades teóricas de derivados fenólicos.....	104
Tabela 14: Propriedades teóricas das vitaminas E e C.....	107
Tabela 15: HOMO e PI para o ácido salicílico e seus derivados hidroxilados.....	108
Tabela 16: Propriedades físico-químicas teóricas dos derivados do <i>p</i> -aminofenol e ácido salicílico.....	115

RESUMO

Três derivados do *p*-aminofenol e salicilatos foram sintetizados e sua atividade antioxidante avaliada e comparada com o paracetamol, ácido salicílico e trolox. Em um esforço para desenvolver derivados de salicilatos como antioxidantes, o farmacóforo antioxidante do paracetamol foi associado ao ácido salicílico.

A estratégia sintética geral empregada para preparar os compostos alvos foi baseada na acilação ou benzoilação do *p*-aminofenol ou ácido 5-amino-salicílico com cloreto do benzoíla ou anidrido acético, formando o *p*-benzamidafenol, ácido 5-acetilamido-2-hidroxibenzóico e ácido 5-benzamido-2-hidroxibenzóico, respectivamente, com rendimento 80-90%. Dados de RMN de H^1 e C^{13} foram usados para determinar a estrutura dos produtos derivados da reação.

O estudo teórico do metabolismo do ácido salicílico usando cálculos de química quântica pela teoria do funcional de densidade no nível B3LYP, com a base 6-31G*, empregada para obter a energia, o potencial de ionização e a distribuição da densidade de spin do ácido salicílico comparando com seus derivados fenol e ácido benzóico. Os resultados confirmam que a geração regioseletiva do ácido 2,5-dihidroxibenzóico pelo Citocromo P-450 e ácido 2,3-dihidroxibenzóico e catecol como derivados da reação seqüestrantes da atividade antioxidante.

Além disso, as atividades antioxidantes dos compostos foram comparadas com o potencial de ionização e o HOMO, calculados usando métodos TDF, para explorar a relação estrutura-atividade. Todos os cálculos foram executados usando os pacotes computacionais Gaussian 03, Hyperchem 7.5 e ChemOffice 2005.

A atividade antioxidante foi determinada pela medida da inibição dos níveis de TBARS na peroxidação lipídica em eritrócitos humanos iniciadas por Fe^{2+} e ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio e AAPH. Suas atividades seqüestrante de radicais livres foram avaliadas também, usando um radical livre estável, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Infelizmente, o modelo da inibição da PGES não foi capaz de quantificar o efeito biológico nas plaquetas humanas.

Os derivados contendo benzoil exibiram uma inibição mais potente de atividade anti-radical livre na peroxidação lipídica e capacidade seqüestrante na DPPH do que o grupo contendo acetil. O *p*-benzamidafenol é o mais ativo dos compostos, sendo mais potente que o paracetamol na inibição da peroxidação lipídica. Enquanto que os compostos da associação molecular, o ácido 5-acetilamido-2-hidroxibenzóico e ácido 5-benzamido-2-hidroxibenzóico são mais potentes que o ácido salicílico nas mesmas circunstâncias. Simultaneamente, o método DFT forneceu um valor de potencial de ionização que explicou a relação estrutura-atividade. Os resultados mostram que para associação molecular dos novos derivados, a inibição de TBARS e de DPPH aumenta desde que o potencial de ionização e o HOMO diminuam, quando comparado ao ácido salicílico.

ABSTRACT

Three *p*-aminophenol and salicylate derivatives were synthesized and their antioxidant activities were evaluated and compared to paracetamol, salicylic acid and trolox. In an effort to develop the salicylate derivatives as antioxidant, the paracetamol antioxidant pharmacophore was associated to the salicylic acid.

The general synthetic strategy employed to prepare the target compounds was based on the acylation or benzylation of *p*-aminophenol or 5-amine-salicylic acid with benzoyl chloride or acetic anhydride to give *p*-benzamidephenol, 5-acetylamino-2-hydroxy-benzoic acid, and 5-benzoylamino-2-hydroxy-benzoic acid, respectively, in 80-90% yield. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra analyses were used to determine the structure of the new product derivatived from the reaction.

The theoretical study of the salicylic acid metabolism using quantum chemistry calculations at the B3LYP theory level, together with the 6-31G* basis set, were employed to obtain energy (E), ionization potential (IP), and spin-density distribution of the salicylic acid and its derivatives phenol and benzoic acid. This results supported the 2,5-dihydroxybenzoic acid generation by cytochrome P-450 and 2,3-dihydroxybenzoic acid and catechol as scavengers derivatives in antioxidant activity.

In addition, was evaluated their antioxidant activities and the ionization potential and HOMO of the compounds have been calculated using the density functional theory (DFT) method at the B3LYP level, employing the 6-31G(d) basis set, to explore the structure-activity relationship. All calculations have been performed by using the Gaussian 03 program, Hyperchem 7.5, and ChemOffice 2005.

The antioxidant activity was determined measuring the inhibition of lipid peroxidation initiated using TBARS level by Fe²⁺ and L-ascorbic acid, hydrogen peroxide, and AAPH in human erythrocytes. Their radical scavenging activities were also evaluated using a stable free radical, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Unfortunately, the model of PGES-inhibition was not capable to quantify the effect biological in platelets.

Benzoyl derivatives exhibited more potent inhibition of lipid peroxidation and DPPH radical scavenging activities than acetyl moiety. The most active compounds *p*-benzamidephenol is more potent than paracetamol in the inhibition of lipid peroxidation. Compounds 5-acetylamino-2-hydroxy-benzoic acid, and 5-benzoylamino-2-hydroxy-benzoic acid are more potent than salicylic acid in the same conditions. Simultaneously, the DFT method can provide an ionization potential value to explain the structure-activity relationship. The results shown that molecular association for the new derivatives, increased TBARS and DPPH inhibition and less ionization potential value, compared with salicylic acid.

1. INTRODUÇÃO:

1.1. DERIVADOS DO *p*-AMINOFENOL:

Os efeitos farmacológicos do paracetamol (PAR) são muito discutidos, mas o provável mecanismo está baseado na inibição da prostaglandina sintase (BESSEMS & VERMEULEN, 2001). Em níveis terapêuticos, o PAR é considerado seguro para humanos, no entanto, quando usado em doses altas pode desenvolver um quadro de hepatite medicamentosa e óbito em poucos dias (THOMAS, 1993).

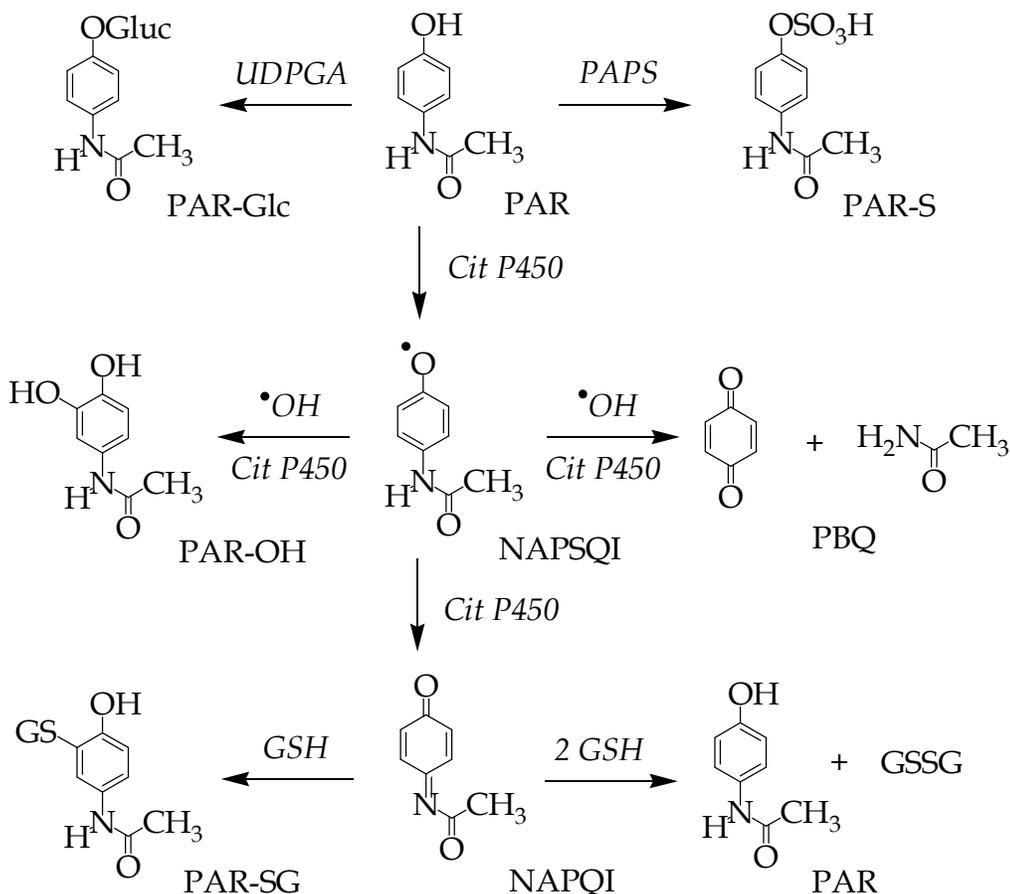
Este fármaco apresenta fórmula e peso molecular $C_8H_9O_2$ e 151,16g/mol, respectivamente. A solubilidade de 1g da substância em 70mL de água e 50mL de clorofórmio a 25°C, caracteriza-o como uma molécula de média polaridade. Enquanto que seu pKa de 9,51 é estável entre pH 4 e 7 a 25°C, demonstrando sua natureza fracamente ácida. A substância química é estável à temperatura, luz e umidade (THE MERCK INDEX, 1996).

1.1.1. Farmacocinética do Paracetamol:

A absorção de doses terapêuticas do PAR é normalmente completa, a biodisponibilidade sistêmica e a meia-vida de eliminação é aproximadamente 75% em 1,5 a 2,5 horas, respectivamente (BESSEMS & VERMEULEN, 2001).

Os metabólitos urinários do PAR já identificados são formados das reações de glucuronidação e sulfatação, constituindo-se nas principais vias de biotransformação. A formação destes conjugados, PAR-sulfato (PAR-S) e PAR-glucuronídeo (PAR-Glc), são mediadas pelas enzimas uridina difosfato do ácido glucurônico (UDPGA) e fosfoadenosil-fosfosulfato (PAPS), respectivamente, por serem os produtos mais solúveis em água que o composto químico original são excretados principalmente pela via urinária (ambos) e uma pequena parte pela via biliar (PAR-Glc) (THOMAS, 1993; GODEJOHANN *et al.*, 2004; JENSEN *et al.*, 2004) (Esquema 1).

Esquema 1: Principais vias de biotransformação do paracetamol



Fonte: Adaptado com modificações de Thomas, 1993.

Aproximadamente 30 e 55% do PAR administrado são excretados na urina como PAR-S e PAR-Gluc, respectivamente. Entretanto, em vários animais de laboratório, uma quantidade pequena de PAR é metabolizada por um terceiro caminho, isto é, a oxidação pelo sistema microsossomal via citocromo P-450 (Cit P-450), enzima contendo uma oxidase de função mista, formando a *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI) (TONE *et al.*, 1990).

Uma reação de oxidação secundária, através da hidroxilação, formando o 3-hidroxiacetaminofeno (PAR-OH) provavelmente ocorra no homem, uma vez que esta molécula foi encontrada na urina de pacientes que tomaram uma overdose de PAR (KNOX & JURAND, 1977). É possível que a prostaglandina endoperóxido sintase e mieloperoxidase, tenham a habilidade de biotransformar o PAR também

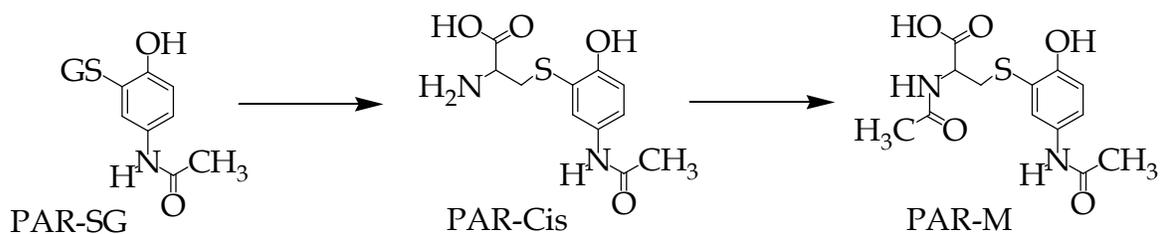
em humanos por ter sido demonstradas em modelo animal e enzimas com atividade peroxidase (BESSEMS & VERMEULEN, 2001).

A indução da toxicidade do PAR está clara em animais de laboratório em espécies como rato, hamster ou cachorro. Além dos metabólitos humanos, vários outros foram encontrados na urina, como o 3-tiometil-paracetamol (inclusive as formas de sulfato, glucuronídeo e sulfona), *p*-aminofenol, ácido mercaptúrico e conjugados de *p*-benzoquinona (PBQ) (LUBEK *et al.*, 1988).

As enzimas do Cit P-450 são as mais importantes biotransformadoras de fármacos no fígado, estando presentes na maioria dos outros tecidos do corpo, portanto, pode-se esperar que elas sejam mediadoras da bioativação oxidativa do PAR (VERMEULEN *et al.*, 1992; HINSON *et al.*, 1995; NELSON, 1995).

É consenso que a NAPQI é o principal reagente metabólico eletrofílico formado pela biotransformação oxidativa do PAR tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MINER & KISSINGER, 1979; HINSON *et al.*, 1981). Embora seja difícil sua caracterização direta em sistemas *in vitro* (DAHLIN *et al.*, 1984), muitos mecanismos para sua formação foram propostos e identificados (BESSEMS *et al.*, 1997 e 1998), sendo o principal através da conjugação com glutathiona via adição 1,4 de Michael, obtendo-se o correspondente conjugado de cisteína e mercapturato (PAR-Cis e PAR-M) (Esquema 2).

Esquema 2: Formação do paracetamol-cisteína e paracetamol-mercapturato (Thomas, 1993).



Além disso, PAR-OH, PBQ e acetamida, foram isolados como metabólitos do PAR dependente do Cit P-450, derivados da NAPQI (FORTE *et al.*, 1984). HOFFMANN *et al.* (1985) e MYERS *et al.* (1994), usaram os métodos de espectroscopia de ressonância de spin (ERS) para determinar a interação do PAR

no sítio ativo de enzimas de Cit P-450, com a finalidade de sustentar esta interpretação mecanística. No entanto, a *N*-acetil-*p*-benzosemiquinona imina (NAPSQI) foi indiretamente determinada por VAN DE STRAAT *et al.* (1987), através do sinal melaminico observado através de ERS pela redução da NAPQI catalisada do pelo Cit P-450.

Até o momento, evidências diretas apontam para a existência do radical semiquinona imina, intermediando a catálise oxidativa do paracetamol e análogos substituídos pelo Cit P-450 quando as drogas são administradas em altas doses. Conseqüentemente, qualquer discussão com relação à relevância da NAPSQI no mecanismo de toxicidade de traços de PAR dependente Cit P-450 é especulativa (BESSEMS *et al.*, 1998; YANG & BEARD, 2006; MOFFIT *et al.*, 2007).

Embora uma grande variedade de xenobióticos possam ser bioativados por uma ou mais enzimas da superfamília Cit P-450, outras enzimas podem estar envolvidas na biotransformação do PAR, como as peroxidases, incluindo mieloperoxidase, cloroperoxidase e lactoperoxidase (POTTER & HINSON, 1989) e prostaglandina endoperoxídeo sintase (PGES) (HARVISON *et al.*, 1988). Estas foram encontradas em quase todos os tecidos de mamíferos investigados (ELING & CURTIS, 1992).

Nos glóbulos brancos, por exemplo, as mieloperoxidases demonstraram estar presente na bioativação de uma grande variedade de drogas. Em outros tecidos com baixa atividade de Cit P-450, a PGES, pode estar associada na bioativação do PAR, em locais como os rins, onde a toxicidade do PAR pode resultar da ativação por esta enzima (PIRMOHAMED *et al.*, 1996).

1.1.2. Farmacodinâmica do Paracetamol:

A atividade inibitória do PAR sobre a ciclooxigenase (COX) pode estar relacionada a sua capacidade de reagir com o radical tirosil presente na PGES (KULMACZ *et al.*, 1991), tendo em vista que análogos monometilados do PAR são

capazes de inibir PGES (HARVISON *et al.*, 1988). Derivados com substituições no anel benzeno por átomos de flúor adjacentes aos grupos hidroxil e amida ou presentes no grupo metila da acetamida, podem apresentar uma variação na atividade analgésica tanto *in vivo* quanto *in vitro*, mas apresentam a capacidade de inibição da COX. A coplanaridade do grupo acetamida com o anel fenila é importante na capacidade de inibição da desta enzima por análogos de PAR (BARNARD *et al.*, 1993; BESSEMS *et al.*, 1995). O segundo local de ação do PAR e seus derivados é a inibição da peroxidase ou hidroperoxidase, que catalisa a redução do hidroperóxido-endoperóxido (PGG₂) para o álcool hidróxido-endoperóxido (PGH₂), atividade esta exibida por todas as peroxidases (MOLDÉUS *et al.*, 1982; KULMACZ *et al.*, 1994).

Como a função peroxidase é uma das atividades de PGES, foi investigado o mecanismo de ativação do PAR usando peroxidases específicas, onde as possíveis relações de estrutura-atividade como, potencial de oxidação, influência da coplanaridade entre a cadeia lateral *N*-acetil e o anel fenol, bem como os aspectos de solubilidade como o coeficiente de partição para vários análogos do paracetamol (BESSEMS & VERMEULEN, 2001). Entretanto, tanto a atividade quanto da toxicidade do paracetamol resulta de sua interação com enzimas ferro-porfirínicas e seu metabolismo via citocromo P-450.

1.1.3. Metabolismo de Drogas Via Citocromo P-450:

O citocromo P-450 foi descoberto no final dos anos de 50 (KLINGENBERG, 1958; GARFINKEL, 1958). O termo Cit P-450 se refere a uma superfamília de enzimas heme-tiolato onde o complexo Fe⁺²-CO apresenta uma absorção no espectro com o máximo de 450 nm. Uma diversidade de isoenzimas tem sido encontrada em praticamente todos os organismos, incluindo bactéria, fungos, leveduras, plantas, insetos, peixes e mamíferos. Todos os genes Cit P-450 provavelmente evoluíram de genes comuns, que existiam antes da separação de procarióticos e eucarióticos (NELSON *et al.*, 1996).

Devido ao grande número de enzimas Cit P-450, um sistema padrão de nomenclatura foi desenvolvido. As enzimas foram organizadas com base na identificação da seqüência de proteínas e nomeadas CYP, representando o citocromo P-450, seguido pelo número denotando a família, uma letra designando a subfamília e o segundo número representando a enzima individual. O correspondente nome do gene escrito em itálico. As enzimas que tem uma seqüência de aminoácidos identificados > 40% são consideradas como pertencentes de alguma família, enquanto que enzimas com seqüência identificada > 55% são de alguma subfamília (NELSON *et al.*, 1996).

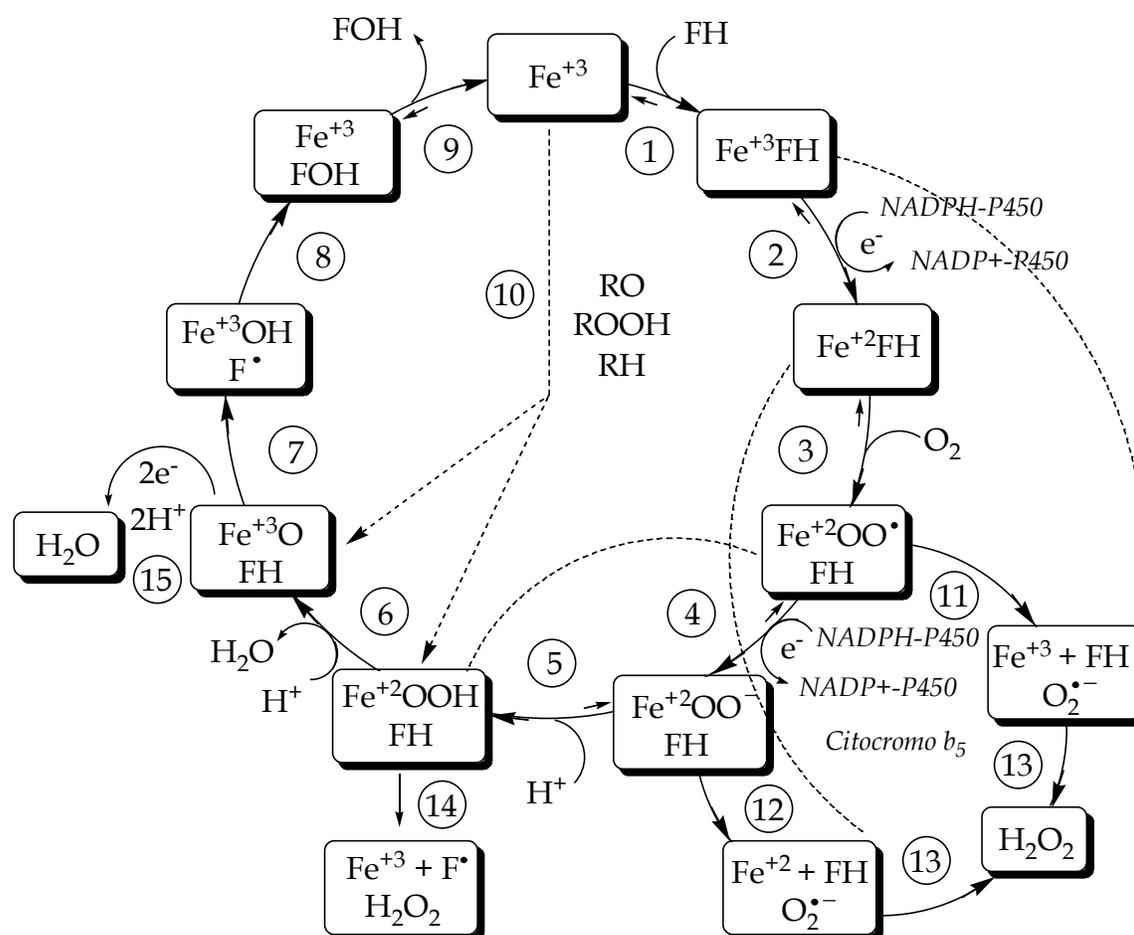
As enzimas Cit P-450 possuem duas principais funções (NELSON *et al.*, 1996; PARKINSON, 1996). Elas estão envolvidas na biossíntese, bioativação e metabolismo de compostos endógenos, como ácidos graxos, hormônios esteróides, vitaminas, ácidos biliares e eicosanóides. E estão também envolvidos no metabolismo de compostos químicos estranhos e fármacos, que após conversão em moléculas mais polares, são excretados diretamente ou conjugados por outras enzimas, que devido a sua solubilidade em água, são eliminados por excreção urinária. Algumas dessas reações do Cit P-450 formam moléculas bioativas mais tóxicas com propriedades citotóxicas ou cancerígenas (PARKINSON, 1996; GUENGERITH & SHIMADA, 1998).

As enzimas de Cit P-450 estão localizadas na célula principalmente no retículo endoplasmático e no interior da membrana mitocondrial. A mitocôndria aloja varias enzimas Cit P-450 envolvidas na biossíntese e metabolismo de hormônios esteróides, ácidos biliares e vitamina D (PARKINSON, 1996).

O mecanismo catalítico do Cit P-450 microsomal mediando a monooxigenação é mostrado no Esquema 3. Na etapa 1, o ciclo catalítico começa com a ligação do substrato ao ferro da enzima na forma férrica. A etapa 2 ocorre quando o complexo é reduzido pela transferência de um elétron via NADPH-Citocromo P-450 redutase, formando o complexo reativo ferroso-substrato. Na etapa 3, o oxigênio molecular se liga ao complexo enzima-substrato reduzido. A etapa 4 vem em seguida, pela introdução de um segundo elétron, transferido via

NADPH-Citocromo P-450 redutase ou Citocromo-b₅, formando o complexo ferro-peroxila-substrato. A etapa 5 envolve a adição de um próton formando o complexo ferro-hidroperóxido-substrato. Na etapa 6, temos a adição de um segundo próton e o complexo formado sofre uma clivagem homolítica da ligação FeO-OH₂ na etapa 7 com a liberação de uma molécula de água, formando o complexo ferroxeno-substrato. Na etapa 8, o grupo ferroxeno retira um elétron e um próton ou um hidrogênio radical do substrato, formando o complexo ferro-hidroxil-substrato radical livre. Finalmente, na etapa 9 o grupo hidroxil reage com o substrato radical livre, o produto oxidado é liberado e a forma férrica da enzima é regenerada (GUENGERITH, 1991 e 1998; SCHLICHTING *et al.*, 2000).

Esquema 3: Mecanismo catalítico da monooxigenação via P-450 microsossomal. FH = fármaco.



Fonte: Adaptado de Guengerith, 1991 e Schlichting *et al.*, 2000.

A etapa 10 ocorre em sistemas experimentais, quando compostos contendo oxigênio substituem e convertem o íon ferro em um complexo ferro-oxigênio de

alta valência. Algumas dessas reações são relevantes, porém não muito usuais fisiologicamente nos sistemas biológicos (GUENGERICH & SHIMADA, 1998).

Nas etapas 11 e 12 podemos observar a formação das espécies reativas de oxigênio. O ânion superóxido liberado do sistema através da clivagem heterolítica e homolítica dos complexos ferro-peroxil-substrato e ferro-peroxila-substrato, com a concomitante formação dos complexos Fe^{3+} -substrato e Fe^{2+} -substrato, respectivamente. Os complexos Fe^{3+} -substrato e Fe^{2+} -substrato recebem elétrons e reagem com oxigênio novamente, ou seja, dependendo do substrato podemos ter um efeito pró-oxidante com a liberação de ânion superóxido. Na etapa 13 o ânion superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio através da enzima superóxido dismutase (GUENGERICH & SHIMADA, 1998).

Na etapa 14 observamos a formação de peróxido de hidrogênio, através de uma quebra heterolítica do complexo ferro-peróxido de hidrogênio, regenerando a forma férrica da enzima (GUENGERICH & SHIMADA, 1998).

O ferroxeno pode ser decomposto na etapa 15 pela incorporação de dois elétrons e dois hidrogênios, regenerando a forma férrica da enzima e liberando uma molécula de água (GUENGERICH & SHIMADA, 1998).

O citocromo P-450 catalisa muitos tipos de reações incluindo oxigenações, dehalogenação, dealquilação, deaminação, desidrogenação e isomerização. A reação de oxigenação é a mais importante. As enzimas Cit P-450 são geralmente chamadas de oxidase ou mooxidase de função mista, por incorporar um átomo de oxigênio molecular em um substrato (PARKINSON, 1996).

Os trabalhos de modelagem molecular têm utilizado com sucesso o Cpd I (Figura 1), um modelo simplificado contendo o ferroxeno em um grupo heme substituído por um aminoácido cisteína quelada ao ferro, dois alcenos e dois ácidos carboxílicos, para estudar a estrutura, reatividade química e mecanismo de reação do citocromo P-450 em diferentes estados de oxidação (SCHÖNEBOOM *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2006).

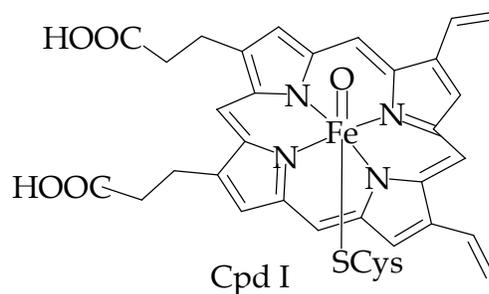


Figura 1: Estrutura do Cpd I modelo simplificado do Citocromo P-450 (Schöneboom *et al.*, 2000).

O citocromo P-450 apresenta cinco estados reativos principais além do complexo Fe-hidrato (I), os estados reativos são o Fe-peroxil (II), Fe-peroxila (III), Fe-hidroperóxido (IV), Ferroxeno (V) e Fe-hidroxil (VI) (Figura 2) (GUENGERICH *et al.*, 1991). Alguns apresentam alto e baixo spin como ferro-peróxido e ferroxeno. Com propriedades e afinidade por diferentes substratos, realizando reações de C-oxidação, epoxidação, X-oxidação e X-oxigenação (X=heteroátomos como halogênios, nitrogênio ou enxofre) (SCHÖNEBOOM *et al.*, 2000).

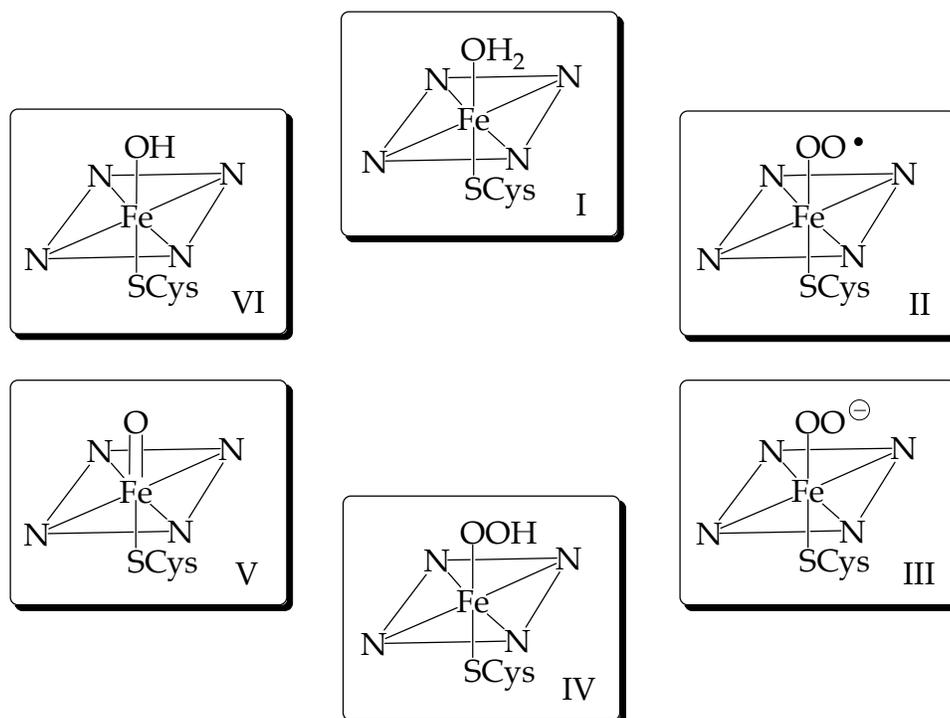
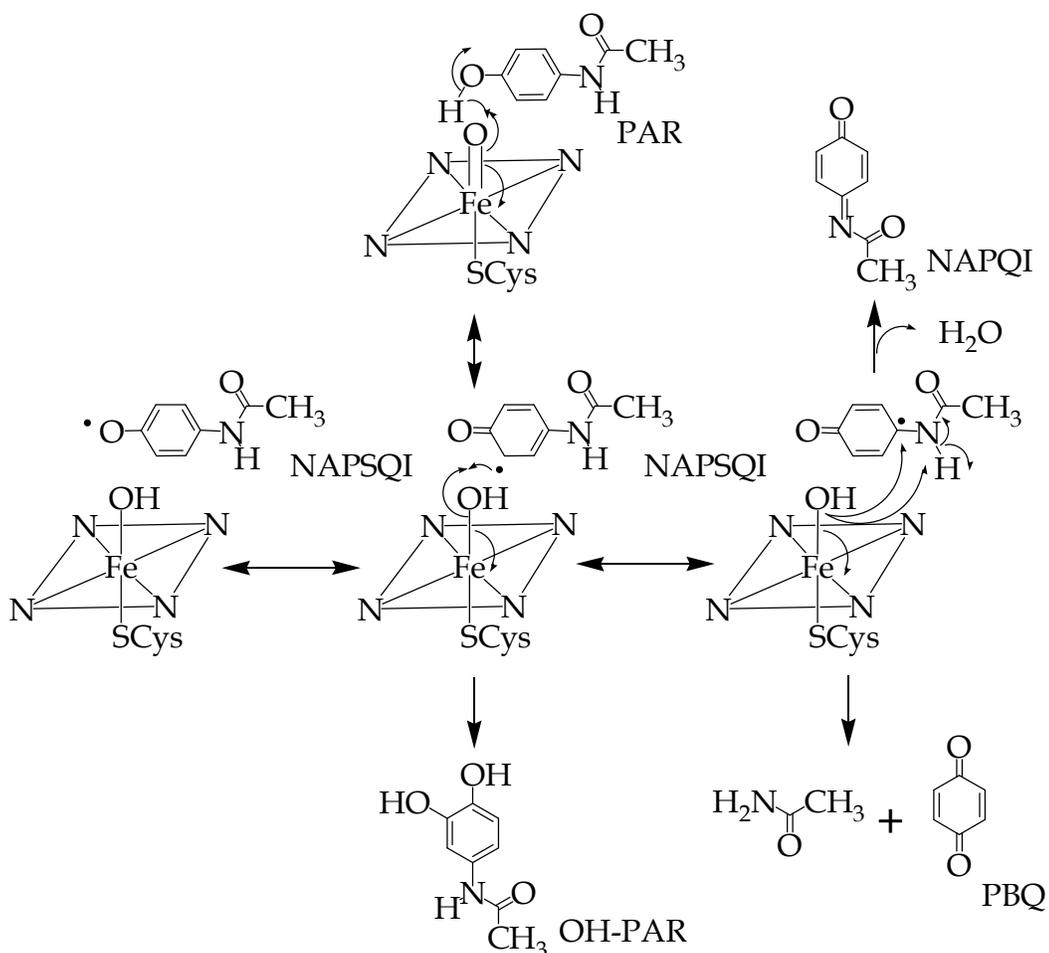


Figura 2: Estrutura dos complexos ferro-hidrato (I), ferro-peroxil (II), ferro-peroxila (III), ferro-hidroperóxido (IV), ferroxeno (V) e ferro-hidroxil (VI) (Schöneboom *et al.*, 2000).

A reação mais provável de formação dos metabólitos oxidados do PAR via Cit P-450 é através de um caminho radicalar, onde o ferroxeno inicialmente retira um hidrogênio fenólico, gerando a semiquinona, que apresenta uma deslocalização do elétron desempareado juntamente com a forma Fe-Hidroxil.

Esquema 4: Mecanismo catalítico da monooxigenação via P-450 microsomal do paracetamol



Fonte: Adaptado com modificações de Myers *et al.*, 1994.

O Fe-Hidroxil pode reagir através de três formas. A primeira pela recombinação do radical hidroxil com a *N*-acetil-*p*-benzosemiquinona imina (NAPSQI) na posição 3, formando 3-hidroxi-paracetamol (HO-PAR). A segunda forma, pelo ataque na posição 4, formando *p*-benzoquinona (PBQ) mais acetamida. E a terceira forma, pela abstração de um segundo hidrogênio do grupo amida formando a *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI), segundo o esquema 4 (KOYMANS *et al.*, 1989; MYERS, *et al.*, 1994).

1.1.4. Mecanismos de Toxicidade do Paracetamol:

Após a ingestão de uma dose tóxica de PAR, a principal consequência é a hepatotoxicidade centrolobular dependente de Cit P-450, observada pelo aumento dos níveis sorológicos de alanina aminotransferase (ALT), tanto no homem como em vários animais de laboratório (HINSON, 1980).

Os principais metabólitos tóxicos do PAR via bioativação do Cit P-450 são a NAPQI e NAPSQI, sejam como intermediário eletrofílico reativo ou espécie reativa radicalar de oxigênio, respectivamente (ALBANO *et al.*, 1985; VAN DE STRAAT *et al.*, 1988; DE VRIES, 1981; HINSON, 1990; BESSEMS *et al.*, 1998; HANNEMANN *et al.*, 2007).

Baixas quantidades de NAPQI são formadas com o uso terapêutico de PAR, mas na presença de glutatona reduzida (GSH), a NAPQI pode ser reduzida ao PAR, por um mecanismo de quimioproteção ou ligar-se covalentemente com GSH, gerando conjugados 3-glutationa-S-il-paracetamol (PAR-SG) sem efeito adverso significativo (VAN DE STRAAT *et al.*, 1986).

Nos casos de intoxicação aguda, quando o sistema Cit P-450 estiver induzido ou os níveis de GSH hepática estiverem diminuídos, os mecanismos de quimioproteção podem não compensar a produção aumentada de NAPQI, fato que tem sido evidenciado através da relação em que a redução mitocondrial dos níveis de GSH está diretamente correlacionada com a toxicidade hepática (VENDEMIALE *et al.*, 1996).

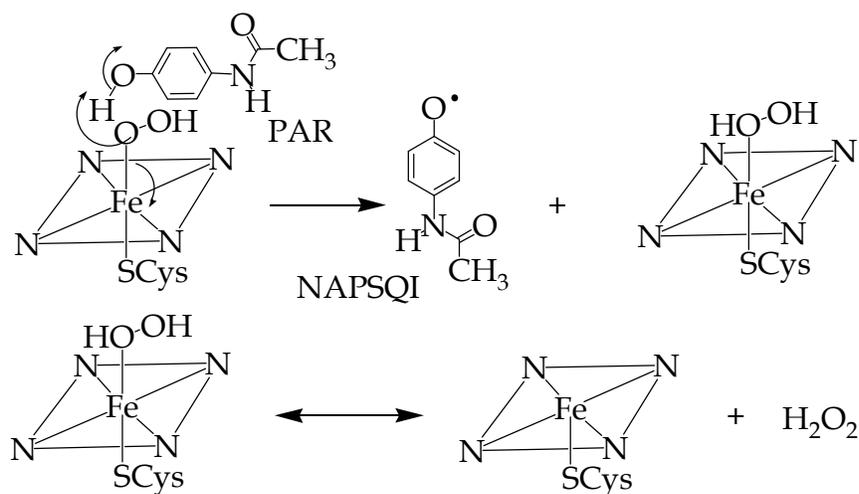
As vias mais prováveis de reação da NAPQI são as formações de adutos com proteínas (NELSON, 1995), oxidação de sulfidril de proteínas (TIRMENSTEIN & NELSON, 1990), ligação covalente com DNA no fígado e rins (HONGSLO *et al.*, 1994) e eventualmente, rompimento da homeostase celular. A overdose de PAR em ratos, camundongos e humanos, resulta em severa necrose hepática (VERMEULEN *et al.*, 1992) e renal (EMEIGH HART *et al.*, 1996).

Além disso, ratos apresentaram necrose de células bronquiolares (JEFFERY & HASCHEK, 1988) e adutos covalentes formados com proteínas (BARTOLONE *et al.*, 1989; WELLS *et al.*, 1995).

No homem, os efeitos hematológicos mais danosos foram encontrados, principalmente nas plaquetas, após a ingestão de grande quantidade de PAR (FISCHEREDER & JAFFE, 1994). Além disso, está comprovado que a exposição humana a repetidas doses por longo período de tratamento, ainda que terapêuticas, está correlacionada com o aumento do risco de doença renal crônica (SANDLER *et al.*, 1989).

Ratos submetidos ao consumo de etanol, com provável indução de CYP2E1, quando submetidos a altas doses de PAR, após o isolamento da fração microsomal hepática, apresentaram taxas de ligação com proteínas e conjugação com cisteína de 97% e 33%, respectivamente (ZHOU *et al.*, 1997).

Esquema 5: Mecanismo de formação de radical livre semiquinona do paracetamol via P-450.



Fonte: Adaptado com modificações de Goeptar *et al.*, 1995.

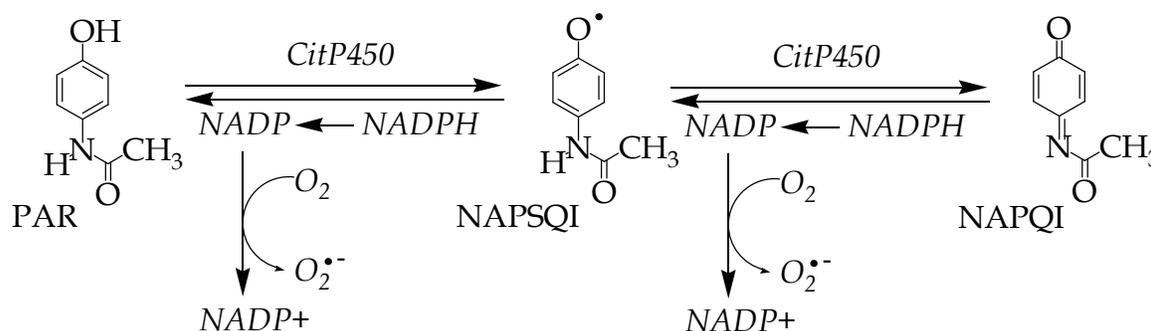
A ligação de proteína com NAPSQI pode ser favorecida sobre a conjugação com a cisteína e estas diferenças poderiam ser devido à formação de NAPSQI por CYP2E1. No mecanismo de formação de NAPSQI, apresentado no esquema 5, o complexo ferro-hidroperóxido do Cit P-450 pode captar um hidrogênio do PAR e liberar o radical NAPSQI e peróxido de hidrogênio, liberando a enzima na forma

livre (BESSEMS & VERMEULEN, 2001) por um mecanismo semelhante ao que ocorre em *peroxidase horseradish* (PORTER & HINSON 1987). Este mecanismo foi proposto para explicar a toxicidade do PAR através de um mecanismo via radical livre da NAPSQI (GOEPTAR *et al.*, 1995; MICHAEL *et al.*, 1999).

O estresse oxidativo mediado por espécie reativa de oxigênio como o peróxido de hidrogênio e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou pela ação oxidante direta de um metabólito reativo como NAPSQI na hepatotoxicidade induzida por PAR foi observado pela diminuição da proporção entre NADPH / NADP⁺ (KELLER; HINSON, 1991), GSH / GSSG (SUBRAHMANYAM *et al.*, 1987), ProtSH / ProtSSProt (ALBANO *et al.*, 1985).

No entanto, a redução de NAPQI formando NAPSQI pode ser devido à atividade do Cit P-450-reductase na presença de oxigênio, formando o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (GOEPTAR *et al.*, 1995). De igual modo, a forma NAPSQI pode oxidar a nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzido (NADPH) a nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato oxidado (NADP⁺), que por sua vez, reage com O_2 gerando o ânion $O_2^{\cdot-}$ (KELLER; HINSON, 1991), segundo mecanismo descrito no esquema 6.

Esquema 6: Redução de NAPQI / NAPSQI e geração do ânion $O_2^{\cdot-}$.



Fonte: Adaptado com modificações de Keller & Hinson, 1991.

A NAPQI pode oxidar grupos tiólico de cisteína presentes na GSH, para GSSG e formar ligações dissulfetos em proteínas (BIRGE *et al.*, 1991). O aumento da oxidação de grupos tiol das proteínas tem sido demonstrado em hepatócitos,

desempenhando um papel causal na toxicidade mediada pelo PAR (ADAMSON & HARMAN, 1993).

A oxidação de GSH por NAPQI pode ocorrer via *ipso*-ataque de GSH no carbono eletrofílico, como proposto por vários autores para NAPQI, como também na 2,6-dimetil-*p*-benzoquinona imina e 3,5-dimetil-*p*-benzoquinona imina (NELSON *et al.*, 1991). Portanto, o mecanismo de toxicidade do PAR pode ser tanto por ligação covalente através da NAPQI, quanto por estresse oxidativo através de NAPSQI (GIBSON *et al.*, 1996).

As condições fisiológicas e bioquímicas podem diferir de paciente para paciente, portanto, o uso de um ou mais ensaios celulares, como a atividade antioxidante ou pró-oxidante, são importantes para a obtenção de dados da exposição *in vivo* a substâncias indutoras de peroxidação lipídica, permitindo a seleção de candidatos a fármacos com um potencial de segurança terapêutica mais elevada na fase de descoberta e desenvolvimento (XU *et al.*, 2004). Compostos capazes de alterar a proporção entre as formas GSH /GSSG podem ser úteis na prevenção da hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol.

1.1.5. Quimioproteção contra a Toxicidade do Paracetamol:

O antídoto mais importante usado na clínica há muito tempo é a *N*-acetilcisteína (NAC; Fluimucil®) e a metionina, atuando por mecanismo de quimioproteção, pois são precursores da glutatona (GSH), uma vez que este tripeptídeo não é absorvido pelas células, apenas após a degradação aos aminoácidos correspondentes (PRESCOTT, 1983; THOMAS, 1993; JONES, 1998).

Várias combinações de compostos tiólicos aumentaram os níveis intracelulares de GSH, na seguinte ordem: *N*-acetilcisteína > tioprolina > cisteína > ácido 2-oxo-4-tiazolidina carboxílico > metionina. Contudo, somente a *N*-acetilcisteína, tioprolina e cisteína protegeram substancialmente a depleção de GSH induzida pelo PAR em hepatócitos humanos (LARRAURI *et al.*, 1987).

O tratamento de ratos intoxicados com PAR combinou NAC e cimetidina, um inibidor de oxidação metabólica P-450-dependente. Cerca de 2 h depois, os animais apresentaram uma taxa de 100% de sobrevivência e redução nos níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), quando comparados com a administração de NAC ou cimetidina, que causou somente uma melhora parcial destes parâmetros. O tratamento combinado pode ser útil desde que baixos níveis de NAC no plasma possam ser suficientes, minimizando o risco potencial da toxicidade induzida pelo PAR (THOMAS, 1993; AL-MUSTAFA *et al.*, 1997).

No entanto, compostos tiólicos como a *N*-acetilcisteína apresenta efetividade somente quando administrada logo após (algumas horas) a intoxicação por PAR (THOMAS, 1993). Isto porque a NAC pode ser a principal via de proteção contra a depleção de GSH e até certo ponto um co-fator para a conjugação sulfatada com NAPQI (BESSEMS & VERMEULEN, 2001).

1.1.6. Modificações Químicas do Paracetamol:

A toxidade do paracetamol motivou o desenvolvimento e estudo de homólogos e análogos mais seguros e muitos derivados foram desenvolvidos na tentativa de diminuir sua toxidade, mas mantendo suas propriedades terapêuticas.

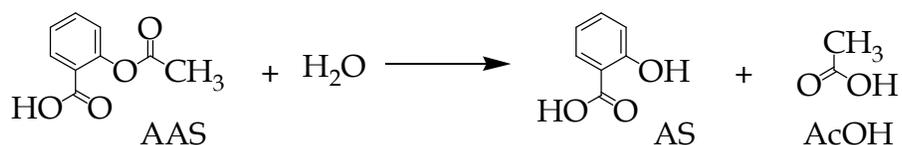
Entretanto, estes esforços não resultaram em novos compostos mais seguros, introduzidos no mercado farmacêutico, mas os estudos contribuíram para a obtenção de dados da relação entre estrutura química e atividade biológica do paracetamol e seus análogos e de seus prováveis mecanismos de ação biológica e toxicidade, resultados que serão analisados e discutidos neste trabalho, através da modelagem molecular dos trabalhos de HARVISON *et al.*, 1986; VAN DE STRAAT *et al.*, 1987; BARNARD *et al.*, 1993; BESSEMS *et al.*, 1995; DUFFY *et al.*, 2001; DINIZ *et al.*, 2004.

1.2. DERIVADOS DE SALICILATOS:

A aspirina ou ácido acetilsalicílico consiste em um grupo acetil esterificado ao grupo hidroxila fenólica do ácido salicílico. É o agente analgésico, antitérmico e antiinflamatório mais consumido no mundo (COUDRAY & FAVIER, 2000).

O ácido salicílico apresenta fórmula molecular $C_7H_6O_3$ e peso molecular de 138,12g/mol. A solubilidade de 1g da substância em 460mL de água e 15mL de clorofórmio a 25°C, caracterizando o composto como polar. O pKa de 2,4 a 25°C demonstra sua natureza ácida. Formado pela hidrólise gradual da aspirina e quando armazenada por longos períodos na presença de umidade libera o ácido acético, apresentando odor de vinagre, segundo mecanismo no Esquema 7 (THE MERCK INDEX, 1996).

Esquema 7: Reação de hidrólise do ácido acetil-salicílico (The Merck Index, 1996).



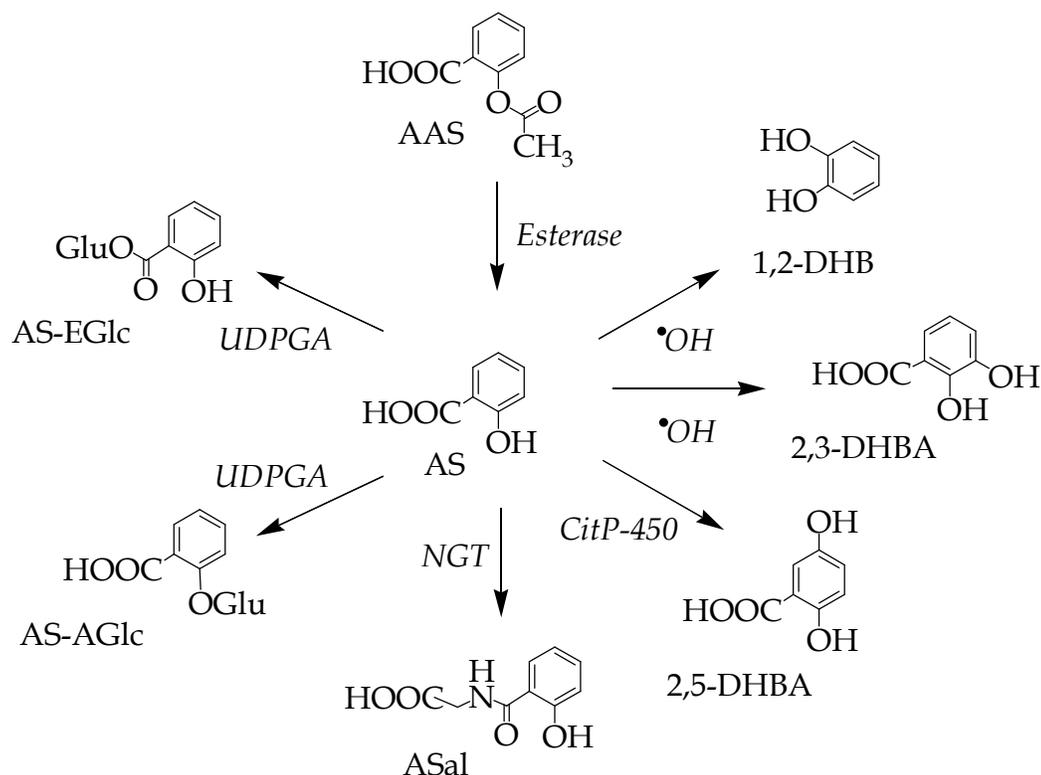
1.2.1. Farmacocinética dos Salicilatos:

Após a ingestão oral, uma quantidade substancial de AAS é hidrolisado ao ácido salicílico (AS) por esterases no tubo gastrintestinal, fígado e em menor extensão no soro (LEONARDS, 1962).

O salicilato alcança seu pico no plasma aproximadamente 0,5-1,5 h após a administração oral de AAS. O AS é metabolizado em maior quantidade pela conjugação com glicina, através da glicina *N*-acetilase (NGT) hepática formando o ácido salicílico (ASal), pela hidroxilação, através das hidroxilases microsossomais do fígado, formando o ácido gentísico e pela formação do glucuronídeo fenólico (AS-FGlu) e do acil-glucuronídeo (AS-AGlu). Aproximadamente 60% do salicilato remanescente não é modificado e podem reagir com HO[•] para produzir dois derivados, o ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHBA) e em menor extensão, o

catecol (Cat) (GROOTVELD & HALLIWELL, 1986; BLACKBURN *et al.*, 1998), produtos estes não relatados no metabolismo enzimático (Esquema 8).

Esquema 8: Principais vias de biotransformação dos salicilatos



Fonte: Adaptado de Coudray & Favier, 2000.

1.2.2. Inibição da Ciclooxygenase pela Aspirina:

A aspirina ou ácido acetil-salicílico acetila seletivamente o grupo hidroxila de um resíduo de Serina (Ser 530), entre os 70 aminoácidos terminais da cadeia da enzima PGES (ROTH, 1975). A acetilação conduz à inibição irreversível da função ciclooxygenase (COX) (Figura 3).

Após a purificação, apenas a COX está inibida, enquanto que a atividade da peroxidase permanece ativa. A estequiometria desta reação em baixas concentrações é 1:1, com um grupo acetil transferido de forma rápida e seletivamente para um monômero desta proteína dimérica. Em concentrações

elevadas, por período de tempo prolongado, o AAS também acetila, não especificamente, uma variedade de proteínas e ácidos nucleicos (SMITH, 1989 e 1991). A acetilação pelo AAS adiciona um substituinte volumoso na hidroxila da Ser 530, que inibe o acoplamento do ácido araquidônico (DE WITT, 1990).

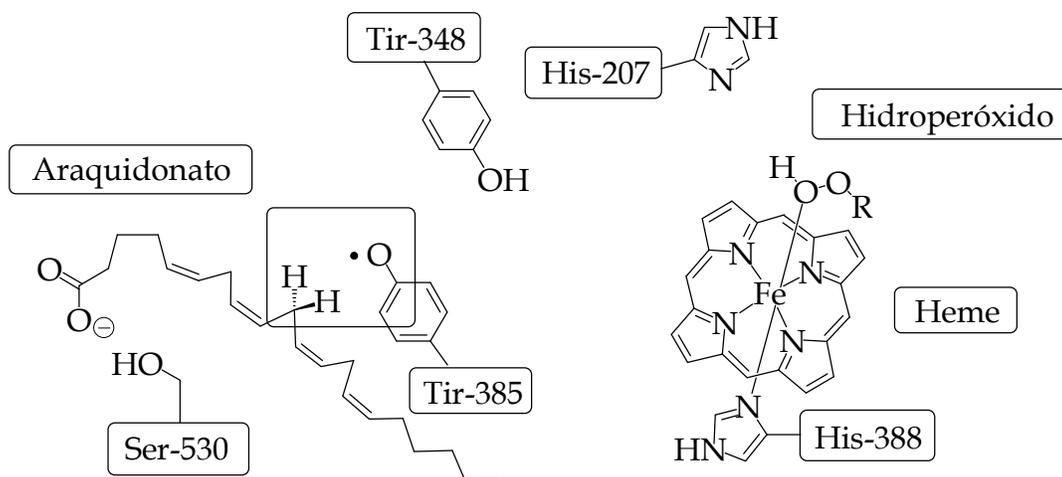
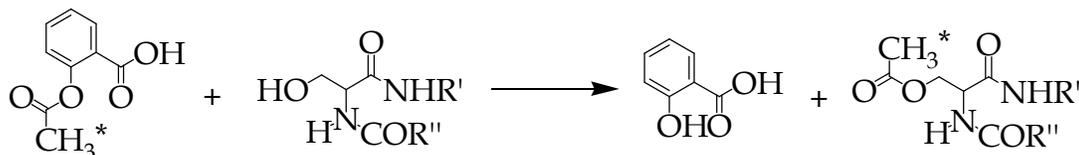


Figura 3: Modelo para o sítio ativo da prostaglandina endoperóxido sintase (Smith *et al.*, 1991).

1.2.3. Acetilação de Proteína Mediada pela Aspirina:

Plaquetas incubadas com AAS contendo o grupo acetil tritiado*, um agente acilante marcado, possibilitou a identificação de uma proteína aspirina-acetilada, encontrada na fração da membrana, embora concentrações mais elevadas de aspirina (100 μ M) e incubações mais longas (30-60 minutos) fossem requeridos para acetilação máxima (ROTH, (1975) (Esquema 9). A aspirina, através da ligação covalente modifica e inativa a síntese das prostaglandinas acetilando um único resíduo de serina da enzima PGES. A acetilação inibe seletivamente a atividade da oxigenase e a formação de PGG₂ a partir do ácido araquidônico. A consequência desta modificação é atualmente desconhecida, mas poderia relacionar-se a algum rompimento no acoplamento de outros cofatores necessários ao funcionamento da enzima (VANE & BOTTING, 2003).

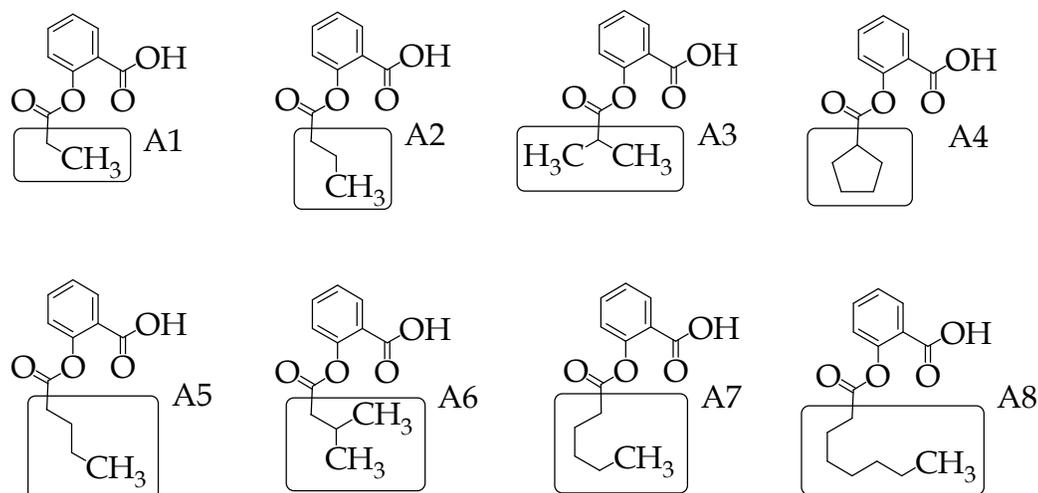
Esquema 9: Reação de transacilação entre aspirina-tritiada e serina 530 da PGES (Roth,1975).



1.2.4. Inibição Seletiva da PGES por Ésteres de Cadeia Longa:

Bhattacharyya *et al.* (1995) mostrou que quanto maior o grupo acila, menor a inibição para as duas isoenzimas de COX com homólogos esterificados da aspirina (A1-A8), indicando um possível impedimento espacial ou redução de reatividade química e diferenças estéricas entre as isoformas COX-1 e COX-2, onde os grupos mais volumosos favoreceram maior seletividade sobre a COX-2.

Figura 4: Novos derivados acílicos da aspirina.



Fonte: Adaptado de Bhattacharyya *et al.*, 1995.

1.2.5. Atividade Antiagregante Plaquetária dos Salicilatos:

As plaquetas humanas são pequenas e de forma discóide, com dimensões de aproximadamente 2,0-4,0 por 0,5 μm e são o segundo mais numerosos corpúsculos do sangue, circulando normalmente entre 150-450x10⁹/l. São células

anucleadas derivadas dos megacariócitos e circulam tipicamente por 10 dias (GEORGE *et al.*, 2000).

Sua forma e tamanho pequeno permitem serem empurradas para as bordas dos vasos, colocando-as na melhor posição requerida para estar constantemente em contato e garantir a integridade dos vasos. Apresentam um surpreendente aspecto multifuncional e estão envolvidas em muitos processos fisiopatológicos, como a hemostasia, trombose, retração do coágulo, constrição e reparo dos vasos, inflamação, incluindo a promoção da aterosclerose, defesa do hospedeiro e formação de metástase.

Todas estas respostas funcionam para formar rapidamente um tampão hemostático que oclui o local dos danos impedindo a perda do sangue (MICHELSON *et al.*, 2002) e quando há um defeito em alguma destas funções e/ou no número de plaquetas, pode haver um risco aumentado associado ao sangramento. Em contraste, um aumento no número de plaquetas ou a reatividade podem conduzir à formação imprópria de trombos. Os trombos arteriais podem formar-se também dentro das lesões ateroscleróticas (CLUTTON *et al.*, 2001).

A formação de trombos na artéria coronária é o principal evento no infarto do miocárdio (FALK *et al.*, 1985). A ruptura da placa ateromatosa e a formação subsequente do trombo ocorrem na maioria da síndrome coronariana aguda (DAVIES *et al.*, 1984).

A exposição do tecido endotelial, o ferimento profundo causado pela ruptura da placa, exposição do colágeno e fator de von Willebrand das plaquetas (DAVIES *et al.*, 1984), desencadeia a ativação local das plaquetas, estimulando a formação adicional de trombos, seguido pelo recrutamento adicional de plaquetas, levando a formação da trombina na superfície das células e liberação de ADP, serotonina e tromboxano A₂, todas estas substâncias são agentes pró-agregantes plaquetários e contribuem para o agravamento da resposta (SANTOS *et al.*, 1991).

O trombo se forma como agregado de plaquetas através da transformação do fibrinogênio em fibrina. A importância da ativação das plaquetas na síndrome coronariana aguda reforça os benefícios clínicos da desobstrução pelo tratamento com a aspirina nas estratégias preliminares e secundárias da prevenção de acidentes vasculares (CLUTTON *et al.*, 2001). Outros mecanismos bioquímicos podem ser utilizados na prevenção de acidentes vasculares, uma vez que a adesão das plaquetas ao endotélio é inibida por diversos mecanismos incluindo a produção endotelial de prostaciclina e óxido nítrico (DE GRAAF *et al.*, 1992). O óxido nítrico inibe a adesão e ativação plaquetária (COOKE *et al.*, 1990).

1.2.6. Resistência ao Tratamento com Salicilatos:

Estudos recentes sugerem que a agregação plaquetária em pacientes com doença coronariana e riscos de acidente vascular cerebral estejam relacionadas com a resistência ao tratamento com baixas doses de AAS, que não impedem a formação de trombos. Contudo, o mecanismo de resistência plaquetária ao AAS não está suficientemente entendido (CSISZAR *et al.*, 2002).

Embora a agregação plaquetária inibida pelo AAS ocorra primariamente pela COX, desta maneira decrescendo a síntese de metabólitos pró-agregantes do ácido araquidônico como TxA_2 , uma segunda via não enzimática foi identificada, na qual os derivados de isoprostanos oxidados a partir do ácido araquidônico exibiram potente ação vasoconstritora e efeito pró-agregante similar aos apresentados por TxA_2 (CSISZAR *et al.*, 2002).

Condições fisiopatológicas que promovam doença vascular aterosclerótica como hipercolesterolemia, diabetes, hiperhomocisteinemia, podem estar associadas com o aumento de espécies reativas de oxigênio, elevando os níveis plasmáticos de isoprostanos como uma hipótese para o aumento independente da formação de agentes pró-agregantes em plaquetas, contribuindo para a resistência ao AAS (CSISZAR *et al.*, 2002).

1.2.7. Atividade Anti-Radicalar de Salicilatos e Derivados do *p*-Aminofenol:

As espécies reativas de oxigênio são conhecidas pela contribuição no dano tecidual durante o fermento e a inflamação, a ativação da fosfolipase A2 e mobilização do ácido araquidônico, dependente ou não de Ca^{2+} e a participação de rotas alternativas como o estresse oxidativo no processo inflamatório (BALBOA & BALSINDE, 2006).

Os compostos fenólicos paracetamol (PAR), ácido salicílico (ACS) e ácido 5-amino-salicílico (5-ASA) (Figura 5), conhecidos por suas atividades antiinflamatórias foram avaliados como antioxidante e inibidores da peroxidação lipídica na busca de inibidores mais potentes da agregação plaquetária.

Estes compostos apresentaram diferentes reatividades com a 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e diferente capacidade de proteção na peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} /Ascorbato medida pelo nível de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os compostos exibiram também atividade seqüestrante contra radicais peroxil gerados pela decomposição da 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dicloridrato, um azo-inciador de radicais peroxil.

Os resultados mostraram que o 5-ASA apresentou uma inibição dependente da concentração similar ao trolox e cisteína, sugerindo uma atividade antioxidante por inibir a fase de propagação, enquanto que o PAR foi menos ativo e o ACS demonstrou uma fraca atividade. Estudo de relação estrutura e atividade mostraram que o grupo *para* amina aumenta o poder antioxidante e estabiliza o fenoxil radical formado, a *para* amida apresenta ressonância com a carbonila e grupo *orto* carboxilato não é um bom doador de elétrons (DINIS *et al.*, 1994).

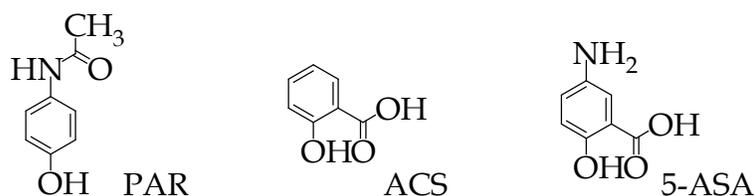


Figura 5: Estruturas químicas do paracetamol, ácido salicílico e ácido 5-amino-salicílico.

1.3. ESTRESSE OXIDATIVO:

1.3.1. Radicais Livres:

A ação de radicais livres sobre as membranas biológicas tem sido relacionada com eventos citotóxicos primários, que desencadeiam lesões celulares, acarretando transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de outras substâncias, perda da seletividade para a entrada ou saída de nutrientes, acúmulo de compostos tóxicos resultantes do metabolismo celular, alterações do DNA, oxidação da fração de ácidos graxos polinsaturados e comprometimento de substâncias que compõem a matriz extracelular, como proteoglicanos, colágeno e elastina (VACA *et al.*, 1988; BABER *et al.*, 1994).

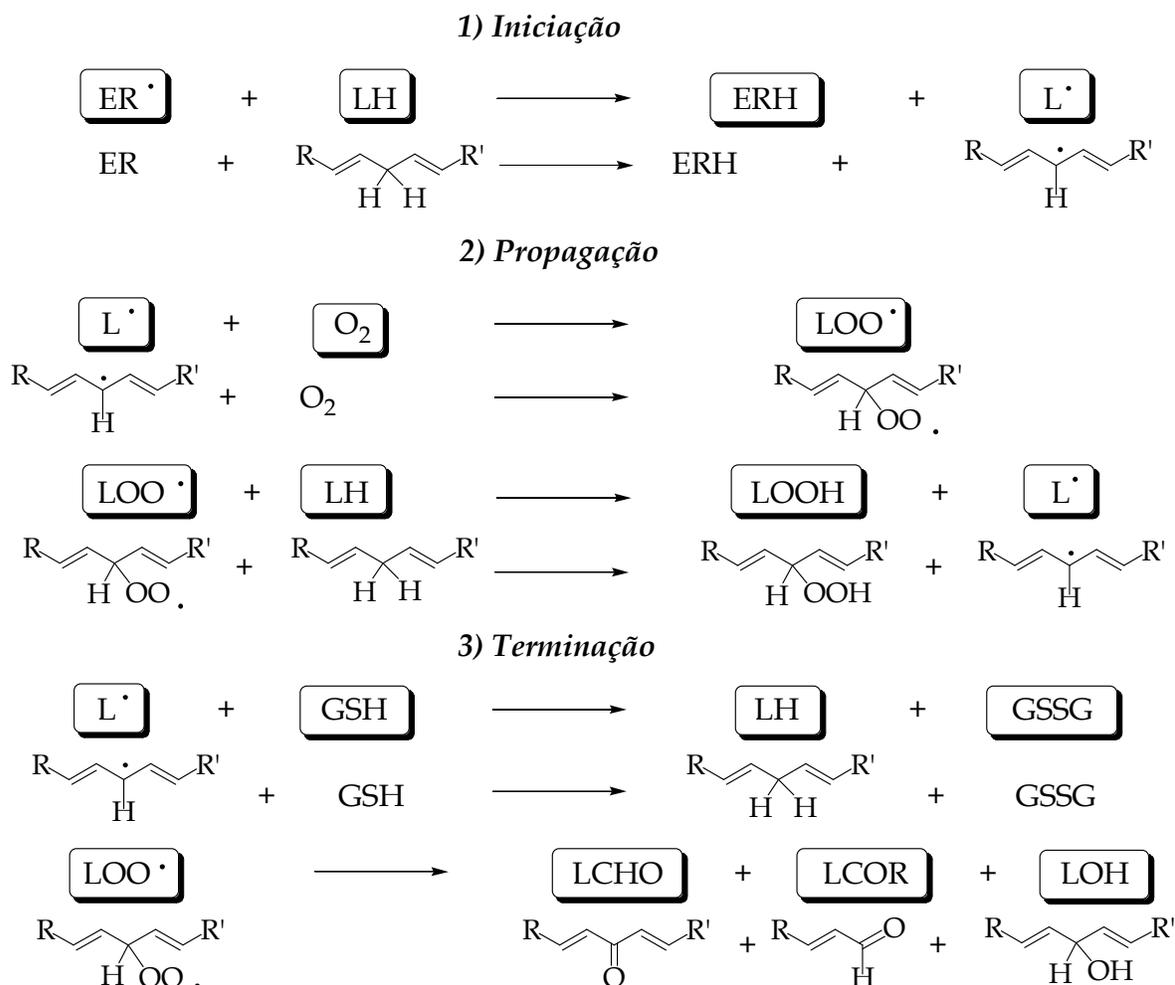
O oxigênio no estado ativado é um iniciador da oxidação de ácidos graxos polinsaturados, pois no estado fundamental se encontra no estado triplete, com dois elétrons não pareados de mesmo spin em diferentes orbitais. O estado singlete corresponde a um estado excitado e apresenta um par de elétrons na camada eletrônica externa ou um elétron em cada orbital com spins opostos e meia vida de 10^{-11} s, enquanto que o estado triplete é de 10^{-6} s. O estado singlete é menos estável, portanto mais reativo, restringindo a reação com o ácido graxo, somente pelo estado do oxigênio ou quando não está na forma de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil (HO^{\bullet}), oxigênio complexado ao ferro ou na clivagem homolítica dos hidroperóxidos mediado por ferro ou metais de transição (HSIEH *et al.*, 1989; DI MASCIO & KINSELLA, 1995).

1.3.2. Peroxidação Lipídica:

A peroxidação lipídica resulta na desorganização estrutural das membranas biológicas, resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando a destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de trocas metabólicas e finalmente, em condições irreversíveis, a morte celular, sendo responsável por diversas patologias, tais como aterosclerose,

câncer, processos inflamatórios, enfermidades neurodegenerativas e o processo de envelhecimento (BENZIE, 1996; HALLIWELL, 1992; MASUTANI, 2000).

Esquema 10: Reações de peroxidação lipídica com espécies reativas



Fonte: Porter *et al.*, 1995 (Com adaptações).

Como toda reação radicalar, a peroxidação lipídica, pode ser dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação (Esquema 10). As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são os iniciadores do processo de peroxidação lipídica (BENZIE, 1996). O ataque da espécie reativa (ER^\bullet) sobre o ácido graxo polinsaturado leva a abstração homolítica de um átomo de hidrogênio do grupo metileno, formando um radical de carbono (L^\bullet) razoavelmente estável, devido o efeito de ressonância dos alcenos vizinhos ou por rearranjo sigmatrópico [1,5] de hidrogênio. Em meio aeróbio, este composto se combina com o oxigênio

(O₂) formando o radical peroxila (LOO[•]), o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical (L[•]), promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio forma o hidroperóxido lipídico (LOOH) (PORTER *et al.*, 1995).

Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com a dupla ligação. Íons e metais de transição podem participar do processo, catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxila (LO[•]), peroxila (LOO⁻) e hidroxila (HO⁻) a partir dos hidroperóxidos. A última fase ocorre, quando os radicais livres são aniquilados por reação com a glutatona, dismutação ou clivagem, formando ligações covalentes com resíduos de aminoácidos ou rearranjos, formando grupos epóxidos (ROR), aldeídos (RCHO), cetonas (RCOR) e álcool (ROH) (CHAN, 1987). Estas reações fazem parte de um sistema de defesa celular contra a oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

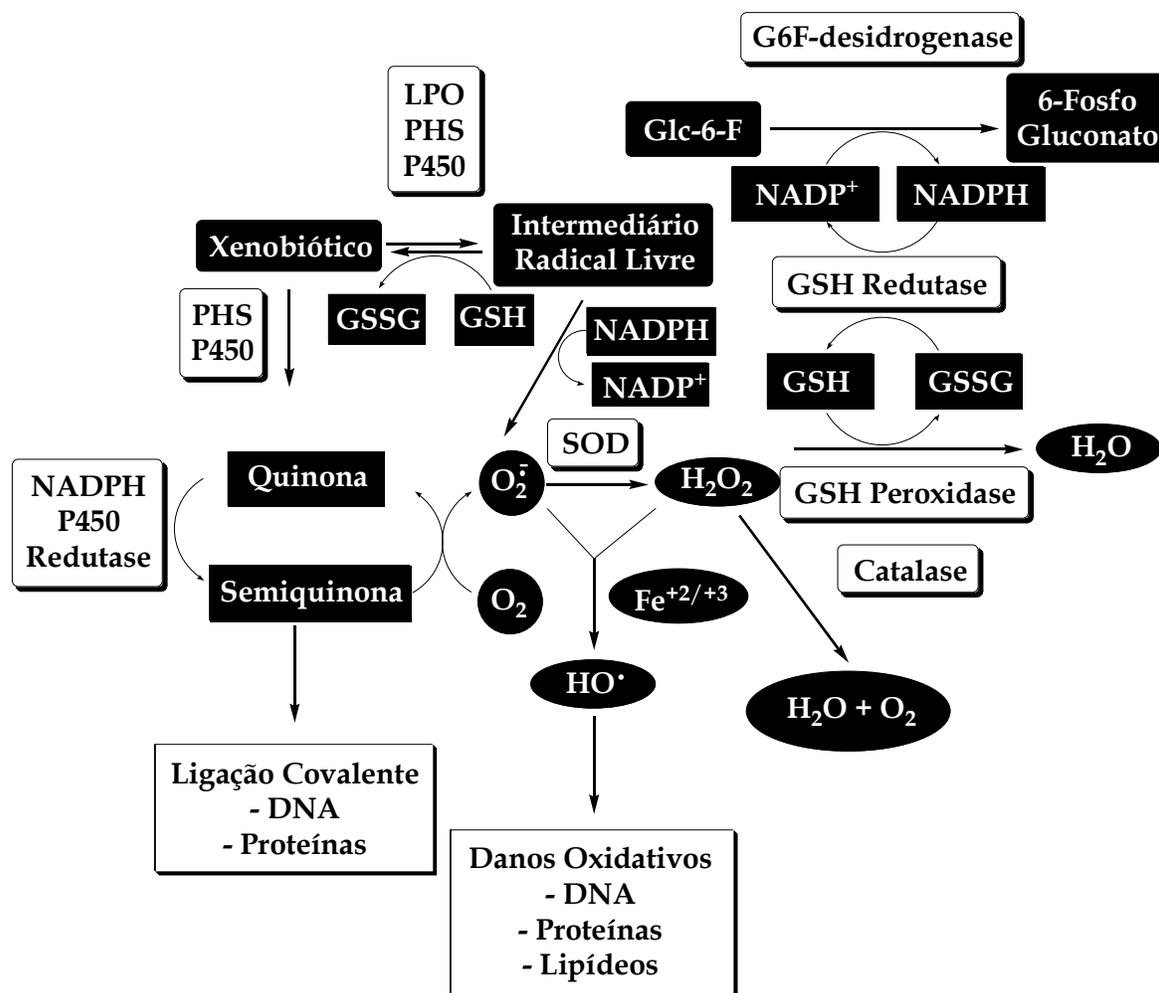
1.3.3. Sistema de Defesa Antioxidante:

A célula possui dois sistemas de defesa para proteger-se, que pode atuar inicialmente como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, constituída por glutatona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona-peroxidase (GSP) e vitaminas antioxidantes. O outro sistema de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutatona-redutase (GSR) e pela GSP, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FIERS *et al.*, 1999).

Existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante. As lesões pós-isquemia de coração, rim, fígado e intestino são prevenidas pela atividade da SOD, CAT ou alopurinol, sendo este último um bloqueador da produção de O₂⁻, pela via da xantina-oxidase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

O estresse oxidativo imposto as células é resultante de três fatores que estão descritos no esquema 11. Inicialmente pelo aumento na geração de ERO como o oxigênio molecular (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxil (HO^{\bullet}), ERN como óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). Em seguida, pelo decréscimo da capacidade protetora antioxidante, realizado através de sistemas enzimáticos celulares como superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GSP) e catalase (CAT). E finalmente, pela falência dos mecanismos de reparo aos danos oxidativos, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutaciona-redutase (GSR) e pela glutaciona-peroxidase (GSP), entre outros (FIERS *et al.*, 1999; NICHOLLS *et al.*, 2000; HAYES *et al.*, 1999).

Esquema 11: Mecanismo de hepatotoxicidade de drogas e sistema de defesa antioxidante.



A principal fonte *in vivo* de ERO é a respiração aeróbica, embora sejam também produzidos pela β -oxidação de ácidos graxos, pelo metabolismo via Citocromo P-450 de xenobióticos, pela estimulação da fagocitose por patógenos ou lipopolisacarídeos, pelo metabolismo da arginina e enzimas teciduais específicas. Em condições normais, as ERO são detoxificadas pela ação enzimática da superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Os principais danos celulares resultam da indução de alterações de macromoléculas como, ácidos graxos polinsaturados na membrana lipídica, proteínas essenciais e DNA/RNA (FIERS *et al.*, 1999; NICHOLLS *et al.*, 2000; HAYES *et al.*, 1999).

Nos sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 e também em situações não-fisiológicas, pela exposição da célula a xenobióticos (fármacos e toxicantes) que provocam a redução incompleta de O_2 e o sistema de defesa antioxidante (ROSS & MOLDEUS, 1991).

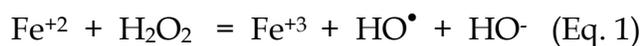
Durante a inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e redução dos níveis de GSH. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo (SHAN *et al.*, 1990; GILBERT & MC LEAN, 1990; HALLIWELL, 1993).

A magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH. Em pulmões de ratos submetidos a hiperoxia por 48 horas, esta razão está significativamente aumentada, quando comparada ao grupo controle não exposto (BEEHLER *et al.*, 1989). O excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH). A formação de pontes dissulfeto por oxidação de proteínas tiólicas, compromete suas funções. Esta oxidação é reversível com o consumo de compostos antioxidantes, como a GSH. A membrana do eritrócito contém grande número de grupos -SH, e os agentes oxidantes podem converter estes grupos tióis (R-SH) em componentes dissulfeto (R-SSG), levando à

desnaturação das proteínas da membrana (GILBERT & MC LEAN, 1990). Neste processo, pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina a metahemoglobina, que precipita e forma os corpúsculos de Heinz (RICE-EVANS & BAYSAL, 1987; WINTERBOURN, 1990).

O componente lipídico da membrana eritrocitária está também sujeito à agressão oxidativa. Os produtos desta lipoperoxidação podem induzir o estresse oxidativo intracelular. A associação dos fenômenos lipoperoxidação, formação de corpúsculos de Heinz e oxidação dos grupos -SH poderão promover a lesão da membrana do glóbulo vermelho. Se a eficiência do sistema antioxidante for superada pela magnitude destes fenômenos, ocorrerá o estresse oxidativo, que culminará em hemólise. Há uma relação destes processos, considerando o ferro como o agente oxidante agressor e o eritrócito como célula-alvo. É possível, no entanto, generalizar este padrão de agressão e defesa celular antioxidante para grande parte dos tecidos do organismo. A utilização de compostos com propriedades antioxidantes, como os derivados fenólicos, pode ajudar na defesa contra agentes indutores da peroxidação lipídica (RICE-EVANS *et al.*, 1986).

A suplementação de ferro causa aumento nos valores de TBARS e diminuição nos valores de GSH (SEYMEN *et al.*, 2004). Segundo Troost *et al.* (2003), em humanos uma única dose clínica de sulfato ferroso leva a um dano oxidativo em pacientes saudáveis com aumento nos valores de TBARS. A produção do radical hidroxil, uma espécie reativa citotóxica, é facilitada pelo ferro, que catalisa a interação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio através das reações de Fenton (Eq. 1) e Haber-Weiss (Eq. 2) (SCHIMMEL & BAUER, 2002).



A oxidação do eritrócito tem sido estudada como modelo para avaliar o dano oxidativo sobre biomembranas. Quando há ataque dos radicais livres sobre as membranas dos eritrócitos ocorre oxidação dos lipídios e proteínas causando

hemólise. A fragilidade osmótica é influenciada por fatores como a forma, o volume e o tamanho do eritrócito, quantidade de hemoglobina, as diferenças na viscoelasticidade das membranas e na composição química e estrutural das mesmas. Aparentemente, células menores apresentam capacidade limitada de expansão e atingem o volume crítico mais precocemente (SIES, 1993).

1.3.4. Atividade Antioxidante de Derivados Fenólicos:

De acordo com Halliwell (2000), “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada ao substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”.

Os polifenóis constituem um numeroso e representativo grupo de metabólitos secundários das plantas, tendo participação na fisiologia e metabolismo celular, morfologia, crescimento, reprodução, defesa contra predadores e processos germinativos. A maioria dos produtos vegetais consumidos pelo homem demonstrou atividade antioxidante, evidenciando seu potencial benéfico à saúde humana (BRAVO, 1998; KAHKONEN *et al.*, 1999).

Compostos fenólicos de origem natural como derivados flavonóides, mostraram que sua propriedade antioxidante pode estar relacionada com sua atividade na cascata inflamatória (WEBER *et al.*, 2002). Alguns compostos fenólicos naturais ou sintéticos estão envolvidos na toxicidade hepática, renal, câncer e citotoxicidade, o que fomenta a pesquisa deste grupo de substância quanto aos seus parâmetros moleculares, farmacológico e toxicológico (BESSEMS & VERMEULEN, 2001; RIETJENS *et al.*, 2002).

O mecanismo molecular proposto que explica a propriedade antioxidante é através da capacidade dos compostos fenólicos neutralizarem radicais livres, como doadores de hidrogênio ou elétron, como agentes redutores ou agentes quelantes (RICE-EVANS *et al.*, 1995).

1.4. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA:

As principais vias enzimáticas de peroxidação lipídica nos sistemas biológicos são a ciclooxigenase e lipoxigenase, enquanto que as vias não enzimáticas ocorrem através da participação de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, metais de transição e outros radicais livres (AL MEHI *et al.*, 1993; PORTER *et al.*, 1995).

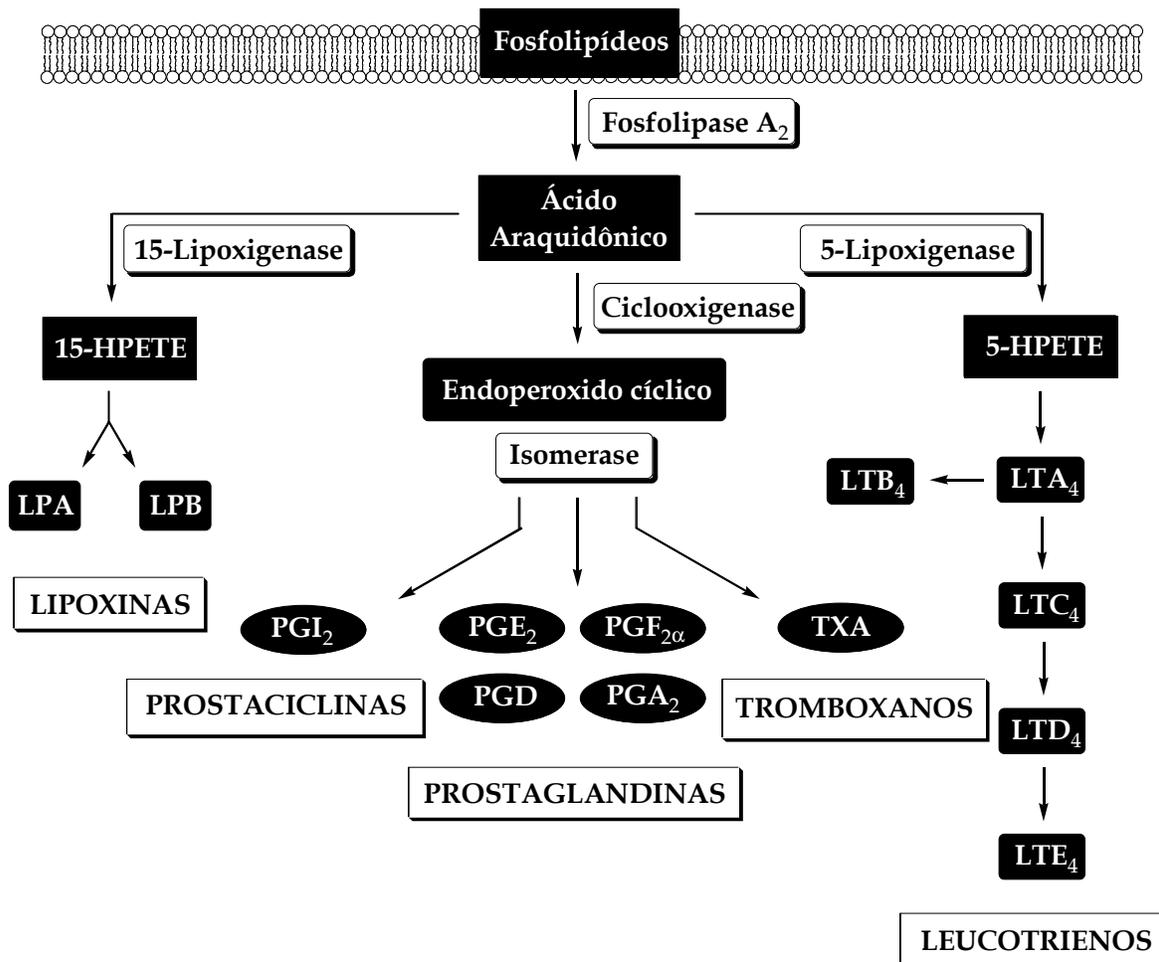
A inflamação é resultante dos efeitos nervoso e vascular em resposta a injúria, causada por agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo, lesão térmica ou de outra natureza. Os sinais clínicos deste fenômeno estão relacionados ao fluxo sanguíneo aumentado nos vasos locais, causando rubor, eritema, dor e extravasamento de líquidos ou edema (SIMMONS *et al.*, 2004).

O envolvimento dos metabólitos do ácido araquidônico (AA) nos processos inflamatórios é amplamente reconhecido, o qual funciona como precursor para a formação de uma ampla variedade de substâncias denominadas eicosanóides. Outros mediadores químicos capazes de sensibilizar os nervos nociceptivos por efeito estimulante, são as cininas, serotonina, histamina, fator de agregação plaquetária (PAF), complexo antígeno-anticorpo, sistema complemento e enzimas lisossomais provenientes de lesão celular (SIMMONS *et al.*, 2004).

No processo inflamatório mediado pelos metabólitos do ácido araquidônico, os principais sistemas enzimáticos envolvidos são as peroxidases, monooxigenases e dioxigenases, presentes nas enzimas PGES e lipoxigenase (SIMMONS *et al.*, 2004).

A concentração do AA livre na célula é muito baixa, portanto, a biossíntese dos eicosanóides depende de sua liberação dos fosfolipídeos da membrana celular, sendo realizada pela ação direta da fosfolipase A₂ e indireta pela fosfolipase C, que são hidrolases acílicas (SIMMONS *et al.*, 2004). O AA é convertido a ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos ou hidroperoxi, leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos (Esquema 12) (SMITH *et al.*, 1991; SIMMONS *et al.*, 2004).

Esquema 12: Formação dos Intermediários via oxidação enzimática do ácido araquidônico

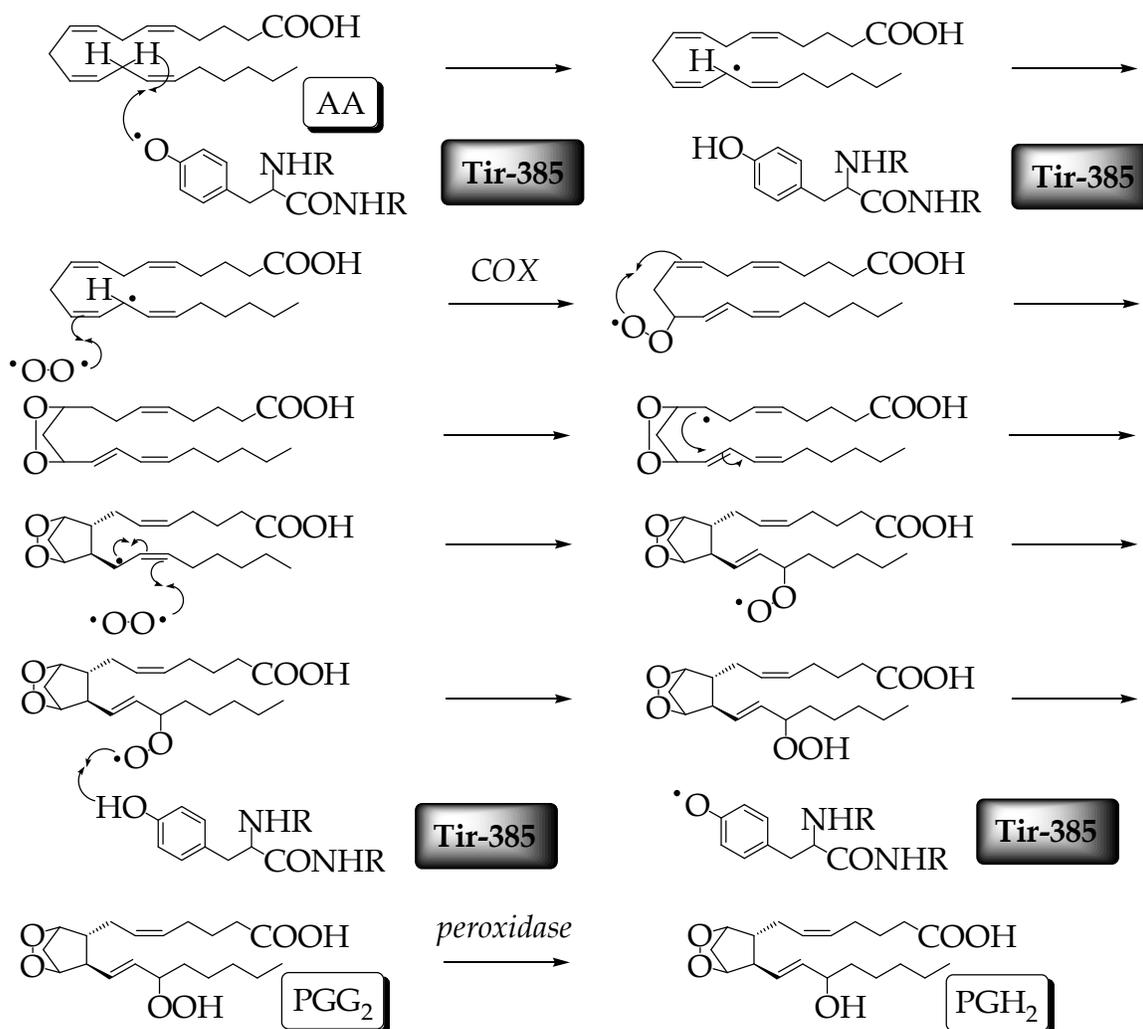


Fonte: Simmons *et al.*, 2004.

A biossíntese aumentada dos eicosanóides é estritamente regulada e ocorre em resposta a vários estímulos físicos, químicos e hormonais. Os antiinflamatórios esteroidais, como a dexametasona, bloqueiam a liberação do ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana (SMITH *et al.*, 1991).

A síntese das PGs é realizada, através de um complexo de enzimas microsomais via radicais livres, iniciadas por um radical tirosil presente na COX na posição 385 (Tir-385) que funciona como um abstrator ou doador de hidrogênio radical e podem ser bloqueadas por derivados fenólicos (KULMACZ *et al.*, 1991) (Esquema 13).

Esquema 13: Enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico



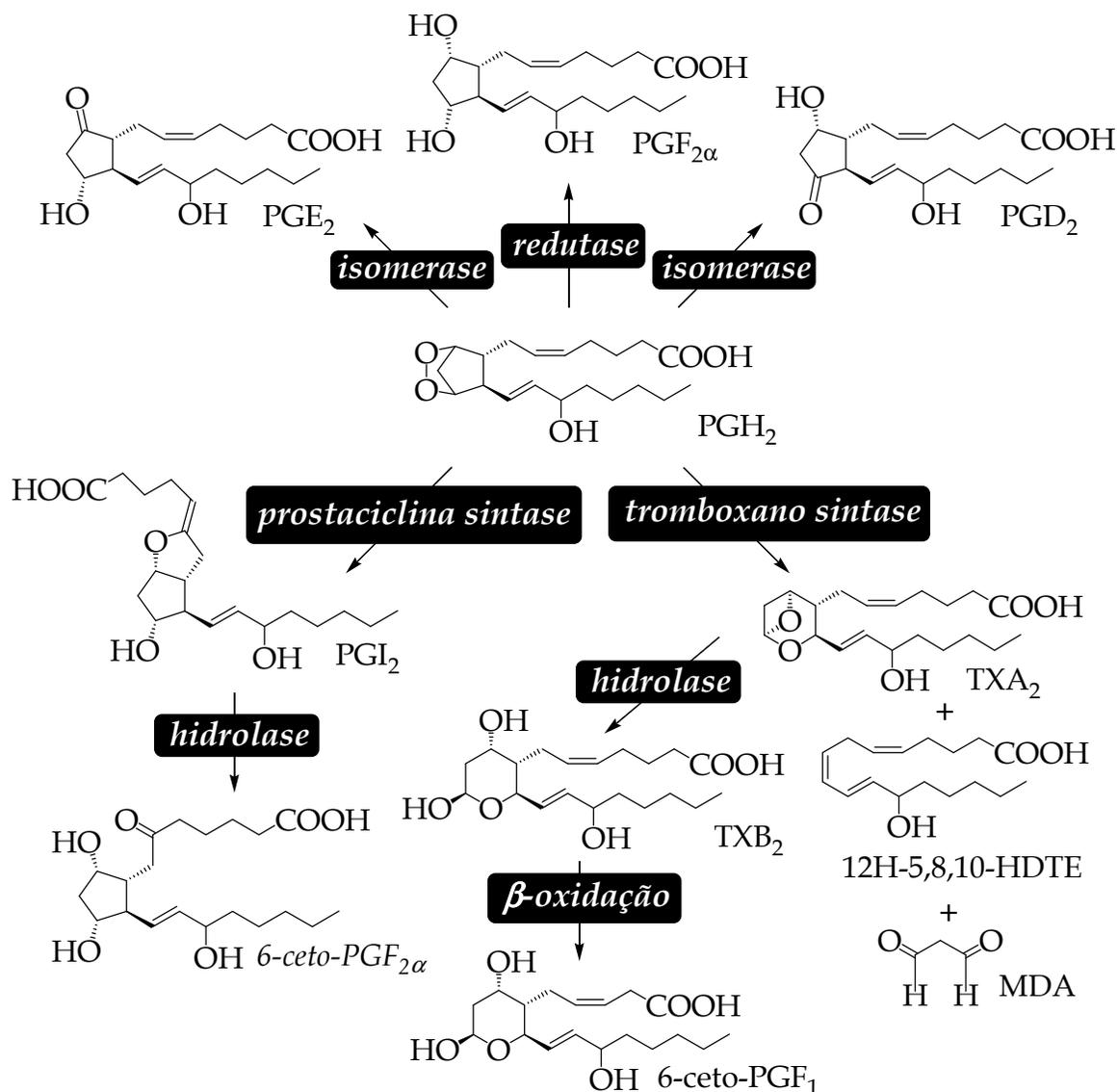
Fonte: Kulmacz *et al.*, 1991 (Com adaptações).

A dupla função da prostaglandina endoperóxido sintetase (PGES) pode ser bloqueada. A ciclooxigenase (COX) oxida e cicla o ácido graxo precursor não esterificado formando o endoperóxido-hidroperóxido cíclico (PGG₂) e a peroxidase converte a PGG₂ em endoperóxido cíclico alcoólico (PGH₂) (SMITH *et al.*, 1991). A função COX é inibida pelos antiinflamatórias não esteróides (AINEs) (ROTH, 1975), enquanto que os derivados fenólicos são inibidores de peroxidase (MOLDÉUS & RAHIMTULA, 1980; MOLDÉUS *et al.*, 1982; KULMACZ *et al.*, 1991; KULMACZ *et al.*, 1994).

Os endoperóxidos são quimicamente instáveis, mas podem ser biotransformados enzimaticamente em vários produtos (Esquema 14). Foram

identificadas as isomerases para a síntese das prostaglandinas E₂ e D₂ (PGE₂ e PGD₂). Uma 9-ceto-redutase catalisa a interconversão das prostaglandinas PGE₂ e PGF_{2α} em alguns tecidos (SIMMONS *et al.*, 2004).

Esquema 14: Formação das prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (Simmons *et al.*, 2004).

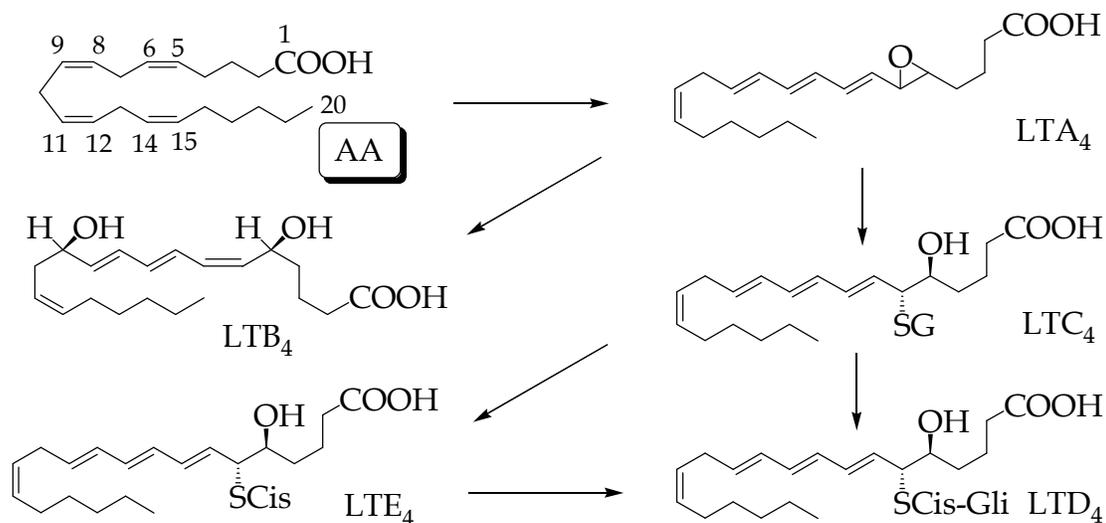


O endoperóxido PGH₂ é metabolizado pela enzima tromboxano-sintase em um composto instável muito reativo denominado de tromboxano A₂ (TXA₂), que é decomposto enzimaticamente por uma hidrolase, em tromboxano B₂ (TXB₂), mais estável (HAMBERG *et al.*, 1975; PACE-ASCIK & SMITH, 1983). No entanto, o metabolismo da PGH₂ nas plaquetas produz também o malondialdeído (MDA), formado em uma mistura equimolecular com a tromboxana A₂ (TxA₂), com a concomitante formação do ácido 12-(L)-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienóico (12-H-

5,8,10-HDTE) (DICZFALUSY *et al.*, 1977) (Esquema 14). A prostaciclina I₂ (PGI₂) é um prostanóide contendo um anel furo-pentano formada pela reação de PGH₂ com a enzima prostaciclina-sintase, sendo posteriormente hidrolisada enzimaticamente em 6-ceto-PGF_{1α} (SMITH *et al.*, 1991).

As lipoxigenases constituem uma família de enzimas citosólicas que catalisam a oxigenação de ácidos graxos poliênicos em hidroperóxidos lipídicos. O principal substrato é um ácido graxo com quatro ligações duplas *cis* separadas por um grupo metilênico, nos carbonos 5, 8, 11 e 14. O AA é oxidado em diferentes posições, formando ácidos hidroperoxi-eicosatetraenóicos (HPETE) nas posições 5 e 12, por 5 e 12-lipoxigenases (5 e 12-LO), respectivamente (SMITH *et al.*, 1991).

Esquema 15: Numeração do ácido araquidônico e formação dos leucotrienos.



Os HPETEs são análogos instáveis da PGG₂ ou PGH₂, podem ser convertidos em seu ácido graxo hidroxilado (HETE), tanto por uma peroxidase, como não enzimaticamente. As hepoxilinas são formadas por epoxidação. A 5-LO é a mais importante destas enzimas, que leva à síntese dos leucotrienos (LT). A conversão em um 5,6-epóxido reativo LTA₄, que é transformado em LTB₄. O LTA₄ pode ser conjugado com glutatona, formando o LTC₄, que produz LTD₄ pela remoção do ácido glutâmico. A clivagem da glicina forma LTE₄ (SMITH *et al.*, 1991). Compostos fenólicos com propriedades antioxidantes apresentam potente ação inibidora da síntese de leucotrienos (WEBER *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2006).

1.5. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS:

O planejamento de fármacos assistido por computador utiliza programas computacionais de química e bancos de dados como ferramentas para a descoberta e planejamento de fármacos, atuando em conjunto com outras áreas como química, bioquímica, farmacologia e toxicologia, formando um campo mais vasto de atuação conhecido como química medicinal (WERMUTH, 1996).

A química medicinal compreende o planejamento, descobrimento, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, associados ao estudo do metabolismo, a interpretação do modo de ação molecular permitem a construção das relações entre estrutura e atividade, através da modelagem molecular (WERMUTH, 1996).

A modelagem molecular compreende a investigação das estruturas e propriedades moleculares usando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica, que fornecem uma representação tridimensional. O planejamento de fármacos através de programas computacionais auxilia na investigação das interações químicas de um ligante com o seu receptor e exploração dos fatores estruturais que estão relacionados ao efeito biológico. Como consequência, os mecanismos de ação molecular dos fármacos podem ser compreendidos pela integração de conhecimentos fundamentais de química orgânica, bioquímica, biologia molecular e farmacologia (CARVALHO *et al.*, 2003). O desafio é atingir o estágio onde novos fármacos possam ser projetados com suas estruturas, atividades e aplicações bem definidas, reduzindo a toxicidade, tempo e custos financeiros.

Segundo Thomas, 2000, se a atividade biológica é definida em termos de interações químicas entre o ligante e seu receptor, os grupamentos químicos presentes contribuem para a formação do complexo fármaco-receptor, portanto, é possível combinarmos os grupos funcionais responsáveis por determinada ação biológica e retirarmos os fragmentos responsáveis pela toxicidade.

1.6. OBJETIVOS:

1.6.1. Geral:

Planejar, desenvolver e avaliar novos candidatos a fármacos inibidores da prostaglandina endoperóxido sintase com propriedade antioxidante, derivados da associação *p*-aminofenol e ácido salicílico.

1.6.2. Específicos:

- Selecionar os parâmetros moleculares capazes de ajudar no planejamento de novos inibidores fenólicos;
- Relacionar teoricamente a formação dos produtos do metabolismo oxidativo do ácido salicílico;
- Desenhar, desenvolver e sintetizar candidatos a fármacos pela associação molecular do *p*-aminofenol e salicilatos;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* usando a difenil-picril hidrazil radical (DPPH) e da atividade antioxidante *in vitro* em modelo de peroxidação lipídica e nível de hemólise induzida em eritrócitos humanos;
- Avaliar a atividade antiinflamatória *in vitro* na inibição da formação de endoperóxido cíclico de prostaglandina;
- Relacionar a relação estrutura química e atividade biológica de derivados fenólicos no sistema prostaglandina endoperóxido sintase.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.1. MODELAGEM MOLECULAR:

Inicialmente foram realizados cálculos teóricos dos derivados do paracetamol descritos na literatura para determinação da estrutura geométrica e obtenção de parâmetros moleculares. O método semi-empírico PM3 (Terceira Parametrização) foi empregado na otimização da geometria e obtenção de parâmetros teóricos.

As propriedades físico-químicas calculadas com a finalidade de determinar na estrutura química possíveis sítios ou formas de interação com os receptores biológicos e fatores que podem afetar as propriedades de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) dos fármacos, entre as quais o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), o orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO), o logaritmo do coeficiente de partição óleo/água (LogP) e a energia de hidratação (EH) (STEWART, 1989). Estes cálculos foram realizados utilizando os programas computacionais Hyperchem 7.5 (2002) e ChemOffice (2005).

Os cálculos com o método da teoria do funcional da densidade (TFD) foram empregados também nas determinações de geometria e propriedades termodinâmicas (PARR *et al.*, 1989).

As geometrias obtidas pelo método PM3 foram otimizadas pelo método TFD usando o conjunto de base 6-31 G* (HEHRE, 1986). Somente as conformações mais estáveis para as moléculas estudadas foram utilizadas. Os descritores moleculares calculados foram: potencial de ionização (PI) das moléculas neutras e ionizadas, energia de dissociação da ligação fenólica OH (ED_{LOH}) e densidades de spin. Nesta etapa, os cálculos foram realizados utilizando os programas computacionais Gaussview e Gaussian 2003 (FRISCH *et al.*, 2006).

2.1.1. Energia dos Orbitais de Fronteira (HOMO e LUMO):

O HOMO é o orbital molecular ocupado de maior energia e está diretamente relacionado com a capacidade de doar elétrons, podendo ser utilizado para caracterizar o composto como nucleofílico. A maior ou menor nucleofilicidade está relacionada com o menor ou maior valor em módulo, respectivamente. Enquanto que o LUMO é o orbital molecular desocupado de mais baixa energia, sendo diretamente relacionado com a capacidade de receber elétrons, indicando a possibilidade de reagir como um eletrófilo. A maior ou menor eletrofilicidade está relacionada com o maior ou menor valor em módulo, respectivamente. Valores de HOMO e LUMO são expressos em elétron-volt (eV) (KOROLKOVAS, 1978).

Estes parâmetros estão relacionados com as regiões em que a estrutura química do fármaco pode ser atraída por pontos específicos do receptor biológico como regiões ricas ou deficientes em elétrons, representando um importante parâmetro que contribui para uma maior compreensão das características de um candidato a ligante em um conjunto de moléculas em estudo (KUBINYI, 2002).

2.1.2. Logaritmo do Coeficiente de Partição (log P):

Parâmetro que expressa a solubilidade de uma molécula, sendo representado como o logaritmo da razão entre a solubilidade de uma molécula em solvente orgânico e em solução aquosa. Esta propriedade relaciona a capacidade da molécula vencer as barreiras biológicas e mover-se nas diferentes biofases. Os maiores valores positivos de logP indicam que a molécula apresenta maior lipofilicidade, enquanto que os valores menores, próximos de zero ou negativos indicam que a molécula apresenta maior hidrofiliicidade, representando um importante parâmetro para que se possa estimar e compreender os fenômenos da absorção e distribuição dos compostos em um modelo de estudo comparativo com compostos conhecidos (EISENBERG & MCLACHLAN, 1986).

2.1.3. Energia de Hidratação (EH):

A energia de hidratação está relacionada com a capacidade dos fármacos absorverem ou liberar energia, quando em contato com solvente aquoso. São importantes para inferir sobre o transporte e distribuição pelas diferentes biofases plasmáticas, bem como pela atração e interação do fármaco com seu receptor. Seus valores são expressos em kilocalorias por mol (kcal/mol). Valores negativos indicam uma reação exotérmica, enquanto que valores positivos indicam uma reação endotérmica. Representa um parâmetro complementar na compreensão do comportamento do ligante com um receptor e de um componente que precisa vencer as barreiras biológicas em comparação com outras moléculas com propriedades farmacocinéticas conhecidas (MIYAMOTO & KOLLMAN, 1993).

2.2. CONJUNTO DE COMPOSTOS ESTUDADOS:

As moléculas em estudo foram denominadas de moléculas testes e receberam a numeração de T1 (paracetamol) até T30 (aspirina) (Figura 6), selecionados de estudos anteriores descritos na literatura (HARVISON *et al.*, 1986; VAN DE STRAAT *et al.*, 1987; BARNARD *et al.*, 1993; BESSEMS *et al.*, 1995; DUFFY *et al.*, 2001).

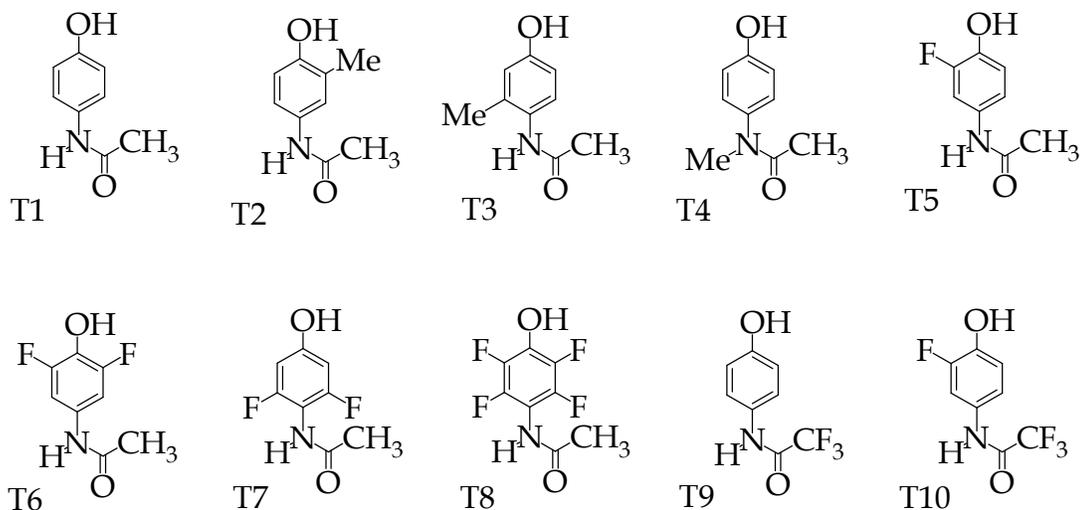


Figura 6: Derivados utilizados nos estudos de modelagem molecular.

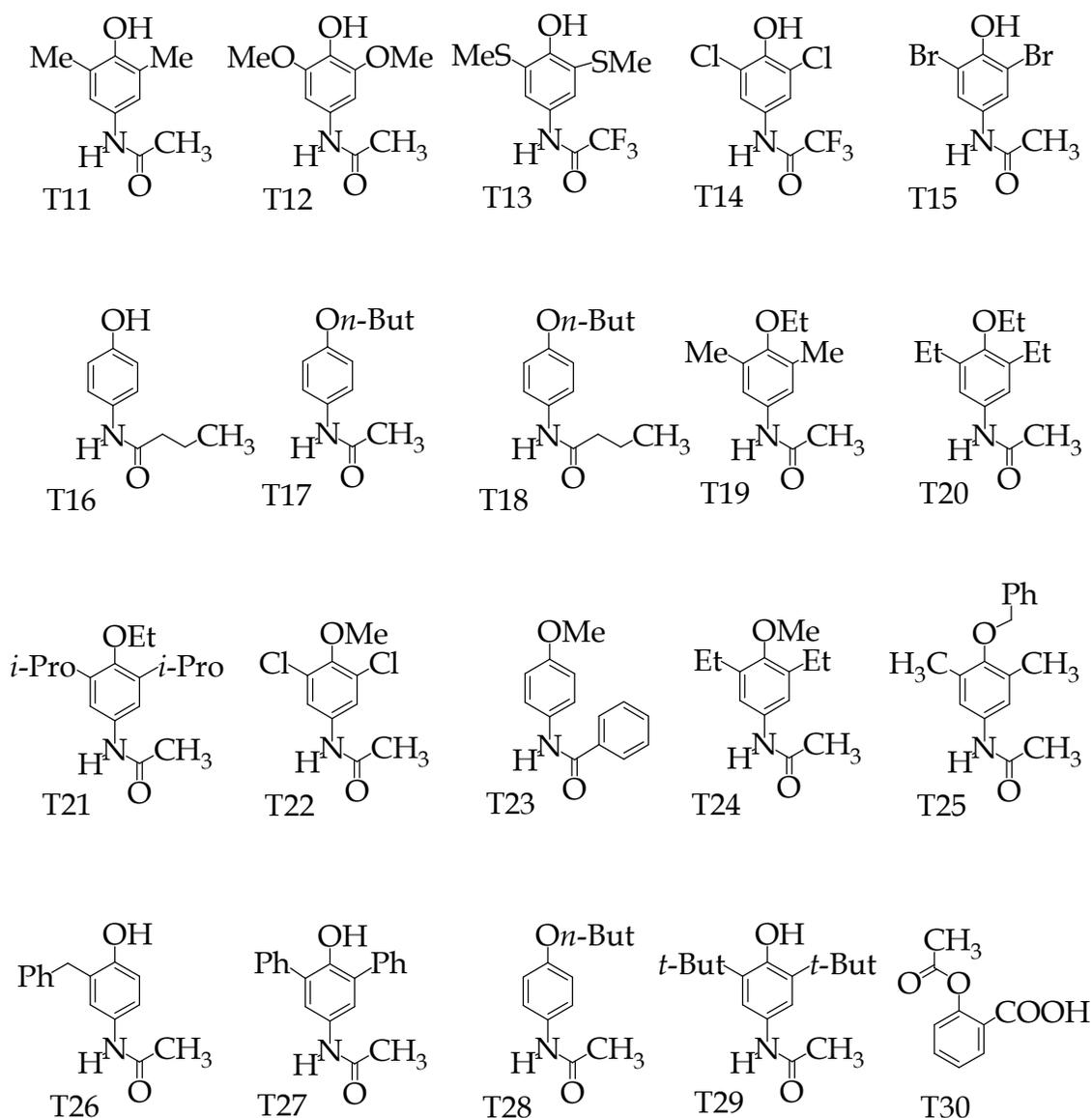


Figura 6: Derivados utilizados nos estudos de modelagem molecular (continuação).

2.3. SÍNTESE DE DERIVADOS FENÓLICOS:

2.3.1. Compostos Sintetizados:

Os derivados da associação *p*-aminofenol e ácido salicílico (Figura 7) foram sintetizados, através de reações de acilação e técnicas de planejamento racional (HOUSE, 1972; PATANI & LAVOIE, 1996), onde os parâmetros eletrônicos e de solubilidade foram combinados de forma que as propriedades de reatividade química e interação dos novos compostos com grupos específicos do sítio ativo do

Cit P450 e metabolismo oxidativo de ácidos graxos, responsável pela atividade inflamatória e pró-oxidante possam ser modificados.

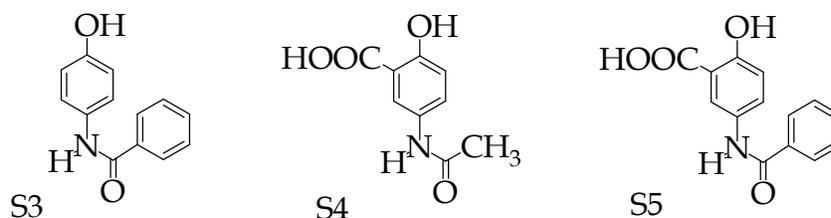
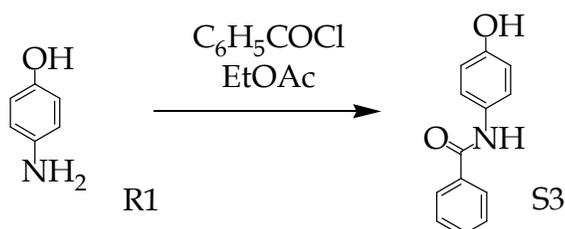


Figura 7: Derivados selecionados do paracetamol e ácido salicílico.

2.3.2. Metodologia Sintética:

O *p*-aminofenol **R1** é utilizado como reagente de partida para a obtenção do composto *p*-benzamidafenol **S3**, através de reações de *N*-acilação com cloreto de benzoíla, utilizando acetato de etila como solvente (Esquema 16).

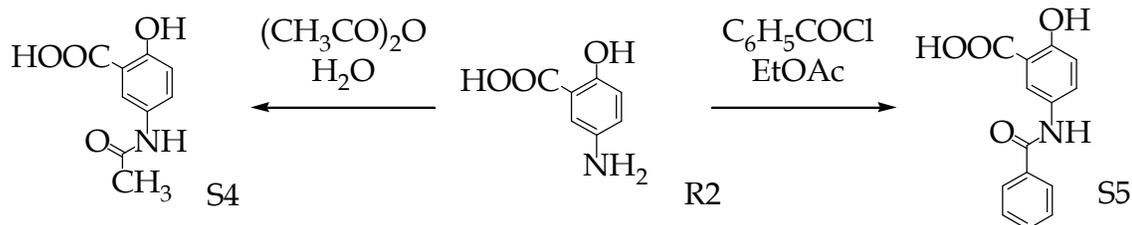
Esquema 16: Metodologia sintética para a preparação do *p*-benzamidafenol.



A obtenção dos produtos ácido 5-acetamidosalicílico **S4** e ácido 5-benzamidosalicílico **S5**, através de reações de *N*-acilação do ácido 5-aminosalicílico **R2** com anidrido acético e cloreto de benzoíla, utilizando água e acetato de etila como solventes, respectivamente (BIAGI *et al.*, 2004) (Esquema 17).

As reações de acilação com controle de temperatura (60 a 80 °C) usando uma amina com anidrido ou cloreto de acila, através de uma reação de adição-eliminação nucleofílica do grupo amina sobre o carbono acílico. Nas condições de reação ocorre apenas a acilação da amina (SPORTOLETTI, 1986).

Esquema 17: Metodologia sintética para a preparação de derivados da associação.



2.3.3. Identificação e caracterização físico-química dos derivados:

A identificação e a caracterização físico-química dos derivados foram realizadas através das seguintes técnicas: ponto de fusão, teste de solubilidade e espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de H^1 e C^{13} (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1994).

2.3.4. Materiais, Equipamentos e Vidrarias:

Espectrômetro Varian, modelo Gemini: RMN- H^1 (300 MHz) e RMN- C^{13} (75 MHz); Aparelho Digital de Ponto de Fusão, modelo MQAPF - 302 Microquímica Equipamentos Ltda. Balança analítica - Sartorius; Chapa aquecedora com agitador magnético - Quimis; Becker de 100 mL e 250 mL; Erlenmeyer de 125 mL, 250 mL e 500 mL; placa de Petri; provetas de 25 mL, 50 mL e 100 mL; pipeta de 1 mL e 5 mL; funil de separação de 250 mL; tubos de ensaio; vidros de relógio; cuba de gelo; bastão de vidro; papel de filtro; placa cromatográfica; barra magnética; capilares; Acetato de etila - Synth; *p*-aminofenol - Aldrich; ácido 5-amino-salicílico - Fluka; cloreto de acetil-saliciloíla - Aldrich; cloreto de benzoíla - Merck; ácido acético - Nuclear; ácido sulfúrico - Synth; ácido nítrico - Synth; cloreto de sódio - Nova Química; água destilada; acetonitrila - Merck; acetato de etila - Nuclear; clorofórmio - Merck; diclorometano - Synth; dimetilsulfóxido - Riedel-de-Haen; etanol - Synth; hexano - Synth; metanol - Synth; tolueno - Synth.

2.4. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE:

2.4.1. Avaliação Biológica:

A detecção direta das espécies reativas de oxigênio (ERO) é o primeiro método usado em sistemas biológicos. No entanto, esta técnica é dificultada pelas concentrações extremamente baixas, na ordem de 10^{-11} M e pelas altas velocidades de reação, chegando ao ponto, onde as taxas de produção são iguais às taxas de reação com biomoléculas. No entanto, os subprodutos das EROs podem ser aferidos diretamente por técnica de ressonância paramagnética de elétrons, porém o custo e outras limitações desta avaliação dificultam seu uso (FLOYD, 1990).

Os métodos indiretos são espectrofotométricos ou cromatográficos, que medem a reação das espécies reativas com produtos reativos (luminol) ou pelo aumento da defesa antioxidante através das atividades enzimáticas superóxido-dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase (FIERS *et al.*, 1999; HAYES *et al.*, 1999).

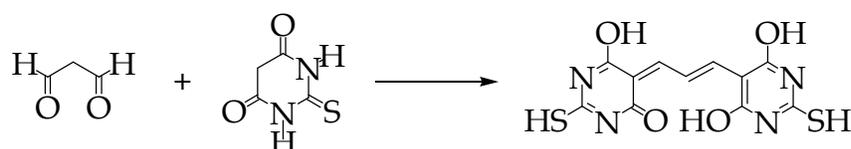
Outros métodos utilizam a medida da concentração de tripeptídeos tiólicos (GSH, GSSG) por dosagens de GSSG e/ou pelo cálculo da razão GSSG/GSH e a medida da capacidade antioxidante total é determinada, através dos níveis de vitaminas antioxidantes (C, E, A, D₃ e pró-A), medidas em tecidos, sangue e outros fluídos (HAYES *et al.*, 1999; NICHOLLS *et al.*, 2000).

A lipoperoxidação de membranas é habitualmente monitorada pelo método do malondialdeído (MDA), sendo que uma das técnicas mais utilizadas é a determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A sensibilidade da medida de TBARS faz deste ensaio, o método de escolha para a seleção e o monitoramento dos níveis de peroxidação lipídica, sendo o principal indicador do estresse oxidativo (YAGI, 1998; ARMSTRONG & BROWNE, 1994). Este procedimento rápido e fácil foi modificado para o uso de vários tipos de amostras, incluindo fármacos, alimentos e tecidos biológicos de humanos e animais (CALLAWAY *et al.*, 1998; JANERO, 1998; JENTZSH, 1996).

O ensaio fornece informações importantes a respeito da atividade de radicais livres em estados patológicos e foi usado para avaliar a atividade antioxidante de diversos compostos (JANERO *et al.*, 1990).

Embora haja controvérsias a respeito da especificidade do TBARS para outros compostos à exceção do MDA, este permanece como o ensaio mais extensamente empregado para avaliar a peroxidação lipídica. O sistema MDA forma um aduto 1:2 (Figura 18) com o ácido tiobarbitúrico (ATB), podendo ser medida em 532 nm por fluorimetria ou espectrofotometria (BRAUN & FROMHERZ, 1997; ARMSTRONG *et al.*, 1998).

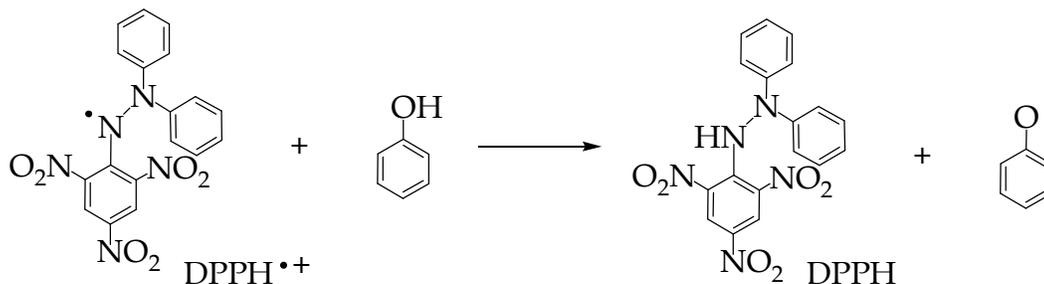
Esquema 18: Reação do malondialdeído com ácido tiobarbitúrico



O modelo de estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio em eritrócitos humano ou de animais é muito utilizado. Outros modelos biológicos utilizam homogenados de cérebro de camundongo, microsomas e lipossomas, e outros indutores também são usados e monitorados pelo método de TBARS (ORHAN & SAHIN, 2001; DINIS *et al.*, 1994; MAHARAJ *et al.*, 2004; MAHARAJ *et al.*, 2006; DAYA *et al.*, 2000; CASPER *et al.*, 200; AUBIN *et al.*, 1998; TEISMANN *et al.*, 2001; MOHANAKUMAR *et al.*, 2000; SAIRAM *et al.*, 2003).

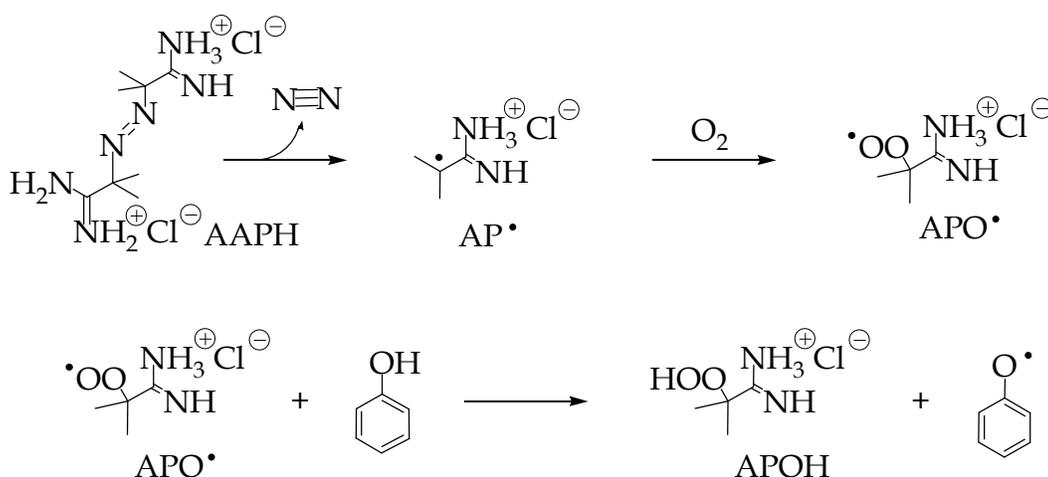
2.4.2. Avaliação Química:

Os modelos químicos determinam a propriedade antioxidante de compostos baseada na reação com um radical livre conhecido como a 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^{•+}) com os derivados, em solução etanólica e tampão de fosfato com pH 5,5 (Esquema 19). A reação se processa pela mudança de cor e a atividade é avaliada pelo decréscimo da absorvância medida em 517 nm em relação ao correspondente solvente branco (BLOIS, 1958).

Esquema 19: Reação da 2,2-difenil-1-picrilhidrazil com derivados fenólicos

A análise da capacidade antioxidante total pode ser determinada com reagente de Folin-Ciocalteu usando o método de Spanos & Wrolstad (1990), modificado por Lister & Wilson (2001). A absorvância é mensurada em 756 nm e os resultados expressos em miligramas de ácido gálico equivalentes por grama de peso seco (mg GAE/g).

Outro método utilizado é a determinação da capacidade antioxidante pelo método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), desenvolvido por Cao e col. (1993 e 1999) e mede o aumento ou diminuição de um substrato oxidável, por fluorescência, no decorrer do tempo, induzido por moléculas que geram radicais livres em fase aquosa, como o 2,2-azobis-amidinopropano-dihidrocloridrato (AAPH), o qual se fragmenta sob ação do calor para formar radicais alquilas (AP•) (CAO *et al.*, 1993; PRIOR & CAO, 1999) (Esquema 20).

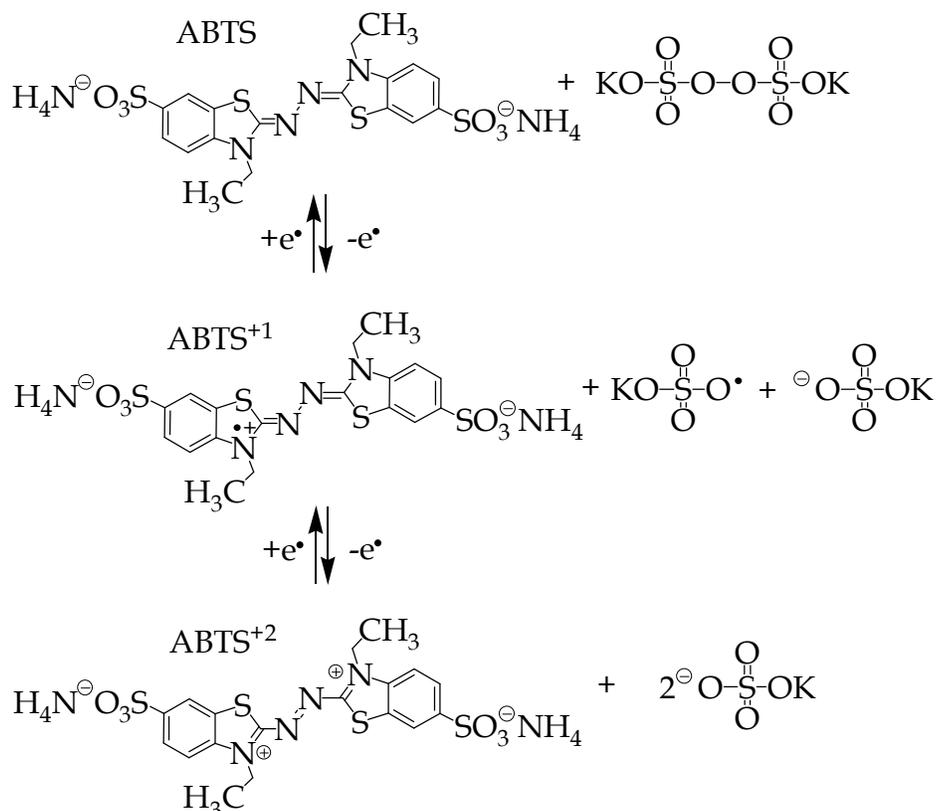
Esquema 20: Reação da 2,2-azobis-amidinopropano-dihidrochlorido com derivados fenólicos

Os radicais alquilas AP• reagem com oxigênio, produzindo radicais alquilperóxidos (APO•). Os radicais alquilperóxidos APO• reagem com os derivados produzindo radicais fenoxil e hidroperóxidos APOH. Quanto mais eficaz o antioxidante, menor será a diminuição da fluorescência, pois o método mede a competição das reações entre o APO• + fluoresceína e o APO• + antioxidante.

O método mais utilizado determina a equivalência dos compostos com um potente antioxidante conhecido, o trolox, um análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E, sendo denominado de TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (MILLER *et al.*, 1993; RE *et al.*, 1999).

É uma técnica baseada na reação entre o 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio (ABTS) com persulfato de potássio (K₂S₂O₈), produzindo diretamente o radical cátion ABTS^{•+}(ABTS⁺¹) e o cátion ABTS²⁺, cromóforos de coloração verde/azul (Esquema 21).

Esquema 21: Reação da 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio (ABTS) com persulfato de potássio e formação do ABTS¹⁺ e ABTS²⁺.



A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS em uma extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação, observados pela mudança na absorvância em 734nm. A redução na intensidade da absorvância como índice de inibição do radical cátion ABTS^{•+} é determinada como a atividade antioxidante total da amostra, sendo então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições.

2.4.3. Metodologia de Determinação da Atividade Antioxidante:

2.4.3.1. Difenilpicril-hidrazil radical (DPPH):

Para a determinação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos da associação *p*-aminofenol e ácido salicílico, foi misturado uma solução tampão de acetato 100mM pH 5,5 com solução etanólica 100 μ M de DPPH. Ao final a solução de drogas foi adicionada para estudo em diferentes concentrações. A mudança na absorvância medida em 517 nm após 5 minutos, de acordo com Blois (1958).

2.4.4. Determinação da Capacidade Antioxidante *in silico*:

Nos últimos anos, os métodos teóricos têm sido aplicados com sucesso na predição da capacidade antioxidante. Os estudos *in silico* foram empregados para explicar o comportamento molecular de compostos polifenólicos, principalmente flavonóides em diferentes modelos biológicos (GALATI & O'BRIEN, 2004).

Estes modelos utilizam o método TFD, usando o funcional híbrido B3LYP (BECKE *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1998) e o conjunto de base 6-31G(d) (HEHRE, 1986), para derivados fenólicos (ArOH), que funcionam como doadores de elétrons (Eq. 3) ou hidrogênio (Eq. 4), cujos resultados podem ser correlacionados com os diferentes mecanismos da resposta ao estresse celular.



Os resultados podem ser comparados com um conjunto de composto em estudo ou compostos com atividade conhecida como as vitaminas E, C ou A, suas pró-vitaminas ou seus derivados (LEMANSKA *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006). O potencial de ionização ou oxidação é calculado pela diferença de energia entre a forma ionizada menos a forma neutra (ALVES *et al.*, 2006). Os estudos são complementados pela análise de distribuição de spin, com a finalidade de localizar as posições e os grupos responsáveis pela maior ou menor estabilidade do radical livre formado (DINIZ *et al.*, 2004).

2.4.5. Métodos para o Cálculo do Potencial de Ionização (PI):

O cálculo do PI foi realizado pela diferença entre a energia da molécula ionizada (cátion radical), menos a energia da molécula neutra. Enquanto que a energia de dissociação da ligação fenólica (ED_{LOH}) foi calculada pela diferença entre a energia da molécula sem o hidrogênio (semiquinona), menos a energia da molécula neutra. No estudo de biotransformação do ácido salicílico, os valores de energia foram correlacionados com as densidades de spin dos radicais livres, onde podemos localizar os grupos que estão contribuindo para a estabilização do elétron desemparelhado, ou com maior índice de reatividade, segundo resultados alcançados com sucesso empregando esta metodologia por Diniz *et al.*, 2004 e Alves *et al.*, 2006.

Estes estudos podem ser complementados com cálculos de barreira de energia utilizando novos modelos de interação com o Cit P-450 e radical tirosil para o estudo farmacológico. As reações com dienos alternados e geração de radicais lipoperoxil e lipohidroperóxido, bem como a reação com radical hidroxil para os estudos de atividade seqüestrante e próoxidante, dando maior suporte na elucidação dos mecanismos de toxicidade.

2.5. ESTRESSE OXIDATIVO EM ERITRÓCITOS HUMANOS:

2.5.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos:

O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Instituto de Ciências da Saúde da UFPA (Anexo 1, pg. 140).

2.5.2. Amostras Biológicas:

O sangue foi obtido através da punção venosa com o consentimento prévio dos doadores voluntários de ambos os sexos, assegurando-se que os mesmos não utilizaram qualquer tipo de medicamentos em um período de dez dias antes da coleta. Foram obtidos 20 ml de sangue da veia antecubital utilizando uma solução anticoagulante de EDTA sódico 5mM

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido pela centrifugação por 15 minutos a 3000 RPM. O concentrado contendo a fração eritrocitária foi separada e o PRP foi utilizado na avaliação da atividade anti-prostaglandina-endoperóxido sintetase (ORHAN & SAHIN, 2001).

2.5.3. Indução do Estresse em Eritrócitos com H₂O₂:

A fração eritrocitária foi lavada duas vezes em solução de tris-KCl-HCl pH 7,4 durante 10 minutos a 3000 RPM para separar as hemácias hemolisadas e hemoglobina. O concentrado de eritrócitos foi separado e dissolvido em solução de tris-HCl-KCl pH 7,4 com azida de sódio 14mM e incubado por 30 minutos a temperatura de 37°C, com os compostos nas concentrações de 1000, 500 e 250 µM. Em seguida foi adicionado uma solução de peróxido de hidrogênio na concentração 30 mM e as amostras foram incubadas por duas horas (ORHAN & SAHIN, 2001).

2.5.4. Indução do Estresse em Eritrócitos pelo sistema Ferro-Ascorbato:

Ao concentrado de eritrócitos foi adicionado os compostos dissolvidos em tris-HCl-KCl pH 7,4 nas concentrações de 1000, 500 e 250 μM e em seguida adicionado uma solução com FeSO_4 e vitamina C (500 μM /5mM) e incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida o peróxido de hidrogênio 10 mM foi adicionado e incubada por uma hora (DINIS *et al.*, 1994, com modificações).

2.5.5. Indução do Estresse em Eritrócitos pelo sistema AAPH:

Ao concentrado de eritrócitos foi adicionado os compostos dissolvidos em tris-HCl-KCl pH 7,4 nas concentrações de 1000, 500 e 250 μM foi adicionado uma solução com 2,2'-azobis-amidinopropano dicloridrato (AAPH) (10-50mM) e incubada por 1, 2 e 4 horas a 37°C (SIMÃO *et al.*, 2006, com modificações).

2.5.6. Avaliação do grau de Hemólise:

O grau de hemólise dos eritrócitos induzidos pelo estresse oxidativo de derivados fenólicos na concentração de 1000 μM foi determinada pela leitura da absorvância da hemoglobina em 540nm (SATO *et al.*, 1995).

2.5.7. Nível de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico:

Ao final do tempo de incubação, foi adicionado uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico 1% (ATB) em ácido tricloro-acético 28% (ATC) e HCl 0,25M. A mistura foi aquecida por 15 minutos a 95°C em banho de água. Após o resfriamento a mistura foi centrifugada a 15000 RPM durante 10 minutos a 25°C e o sobrenadante separado para a leitura de suas absorvâncias em 532 nm (ORHAN & SAHIN, 2001). Os níveis de malondialdeído - MDA foram determinados a partir de uma curva de calibração usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

2.6. INIBIÇÃO DA PGES EM PLAQUETAS:

2.6.1. Avaliação da Atividade Antiinflamatória em Plaquetas:

A ativação de plaquetas ocorre pela interação de agonistas com receptores de membrana, seguida por respostas celulares específicas, após a transdução de sinais para o interior da célula (MICHELSON *et al.*, 2002). Estas respostas englobam os seguintes mecanismos físicos e bioquímicos como alteração da forma das plaquetas, centralização dos grânulos e a formação de pseudópodos, ativação do ciclo fosfatidilinositol, mobilização do cálcio plaquetário, liberação do ácido araquidônico, secreção do conteúdo dos grânulos densos e alfa e agregação plaquetária (CLUTTON *et al.*, 2001). O aumento do influxo de cálcio produz a ativação da fosfolipase A₂ que leva a liberação do ácido araquidônico presente nos fosfolipídeos da membrana (BALBOA & BALSINDE, 2006).

A agregação plaquetária é mediada por diferentes condições, mecanismos e agentes químicos, portanto este fenômeno comumente é usado para avaliar compostos com possível propriedade nesta cascata de eventos. A atividade de agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) induzida por agentes agregantes como ADP, colágeno e ácido araquidônico pode ser avaliada usando um agregômetro, que utiliza um método turbidimétrico em comparação com o plasma pobre em plaquetas (PPP) como branco (HUANG *et al.*, 2002).

Outros modelos utilizam ácido araquidônico marcado ou métodos imunoenzimáticos para a quantificação dos metabólitos formados, principalmente tromboxano B₂ (SINZINGER *et al.*, 1989; HUANG *et al.*, 2002). O ácido araquidônico é um composto instável e reativo deve ser armazenado em condições que preserve sua estrutura química (HUANG *et al.*, 2002; KUDOLO *et al.*, 2005), portanto o influxo de cálcio pode ativar a fosfolipase-A₂ e promover sua liberação dos fosfolipídeos *in situ* para produção dos metabólitos via prostaglandina endoperoxído sintase, responsáveis pela agregação plaquetária (BALBOA & BALSINDE, 2006). Neste método experimental de avaliação utilizamos o cloreto de cálcio como ativador da fosfolipase A₂.

2.6.2. Contagem de plaquetas:

As plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer utilizando uma solução fisiológica e formol ou em contador de células, sendo utilizado para os testes de inibição da PGES as amostras com valores entre 200.000 - 250.000 plaquetas/ μ l (OLAS & WACHOWICZ, 2002).

2.6.3. Inibição da Prostaglandina-Endoperóxido Sintase:

O plasma rico em plaquetas foi transferido para tubos de ensaio com capacidade para 5ml e em seguida incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente, com uma solução contendo os inibidores nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M na concentração de 2×10^8 plaquetas/ml. Em seguida foi adicionado uma solução de cloreto de cálcio 10 μ M em tampão de Tris-HCl pH 7,4. Ao final do tempo de incubação, foi adicionada uma solução aquosa de ácido tricloro-acético 28% e a mistura foi centrifugada a 15000 RPM durante 20 minutos a 25°C e em seguida ao sobrenadante foi adicionado a uma solução de ácido tiobarbitúrico 1% em hidróxido de sódio. Todos os tubos de ensaio foram aquecidos por 15 minutos a 95°C em banho de água. Após o resfriamento foram separados para a leitura de suas absorvâncias em 532 nm. Os níveis de malondialdeído - MDA foram determinados a partir de uma curva de calibração usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

2.6.4. Equipamentos e Reagentes:

Balança analítica - Sartorius; Centrifuga - Sigma 2K15; chapa aquecedora - Quimis; Becker de 100 mL e 250 mL; Erlenmeyer de 125 mL, 250 mL e 500 mL; pipeta Pasteur; tubos falcon de 50 mL; provetas de 25 mL, 50 mL e 100 mL; pipeta de 1 mL e 5 mL; tubos de ensaio de 5 mL - Pyrex; estante de alumínio com capacidade para 30 tubos de ensaio; banho-maria termostatizado - Fanem-Ltda;

seringa descartável de 10 e 20 mL; Tris-hidroximetil-amino-metano - Reagen; cloreto de potássio - Reagen; cloreto de cálcio - Vetec; ácido etilenodiamino-tetracético dissódico - Carlo Erba; ácido tiobarbitúrico - Sigma; 1,1,3,3-tetraetoxipropano - Aldrich; EDTA sódico - Merck; ácido clorídrico - Synth; ácido tricloro-acético - Merck; hidróxido de sódio - Reagen; Solução tampão-fosfato; 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - Fluka; 2,2-azobis-amidinopropano-dihidrocloridrato - Sigma.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média e analisados pela análise de variância (ANOVA). Os valores são apresentados em gráficos através de valores percentuais de inibição e aumento de atividade a partir do controle. Para os modelos de estresse oxidativo em eritrócitos humanos e grau de hemólise os valores são expressos nos seus percentuais de inibição. Enquanto que na inibição da PGES em plaquetas humanas, os valores da EC₅₀ e ID₅₀ foram calculados usando-se pelo menos três dosagens dos compostos, através da regressão linear usando o software apropriado Statistica® e BioEstat® 4.0.

Para todas as análises o teste *t* de Student, foi utilizado para comparações múltiplas entre grupo controle e grupos tratados. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significativa foi de $p < 0.05$. Nos estudos de modelagem molecular utilizou-se o método da análise de regressão a fim de selecionar os parâmetros que apresentam maior correlação com a atividade biológica em estudo. Os valores de correlação acima de 50% foram considerados satisfatórios para os estudos, mas para a fase de planejamento de novos fármacos foram utilizados os valores superiores a 75%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. MODELAGEM MOLECULAR:

No estudo de modelagem molecular foram realizados cálculos teóricos usando o método semi-empírico PM3 de vinte e oito candidatos descritos nos estudos de Harvison e col., 1986; Barnard e col., 1993; Bessems e col., 1995; Duffy e col., 2001, comparados com o paracetamol e a aspirina.

O estudo da relação entre estrutura química e atividade biológica selecionou as propriedades físico-químicas mais importantes, usando análise de regressão. As propriedades físico-químicas como orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO), logaritmo do coeficiente de partição óleo/água (Log P) e energia de hidratação (EH), mostraram maior capacidade de correlação entre estrutura química e atividade biológica.

3.1.1. Modelagem Molecular de Derivados Monometilados do Paracetamol:

A relação estrutura e atividade de três derivados monometilados do paracetamol (Figura 8) mostraram uma correlação entre o potencial de ionização tanto com a atividade quanto com a toxicidade. As atividades foram determinadas por Harvison e col. (1986), através do modelo de analgesia, pela contorção intraperitoneal induzida pelo ácido acético em camundongos e a toxicidade medida pelos níveis de alanina aminotransferase (ALT), enquanto que o potencial de oxiredução (Redox) foi obtido usando voltametria cíclica no pH 7,0.

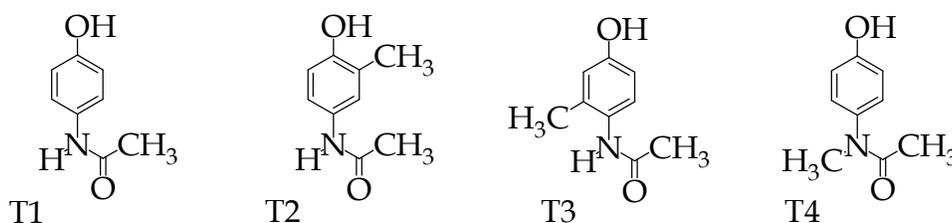


Figura 8: Paracetamol e derivados monometilados.

Tabela 1: Propriedades dos derivados monometilados do paracetamol obtidos pelo método semiempírico PM3.

Comp	ED 50*	Redox*	ALT*	HOMO	LUMO	CLogP	EH
T1	84,3	0,39	4030	-8,45	0,18	0,49	-10,62
T2	177,1	0,36	690	-8,39	0,20	0,94	-8,16
T3	94,6	0,45	3251	-8,47	0,19	0,34	-9,18
T4	> 200	0,68	32	-8,39	0,28	0,44	-7,23

* Dados obtidos por Harvison e col., 1986.

As moléculas que apresentam valores de HOMO abaixo de -8,45 eV mostram maior atividade analgésica e toxicidade, enquanto que os valores de HOMO acima de -8,45 eV são para as moléculas com menor atividade. No entanto, as moléculas com valores de LUMO abaixo de 0,19 eV apresentam maior atividade analgésica e toxicidade e valores acima de 0,19 eV para as menos ativas. O composto T1 foi o mais polar e mais hidrossolúvel, com um valor de energia de hidratação de -10,62 kcal/mol. A substituição de hidrogênio por metila reduziu a polaridade, tornando-se mais lipossolúvel, com destaque para a amida secundária com valor de -7,23 kcal/mol (Tabela 1). Os valores de HOMO e LUMO indicam que quanto maior o potencial doador de elétrons, maior a toxicidade e atividade.

Os resultados mostram a influência da metila sobre os orbitais moleculares e os parâmetros de solubilidade. Substituição na posição 2 (T2), evidenciou redução da atividade, toxicidade, HOMO e EH e aumento do LogP e LUMO. A substituição na posição 3 (T3), apresentou uma redução menor da atividade, toxicidade, EH e LogP e aumento do HOMO e LUMO. No entanto, a substituição na amida (T4), mostrou a menor atividade, toxicidade e EH, o valor de HOMO diminuiu, o CLogP aumentou e a molécula apresentou o maior valor de LUMO. Os resultados podem ser influenciados pelos efeitos eletrônicos, não obstante, há falta de correlação entre atividade e potencial de oxiredução. Outros efeitos como a coplanaridade do grupo acetil pode estar relacionado com sua capacidade de interação com Cit P-450.

3.1.2. Modelagem Molecular de Derivados Fluorados do Paracetamol:

Os dados da relação estrutura e atividade de seis derivados fluorados do paracetamol mostrados na figura 9 estão descritos na tabela 2.

As moléculas foram avaliadas através dos modelos de inflamação e toxicidade, pela contorção abdominal induzida pela *p*-benzoquinona em camundongos e dosagem dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), respectivamente. Os resultados biológicos foram comparados com o pKa e potencial de oxiredução (Redox), obtido através da voltametria cíclica (V) por Barnard e col. (1993).

Entre os compostos avaliados nestes modelos, duas moléculas foram mais ativas e quatro apresentaram menor efeito tóxico que o PAR. Os resultados mostram que a molécula T10 é a mais ativa, a molécula T8 é a menos ativa. Quanto a toxicidade, a molécula T7 é a menos tóxica e T9 é a mais tóxica.

Os valores teóricos de HOMO de -9,16 para T9 e -8,97 eV para T10, permitiu a seleção dos compostos mais ativos e o mais tóxico. Enquanto que os valores teóricos de LUMO entre -0,40 e -0,45 eV selecionou as duas moléculas também.

Os compostos com maior atividade e toxidade apresentam também as maiores propriedades hidrofílicas representadas pelos maiores valores de CLog P de 1,60 e 1,92.

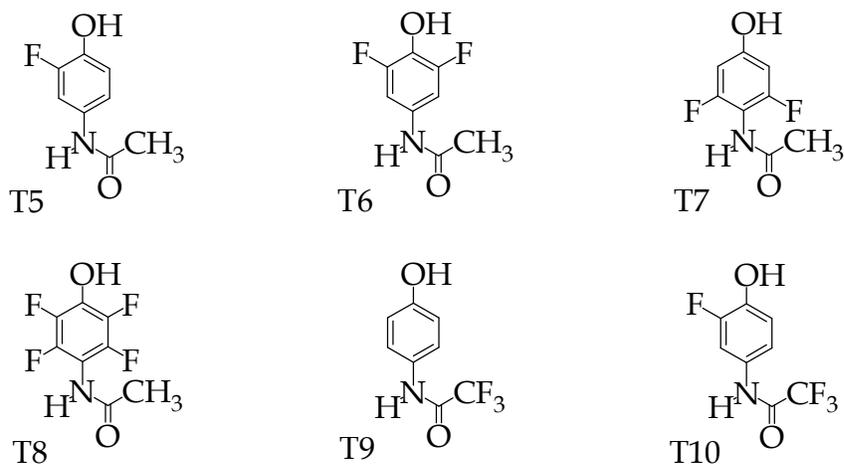


Figura 9: Paracetamol e derivados fluorados.

O efeito da substituição do hidrogênio por flúor aumentou a lipossolubilidade para os compostos com substituição nas posições 2, 3, 5 e 6 do anel aromático, mas quando os átomos de flúor foram substituídos na metila do grupo acetamida houve aumento da hidrossolubilidade. Este fato pode ser observado pelos valores de EH de -11,22 kcal/mol para os compostos T9, que representa a molécula mais polar e mais hidrossolúvel com o radical trifluoroacetil, enquanto que a EH para a molécula T8 e de -7,89 kcal/mol, a mais lipossolúvel com o grupo aromático tetrasubstituído (Tabela 2).

Tabela 2: Propriedades dos derivados fluorados do paracetamol

Comp	pKa*	Redox*	AB ED ₅₀ *	ToxED ₅₀ *	HOMO	LUMO	CLogP	EH
		(V)	(mM/kg)	(mM/kg)	(eV)	(eV)		(Kcal/mol)
T1	9,53	1,14	2,08	3,38	-8,45	0,18	0,49	-10,62
T5	8,10	1,24	2,53	3,96	-8,65	-0,09	0,81	-9,46
T6	7,00	1,33	4,18	4,01	-8,86	-0,34	0,88	-8,87
T7	9,05	1,52	4,28	5,88	-8,73	-0,35	0,08	-9,48
T8	4,75	1,74	4,48	3,23	-9,13	-0,93	0,23	-7,89
T9	9,14	1,37	0,48	1,42	-8,97	-0,43	1,60	-11,22
T10	8,40	1,47	0,38	-	-9,16	-0,45	1,92	-10,07

* Dados obtidos por Barnard e col., 1993.

Com base nos valores obtidos pelos métodos biológicos como atividade antiinflamatória e toxicidade, nos testes experimentais como potencial de oxiredução (Redox) e pKa (BARNARD *et al.*, 1993), foram correlacionadas com os valores dos parâmetros eletrônicos (HOMO e LUMO) e de solubilidade (CLogP e EH), descritos nas tabelas 3 e 4.

A análise de correlação entre estrutura e atividade para os derivados fluorados apresentaram baixa correlação tanto para o pKa quanto para o potencial Redox com valores de 0,36 e 0,08 para pKa, 0,04 e 0,15 para potencial redox, para a atividade analgésica e toxicidade, respectivamente. Os parâmetros de HOMO com valores de 0,48 e 0,58 para a atividade analgésica e toxicidade, respectivamente.

Tabela 3: Matriz de correlação entre atividade analgésica e propriedades físico-químicas de derivados fluorados do paracetamol

	AB ED ₅₀	pKa	Redox	HOMO	LUMO	CLogP	EH
AB ED ₅₀	1						
pKa	0,36	1					
Redox (V)	0,04	0,67	1				
HOMO	0,48	0,54	0,76	1			
LUMO	0,13	0,41	0,58	0,68	1		
CLogP	0,88	0,00	0,40	0,81	0,47	1	
EH Kcal/mol	0,65	0,88	0,61	0,29	0,38	0,29	1

Tabela 4: Matriz de correlação entre hepatotoxicidade e propriedades físico-químicas de derivados fluorados do paracetamol

	ToxED ₅₀	pKa	Redox	HOMO	LUMO	CLogP	EH
ToxED ₅₀	1						
pKa	0,08	1					
Redox (V)	0,15	0,70	1				
HOMO	0,58	0,71	0,81	1			
LUMO	0,19	0,43	0,57	0,71	1		
CLogP	0,90	0,09	0,40	0,73	0,49	1	
EH Kcal/mol	0,37	0,88	0,65	0,45	0,42	0,25	1

Enquanto que os valores de correlação de LUMO não são significativos. Não obstante, os parâmetros de solubilidade apresentaram alta correlação quando comparamos os valores de CLogP de 0,88 e 0,90 para ambas atividades. No entanto a EH apresentou valores de 0,65 e 0,37 para a atividade analgésica e toxicidade, respectivamente. A introdução de átomos de flúor na estrutura molecular dos compostos altera sua solubilidade e passa a governar a interação droga-receptor. Compostos mais lipofílicos apresentar maior facilidade de

absorção, atingindo maior biodisponibilidade durante o período de avaliação. Portanto, as propriedades teóricas não foram capazes de descrever as possíveis interações com o provável sítio receptor e as mudanças de propriedades de ADME são as responsáveis pelas diferenças de atividades.

3.1.3. Modelagem Molecular de Derivados 3,5-Dissubstituídos do Paracetamol:

Os dados da relação estrutura e atividade de sete derivados do paracetamol, substituídos nas posições 3 e 5 por metila, metoxi, metilsulfeto e os halogênios flúor, cloro, bromo e iodo, mostrados na figura 10 e cujos valores de atividade e parâmetros teóricos obtidos pelo método semiempírico PM3 estão descritos na tabela 5. A atividade anti-ciclooxigenase foi avaliada pela dosagem de PGE₂ em microsomas e hepatotoxicidade pela dosagem de lactato desidrogenase (LDH) em cultura de hepatócitos de ratos realizado por Bessems e col. (1995).

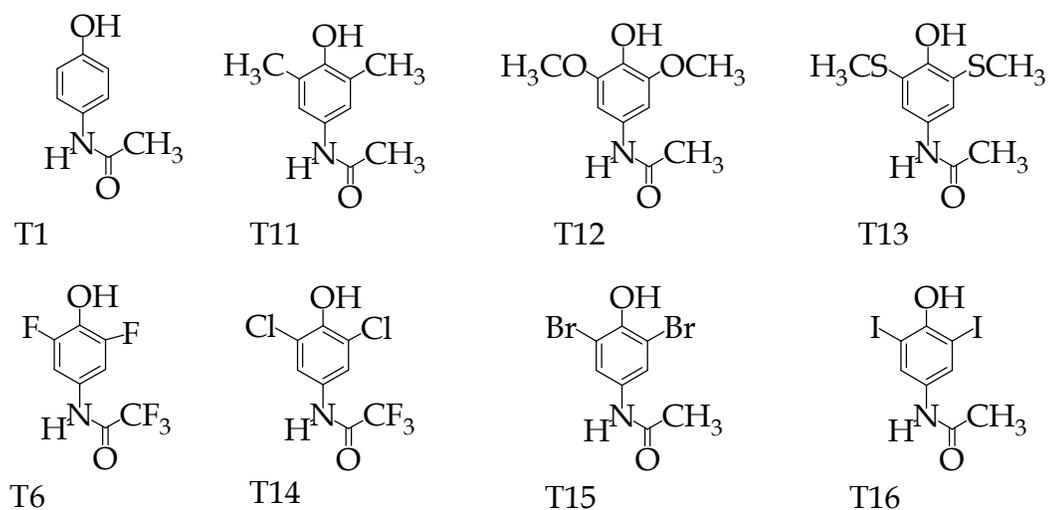


Figura 10: Paracetamol e derivados 3,5-dissubstituídos

Cálculos usando TFD realizados por Diniz e col. (2004) mostraram que o potencial de ionização (PI) e a quebra da ligação fenólica estão relacionados com a inibição *in vitro* da formação de PG, possivelmente devido a inibição do tirosil-385 da COX (KULMACZ *et al.*, 1994). Enquanto que a quebra da ligação OH fenólico, a

quebra da ligação NH amídica e PI estão relacionados com a citotoxicidade, devido a formação de NAPQI (GOEPTAR *et al.*, 1995).

Tabela 5: Propriedades de derivados 3,5-dissubstituídos do paracetamol obtidos pelo método semiempírico PM3.

Comp	Redox* (V)	IC 50* (mM)	LDH* (%)	HOMO
T1	0,28	0,35	50,6	-8,45
T11	0,21	0,16	15,0	-8,34
T12	0,12	0,20	12,4	-8,46
T13	0,12	0,14	14,5	-8,26
T6	0,32	1,14	42,3	-8,86
T14	0,34	0,56	36,0	-8,63
T5	0,32	0,48	26,1	-8,72
T16	-	1,11	14,7	-8,50

* Dados obtidos por Bessems e col., 1995.

Os derivados 3,5-dissubstituídos com substituições com grupos elétrons-doadores como metila, metoxila e sulfeto apresentam menores valores de HOMO (-8,26 a -8,46 eV), maior atividade antiinflamatória e menor hepatotoxicidade, com maior participação destes grupos sobre o HOMO. Enquanto que substituições com grupos elétron atraentes como halogênios apresentam maiores valores de HOMO (-8,50 a -8,86 eV), menor atividade antiinflamatória e maior hepatotoxicidade, com menor participação destes grupos sobre HOMO (Figura 11).

Estes resultados indicam que o paracetamol e seus derivados devem necessariamente passar por um processo de oxidação, com a formação de semiquinona, tanto na atividade quanto na toxicidade, possivelmente através do radical tirosil-385 da COX e citocromo P-450 (MYERS, *et al.*, 1994). Portanto, grupos substituídos na posição 3,5 podem contribuir na estabilização do elétron desemparelhado, o que foi confirmado pela análise da distribuição de spin realizada por Diniz *et al.* (2004).

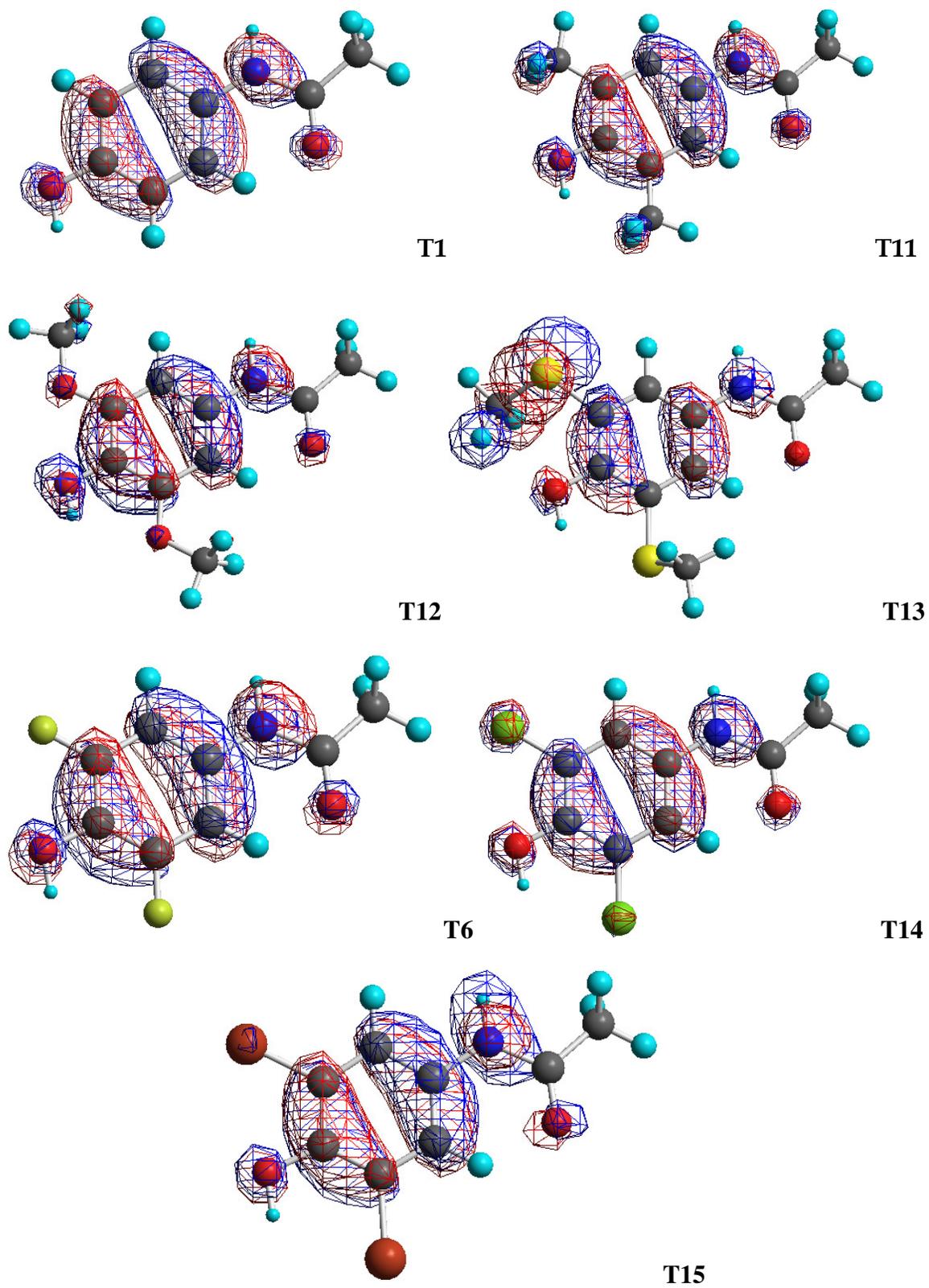


Figura 11: Gráficos de HOMO para derivados do paracetamol 3,5-dissubstituídos obtidos com o método semiempírico PM3.

3.1.4. Modelagem Molecular de Derivados Fenol e Éter do Paracetamol:

As propriedades teóricas calculadas para os derivados fenólicos e éter, funcionalizados com grupos alquílicos (Figura 12) foram relacionados com sua atividade analgésica medida pelo número de contorções induzidas por ácido acético comparados com a aspirina, realizados por Duffy *et al.* (2001).

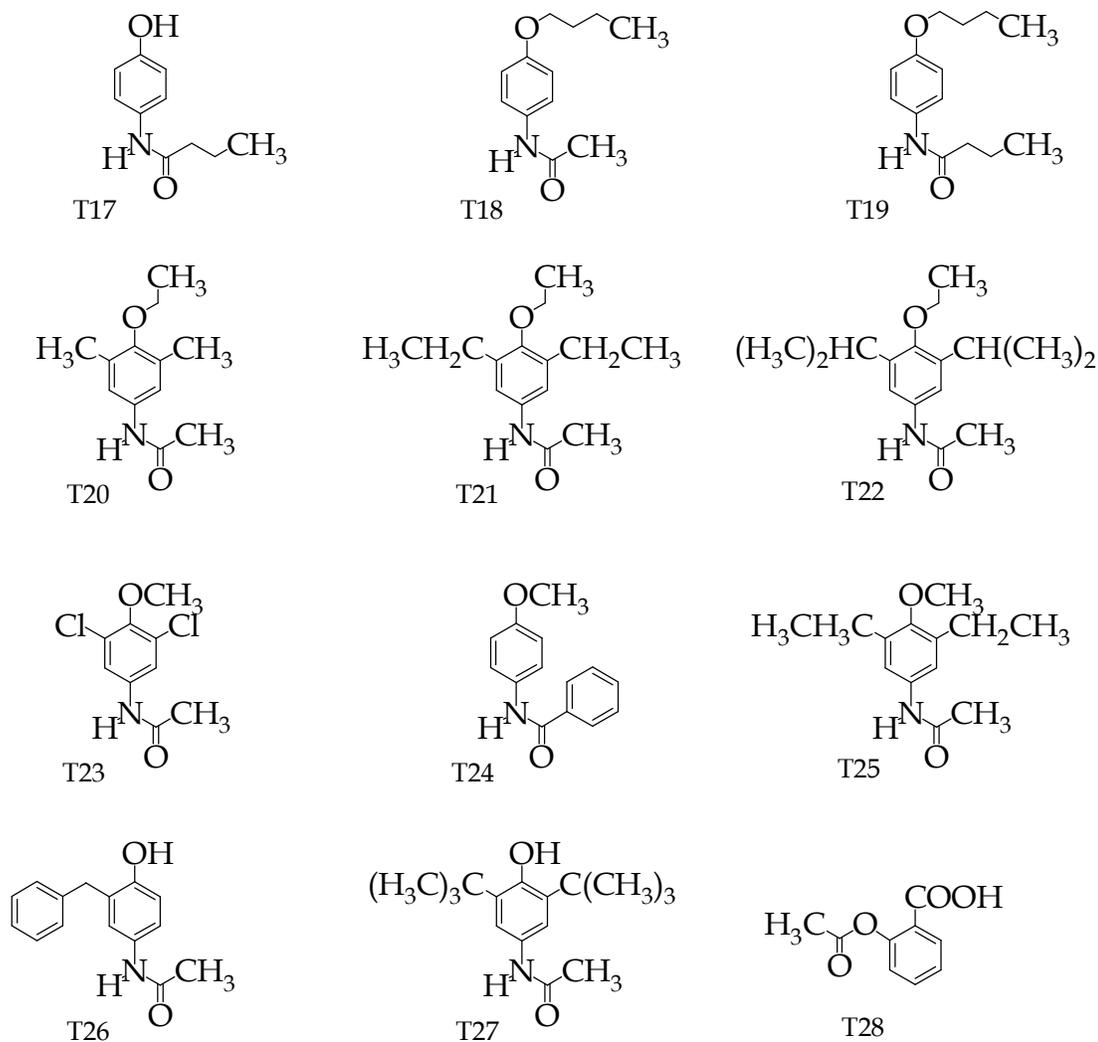


Figura 12: Estrutura de derivados fenóis-éteres do paracetamol.

Os resultados experimentais para compostos éter e fenólicos substituídos mostram que todos os compostos apresentaram atividade superior a aspirina. A molécula mais ativa, molécula T27, apresentou o menor valor de HOMO (-8,27 eV) em comparação com a aspirina que apresentou a menor atividade e maior valor de HOMO (-9,93 eV).

Por outro lado, a molécula mais ativa apresentou o menor valor de LUMO (0,27 eV), enquanto que o derivado menos ativo, aspirina, apresentou o maior valor de LUMO (-0,68).

O efeito da substituição do hidrogênio fenólico por grupos alquila, do grupo metil-acila por propil e fenil, dos hidrogênios das posições 3,5 do anel aromático por grupos alquila e cloro aumentou a lipossolubilidade deste conjunto. Os valores de LogP de 3,87 para o derivado mais ativo e mais lipofílico, enquanto que a aspirina apresentou o menor valor de 1,24 e menor lipofilia. Os valores de EH de 0,04 e -9,37 kcal/mol para a molécula T22, sendo a mais apolar ou lipofílica, apresentando radicais etoxi e *bis*-isopropil, enquanto que o derivado T17 é o mais hidrofílico com o grupo acila propílico (Tabela 6).

Tabela 6: Propriedades dos derivados éteres e fenóis do paracetamol obtidos pelo método semiempírico PM3.

Comp	AB* ED ₅₀	MD	HOMO	LUMO	Sup	Vol	EH	LogP	Ref	Pol
T17	0,00024	2,363	-8,52	0,18	404,02	655,65	-9,37	2,03	54,66	21,68
T18	0,00034	3,833	-8,65	0,20	459,75	723,23	-3,38	1,85	59,48	23,52
T19	0,00021	3,696	-8,45	0,25	565,34	879,28	-2,15	3,27	73,31	29,02
T20	0,00019	3,584	-8,35	0,07	423,32	693,05	-2,14	1,92	60,43	23,52
T21	0,00051	3,565	-8,76	0,10	464,34	786,83	-1,01	2,71	69,64	27,19
T22	0,00042	3,519	-8,82	0,09	508,45	879,64	0,04	3,37	78,73	30,86
T23	0,00011	3,994	-8,55	-0,17	433,46	684,99	-3,18	2,02	59,96	23,70
T24	0,00039	2,317	-8,46	-0,53	397,23	712,08	-7,10	2,56	65,78	25,84
T25	0,00037	3,297	-8,81	0,10	444,78	742,69	-1,56	2,37	64,89	25,35
T26	0,00014	2,163	-8,69	0,18	407,84	762,36	-8,86	2,69	70,57	27,67
T27	0,000049	2,035	-8,27	0,27	511,79	846,36	-1,31	3,87	78,17	30,86
T28	0,00094	3,959	-9,93	-0,68	301,85	526,89	-7,91	1,24	43,95	17,38

* Dados obtidos por Duffy e col., 2001.

Outras propriedades teóricas foram acrescentadas para o estudo da relação estrutura e atividade, como momento dipolar (MD), superfície (Sup), volume (Vol), refratividade (Ref) e polarizibilidade (Pol) estando descritas na tabela 6.

Os parâmetros eletrônicos de HOMO e LUMO apresentaram um coeficiente de correlação de 0,71 e 0,52, respectivamente, em relação a atividade antiinflamatória. Não obstante, os parâmetros de solubilidade apresentaram uma correlação menor, pois o CLogP foi 0,49 e a EH de 0,13 (Tabela 7).

Tabela 7: Matriz de correlação entre atividade analgésica e propriedades físico-químicas de derivados éteres e fenóis do paracetamol

	AB ED ₅₀	MD	HOMO	LUMO	Sup	Vol	EH	LogP	Ref	Pol
AB ED ₅₀	1									
MD	0,45	1								
HOMO	0,71	0,41	1							
LUMO	0,52	0,19	0,62	1						
Sup	0,43	0,01	0,62	0,73	1					
Vol	0,39	0,18	0,57	0,67	0,93	1				
EH	0,13	0,41	0,28	0,41	0,71	0,63	1			
LogP	0,49	0,43	0,52	0,52	0,79	0,91	0,48	1		
Ref	0,45	0,34	0,57	0,58	0,81	0,96	0,57	0,95	1	
Pol	0,46	0,34	0,58	0,58	0,82	0,96	0,56	0,95	0,99	1

Os resultados indicam que a introdução de grupos alquil no fenol, na amina e nas posições 3,5 do anel aromático alteraram a solubilidade. No entanto, o caráter ligante dos orbitais HOMO, pela possível doação de elétron ou hidrogênio, governam a interação droga-receptor. As moléculas mais lipofílicas apresentaram maior facilidade de absorção, conseqüentemente, atingiram maior biodisponibilidade e atividade. Deve ser ressaltado que os derivados fenólicos são inibidores radiculares, enquanto que a aspirina é um fármaco acilante da PGES (ROTH, 1975; KULMACZ *et al.*, 1994).

3.1.5. Modelagem Molecular de Derivados *p*-Aminofenol e Ácido Salicílico:

As moléculas S3, S4 e S5 mostradas na figura 13 foram selecionados pelo método de modelagem molecular por seus valores do HOMO, simplicidade molecular e suas propriedades de ADME, como a solubilidade, para serem sintetizados e avaliados biologicamente. Suas propriedades físico-químicas estão descritas na tabela 8. Outras moléculas tiveram suas propriedades calculadas, mas não foram selecionadas pelo critério sintético.

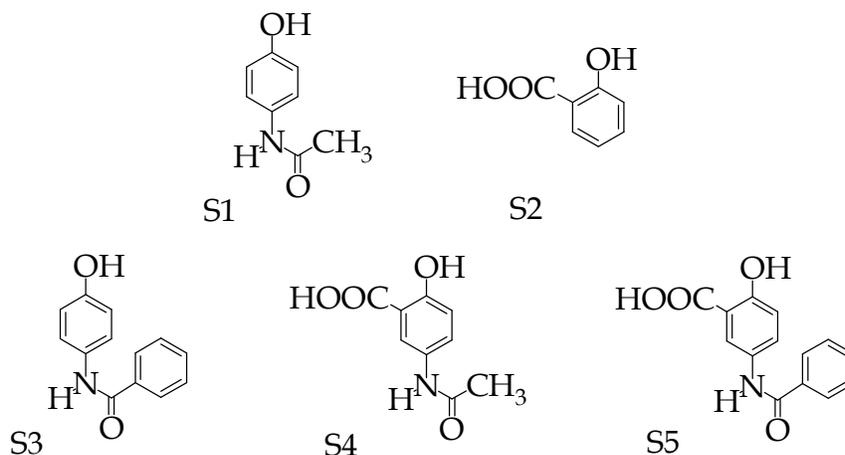


Figura 13: Derivados do *p*-aminofenol e ácido salicílico selecionados por modelagem molecular.

Os resultados de modelagem molecular para a seleção das moléculas foram a energia de hidratação semelhante ao ácido salicílico, ou seja, com maior hidrofiliicidade e os valores do HOMO próximos ao paracetamol, combinando as propriedades do grupo *p*-acetamidafenol e salicilato.

Tabela 8: Propriedades físico-químicas teóricas dos derivados do *p*-aminofenol e ácido salicílico obtidos pelo método semiempírico PM3.

Compostos	HOMO	CLogP	EH Kcal/mol
S1	-8,45	0,49	-10,61
S2	-9,06	2,18	-13,22
S3	-8,40	1,98	-12,29
S4	-8,66	1,29	-14,75
S5	-8,64	2,78	-16,46

3.2. ESTUDO DO METABOLISMO DO ÁCIDO SALICÍLICO:

Nossos resultados usando a teoria do funcional da densidade (TFD) com o funcional B3LYP e a base 6-31G(d), onde foram calculados o potencial de ionização (PI) e a densidade de spin. O fenol e o ácido benzóico foram usados para comparar a influência do grupo hidroxila e carboxila. O PI foi calculado através das diferenças de energia entre a forma radical cátion e a respectiva forma neutra.

A abstração de elétron pode ocorrer através da reação de um radical livre, como HO^\bullet ou uma enzima, como citocromo P-450. O envolvimento de intermediário tipo radical livre reativo durante a biotransformação de fármacos, tem sido relacionado a formação de radicais semiquinona, (BESSEMS *et al.*, 1988).

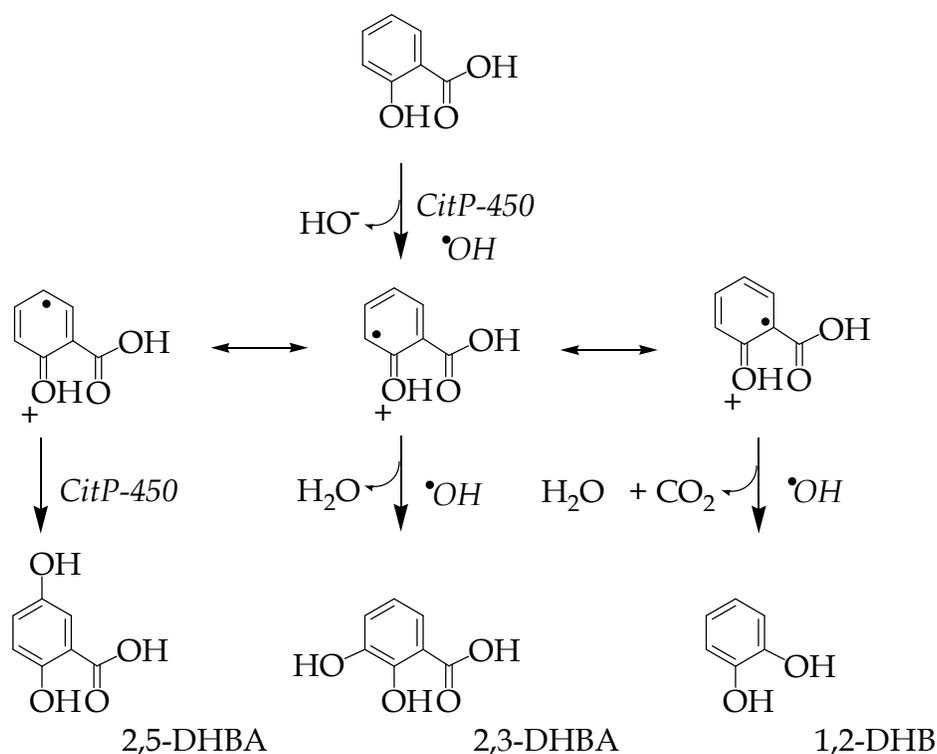


Figura 14: Proposta de estrutura, reações e formação de derivados hidroxilados do ácido salicílico.

Os cálculos com a TFD indicam que uma abstração inicial de um elétron para o ácido salicílico, fenol e ácido benzóico e aproximadamente 194,4, 190,8 e 214,6 kcal/mol. Estes resultados mostram que o substituinte elétron-doador como a hidroxila fenólica, decresce o PI, enquanto o grupo elétron-atraente como a carbonila aumentam o PI.

Um caminho hipotético foi proposto por Blackburn *et al.*, 1998 para a oxidação do ácido salicílico e está representado na figura 14, onde uma inicial abstração de elétron pode ocorrer através da reação do radical hidroxil ou citocromo P-450 com o ácido salicílico formando ácido salicílico cátion radical e anion hidroxila. A carga positiva radicalar é estabilizada por ressonância. A reação do citocromo-hidroxil com o cátion radical na posição 5 produz o ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,5-DHBA) via citocromo P-450. Enquanto que a recombinação durante a peroxidação lipídica nas posições 3- e 2- entre o cátion radical e outro radical hidroxil, gerando o ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHBA) e catecol, respectivamente.

O cálculo de densidade de spin para os cátions radicais do ácido salicílico e os derivados fenol e ácido benzóico, que foram usados para comparar a influência dos grupos fenol e ácido carboxílico (Figura 15). A distribuição de spin mostrou as maiores contribuições para o ácido salicílico no O₇ fenólico (22%), carbono C₁ ligado ao grupo carbonila (12%), carbono C₂ ligado ao grupo hidroxila (15%), carbono C₃ (22%) e carbono C₅ (40%). Na molécula do fenol as contribuições no O₇ fenólico (23%), carbono C₁ (17%), carbono C₂ (22%), carbono C₃ (12%) e no carbono C₅ (42%). Enquanto que para o ácido benzóico as contribuições no carbono C₁ (25%), carbono C₂ (35%), carbono C₄ (22%) e carbono C₅ (35%). Os resultados indicam que tanto no ácido salicílico quanto no fenol e ácido benzóico a posição 5 contribui mais para a estabilização do elétron desemparelhado e pode ser o ponto de maior reatividade na biotransformação destes compostos.

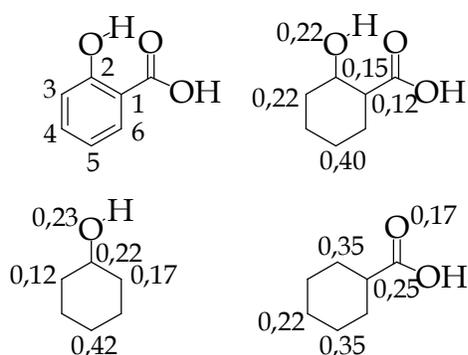


Figura 15: Estrutura, numeração e cálculo de densidade de spin para o ácido salicílico e seus derivados.

A presença do grupo hidroxila no anel aromático aumenta as contribuições de spin particularmente nas posições *ortho* (0,12 e 0,17) e *para* (0,42), enquanto que o grupo carbonila aumenta a reatividade nas posições *ortho* (0,35), *meta* (0,35), e *para* (0,22). Portanto, o OH é o grupo que mais contribui para a reatividade química e potencial de ionização do ácido salicílico. Ou seja, grupos elétron-doadores substituídos na posição 2, como hidroxila (-OH) aumentam as contribuições de spin nas posições C₁, C₂, C₃ e C₅, enquanto que grupos elétron-atraentes substituídos na posição 1, como carbonilas de ácidos (-COOH) diminuem a contribuição de spin nas posições C₁, C₂, C₄ e C₆.

Os resultados dos estudos teóricos mostram que a biotransformação do ácido salicílico pode ser compreendida através da densidade de spin é o potencial de oxidação formando os derivados hidroxilados. O grupo hidroxila fenólica apresenta maior influência na reatividade química, potencial de ionização e distribuição de spin, em relação ao grupo carbonila ácido.

A localização do elétron desemparelhado na posição C₅ explica a formação do principal metabólito oxidativo do ácido salicílico, o ácido 2,5-dihidroxibenzóico ou ácido gentísico via citocromo P-450 presente no sistema de hidroxilases microsossomais hepáticos (RUMBLE *et al.*, 1981). Enquanto que a localização do elétron desemparelhado nas posições C₁ e C₃ explica a reatividade química, via radical hidroxil para formar o ácido 2,3-dihidroxibenzóico e catecol, respectivamente, durante a peroxidação de lipídeos. O 2,3-DHBA é usado como marcador durante a peroxidação lipídica induzida *in vivo* pela produção de radicais HO• (TSUJINOMOTO *et al.*, 1998) e são seqüestradores de HO• na inflamação aguda causada por hipoclorito de sódio e bloqueada por salicilatos, onde foi detectadas a formação dos ácidos 2,3- e 2,5-DHBA após a hidroxilação do salicilato por Nappi & Vass (1998). Kadkhodae e col. (1995) e Exner e col. (2000) mostraram a formação destes ácidos após a administração do ácido acetilsalicílico ou salicilato de sódio em condições de estresse oxidativo, pela exposição ao oxigênio, indução pela doxorubicina, que altera o ciclo-redox, na artrite

reumatóide, infarto do miocárdio, isquemia cerebral, diabetes, pulmonar e injúria renal.

Salicilatos apresentaram a capacidade seqüestrante sobre os radicais hidroxil (GROOTVELD & HALLIWELL, 1996; KAUR *et al.*, 1997; HERMANN *et al.*, 1999), seus derivados ácido salicílico e o ácido gentísico são a primeira e segunda linha de metabólitos da aspirina, que impediram a oxidação radicalar do LDL induzida por óxido nítrico e superóxido (HERMANN *et al.*, 1999).

Os ensaios de hidroxilação aromática foram usados em sistemas biológicos, envolvendo a adição de compostos aromáticos a um modelo, onde as reações são produzidas pelo radical hidroxil, e os produtos hidroxilados são quantificados. O 2,5-DHBA pode também ser gerado da oxidação enzimática via citocromo P-450 *in vivo*, enquanto que o 2,3-DHBA pode ser produzido somente pelo ataque do radical hidroxil no salicilato e o catecol é formado pela reação de descarboxilação (HALLIWELL *et al.*, 1991). Entretanto, até então nenhum mecanismo de hidroxilação seletiva dos salicilatos foi esclarecido e proposto na literatura.

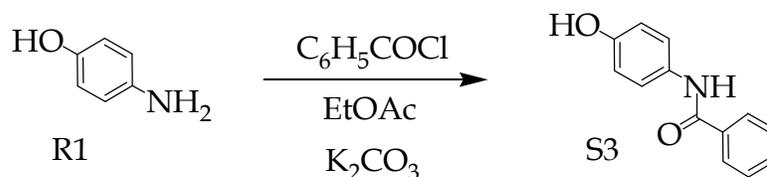
Devido a alta reatividade, o HO[•] tem uma meia-vida muito curta e, conseqüentemente, presente em concentrações extremamente baixas nos sistemas biológicos. A reação de hidroxilação aromática tem sido usada para a medida de sua produção *in vitro* (LUO & LEHOTAY, 1997; COUDRAY & FAVIER, 2000). Se um composto aromático pudesse ser administrado aos seres humanos com segurança, nas doses que produzem concentrações nos líquidos plasmáticos suficientes para limpar ou seqüestrar HO[•], os ensaios de tais produtos seria uma evidência razoável de que HO[•] está sendo formado *in vivo*, desde que estes produtos não fossem formados por hidroxilação enzimática (HERMANN *et al.*, 1999). O anel aromático é nucleofílico e esta nucleofilia é aumentada pela presença do grupo do fenol, particularmente em suas posições *orto* e *para*, enquanto que a presença do grupo ácido carboxílico aumenta a reatividade na posição *meta*. Os resultados explicam a hidroxilação regioseletiva para a formação dos ácidos 2,3- e 2,5-DHBA substituídos na biotransformação do ácido salicílico via Cit P-450.

3.3. SÍNTESE DE DERIVADOS FENÓLICOS:

3.3.1. Preparação do *p*-benzamidafenol (**S3**):

A síntese do composto *p*-benzamidafenol **S3** foi realizada através da reação de acilação do *p*-aminofenol **R1** com cloreto de benzoíla em acetato de etila e carbonato de potássio para neutralizar o ácido clorídrico eliminado (Esquema 22). O composto é solúvel à frio em etanol, metanol, acetonitrila e dimetilsulfóxido, sendo que à quente apresentou solubilidade em acetato de etila, acetona e ácido acético. Insolúvel em diclorometano, clorofórmio, água e hexano. Apresenta ponto de fusão que varia de 214 a 214,8 °C (SPORTOLETTI, 1986).

Esquema 22: Síntese do derivado *p*-benzamidafenol.



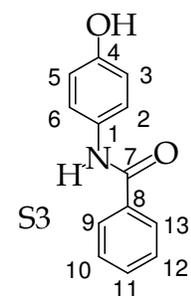
O espectro de RMN- ^1H (300 MHz; DMSO) do composto benzoil **S3**, sumarizado na tabela 9 mostra um duplo-dublete em 7,94 ppm integrando para dois hidrogênios referentes aos hidrogênios aromáticos H-3 e H-5 acoplanando em *orto* (6,9 Hz) com H-2 e H-6. Outro duplo-dublete em 6,76 ppm integrando para dois hidrogênios referentes aos hidrogênios aromáticos H-2 e H-6 acoplanando em *orto* (9 Hz) com H-3 e H-5. Um multiplete centrado em 7,52 ppm integrando para cinco hidrogênios referentes aos hidrogênios aromáticos do grupo benzoil H-11/12/13. O singlete em 10,03 ppm integrando para um hidrogênio, correspondendo ao grupo fenólico e 9,32 ppm integrando para um hidrogênio é referente ao hidrogênio da função acetamida.

O espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz; DMSO) do composto **S3**, sumarizado na tabela 9, mostra um sinal em 130,82 ppm referente ao carbono C-1, um sinal em 115,13 ppm relacionado aos carbonos aromáticos C-2 e C-6, um sinal em 122,48 ppm referente aos carbonos aromáticos C-3 e C-5, um sinal em 153,88 ppm relacionado ao carbono C-4 ligado à hidroxila fenólica, um sinal em 165,15 ppm

atribuído ao carbono carbonílico. Um sinal em 135,30 ppm referente ao carbono C-8, um sinal em 128,46 ppm relacionado aos carbonos C-9 e C-13, outro sinal em 127,69 ppm referente aos carbonos C-10 e C-12 e um sinal em 131,40 ppm atribuído ao carbono C-11.

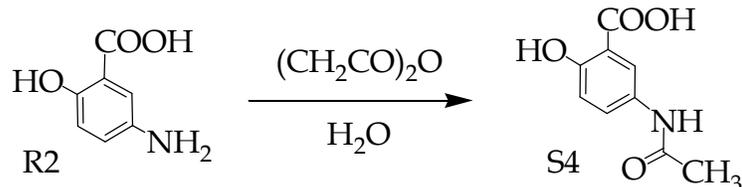
Tabela 9: Deslocamento químico de hidrogênios e carbonos do composto **S3** no RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (300 MHz e 75 MHz; Acetona).

N	E	C δ (ppm)	H δ (ppm)	M	J(Hz)
1	C	130,82	-	-	-
2 e 6	CH	115,13	6,76	dd	9,0
3 e 5	CH	122,48	7,94	dd	6,9
4	C	153,88	-	-	-
7	C=O	165,15	-	-	-
8	C	135,30	-	-	-
9	CH	128,46	7,52	m	-
10	CH	127,69	7,52	m	-
11	CH	131,40	7,52	m	-
12	CH	127,69	7,52	m	-
13	CH	128,46	7,52	m	-
14	OH	-	10,02	s	-
15	NH	-	9,32	s	-



3.3.2. Preparação do ácido 5-acetamidosalicílico (**S4**):

O composto **S4** foi obtido através da reação com ácido 5-amino-salicílico **R2** e anidrido acético, utilizando água como solvente (Esquema 23). Solúvel à frio em etanol, metanol e dimetilsulfóxido, acetonitrila, ácido acético e acetona, já à quente foi solúvel em acetato de etila e água. Sendo que foi insolúvel em diclorometano, clorofórmio e hexano. Apresentando ponto de fusão que varia de 228,0 a 230,0 °C.

Esquema 23: Síntese do derivado ácido 5-acetamidossalicílico.

O espectro de RMN- H^1 (300 MHz; DMSO) do composto **S4**, sumarizado na tabela 10, mostra um dubleto em 6,89 ppm com constante de acoplamento de 9,0 Hz, integrando para um hidrogênio referente ao hidrogênio aromático H-5, um dubleto em 8,08 ppm com constante de acoplamento de 2,7 Hz, integrando para um hidrogênio referente ao hidrogênio aromático H-2, um duplo-dupleto em 7,64 ppm integrando para um hidrogênio com constante de acoplamento de 9,3 e 2,7 Hz atribuído a H-6, um singleto em 9,87 ppm referente ao hidrogênio do grupo hidroxila fenólica. O sinal do grupamento acetamida pode observado através do singleto em 2,00 ppm referente aos três hidrogênios da metila.

Tabela 10: Deslocamento químico de hidrogênios e carbonos do composto ácido 5-acetamidossalicílico **S5** no RMN- H^1 e RMN- C^{13} (300 MHz e 75 MHz; DMSO).

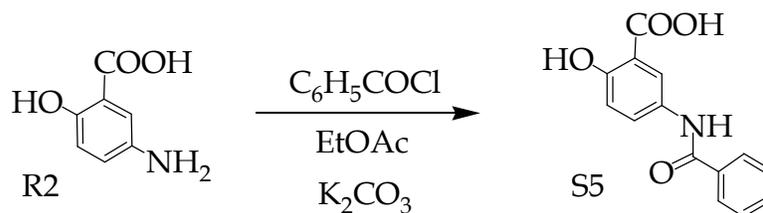
N	E	C δ (ppm)	H δ (ppm)	M	J(Hz)
1	C	131,28	-	-	-
2	CH	127,54	8,08	d	2,7
3	CH	112,52	-	-	-
4	C	157,16	-	-	-
5	CH	117,30	6,89	d	9,0
6	CH	120,54	7,64	d	2,7 e 9,3
7	C=O	168,22	-	-	-
8	CH ₃	23,94	2,00	s	-
9	C=O	171,97	-	-	-
10	OH	-	9,87	s	-

O espectro de RMN- C^{13} (75 MHz; DMSO) do composto **S4**, sumarizado na tabela 10, mostra um sinal em 131,28 ppm referente ao carbono C-1, um sinal em 127,54 ppm relacionado ao carbono aromático C-2, um sinal em 112,52 ppm referente ao carbono aromático C-3, um sinal em 157,16 ppm relacionado ao carbono C-4 ligado à hidroxila fenólica, um sinal em 117,30 ppm relacionado ao carbono aromático C-5, um sinal em 120,54 ppm relacionado ao carbono aromático C-6, um sinal em 171,97 ppm atribuído ao carbono carbonílico da função ácido carboxílico. Os sinais do grupamento acetamida podem observados através do deslocamento em 168,22 ppm referente ao carbono carbonílico da função amida e 23,94 ppm para o carbono do grupo metila.

3.3.3. Preparação do ácido 5-benzamidosalicílico (S5):

O composto ácido 5-benzamidosalicílico **S5** foi obtido através da reação do ácido 5-amino-salicílico **R2** com cloreto de benzoíla, utilizando acetato de etila como solvente (Esquema 24). O composto **S6** foi solúvel à frio em metanol e dimetilsulfóxido, já à quente foi solúvel em acetato de etila, acetonitrila, acetona, ácido acético e etanol. Sendo que foi insolúvel em diclorometano, clorofórmio, água e hexano. Apresenta ponto de fusão entre 278,4 a 279,8 °C (SPORTOLETTI, 1986).

Esquema 24: Síntese do derivado ácido 5-benzamidosalicílico.



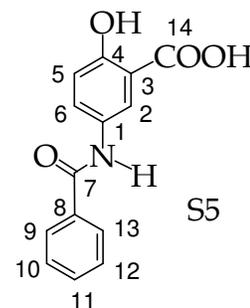
A estrutura química deste composto foi elucidado através da espectroscopia de RMN- H^1 e C^{13} e os valores estão descritos na tabela 11.

O espectro de RMN- H^1 (300 MHz; DMSO) do composto **S5**, sumarizado na tabela 11, mostra um dubleto em 8,29 ppm integrando para um hidrogênio

referente ao hidrogênio aromático H-2, *meta* relacionado com H-6 (2,7 Hz). Um dubleto em 6,97 ppm integrando para um hidrogênio referente ao hidrogênio aromático H-5 acoplanando em *orto* (9,0 Hz) com H-6. Um duplo dubleto em 7,89 ppm integrando para um hidrogênio referente ao hidrogênio aromático H-6, *orto e meta* relacionados com H-5 e H-2 (8,7 e 2,7 Hz), respectivamente. O singlete em 10,24 ppm integrando para um hidrogênio corresponde ao grupo fenólico. O duplo dubleto em 7,96 ppm integrando para dois hidrogênios corresponde aos hidrogênios aromáticos H-9 e H-13 acoplanando em *orto* (6,9 e 1,2 Hz) com H-10/H-12 e H-11, respectivamente. O multiplete centrado em 7,53 ppm integrando para três hidrogênios se refere aos hidrogênios aromáticos H-10, H-11 e H-12.

Tabela 11: Deslocamento químico de hidrogênios e carbonos do composto **S5** no RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (300 MHz e 75 MHz; DMSO).

N	E	C δ (ppm)	H δ (ppm)	M	J(Hz)
1	C	134,87	-	-	-
2	CH	131,66	8,29	d	2,7
3	C	117,21	-	-	-
4	C	157,56	-	-	-
5	CH	112,54	6,97	d	9,0
6	CH	128,80	7,89	dd	2,7 e 8,7
7	C=O	165,39	-	-	-
8	C	130,99	-	-	-
9 e 13	CH	128,52	7,96	dd	1,2 e 6,9
10 e 12	CH	127,71	7,52	m	-
11	CH	121,97	7,52	m	-
14	C=O	171,92	-	-	-
15	OH	-	10,24	s	-



3.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE:

3.4.1. Reatividade com a 1,1-difenil-2-picrilhidrazil radical (DPPH):

Neste estudo foram utilizados nove fenóis na dose de 100 μ M mostrados na figura 16. O trolox **S6** foi usado como controle positivo, a aspirina **S7** por ser desprovida de grupo fenólico foi utilizada como controle negativo, enquanto que o fenol **S8** por ser um fenol não substituído foi utilizado para avaliar as contribuições dos grupos substituídos nas posições *orto* e *para* fenólica e o ácido 5-amino-salicílico **S9** para avaliar a influência dos grupos acetil e benzoil.

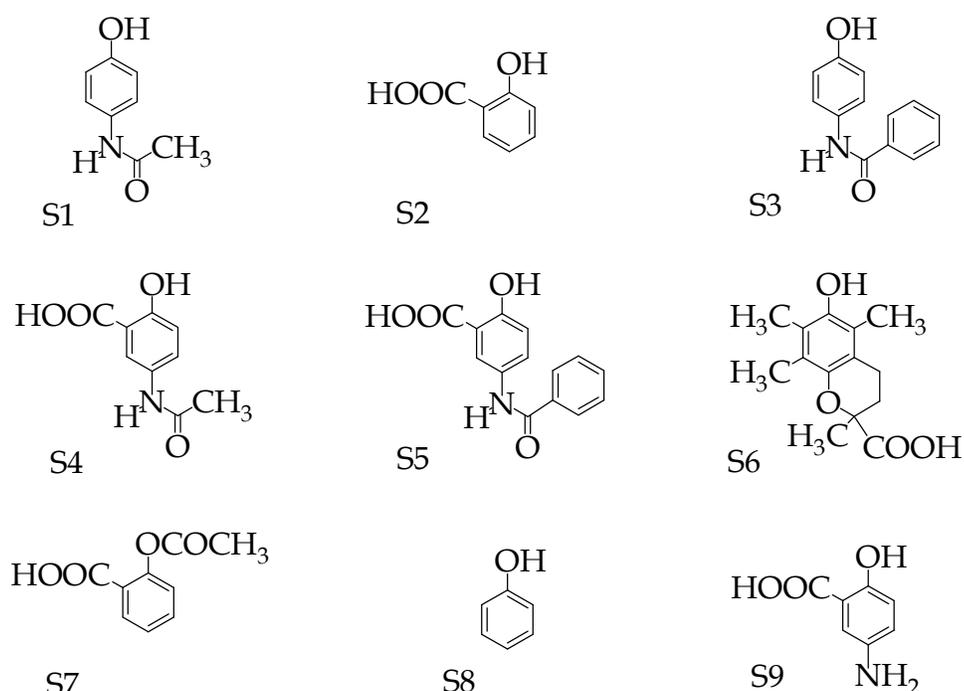


Figura 16: Estrutura química dos derivados fenólicos.

Os resultados da capacidade antioxidante dos derivados fenólicos através da inibição percentual do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil mostram diferente reatividade molecular. Estes valores estão descritos no gráfico 1, onde podemos observar uma inibição de 91,25% para o trolox **S6**, 83,83% para o ácido 5-amino-salicílico **S9**, 1,25% para a aspirina **S7** e 2,58% para o fenol **S8**, indicando que o trolox e o ácido 5-amino-salicílico apresentam uma atividade mais de trinta e quase setenta vezes superior a aspirina e fenol, respectivamente.

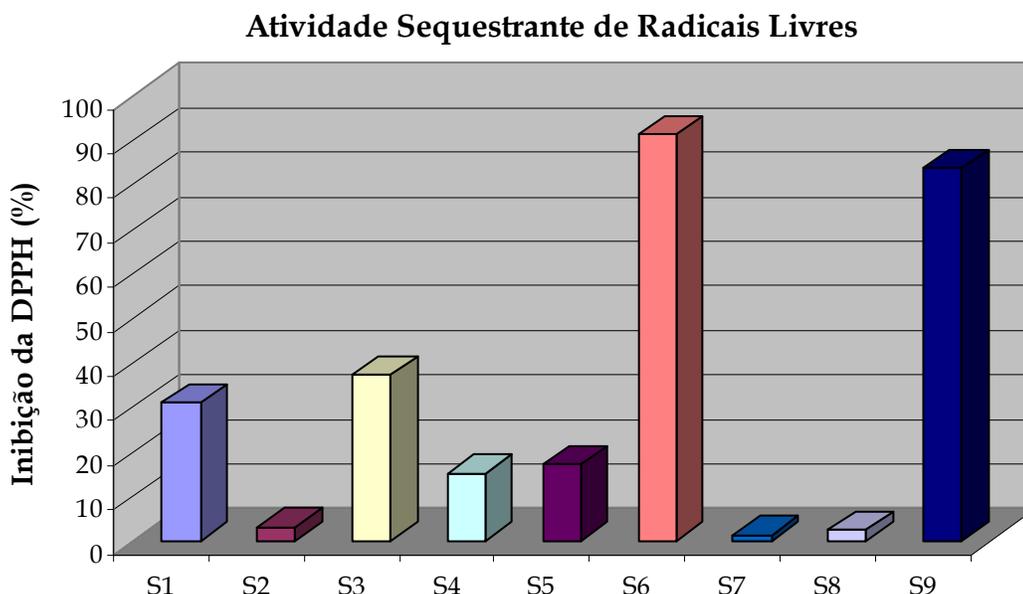


Gráfico 1: Avaliação da capacidade sequestrante de derivados fenólicos na dose de 100 μ M em solução etanólica contra radicais livres usando o métodos da DPPH. As drogas foram usadas na concentração de 100 μ M. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados são mostrados em valores percentuais.

No mesmo experimento, as moléculas paracetamol **S1** e ácido salicílico **S2** apresentaram valores de inibição de 31,15 e 3,14%, respectivamente, mostrando que o paracetamol apresenta uma capacidade antioxidante dez vezes superiores ao ácido salicílico e três vezes menor que o trolox neste modelo de avaliação.

O derivado *p*-benzamidafenol **S3** apresentou uma atividade superior ao paracetamol de 37,21%, mostrando a diferença da influência do grupo benzoil do *p*-benzamidafenol em relação ao grupo acetil do paracetamol.

Os compostos derivados da associação molecular *p*-aminofenol e salicilato apresentaram valores de 15,16 e 17,25% para o ácido 5-acetamidosalicílico **S4** e ácido 5-benzamidosalicílico **S5**, respectivamente. Estes compostos são duas vezes menos ativos que o paracetamol, mas cinco vezes mais ativo que o ácido salicílico. Outro dado importante a ser considerado é a influência do grupo amina do ácido 5-amino-salicílico **S9** em relação às moléculas substituídas por amidas, onde a atividade diminui aproximadamente de cinco vezes.

3.4.2. Relação Estrutura e Atividade Antioxidante:

A relação estrutura química e atividade antioxidante dos nove derivados fenólicos, substituídos por grupos *orto*-ácido e *para*-amida, avaliados através do modelo de inibição do radical DPPH foram comparados com seus valores de HOMO e potencial de ionização, calculados pelo método TFD usando o funcional B3LYP e UB3LYP, com a base 6-31G*, tendo esta metodologia sido empregada com sucesso nos trabalhos de Diniz *et al.*, 2004 e Alves *et al.*, 2006, conforme apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Capacidade antioxidante, HOMO e potencial de ionização de derivados fenólicos pelo método TFD.

Compostos	DPPH (%)	HOMO	PI
Fenólicos	(100µm)	(eV)	(kcal/mol)
S1	31,15	-5,45	171,31
S2	3,14	-6,24	192,69
S3	37,21	-5,46	167,25
S4	15,16	-5,72	174,86
S5	17,25	-5,71	171,19
S6	91,25	-5,08	158,50
S7	1,25	-6,74	200,58
S8	2,58	-5,96	189,16
S9	83,83	-5,02	162,28

Os resultados dos estudos de relação estrutura e atividade de derivados fenólicos indicam que os compostos que demonstraram menor capacidade antioxidante apresentaram maiores valores de -6,74 (S7) a -5,96 eV (S8) para o HOMO e 200,58 (S7) a 189,16 kcal/mol (S8) para o PI. Estes valores mais elevados mostram a influência do grupo fenol, que está esterificado na aspirina e dos substituintes *para* ausentes no fenol. Enquanto os compostos que demonstraram maior capacidade antioxidante apresentaram menores valores de -5,08 (S6) a -5,02 eV (S9) para o HOMO e 158,50 (S6) a 162,28 kcal/mol (S9) para o PI.

As moléculas paracetamol **S1** e ácido salicílico **S2** apresentaram valores de -5,45 (S1) a -6,24 eV (S2) para o HOMO e 171,31 (S1) a 192,69 kcal/mol (S2) para o PI, mostrando que o paracetamol apresenta uma capacidade doadora de elétrons superior em 21,38 kcal/mol em relação ao ácido salicílico.

O derivado *p*-benzamidafenol **S3** apresentou valores de -5,46 eV para o HOMO e 167,25 kcal/mol para o PI. Este valor explica a capacidade antioxidante superior ao paracetamol no modelo de DPPH, mostrando que o grupo benzoil do *p*-benzamidafenol exerce maior influência sobre a capacidade doadora de elétrons que o grupo acetil do paracetamol.

Finalmente, os compostos derivados da associação molecular *p*-aminofenol e salicilato apresentaram valores de HOMO de -5,72 (S4) e -5,71 eV (S5), enquanto que o valor de PI foi de 174,86 (S4) e 171,19 kcal/mol (S5). Os resultados de HOMO são superiores ao paracetamol (-5,45 eV) e inferiores ao ácido salicílico (-6,24 eV), enquanto que o PI estão próximos do valor do paracetamol (171,31 kcal/mol), indicando que o grupo carboxila exerce pouco efeito como um grupo retirador de elétrons, possivelmente devido ao tautomerismo do grupo carboxila entre a carbonila e o grupo hidroxila. Estes resultados mostram também que a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos não é determinada apenas pelo orbital molecular ocupado de mais alta energia ou pelo potencial de ionização, mas pela combinação das duas propriedades.

Os valores que suportam a afirmação acima são o HOMO e o PI do ácido 5-amino-salicílico de -5,02 eV e 162,28 kcal/mol, respectivamente, enquanto que para o trolox os valores são de -5,08 eV e 158,50 kcal/mol. Estes resultados mostram que se o HOMO for o responsável pela atividade o ácido 5-amino-salicílico **S9** seria o mais ativo, mas se o potencial de ionização determinasse a capacidade antioxidante a molécula mais ativa seria o trolox **S6**.

A influência dos grupos amidas foi observada ao compararmos com o grupo amina do ácido 5-amino-salicílico **S9**. No grupo amina os elétrons estão em ressonância com o anel aromático, enquanto que com a substituição com um

grupo acila (acetil ou benzoil), os elétrons são disputados por efeito de ressonância elétron retirador do grupo carbonila.

A análise do orbital molecular de mais alta energia mostra os grupamentos que estão contribuindo para a formação deste orbital, portanto, se a molécula interagir com seu sítio receptor como doador de elétron deverá ser por esta região. Ao mesmo tempo, se a molécula doar um elétron, os grupos que contribuem por efeito de indutivo ou efeito de ressonância para a formação do HOMO, deverão participar na estabilização do elétron desemparelhado (Figura 17). Através desta análise podemos separar as moléculas em três classes distintas de acordo com seus valores de HOMO e PI.

No primeiro grupo, ácido salicílico, aspirina e fenol com os maiores valores de HOMO e PI apresentaram menor capacidade antioxidante, onde podemos observar que apenas o anel aromático e o oxigênio fenólico participam da formação do HOMO, o ácido carboxílico não apresenta uma contribuição efetiva, mas podemos observar o efeito retirador de elétrons da carboxila éster da aspirina, que apresentou o maior valores de HOMO e IP.

O segundo grupo é formado pelo paracetamol, *p*-benzamidafenol, ácido 5-acetamidosalicílico e ácido 5-benzamidosalicílico com valores médios de HOMO e PI com capacidade antioxidante significativa. Neste grupo podemos observar que a contribuição dos grupos *p*-amidafenol na formação do HOMO, enquanto que o ácido carboxílico também não apresenta uma contribuição efetiva.

No último grupo estão as moléculas que apresentaram maior capacidade antioxidante, trolox e ácido 5-amino-salicílico, com os menores valores para o HOMO e PI, onde observamos a participação por efeito de ressonância dos grupos localizados em posição *para* fenólica. O grupo amina do ácido 5-amino-salicílico é mais efetivo e com maior participação em relação ao éter cromona do trolox. No entanto os grupos alquilas (metilas e cromona), substituídos no anel aromático do trolox tem maior participação por efeito indutivo em relação aos demais grupos, por esta razão o trolox é o composto mais ativo.

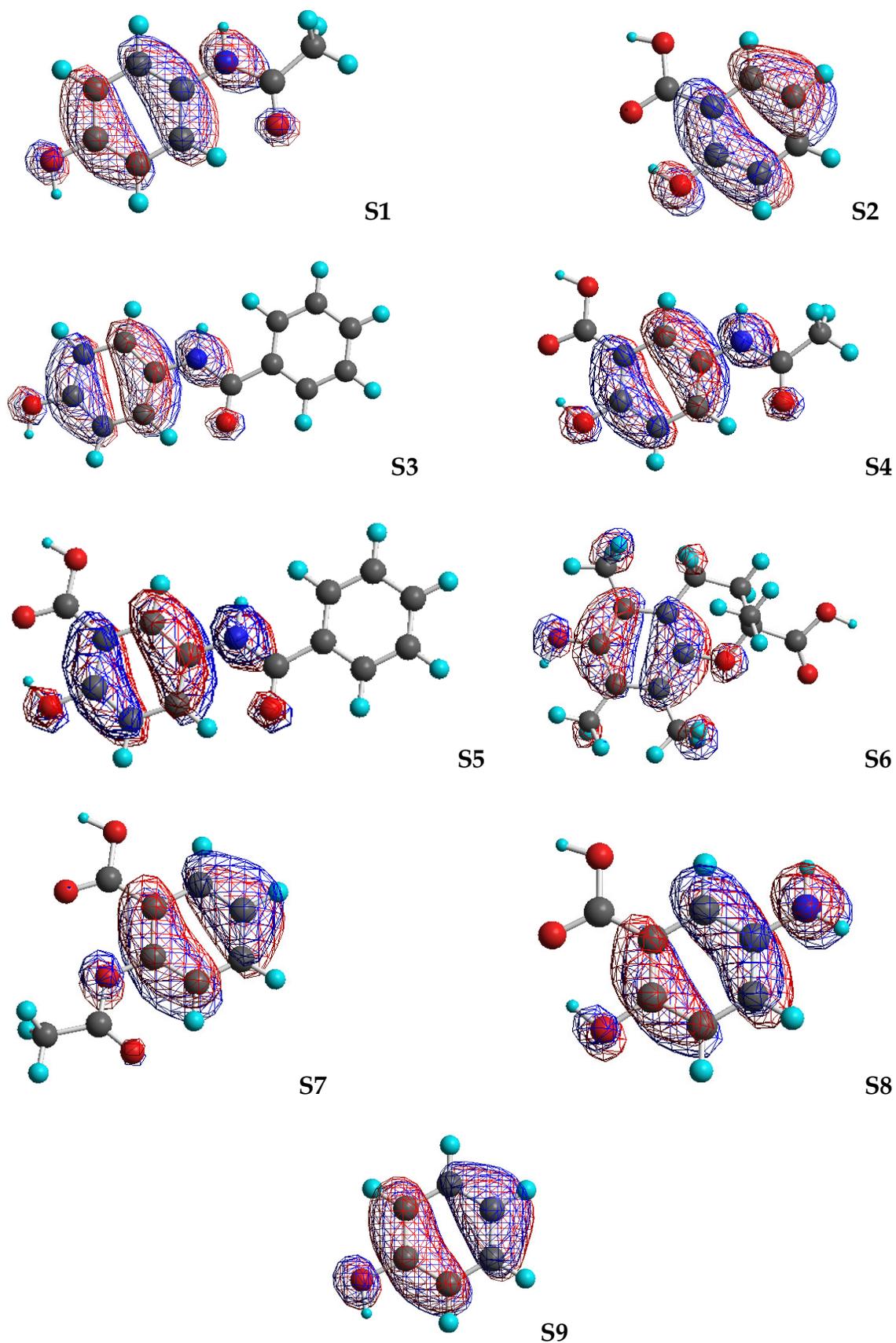


Figura 17: Orbital molecular ocupado de mais baixa energia de nove derivados fenólicos (S1-S9) obtidos pelo método semiempírico PM3.

3.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM ERITRÓCITOS HUMANOS:

3.5.1. Estresse oxidativo Induzido pelo H₂O₂:

Com base nos resultados da capacidade antioxidante dos derivados fenólicos avaliados pela inibição do radical livre 1,1-difenil, 2-picrilhidrazil, o próximo passo foi encontrar um modelo biológico que descrevesse a atividade antioxidante dentro da correlação encontrada pelo método de DPPH. O primeiro modelo de estudo foi a avaliação da atividade antioxidante em eritrócitos humanos induzida pelo peróxido de hidrogênio, com bloqueio da atividade peroxidase. Os resultados do teste foram avaliados através da medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

O gráfico 2 mostra o efeito antioxidante de derivados fenólicos de AINEs na peroxidação lipídica induzida por H₂O₂ (30 mM) em eritrócitos humanos, onde podemos observar que o trolox apresentou significativa redução da concentração dos níveis de TBARS em comparação com o paracetamol e o ácido salicílico.

O ácido salicílico aumentou a concentração de TBARS em 42,5% para a dose de 250 µM, 8% para a dose de 500 µM e 12,6% para a dose de 1000 µM, mas as doses de 500 e 1000 µM não foram estatisticamente significantes em comparação com o controle (Tris-KCl-HCl pH 7,4).

Enquanto que o paracetamol apresentou um aumento não significativamente na dose de 250 µM, mas decresceu os níveis de TBARS em 24,7 e 35,7% nas doses de 500 µM e 1000 µM, respectivamente. Resultados semelhantes aos do paracetamol foram observados para o trolox com uma redução menor nas doses de 500 e 1000 µM com valores de 33,1 e 48,8%, respectivamente.

Estes resultados demonstram que o paracetamol apresenta efeito antioxidante no estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio em eritrócitos humanos, enquanto que o ácido salicílico não apresenta atividade no mesmo modelo de avaliação.

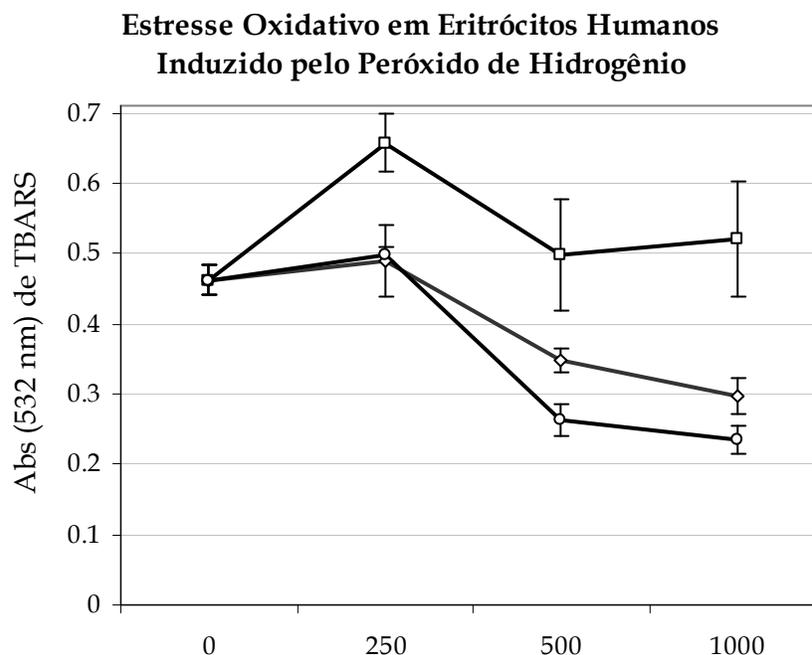
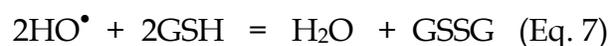
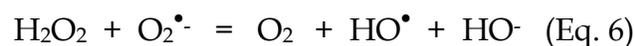
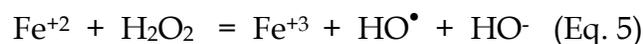


Gráfico 2: Avaliação do efeito antioxidante do paracetamol (◇) e ácido salicílico (□) comparados com o trolox (○) na peroxidação lipídica induzida pelo H₂O₂ (30 mM) em eritrócitos humanos. Os valores representam a média; n = 3. $P \leq 0,05$ na dose de 250 μM, $P \leq 0,001$ nas doses de 500 e 1000 μM em relação ao controle. Para estatística, testes *t* de Student e ANOVA foram usados.

O estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio no eritrócito é resultante do aumento na geração de radical hidroxil (HO[•]). Os radicais hidroxil são formados normalmente através das reações de Fenton (Eq. 5) e Haber-Weiss (Eq. 6) (SCHIMMEL; BAUER, 2002), mas são detoxificados pelo mecanismo seqüestrante de radicais livres realizados pela glutatona (Eq. 7) e pelas vitaminas E e C (Eq. 8) (FIERS *et al.*, 1999; HAYES *et al.*, 1999).



Os eritrócitos possuem um segundo sistema de defesa para proteger-se do peróxido de hidrogênio impedindo a geração de radicais hidroxil, constituída pela

catalise (CAT) (Eq. 9) e glutathiona-peroxidase (GSP) (Eq. 10), transformando o peróxido de hidrogênio em água.



No entanto, em nosso estudo utilizamos a azida de sódio (NaN_3), um bloqueador de peroxidases, para a indução do estresse oxidativo, fazendo com que o peróxido de hidrogênio seja consumido na produção de radical livre hidroxil através das reações de Fenton e Haber-Weiss (FIERS *et al.*, 1999).

Sabe-se que a ação de radicais HO^\bullet sobre as membranas dos eritrócitos está relacionada aos transtornos da permeabilidade, alteração do fluxo iônico, perda da seletividade para a entrada ou saída de nutrientes, acúmulo de compostos tóxicos resultantes do metabolismo celular, resultantes da reação de oxidação da fração de ácidos graxos polinsaturados (Eq. 11) (VACA *et al.*, 1988; BABER *et al.*, 1994).



Também é conhecido que em meio aeróbio L^\bullet se combina com o oxigênio (O_2) forma-se o radical peroxila (LOO^\bullet) (Eq. 12), o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical (L^\bullet), promovendo a etapa de propagação (Eq. 13). A reação do radical peroxila com o hidrogênio forma o hidroperóxido lipídico (LOOH) (PORTER *et al.*, 1995).



E finalmente, sabe-se que a principal defesa contra os danos oxidativos do radical livre hidroxil são glutathiona (Eq. 14), vitaminas e enzimas antioxidantes, formando derivados hidroperóxido, alcoólicos ou carbonílicos (CHAN, 1987).

Derivados carbonílicos aldeído e cetonas, principalmente o malondialdeído são reativos com o ácido tiobarbitúrico (ARMSTRONG *et al.*, 1998).



Portanto, em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH, mas sob condições de excesso de agentes oxidantes, pelo aumento dos níveis de H_2O_2 e HO^{\bullet} , aliado a deficiência do sistema protetor, pela inibição das peroxidases por NaN_3 , haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, caracterizando o estresse oxidativo induzido, com falência dos mecanismos de reparo aos danos oxidativos e aumento da produção de ácidos graxos oxidados e dos níveis de TBARS (HALLIWELL, 1993).

O nível do estresse oxidativo induzido pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH, mas os resultados são mais bem quantificados no estresse fisiológico e dependendo do sistema de indução, quando comparado ao grupo controle não exposto (BEEHLER *et al.*, 1989).

A membrana do eritrócito contém grande número de grupos -SH, e os agentes oxidantes podem converter estes grupos tióis (R-SH) em componentes dissulfeto (R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana (GILBERT & MC LEAN, 1990). Neste processo, pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina à metahemoglobina (RICE-EVANS & BAYSAL, 1987; WINTERBOURN, 1990). Portanto, a utilização de moléculas com propriedades antioxidantes, como o paracetamol e outros derivados fenólicos, podem ajudar na defesa contra agentes indutores da peroxidação lipídica (RICE-EVANS *et al.*, 1986).

Todos estes fatos justificam o estudo da peroxidação induzida no eritrócito humano como modelo para avaliar o dano oxidativo sobre biomembranas e a capacidade antioxidantes dos derivados fenólicos e deve ser ressaltado, que estudos *in vitro* anteriores mostraram a atividade antioxidante dessas moléculas, enfocando principalmente a capacidade geral de o paracetamol diminuir a formação do malondialdeído em modelos de peroxidação lipídica (ORHAN & SAHIN, 2001; MAHARAJ *et al.*, 2004) e o salicilato pode funcionar como seqüestrador de radicais hidroxil, observados nos modelos biológicos de Dinis *et al.*, (1994) e Maharaj *et al.*, (2006), mas não observado neste modelo. Mais

recentemente, foi mostrado que a administração do paracetamol em ratos induz um aumento nos níveis de serotonina e norepinefrina cerebral e peroxidação lipídica induzida em eritrócitos humanos (CASPER *et al.*, 2000). Foi mostrado por Daya *et al.*, (2000) que a associação do paracetamol com aspirina exibe um efeito antioxidante em homogenados de cérebro de ratos, possivelmente devido ao efeito do paracetamol como antioxidante.

Os resultados estão de acordo com os reportados previamente onde o paracetamol apresentou uma significativa redução da geração do anion superóxido induzido por KCN assim como a peroxidação lipídica e quando é usada em combinação com a aspirina este efeito é potencializado (CASPER *et al.*, 2000). Similarmente, a aspirina administrada previamente com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) apresentou uma atenuação na depleção de dopamina estriatal em camundongos (ALBIN *et al.*, 1998; TEISMANN *et al.*, 2001). O metabólito da aspirina, ácido salicílico apresentou uma significativa proteção contra a indução de toxicidade dopaminérgica pelo MPTP ou 1-metil-4-fenil piridínio (MPP+) em camundongos (MOHANAKUMAR *et al.*, 2000) ou ratos (SAIRAM *et al.*, 2003), respectivamente.

É fundamental que o radical livre seja mais reativo como o composto seqüestrante do que com os ácidos graxos lipídicos, e o paracetamol proporciona proteção contra a indução de estresse oxidativo pelo H₂O₂ em eritrócitos humanos, mas o ácido salicílico tem uma baixa capacidade antioxidante como mostrado no presente estudo, não sendo capaz de proteger completamente os danos causados em eritrócitos causados pelo H₂O₂.

No entanto, é conhecido que o paracetamol causa necrose hepática severa quando ingerido em altas doses tanto no homem como em animais de experimentação (PRESCOTT *et al.*, 1983), porque esta droga é bioativada pelo citocromo P-450/peroxidase e a hepatotoxicidade do paracetamol é pela produção de formas quinona e semiquinona, uma espécie de radical livre de oxigênio (SUHAIL & AHMAD, 1995).

3.5.2. Estresse oxidativo Induzido pelo Sistema Fe/Ascorbato/H₂O₂:

O modelo de estresse oxidativo em eritrócitos humanos induzido pelo peróxido de hidrogênio não foi capaz de descrever o efeito sequestrador de radical livre hidroxil pelos derivados da associação molecular, dificultando o estudo de relação estrutura e atividade dos derivados e os resultados não foram apresentados neste trabalho.

Portanto, foi utilizado um segundo modelo de estudo da avaliação da atividade antioxidante em eritrócitos humanos induzida pelo sistema ferro/ácido ascórbico/peróxido de hidrogênio, com bloqueio da atividade peroxidase. Os resultados do teste foram estimados através da medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Neste modelo o fenol e o ácido 5-amino-salicílico não foram utilizados neste estudo. O ácido 5-amino-salicílico por apresentar uma baixa estabilidade, polimerizando em solução de Tris-KCl-HCl pH 7,4. O modelo descreveu a atividade para sete compostos descritos na figura 18.

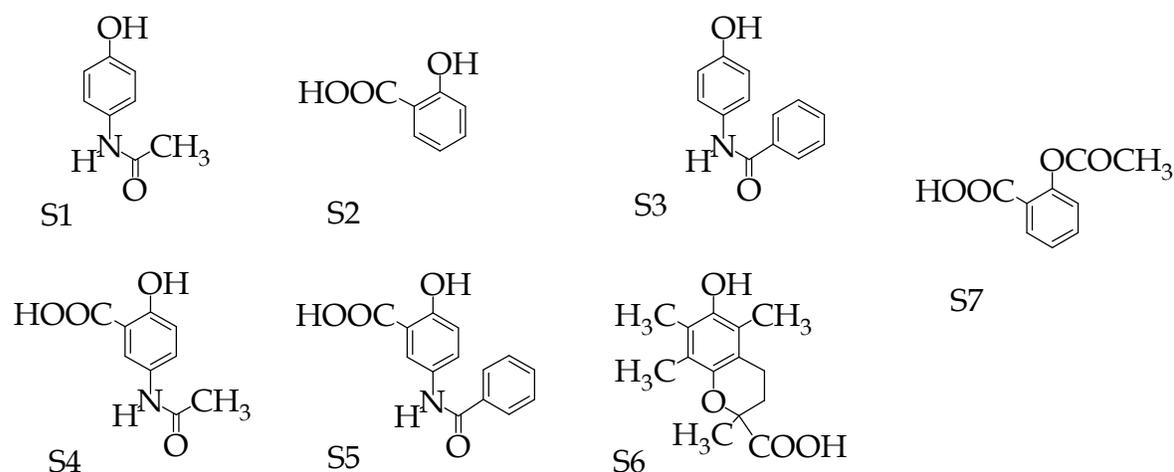


Figura 18: Compostos fenólicos usados no estresse induzido pelo sistema Fe/H₂O₂.

O gráfico 2 mostra o efeito antioxidante de derivados fenólicos na peroxidação lipídica induzida por Fe/Ascorbato/H₂O₂ (0,5/5/10mM) em eritrócitos humanos, onde podemos observar que o trolox **S6** usado como controle positivo, apresentou significativa redução da concentração dos níveis de TBARS (51%) e o ácido acetilsalicílico, usado como controle negativo apresentou uma

inibição de 2,97%, resultado este não significativo em comparação ao grupo controle não tratado com drogas na dose de 1000 μ M (B=Tris-KCl-HCl pH 7,4). Doses menores não foram capazes de descrever o efeito antioxidante de todas as moléculas estudadas neste modelo e não foram mostradas neste trabalho.

O paracetamol **S1** reduziu a concentração de TBARS em 51,3% e o ácido salicílico **S2** 15,6% na dose de 1000 μ M.

Enquanto que a molécula *p*-benzamidafenol **S3** inibiu 53,2% e os derivados do *p*-aminofenol e salicilatos, ácido 5-acetamidosalicílico **S4** e 5-benzamidosalicílico **S5** reduziram os níveis de TBARS significativamente em 32,0 e 34,5%, respectivamente. Resultados semelhantes aos observados pelo modelo de capacidade antioxidante usando a DPPH.

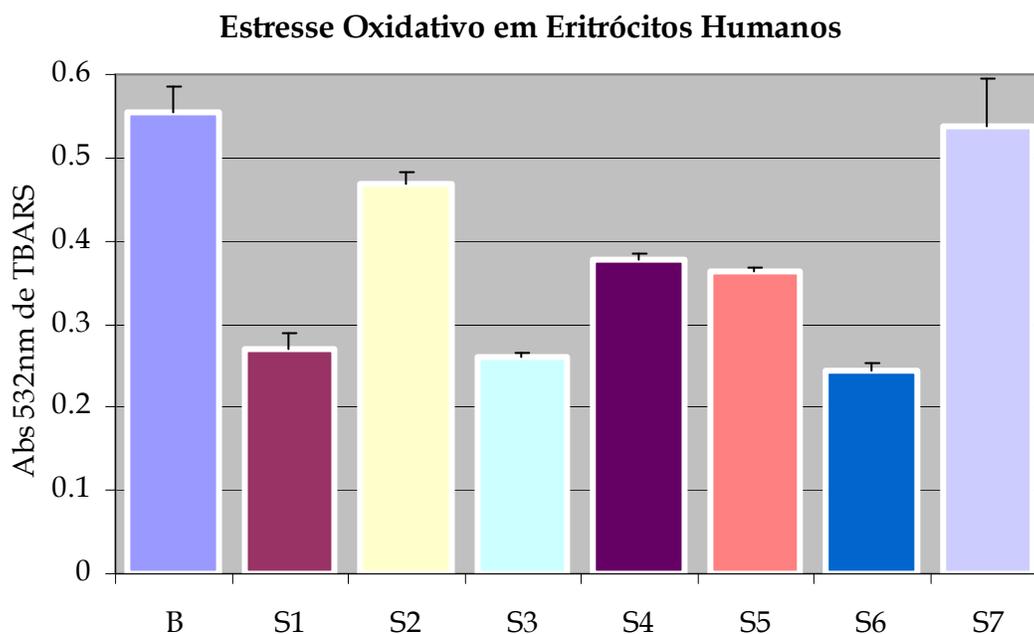


Gráfico 3: Avaliação do efeito antioxidante de derivados fenólicos na dose de 1mM comparados com o trolox na peroxidação lipídica induzida pelo sistema Fe/Ascorbato/H₂O₂ (0,5/5/10mM) em eritrócitos humanos. Os valores representam a média; n = 3. $P \leq 0,05$ entre as drogas e $P \leq 0,001$ em relação ao controle. Para estatística, testes *t* de Student e ANOVA foram usados.

A tabela 13 mostra uma comparação entre o efeito antioxidante com a capacidade antioxidante e as propriedades teóricas HOMO e PI para os sete derivados fenólicos, onde podemos observar que o trolox **S6** foi a molécula mais

ativa, com 56% de inibição dos níveis de TBARS e 91,25% de inibição da DPPH, tem os menores valores de HOMO e PI, de -5,08 eV e 158,50 kcal/mol, respectivamente. Enquanto que o ácido acetilsalicílico **S7** como a molécula menos ativa, apresentou uma inibição de 2,97% dos níveis de TBARS e 1,25% de inibição da DPPH, tendo os maiores valores de HOMO e PI, de -6,74 eV e 200,58 kcal/mol.

Tabela 13: Atividade antioxidante, capacidade antioxidante e propriedades teóricas de derivados fenólicos pelo método DFT.

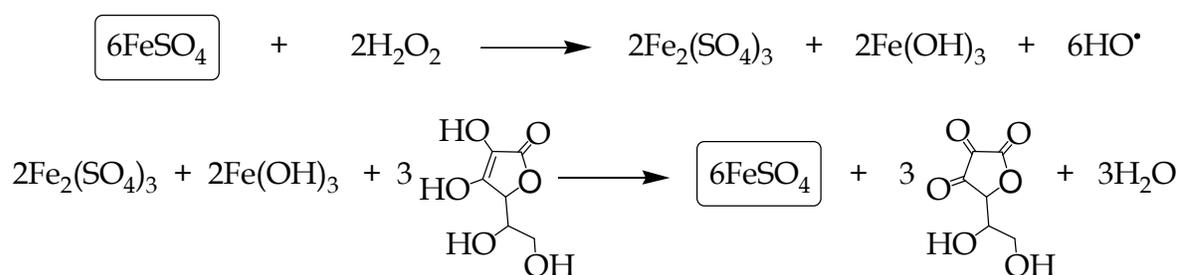
Compostos Fenólicos	TBARS (%) (1mM)	DPPH (%) (100µM)	HOMO (eV)	PI (kcal/mol)
S1	51,32	31,15	-5,45	171,31
S2	15,60	3,14	-6,24	192,69
S3	53,24	37,21	-5,46	167,25
S4	32,05	15,16	-5,72	174,86
S5	34,51	17,25	-5,71	171,19
S6	56,00	91,25	-5,08	158,50
S7	2,97	1,25	-6,74	200,58

O paracetamol **S1** reduziu a concentração de TBARS em 51,32% e o ácido salicílico **S2** 15,60% e inibição da DPPH de 31,15 e 3,14%, respectivamente. Os valores de HOMO foram de -5,45 e -6,24 eV com valores de IP de 171,31 e 192,69 kcal/mol, respectivamente. Enquanto que a molécula *p*-benzamidafenol **S3**, a segunda molécula mais ativa, inibiu 53,2% o nível de TBARS e 37,21% de inibição da DPPH, apresenta um menor valor de HOMO e PI, de -5,46 eV e 167,25 kcal/mol, respectivamente. Uma correlação semelhante foi obtida para os derivados do *p*-aminofenol e salicilatos, ácido 5-acetamidosalicílico **S4** e 5-benzamidosalicílico **S5**, que reduziram os níveis de TBARS em 32,0 e 34,5%, com valores de 15,16 e 17,25%, respectivamente, enquanto que os valores de HOMO foram de -5,72 e -5,71 eV com valores de IP de 174,86 e 171,19 kcal/mol, respectivamente.

Os resultados demonstram que o sistema usando ferro, vitamina C e peróxido de hidrogênio foi capaz de qualificar o efeito antioxidante de compostos fenólicos no estresse oxidativo induzido em eritrócitos humanos, comparado ao primeiro método, induzido somente pelo peróxido de hidrogênio. O mecanismo do estresse oxidativo induzido por este sistema no eritrócito é resultante do aumento na geração de radical hidroxil (HO^\bullet).

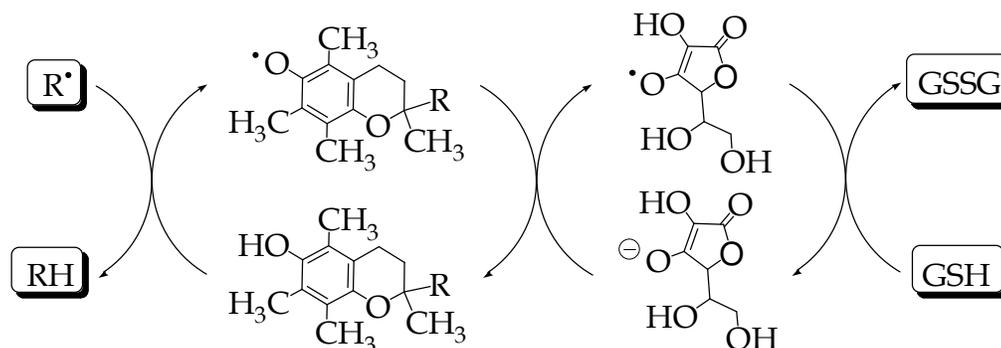
Os radicais hidroxil são formados através das reações do tipo Fenton e Haber-Weiss, onde a vitamina C funciona como doador de elétrons formando o ascorbato-quinona, segundo o esquema 25, onde o sulfato ferroso reduz o peróxido de hidrogênio através das reações do tipo Fenton, formando o sulfato férrico, hidróxido de ferro III e radical livre hidroxil. Enquanto que ácido ascórbico reduz o sulfato férrico e hidróxido de ferro III, regenerando o sulfato ferroso através das reações do tipo Haber-Weiss, formando água e ascorbato-quinona.

Esquema 25: Formação do radical hidroxil e oxidação da vitamina C pelo sistema $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$.

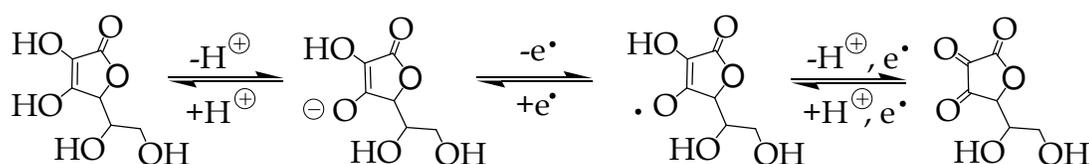


Segundo Fiers *et al.*, (1999) o papel da glutathiona reduzida (GSH) e das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona-peroxidase (GSP) como a primeira linha de defesa detoxificadora de radicais livres no eritrócito é bem conhecido. Enquanto que a segunda linha é constituída pelas vitaminas E (α -tocoferol) e C (ácido ascórbico). No entanto a vitamina C é facilmente oxidável através de metais de transição como o ferro.

Neste modelo as vitaminas são consumidas pelo H_2O_2 para a produção de HO^\bullet . A vitamina C tem a capacidade de reduzir o radical α -tocoferil, passando a forma semiquinona ou quinona, que são reduzidas pela glutathiona conforme descrito por Halliwell & Gutteridge, (2000), mostrado no Esquema 26.

Esquema 26: Mecanismo redox detoxificador das vitaminas E e C.

O balanço redox do sistema ácido ascórbico é mostrado no Esquema 27. O ácido ascórbico nos sistemas biológicos se encontra na forma ionizada como ânion ascorbil, que ao ceder um elétron passa para a forma ascorbato-semiquinona. Esta por sua vez, pode doar elétrons e prótons gerando a forma ascorbato-quinona. Este sistema em equilíbrio pode ser quebrado pela presença de metais ou radicais livres, como descrito por Halliwell & Gutteridge, (2000). Portanto, o balanço positivo do sistema redox do ácido ascórbico é um importante parâmetro de prevenção contra danos oxidativo e funcionamento dos mecanismos de reparo (FIERS *et al.*, 1999; NICHOLLS *et al.*, 2000; HAYES *et al.*, 1999).

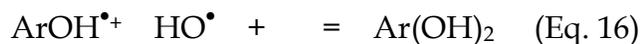
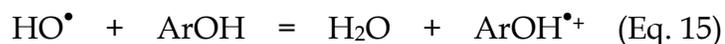
Esquema 27: Mecanismo redox da vitamina C.

Ao comparar os valores de HOMO e PI do ácido ascórbico de -5,46 eV e 195,88 kcal/mol, de seu ânion ascorbato de -0,25 eV e 63,32 kcal/mol e da vitamina E de -4,94 eV e 155,93 kcal/mol, descritos na tabela 14, conclui-se que a vitamina E tem melhor potencial antioxidante em relação a vitamina C na forma molecular. No entanto a vitamina C, por ser polar e se ionizar apresenta os menores valores de HOMO e PI, justificando sua capacidade de reduzir o radical livre α -tocoferil. Portanto a diminuição da vitamina C e aumento da forma ascorbato-quinona compromete o ciclo redox da vitamina E e a capacidade citoprotetora realizada por esta vitamina.

Tabela 14: Propriedades teóricas das vitaminas E e C pelo método TFD.

Compostos	HOMO	PI
Antioxidantes	(eV)	(kcal/mol)
Vitamina E	-4,94	155,93
Vitamina C	-5,46	195,88
Vitamina C (A)	-0,25	63,32

O modelo de indução de peroxidação lipídica usando o sistema de iniciação ferro, ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio, apresenta um mecanismo de formação de radical hidroxil por um sistema muito reativo iniciado pelo ferro e propagado pelo ácido ascórbico. De acordo com os resultados obtidos podemos propor dois possíveis mecanismos. Um através da reação de retirada de elétrons e formação de cátion radical livre (Eq. 15) e outro pela reação direta entre o derivado fenólico e dois radicais livres hidroxil (Eq. 15 e 16).



Este modelo descreveu a atividade de inibição de TBARS significativa do ácido salicílico e os dados da literatura mostram que os ácidos 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHBA) e 2,5-dihidroxibenzóico (2,5-DHBA) podem ser formados, sendo conhecido que salicilatos foram utilizados no seqüestro de HO^\bullet na inflamação aguda causada por HO^\bullet descrito por Nappi & Vass (1998) e Tsujinomoto *et al.*, (1998) utilizou o 2,3-DHBA como marcador durante a peroxidação lipídica induzida *in vivo* pela produção de radicais HO^\bullet . Estes ácidos podem também ser formados após a administração do ácido acetilsalicílico ou salicilato de sódio em condições de estresse oxidativo, como a exposição a altas concentrações de oxigênio, tratamento com drogas que modificam o ciclo-redox como a doxorubicina, artrite reumatóide, infarto do miocárdio, isquemia cerebral, diabetes, pulmonar e injúria renal (KADKHODAEE *et al.*, 1995; EXNER *et al.*, 2000).

Em outros modelos de estudo, os salicilatos apresentaram uma capacidade seqüestrante sobre os radicais hidroxil (GROOTVELD & HALLIWELL, 1996; KAUR *et al.*, 1997; HERMANN *et al.*, 1999) impedindo a oxidação radicalar do LDL induzida por óxido nítrico e superóxido (HERMANN *et al.*, 1999). O HO[•] tem uma alta reatividade e conseqüentemente está presente em concentrações extremamente baixas nos sistemas biológicos, mas a reação de hidroxilação aromática foi usada na medida de sua produção *in vitro* (LUO & LEHOTAY, 1997; COUDRAY & FAVIER, 2000).

Além do seqüestro de radicais livres pelo mecanismo de reação de hidroxilação aromática, descrito no esquema 28, outra possibilidade é que o efeito seja exercido pelos seus derivados 2,3- e 2,5-DHBA. Cálculos de HOMO e PI comparados com o ácido salicílico, mostrado na tabela 15, demonstram que estes compostos apresentam menor valor de HOMO e PI, portanto é possível que o mecanismo antioxidante do ácido salicílico neste modelo seja tanto pela reação com o radical HO[•] quanto pelos seus metabólitos hidroxilados.

Esquema 28: Mecanismo de oxidação do ácido salicílico.

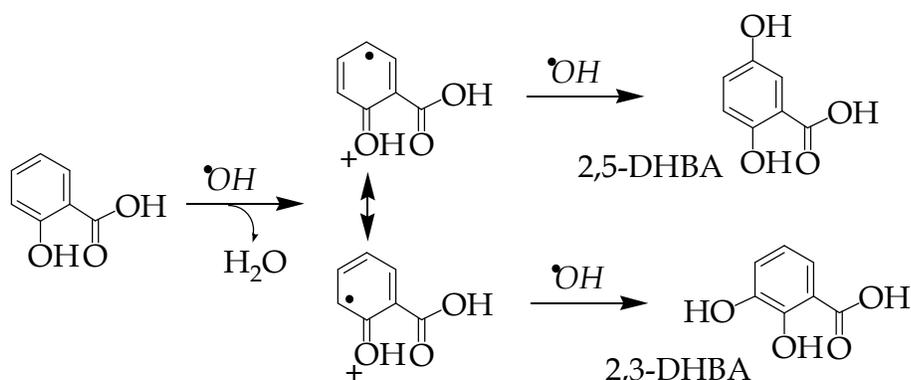


Tabela 15: HOMO e PI para o ácido salicílico e seus derivados hidroxilados pelo método TFD.

Compostos	HOMO	PI
Antioxidantes	(eV)	(kcal/mol)
Ácido Salicílico	-6,24	192,69
2,3-DHBA	-5,88	183,87
2,5-DHBA	-5,69	179,10

3.5.3. Avaliação do Grau de Hemólise:

A avaliação do grau de hemólise foi uma alternativa na busca por um modelo de avaliação capaz de separar as moléculas quanto a sua menor ou maior atividade, que ao mesmo tempo fosse um teste rápido e simples. O estresse induzido pelo AAPH pode ser avaliado através do grau de hemólise, uma vez que no método de dosagem de TBARS a absorvância máxima em 532nm poderia estar associada a hemoglobina, que tem uma absorvância máxima em 540nm, no entanto no método de TBARS a hemoglobina primeiramente é precipitada com as proteína e os níveis de TBARS medidos do sobrenadante.

Outra razão que nos levou a avaliação do grau de hemólise foi a busca por um modelo capaz de qualificar e até quantificar o efeito antioxidante ou pró-oxidante das moléculas em estudo.

O modelo de hemólise induzida pelo 2,2-azobis-amidinopropano-dihidrocloridrato (AAPH) mostrou os melhores resultados, com maior coerência com a modelagem molecular e estão descritas nos gráficos 4 e 5.

O gráfico 4 mostra o efeito hemolítico dos derivados fenólicos trolox, paracetamol e ácido salicílico na hemólise induzida por AAPH (50 mM) em eritrócitos humanos, avaliados pela leitura da absorvância da hemoglobina em 540nm, onde podemos observar que o trolox **S6** usado como controle positivo, apresentou significativa redução da concentração dos níveis de hemólise de 89,2% na dose de 250µM, 89,2% para a dose de 500µM e 95,7% para a dose de 1000µM em comparação ao grupo controle não tratado com drogas (B=Tris-KCl-HCl pH 7,4). E importante observar que nestes resultados os níveis de hemólise diminuíram com o aumento da concentração.

Ao contrário do trolox, o paracetamol **S1** reduziu a concentração dos níveis de hemólise de 80,7% na dose de 250µM, 75,3 % para a dose de 500µM e 71,9% para a dose de 1000µM. Ao contrário do trolox, nestes resultados podemos observar que os níveis de hemólise aumentaram com o aumento da concentração.

O ácido acetilsalicílico **S2**, apresentou um aumento na concentração dos níveis de hemólise de 48,6% na dose de 250 μ M, 81,1 % para a dose de 500 μ M e 269,1% para a dose de 1000 μ M. Portanto, nestes resultados podemos observar que os níveis de hemólise também aumentaram com o aumento da concentração.

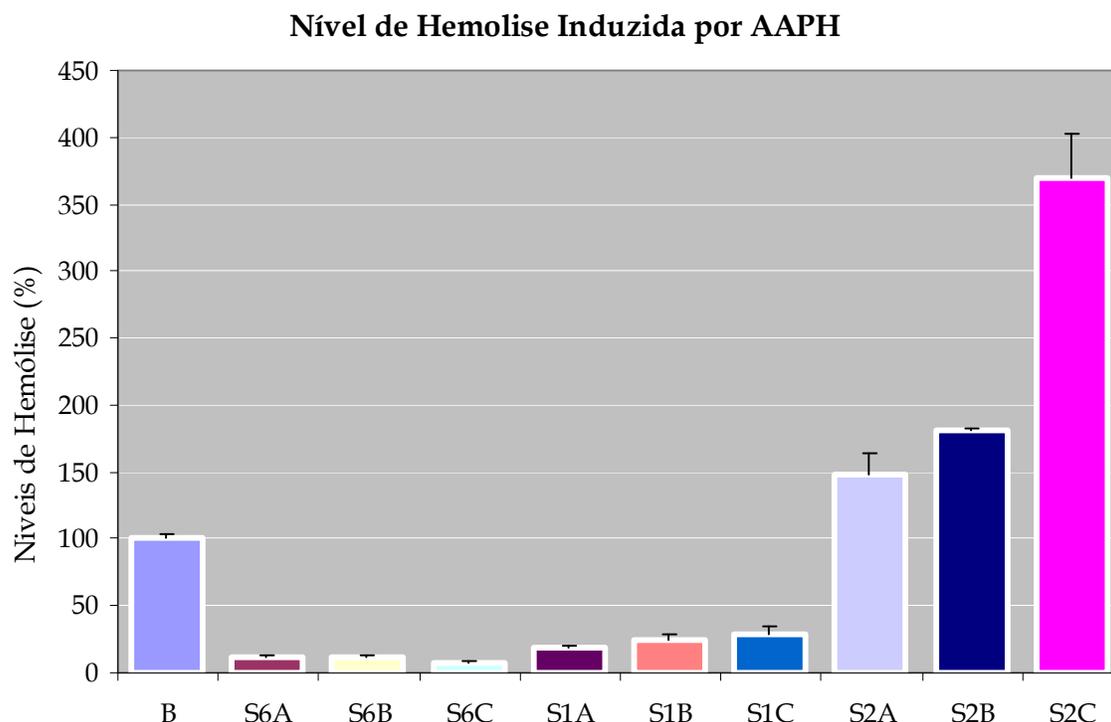


Gráfico 4: Avaliação do efeito hemolítico de derivados fenólicos nas doses de 250, 500 e 1000 μ M comparados com o trolox na peroxidação lipídica induzida pelo AAPH (50 mM) em eritrócitos humanos. Os valores representam a média da absorvância em 540nm \pm S.E.M; n = 3. $P \leq 0,05$ entre as drogas e $P \leq 0.001$ em relação ao controle. Para estatística, testes t de Student e ANOVA foram usados.

Enquanto que no gráfico 5 os efeitos hemolíticos mostrados são dos derivados fenólicos *p*-benzamidafenol, ácido 5-acetamidossalicílico e ácido 5-benzamidossalicílico. A molécula *p*-benzamidafenol **S3** reduziu a concentração dos níveis de hemólise de 88,0% na dose de 250 μ M, 77,0 % para a dose de 500 μ M e 71,0% para a dose de 1000 μ M. De igual maneira, através dos resultados para esta molécula podemos observar que os níveis de hemólise aumentaram com o aumento da concentração de forma semelhante ao paracetamol.

Enquanto que o derivado da associação molecular do *p*-aminofenol e salicilatos, ácido 5-acetamidosalicílico **S4**, apresentou um aumento na concentração dos níveis de hemólise muito menor comparado com o ácido salicílico, de 6,6% na dose de 250 μ M, 45,2 % para a dose de 500 μ M e 122,8% para a dose de 1000 μ M. Portanto, para estes derivados os resultados observamos demonstram que os níveis de hemólise aumentam com o aumento da concentração de forma menos acentuada que o ácido salicílico.

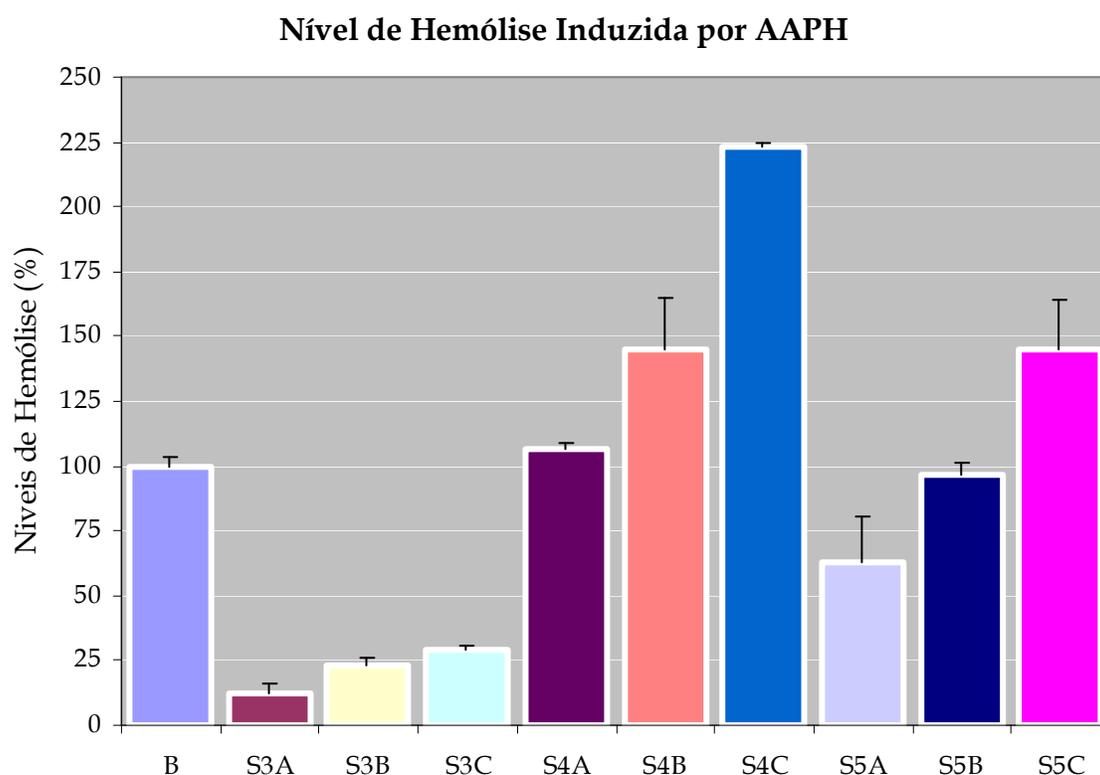


Gráfico 5: Avaliação do efeito hemolítico de derivados fenólicos nas doses de 250, 500 e 1000 μ M na peroxidação lipídica induzida pelo AAPH (50 mM) em eritrócitos humanos. Os valores representam a média da absorvância em 540nm \pm S.E.M; n = 3. $P \leq 0,05$ entre as drogas e $P \leq 0.001$ em relação ao controle. Para estatística, testes *t* de Student e ANOVA foram usados.

No entanto, o resultado mais surpreendente, foi o do segundo derivado da associação molecular do *p*-aminofenol e salicilatos, o ácido 5-benzamidosalicílico **S5**, apresentou uma redução na concentração dos níveis de hemólise de 37,45% na dose de 250 μ M, uma redução não significativa de 3,3 % para a dose de 500 μ M em

relação ao controle (eritrócitos não tratado com drogas) e um aumento dos níveis de hemólise de 44,8% para a dose de 1000 μ M.

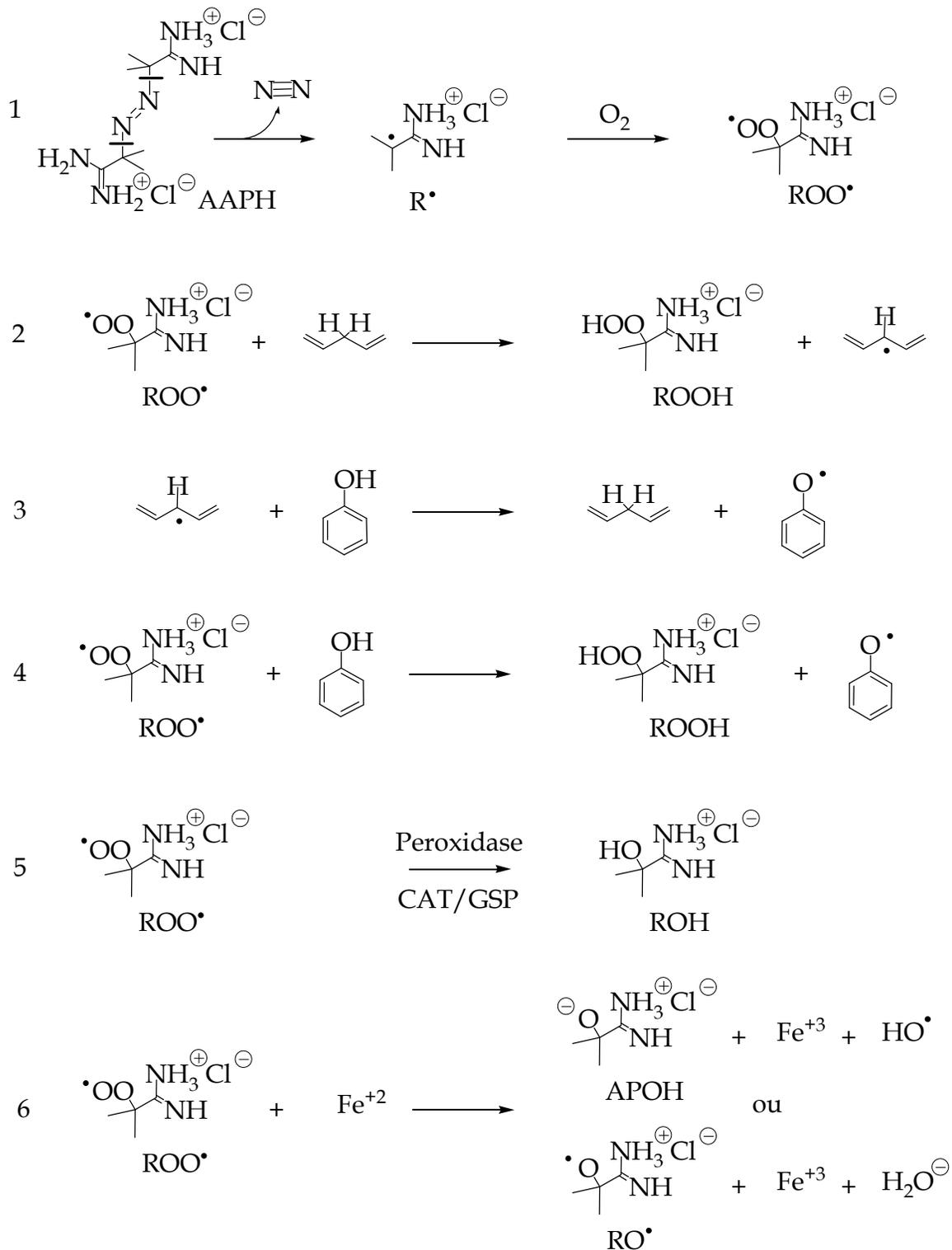
Portanto, através dos resultados desta molécula podemos observar que os níveis de hemólise aumentam com o aumento da concentração, mas representa o melhor efeito da combinação de um derivado da associação molecular do *p*-aminofenol e salicilatos.

O nível de hemólise é proveniente do estresse oxidativo induzido pelo 2,2-azobis-amidinopropano-dihidrocloridrato (AAPH) nos eritrócitos humanos, resultantes do aumento na geração de radical livre alquilperoxila (ROO \bullet). Os radicais livres lipoperoxila (LOO \bullet) são formados normalmente através das reações de peroxidação lipídica (Eq. 17) e representam uma etapa decisiva no nível do estresse oxidativo através da reação de propagação, proveniente da reação com ácidos graxos polinsaturados e a conseqüente transformação em lipídeo radical livre (L \bullet) mais lipohidroperóxido (ROOH) (Eq. 18) (BENZIE, 1996). Podem também ser seqüestrados através da reação com vitamina E (TocOH) formando a vitamina E radical livre (TocO \bullet) mais lipohidroperóxido (ROOH) (Eq. 19). Os lipohidroperóxido são metabolizados por peroxidases, formando álcoois (Eq. 20) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



A fragmentação do AAPH nos eritrócitos humanos resulta no aumento da geração de radical livre peroxila (ROO \bullet) por um mecanismo fotoquímico, segundo o Esquema 29.

Esquema 29: Mecanismo de formação e seqüestro de radicais gerados pelo AAPH.



A reação inicia com a quebra homolítica e eliminação de uma molécula de nitrogênio e a geração de duas moléculas de radical livre alquílico (R^\bullet), que por sua vez, reagem com oxigênio formando os radicais livres alquilperoxila (ROO^\bullet)

(1) (CAO *et al.*, 1999). Os radicais alquilperoxila são os iniciadores da reação de peroxidação lipídica (2), mas podem ser seqüestrados pelo trolox e os demais derivados fenólicos usados neste estudo (3). O trolox e os demais derivados fenólicos usados neste estudo podem também seqüestrar o lipídio radical livre (4). O produto final desta reação é o alquilhidroperoxila (ROOH), que pode ser metabolizado por peroxidases (5) ou ser degradado pela reação do tipo Fenton, gerando o radical livre hidroxil ou alcoxi (6) (Esquema 29).

Os mecanismos antioxidantes podem estar relacionados na capacidade dos derivados fenólicos em seqüestrar o radical R^\bullet inibindo a formação de radicais alquilperoxila (ROO^\bullet). A segunda possibilidade é a inibição da etapa de propagação pelo seqüestro dos radicais L^\bullet ou ROO^\bullet . A terceira possibilidade seria o seqüestro de radicais hidroxil (HO^\bullet) e alcoxi (RO^\bullet) gerados pela reação tipo Fenton. Conseqüentemente, quanto maior a reatividade do composto fenólico com estes radicais livres, maior a inibição do nível de hemólise. Portanto, as moléculas que apresentam menor valor de HOMO e PI devem apresentar maior reatividade com o radical ROO^\bullet . A ordem teórica de reatividade está de acordo com a atividade biológica, sendo a seguinte: trolox > *p*-benzamidafenol > paracetamol > ácido 5-benzamidosalicílico > ácido 5-acetamidosalicílico > ácido salicílico.

Rice-Evans *et al.*, (1986) afirma que os componentes lipídicos da membrana eritrocitária estão sujeitos à agressão oxidativa e os produtos lipoperoxidação podem induzir o estresse oxidativo intracelular, desde que a eficiência do sistema antioxidante seja superada culminando com hemólise. Estas observações são complementadas por Sies (1993) ao afirmar que quando há ataque dos radicais livres sobre as membranas dos eritrócitos ocorre oxidação dos lipídios e proteínas, causando hemólise, devido a fragilidade osmótica causado pela mudança estrutural de lipídeos e proteínas oxidados.

Portanto, a lipoperoxidação induzida pelo AAPH, mostrou ser um método rápido, eficaz, fácil e de baixo custo para avaliação do dano oxidativo sobre biomembranas e capacidade citoprotetora para derivados fenólicos.

Outro aspecto que deve ser discutido é que com exceção do trolox, todas as demais moléculas apresentaram um efeito pró-oxidante, ou seja, o nível de hemólise aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração.

O primeiro aspecto que deve ser considerado é a solubilidade das moléculas em solventes lipídicos. A lipofilicidade ou afinidade por substâncias lipídicas é normalmente utilizada para expressar a capacidade de uma molécula ser transportada de uma exobiofase para o interior de uma célula, onde as biomembranas podem representar um obstáculo para ação do fármaco (THOMAS, 2000). Os valores de logaritmo de partição óleo e água (CLogP e LogP) e energia de hidratação (EH) estão descritos na tabela 16.

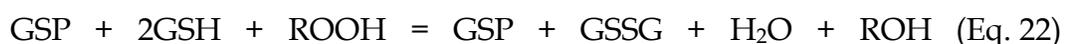
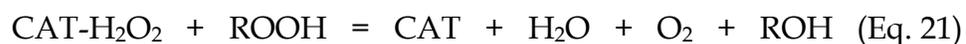
Tabela 16: Propriedades teóricas dos derivados do *p*-aminofenol e ácido salicílico.

Compostos	CLogP	LogP	EH (Kcal/mol)
S1	0,944	0,61	-10,61
S2	2,18	1,46	-13,22
S3	1,98	2,52	-12,29
S4	1,29	0,31	-14,75
S5	2,78	2,22	-16,46
S6	3,08	3,23	-9,54

Os resultados mostraram que o trolox **S6** apresenta os maiores valores de CLogP e LogP e o menor valor de energia de hidratação, conseqüentemente, o trolox é a molécula com maior lipofilia e com maior atividade. Outro resultado importante foi a maior atividade e lipofilia de **S3**, contendo o grupo benzoil em relação a **S1**, contendo o grupo acetil.

Os compostos contendo carboxila não apresentaram valores capazes de correlacionar com suas atividades. Conseqüentemente a lipofilia não é capaz de explicar as diferenças de atividade dos derivados fenólicos neste modelo de avaliação.

Outra forma de explicar o efeito pró-oxidante das demais moléculas é a capacidade do trolox como molécula como seqüestrante contra todos os radicais livres formados, principalmente durante a etapa de iniciação pelo azo-composto ou não apresentar nenhum efeito sobre o sistema enzimático antioxidante dos eritrócitos. Uma vez que os eritrócitos possuem um sistema de defesa enzimático que pode degradar os radicais alquilhidroperoxila (ROOH) gerados pela degradação do AAPH, formado pela catalase (CAT) (Eq. 21) e glutathionaperoxidase (GSP) (Eq. 22), transformando em álcool e oxigênio ou água, respectivamente.



Prescott *et al.*, 1983 observou que o paracetamol causa necrose hepática severa quando ingerido em altas doses tanto no homem como em animais. A bioativação do paracetamol por diversos tipos de peroxidase foi proposta por Suhail & Ahmad (1995) e sua hepatotoxicidade devido a produção de formas quinona e semiquinona. Portanto, quanto menor for o número de radicais livres formados, menor a extensão dos danos oxidativos. Em outras palavras, quanto mais rápida for a ação do antioxidante ou a inibição, antes que um grande número de ciclos de propagação seja realizado, menor é a oxidação de GSH para GSSG, sendo conhecido que o nível de peroxidação está diretamente relacionado com a relação GSH/GSSG, conforme observado por Beehler *et al.* (1989).

É necessário ressaltar que os grupos contendo ácido carboxílico produziram os efeitos mais destacados, portanto é possível que este grupo de moléculas estejam inibindo as enzimas antioxidantes em diferentes proporções, pois como observado por Kulmacz *et al.* (1994) derivados fenólicos são inibidores de peroxidase e este efeito aumenta com a dose. O modelo separou as moléculas mais ativas e principalmente comprovou que os derivados planejados da associação *p*-aminofenol e salicilatos apresentam um efeito antioxidante, quando combinadas maiores que o ácido salicílico, usando o farmacóforo antioxidante do paracetamol.

3.6. ATIVIDADE ANTI-PGES:

No processo de desenvolvimento de fármacos são necessário um método de avaliação biológica rápido, eficaz, de fácil execução e com baixo custo operacional, a fim de estudar e selecionar um maior número de moléculas. O principal objetivo deste teste foi desenvolver um método que confirme o efeito anti-prostaglandina endoperoxídeo sintase dos derivados da associação *p*-aminofenol e salicilatos.

O gráfico 6 mostra o efeito inibidor da produção de TBARS em plaquetas dos derivados fenólicos paracetamol, ácido salicílico, *p*-benzamidafenol, ácido 5-acetamidosalicílico e ácido 5-benzamidosalicílico na agregação plaquetária induzida pelo Ca^{+2} (10 mM), avaliados pela leitura da absorvância em 532nm, onde podemos observar que o paracetamol **S1**, apresentou significativa redução da concentração dos níveis de TBARS de 65,6% em comparação com o *p*-benzamidafenol **S3** de 67,4% em comparação ao grupo controle não tratado com drogas na dose de 100 μM (B=Tris-KCl-HCl pH 7,4). Nestes resultados podemos observar que **S3** é mais ativo que o paracetamol na mesma concentração.

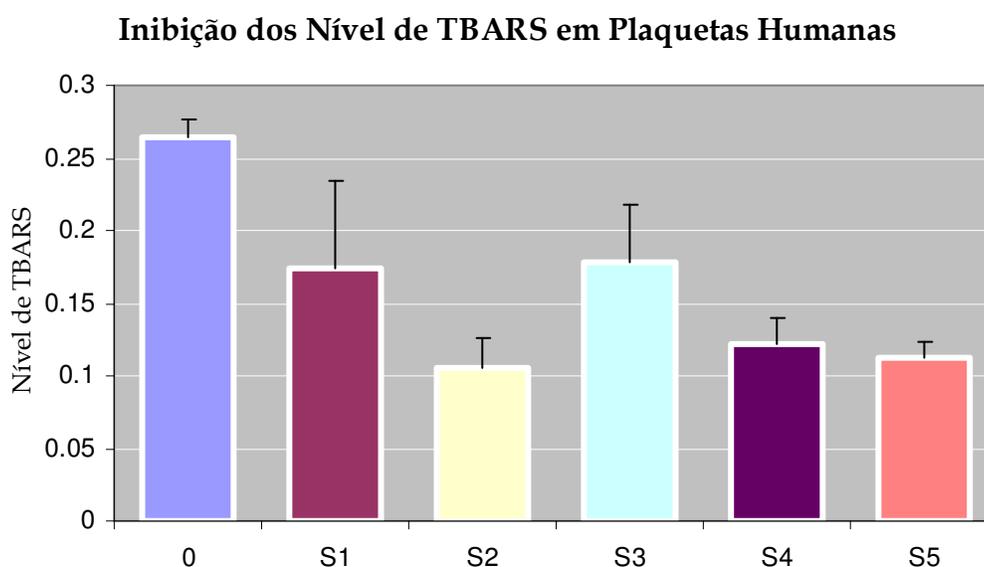


Gráfico 6: Avaliação da inibição dos níveis de TBARS em plaquetas humanas em derivados fenólicos na dose de 100 μM induzida por CaCl_2 (10 mM). Os valores representam a média da absorvância em 540nm \pm S.E.M; n = 3. $P \leq 0.001$ em relação ao controle. Para estatística, testes *t* de Student e ANOVA foram usados.

Enquanto que o ácido acetilsalicílico **S2** apresentou um aumento redução na concentração dos níveis de TBARS de 39,8% em relação a **S4** de 46,1% e **S5** de 42,6%. Não obstante os resultados não apresentaram um nível de significância nesta e nas demais concentração para todas as drogas entre si.

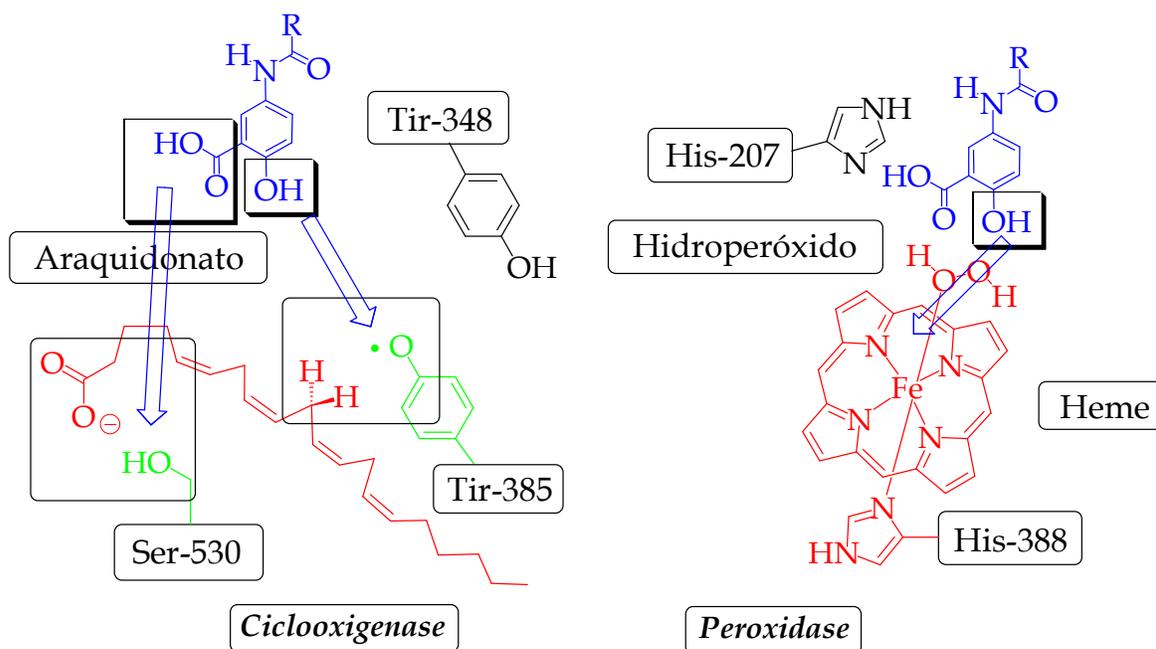
Al Mehi *et al.* (1993) e Porter *et al.* (1995) observaram que as principais vias enzimáticas de peroxidação lipídica são a ciclooxigenase e lipoxigenase, enquanto que as vias não enzimáticas ocorrem através da participação de radicais livres, portanto a combinação de uma molécula capaz de inibir a COX e a peroxidação lipídica pode ser útil no tratamento de diversas patologias.

Para Simmons *et al.* (2004), a concentração do ácido araquidônico na célula é baixa, dependendo da liberação dos fosfolipídeos da membrana celular sendo realizada pela ação direta da fosfolipase A₂ (PLA₂) e indireta pela fosfolipase C para a síntese das prostaglandinas, sendo necessário uma substância capaz de ativar a PLA₂ (SMITH *et al.*, 1991). O aumento do influxo de cálcio produziu a ativação da PLA₂ que levou a liberação do ácido araquidônico presente nos fosfolipídeos da membrana como descrito por Balboa & Balsinde (2006).

A inibição da síntese das PGs por estes derivados pode ser realizada, através da função ciclooxigenase, ao impedir a incorporação do ácido araquidônico a serina 530 realizada pelos antiinflamatórios não esteróides (AINEs) (ROTH, 1975) contendo ácido carboxílico, pela inibição da formação do radical araquidonil pelo radical tirosil presente na COX na posição 385, bloqueadas por derivados fenólicos (KULMACZ *et al.*, 1991), ou pela inibição da peroxidase (KULMACZ *et al.*, 1994), conforme Esquema 30.

Além do mais as alterações das propriedades de ADME são significativas, uma vez que os novos derivados apresentam um grupo carboxila de ácido, conferindo a estas moléculas uma maior polaridade e conseqüentemente maior solubilidade em solventes aquosos, podendo alterar suas propriedades farmacocinéticas, o que representaria uma redução na toxicidade destes compostos na via de bioativação pelo citocromo P-450.

Esquema 30: Mecanismo de inibição da ciclooxygenase e peroxidase.



O modelo utilizando plaqueta descreveu que o cálcio pode ativar a fosfolipase A2, com a conseqüente liberação do ácido araquidônico. Descreveu também, uma inibição dos níveis de TBARS, possivelmente devido a inibição da liberação do malondialdeído, durante a formação da TXA₂ e foi capaz de qualificar as drogas mais ativas, bem como comprovar que os derivados da associação apresentam um sinergismo molecular e as características moleculares dos dois compostos. Este modelo mostrou significativa inibição em relação ao controle, mas não entre as drogas e as doses testadas.

Entretanto, com o uso de um método mais sensível como fluorimetria, podemos quantificar os efeitos destes derivados da associação molecular do *p*-aminofenol e salicilatos. Outros modelos podem ser utilizados no futuro como os métodos imunoenzimáticos para a quantificação da TXB₂ (SINZINGER *et al.*, 1989; HUANG *et al.*, 2002) ou a agregação plaquetária em PRP, utilizando um método turbidimétrico (HUANG *et al.*, 2002).

Os derivados planejados da associação *p*-aminofenol e salicilatos podem ser uma alternativa em caso de resistência terapêutica aos salicilatos ao inibir a agregação plaquetária e o estresse oxidativo induzido por radicais livres.

4. CONCLUSÃO:

Através dos resultados obtidos podemos concluir que:

A modelagem molecular usando os métodos PM3 e TFD foi empregada no planejamento de novos fármacos antiinflamatórios com propriedades antioxidantes, sendo que o orbital molecular ocupado de mais alta energia apresentou maior correlação com a atividade antiinflamatória e toxicidade;

A regioseletividade na geração do ácido gentísico, como produto da biotransformação do ácido salicílico via citocromo P-450 pode estar relacionada com a saída de elétron e *para*-hidroxilação aromática;

Foram sintetizados três derivados através de reações de acilação e seus dados comparados estão de acordo com a literatura;

O paracetamol e o *p*-benzamidafenol apresentaram maior capacidade antioxidante no modelo de DPPH em comparação com o trolox, enquanto que os derivados da associação exibiram atividade superior ao ácido salicílico;

A atividade antioxidante foi determinada em três modelos de indução de estresse oxidativo em eritrócitos humanos, quantificadas pelos níveis de TBARS e nível de hemólise; os derivados fenólicos mostraram alta correlação com valores obtidos para DPPH, HOMO e potencial de ionização;

Salicilatos apresentaram atividade seqüestrante contra radical hidroxil possivelmente devido a reação e formação de 2,3-DHBA ou 2,5-DHBA.

A atividade anti-PGES não pode ser quantificada virtude de limitações experimentais, no entanto foi possível qualificar os efeitos da ativação da PLA₂ pelo cálcio, liberação do ácido araquidônico e formação de malondialdeído nas plaquetas, através dos níveis de TBARS;

Os derivados planejados da associação *p*-aminofenol e salicilatos podem ser inibidores enzimáticos e não enzimáticos do metabolismo do ácido araquidônico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ADAMSON, G.M.; HARMAN, A.W. Oxidative stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen. **Biochemical Pharmacology**. 38: 2289-2294, 1993.
- AUBIN, N.; CURET, O.; DEFFOIS, A.; CARTER, C. Aspirin and Salicylate Protect Against MPTP-Induced Dopamine Depletion in Mice; **J. Neurochem**. 71: 1635-1642, 1998.
- ALBANO, E.; RUNDGREN, M.; HARVISON, P. J.; NELSON, S.D.; MOLDEUS, P. Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. **Molecular Pharmacology**. 28: 306-311, 1985.
- AL MEHI, A.B.; DODIA, C.; JAIN, M.K.; FISHER, A.B.; A phospholipase A₂ inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. **Biophys. Biochim. Acta**. 1166: 56-62, 1993.
- AL-MUSTAFA, Z.H.; AL-ALI, A. K.; QAW, F. S.; ABDUL-CADER, Z. Cimetidine enhances the hepatoprotective action of N-acetylcysteine in mice treated with toxic doses of paracetamol. **Toxicology**. 121: 223-228, 1997.
- ARMSTRONG, D.; BROWNE, R. The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. **Free Radicals in Diagnostic Medicine**. 366: 43-58, 1994.
- ARMSTRONG, D. In vitro screening for antioxidant activity. **Free Radical and Antioxidant Protocols**. 108: 315-324, 1998.
- AYRES, M. **Bio Estat**. Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Versão 4.0, 2006.
- BABER, A.D.; HARRIS, S.R.; Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Amer. Pharmacol**. 34: 26-35, 1994.
- BALBOA, M.A.; BALSINDE, J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. **Biochimica et Biophysica Acta** 1761, 385-391, 2006.
- BARNARD, S.; STORR, R. C.; O'NEILL, P. M.; PARK, B. K. The effect of fluorine substitution on the physicochemical properties and the analgesic activity of paracetamol. **J. Pharm. Pharmac**. 45: 736-744, 1993.

- BARNARD, S.; KELLY, D. F.; STORR, R. C.; PARK, B. K. The effect of fluorine substitution on the hepatotoxicity and metabolism of paracetamol in the mouse. **Biochem. Pharmacol.** 46: 841-849, 1993.
- BARTOLONE, J.B.; BEIERSCHMITT, W.P.; BIRGE, R.B.; HART, S.G.; WYAND, S.; COHEN, S.D.; KHAIRALLAH, E.A. Selective acetaminophen metabolite binding to hepatic and extrahepatic proteins: An in vivo and in vitro analysis. **Toxicology & Applied Pharmacology.** 99: 240- 249, 1989.
- BECKE, A.D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories **J. Chem. Phys.** 98: 1372-1377, 1993.
- BEEHLER, C.J.; SIMCHUK, M.L.; TOTH, K.M.; DRAKE, S.K.; PARKER, N.B.; WHITE, C.W.; BERGER, E.M.; SANDERSON, R.J.; REPINE, J.E. Blood sulfhydryl level increases during hyperoxia: a marker of oxidant lung injury. **J. Appl. Physiol.** 67(3): 1070-1075, 1989.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.** 47: 233-261, 1996.
- BESSEMS, J.G.M.; GAISSER, H.D.; TE KOPPELE, J.M.; VAN BENNEKOM, W.P.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E. 3,5-Disubstituted analogues of paracetamol. Synthesis, analgesic activity and cytotoxicity. **Chem. Biol. Inter.** 98, 237-250, 1995.
- BESSEMS, J.G.M.; VAN STEE, L.L.P.; COMMANDEUR, J.N.M.; GROOT, E.J.; VERMEULEN, N.P.E. Cytotoxicity of paracetamol and 3,5-dihalogenated analogues: Role of cytochrome P-450 and formation of GSH conjugates and protein adducts. **Toxicology in Vitro** 11, 9- 19, 1997.
- BESSEMS, J.G.M.; DE GROOT, M.J.; BAEDE, E.J.; TE KOPPELE, J.M.; VERMEULEN, N.P.E.; Hydrogen atom abstraction of 3,5-disubstituted analogues of paracetamol by horseradish peroxidase and cytochrome P450. **Xenobiotica.** 28: 855-875, 1998.
- BESSEMS, J.G.M.; VERMEULEN, N.P.E. Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. **Critical Reviews in Toxicology.** 31-1: 55-138, 2001.
- BIAGI, G.; GIORGI, I.; LIVI, O.; NARDI, A.; CALDERONE, V.; MARTELLI, A.; MARTINOTTI, E.; SALERNI, O. L. Synthesis and biological activity of novel substituted benzanilides as potassium channel activators. V. **Eur. J. Med. Chem.** 39, 491, 2004.

- BIRGE, R. B.; BARTOLONE, J. B.; COHEN, S. D.; KHAIRALLAH, E. A.; SMOLIN, L. A. A comparison of proteins Sthiolated by glutathione to those arylated by acetaminophen. **Biochemical Pharmacology**. 42: 197-207, 1991.
- BLACKBURN, A.C.; DOE, W.F.; BUFFINTON, G.D. Salicylate hydroxylation as an indicator of hydroxyl radical generation in dextran sulfate-induced colitis. **Free Rad. Biol. & Med.** 25-3: 305-313, 1998.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. 181: 119901200, 1958.
- BHATTACHARYYA, D.K.; LECOMTE, M.; DUNN, J.; MORGANS, D.J.; SMITH, W.L. Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid. **Arch Biochem Biophys**. 20: 317(1) 19-24, 1995.
- BRAUN, D.; FROMHERZ, P. Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. **Applied Physics A**, 1997.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Rev.** 56: 317-333, 1998.
- BROWNE, R.; ARMSTRONG, D. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. **Adv. Exp. Med. Biol.** 366: 43-58, 1994.
- CALLAWAY, J.K. A reliable procedure for comparison of antioxidants in rat brain homogenates. **J. Pharmacology Toxicology Methods**. 39(3): 155-62, 1998.
- CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Rad. Biol. & Med.** 14, 3, 303-311, 1993.
- CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Quím. Nova** 26 (3) 2003
- CASPER, D.; YAPARPALVI, U.; REMPEL, N.; WERNER, P. Ibuprofen protects dopaminergic neurons against glutamate toxicity in vitro. **Neurosci. Lett.** 11: 201-204, 2000.
- CHEMOFFICE, **Manual**. CambridgeSoft Corporation, 2005

- CHEN, W.; SONG, J.; GUO, P.; CAO, W.; BIAN, J. Exploring a possible way to synthesiza novel better antioxidants based n vitamin E: a DFT study. **Biorg. Med. Chem. Lett.** 16: 5874-5877, 2006.
- CLUTTON, P.; FOLTS, J. D.; FREEDMAN, J. E. Pharmacological control of platelet function. **Pharmacological Research.** 44: 4, 2001.
- COOKE, J.P.; STAMLER, J.; ANDON, N.; DAVIES, P.F.; MCKINLEY, G.; LOSCALZO, J. Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol. **Am. J. Physiol.** 259: 804-12, 1990.
- COUDRAY, C.; FAVIER, A. Determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo oxidative stress marker. **Free Rad. Biol. & Med.** 29-11: 1064-1070, 2000.
- CSISZAR, A.; STEF, G.; PACHER, P.; UNGVARI, Z. Oxidative stress-induced isoprostane formation may contribute to aspirin resistance in platelets. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids.** 66: 557-558, 2002.
- DAHLIN, D.C.; MIWA, G.T.; LU, A.Y.; NELSON, S.D. Nacetyl-p-benzoquinone imine: A cytochrome P-450- mediated oxidation product of acetaminophen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 81: 1327-1331, 1984.
- DAVIES, M.J.; THOMAS, A.C. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. **New England J. Med.** 310: 1137-40, 1984.
- DAYA, S.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S. Acetaminophen inhibits liver tryptophan-2,3-dioxygenase activity with a concomitant rise in brain serotonin levels and a reduction in urinary 5-hydroxyindole acetic acid. **Life Sci.**, 67: 235-240, 2000.
- DAYA, S.; WALKER, R.B.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S. Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against oxidative neurotoxicity. **Metab. Brain Dis.** 15: 203-209, 2000.
- DE GRAAF, J.C.; BANGA, J.D.; MONCADA, S.; PALMER, R.M.; DE GROOT, P.G.; SIXMA, J.J. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. **Circulation.** 85: 2284-90, 1992.
- DE VRIES, J. Hepatotoxic metabolic activation of paracetamol and its derivatives phenacetin and benorilate: oxygenation or electron transfer? **Biochemical Pharmacology.** 30: 399-402, 1981.

- DE WITT, D.L.; EL-HARITH, E.A.; KRAEMER, S.A.; ANDREWS, M.J.; YAO, E.F.; ARMSTRONG, R.L. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. **J. Biol. Chem.** 265: 5192-5198, 1990.
- DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G.; BECHARA, E.J.H.; CATALANI, L.H. Singlete molecular oxygen: Generation, reactivity, identification and biological effects. **Cienc. Cult.** 47: 297-311, 1995.
- DICZFALUSY, U.; FALARDEAU, P.; HAMMARSTROM, S. Conversion of prostaglandin endoperoxides to C17-hydroxy acids catalyzed by human platelet thromboxane synthase. **FEBS Lett.** 84: 271-274, 1977.
- DINIS, T. C. P.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. **Arch. Biochem. Biophys.**, 315, 1, 161-169, 1994.
- DINIZ, J.E.M.; BORGES, R.S.; NAHUM, C.N. A DFT study for paracetamol and 3,5-disubstituted analogues. **J. Mol. Struct. (TheoChem)**, 673, 93-97, 2004.
- DUFFY, J.R.; DEARDEN, J.C.; ROSTRON, C. Design, synthesis and biological testing of a novel series of anti-inflammatory drugs. **Pharm. & Pharmacol.** 53: 1505-1514, 2001.
- EISENBERG, D.; MCLACHLAN, A.D. Solvation energy in protein folding and binding. **Nature.** 319, 6050, 199 - 203, 1986.
- ELING, T.E.; CURTIS, J.F. Xenobiotic metabolism by prostaglandin-H synthase. **Pharmacology & Therapeutics.** 53: 61-273, 1992.
- EMEIGH-HART, S.G.; WYAND, D.S.; KHAIRALLAH, E.A.; COHEN, S.D. Acetaminophen nephrotoxicity in the CD - 1 mouse. II. Protection by probenecid and AT-125 without diminution of renal covalent binding. **Toxicology & Applied Pharmacology.** 136: 161-169, 1996.
- EXNER, M.; HERMANN, M.; HOFBAUER, R.; KAPIOTIS, S.; SPEISER, W.; HELD, I.; SEELOS, C.; GMEINER, B. M. K. The salicylate metabolite gentisic acid, but not the parent drug, inhibits glucose autoxidation-mediated atherogenic modification of low density lipoprotein. **FEBS Lett.** 470: 47-50, 2000.
- FALK, E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. **Circulation.** 71: 699-708, 1985.

- FIERS, W.; BEYAERT, R.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage **Oncogene**. 18 (54): 7719-7730, 1999.
- FISCHEREDER, M.; JAFFE, J.P. Thrombocytopenia following acute acetaminophen overdose. **Am. J. Hematology**. 45: 258-259, 1994.
- FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J.** 4: 2587-2597, 1990.
- FORTE, A.J.; WILSON, J.M.; SLATTERY, J.T.; NELSON, S.D. The formation and toxicity of catechol metabolites of acetaminophen in mice. **Drug Metabolism & Disposition**. 12: 484-491, 1984.
- FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; CHEESEMAN, J.R.; MONTGOMERY JR., J.A.; VREVEN, T.; KUDIN, K.N.; BURANT, J.C.; MILLAM, J.M.; IYENGAR, S.S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G.A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J.E.; HRATCHIAN, H.P.; CROSS, J.B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R.E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A.J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J.W.; AYALA, P.Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G.A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J.J.; ZAKRZEWSKI, V.G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A.D.; STRAIN, M.C.; FARKAS, O.; MALICK, D.K.; RABUCK, A.D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J.B.; ORTIZ, J.V.; CUI, Q.; BABOUL, A.G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B.B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R.L.; FOX, D.J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M.A.; PENG, C.Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P.M.W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M.W.; GONZALEZ, C.; POPLER, J.A. **Gaussian 03**, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- GALATI, G.; O'BRIEN, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Rad. Biol. & Med.** 37- 3: 287 - 303, 2004.
- GARFINKEL, D. Studies on pig liver microsomes. I., Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions. **Arch. Biochem. Biophys.** 77: 493-509, 1958.
- GEORGE, M.L.; ECCLES, S.A.; TUTTON, M.G.; ABULAFI, A.M.; SWIFT, R.I. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels

- with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging?. **Clin. Cancer Res.** 6: 3147-3152, 2000.
- GIBSON, J.D.; PUMFORD, N.R.; SAMOKYSZYN, V.M.; HINSON, J.A. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress, **Chemical Research in Toxicology**. 9 pp. 580-585, 1996.
- GILBERT, H.F.; MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** 63: 69-172, 1990.
- GODEJOHANN, M.; TSENG, L.-H.; BRAUMANN, U.; FUCHSER, J.; SPRAUL, M. Characterization of a paracetamol metabolite using on-line LC-SPE-NMR-MS and a cryogenic NMR probe. **J. Chromatography A**. 1058: 191-196, 2004.
- GOEPTAR, A.R.; SCHEERENS, H.; VERMEULEN, N.P.E. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. **Critical Reviews in Toxicology**. 43, 25-65, 1995.
- GROOTVELD, M.; HALLIWELL, B. Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl radical formation in vivo. Identification of hydroxylated derivatives of salicylate in human body fluids. **Biochem. J.** 237: 499-504, 1986.
- GUENGERICH, F. P. Reactions and significance of cytochrome P450 enzymes. **J. Biol. Chem.** 266: 10019-10022, 1991.
- GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. **Mutat. Res.** 400: 201-213, 1998.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.** 59: 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis**. 23: 118-26, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. New York: Oxford University, 1999, p. 936
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000. 936 p.
- HALLIWELL, B.; KAUR, H. Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assays for hydroxyl radicals: a cautionary note revisited for the third time. **Free Radic. Res.** 27: 239-244, 1997.

- HALLIWELL B, KAUR H, INGELMAN-SUNDBERG M. Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note. **Free Rad. Biol. Med.** 10: 439-441, 1991.
- HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; SAMUELSSON, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.** 71: 3824-3828, 1975.
- HANNEMANN. F.; BICHET, A.; EWEN, K.M.; BERNHARDT, R. Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. **Biochim. Biophys. Acta.** 1770(3): 330-344, 2007.
- HARVISON, P.J.; FORTE A.J.; NELSON, S.D., Comparative toxicities and analgesic activities of three monomethylated analogues of acetaminophen. **J. Med. Chem.** 29, 1737-1743, 1986.
- HARVISON, P.J.; GUENGERICH, F.P.; RASHED, M.S.; NELSON, S.D. Cytochrome P-450 isozyme selectivity in the oxidation of acetaminophen. **Chemical Research in Toxicology.** 64, 47-52, 1988.
- HAYES, J.D.; MCMAHON, M.; Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. **Cancer Lett.** 174 (2): 103-113, 2001.
- HEHRE, W.J.; RADOM, L.; SCHLEYER, P.V.R.; POPLE, J.A. **Ab Initio Molecular Orbital Theory**, Wiley: New York, 1986.
- HERMANN, M.; KAPIOTIS, S.; HOFBAUER, R.; EXNER, M.; SEELOS, C.; HELD, I.; GMEINER, B. Salicylate inhibits LDL oxidation initiated by superoxide/nitric oxide radicals. **FEBS Lett.** 445: 212-214, 1999.
- HINSON, J.A.; POHL, L.R.; MONKS, T.J.; GILLETTE, J.R.; GUENGERICH, F.P. 3-Hydroxyacetaminophen: A microsomal metabolite of acetaminophen. Evidence against an epoxide as the reactive metabolite of acetaminophen. **Drug Metabolism & Disposition.** 24: 289-294, 1980.
- HINSON, J.A.; POHL, L.R.; MONKS, T.J.; GILLETTE, J.R. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Life Sciences** 29, 107-116, 1981.
- HINSON, J.A.; ROBERTS, D.W.; BENSON, R.W.; DALKHOFF, K.; LOFT, S.; POULSEN, H.E. Mechanism of paracetamol toxicity. **Lancet.** 24:335(8691) 732,1990.

- HINSON, J.A.; PUMFORD, N.R.; ROBERTS, D.W. Mechanisms of acetaminophen toxicity: immunochemical detection of drug-protein adducts. **Drug Metabolism Reviews**. 73-92, 1995.
- HOFFMANN, K.J.; STREETER, A.J.; AXWORTHY, D.B.; BAILLIE T.A. Identification of the major covalent adduct formed in vitro and in vivo between acetaminophen and mouse liver proteins. **Molecular Pharmacology**. 566-573, 1985.
- HOFFMANN, K.J.; STREETER, A.J.; AXWORTHY, D.B.; BAILLIE, T.A. Structural characterization of the major covalent adduct formed in vitro between acetaminophen and bovine serum albumin. **Chemico-Biological Interactions** 155-172, 1985.
- HONGSLO, J.K.; SMITH, C.V.; BRUNBORG, G.; SODERLUND, E.J.; HOLME, J.A. Genotoxicity of paracetamol in mice and rats. **Mutagenesis**. 93-100, 1994.
- HOUSE, H.; **Modern Synthetic Reactions**. The Benjamin Publishing Co, 1972.
- HSIEH, R.J.; KINSELLA, J.E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Adv. Food Nutr: Res**. 33: 233-241, 1989.
- HUANG, C.G.; CHU, Z.L.; WEI, S.J.; JIANG, H.; JIAO, B.H. Effect of berberine on arachidonic acid metabolism in rabbit platelets and endothelial cells. **Thrombosis Res**. 106: 223-227, 2002.
- HYPERCHEM, release 7.5 professional, Hypercube, Inc. Gainesville, Florida, USA.
- JANERO, D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Rad. Biol. & Med**. 9: 515-540, 1998.
- JEFFERY, E.H.; HASCHEK, W.M. Protection by dimethylsulfoxide against acetaminophen-induced hepatic, but not respiratory toxicity in the mouse. **Toxicology & Applied Pharmacology**. 452-461, 1988.
- JENSEN, L.S.; VALENTINE, J.; MILNE, R.W.; EVANS, A.M. The quantification of paracetamol, paracetamol glucuronide and paracetamol sulphate in plasma and urine using a single high-performance liquid chromatography assay. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 34: 585-593, 2004.
- JENTZSH, A.M. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radio Biol. & Med.**, 20(2), 251-6, 1996.

- GIBSON, J.D.; PUMFORD, N.R.; SAMOKYSZYN, V.M.; HINSON, J.A. Mechanism of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: Covalent Binding versus Oxidative Stress. **Chem. Res. Toxicol.** 9, 580-585, 1996.
- GODEJOHANNA, M.; TSENGA, L.-.; BRAUMANNA, U.; FUCHSERB, J.; SPRAULA, M. Characterization of a paracetamol metabolite using on-line LC-SPE-NMR-MS and a cryogenic NMR probe **J. Chromatography A**, 1058, 191-196, 2004.
- JONES, A. L. Mechanism of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: A critical review. **Clinical Toxicology**. 36: 277-285, 1998.
- KADKHODAEI, M.; ENDRE, Z.H.; TOWNER, R.A.; CROSS, M. Hydroxyl radical generation following ischaemiareperfusion in cell-free perfused rat kidney . **Biochim Biophys Acta**. 1243: 169-174, 1995.
- KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plants extracts containing phenolic compounds., **J. Agric. Food Chem.** 47: 3954-3962, 1999.
- KELLER, R.J.; HINSON, J.A. Mechanism of acetaminophen- stimulated NADPH oxidation catalyzed by the peroxidase-H₂O₂ system. **Drug Metabolism and Disposition**. 184-187, 1991.
- KLINGENBERG, M. Pigment of rat liver microsomes. **Arch. Biochem. Biophys.** 75: 376-386, 1958.
- KNOX, J.H.; JURAND, J. Determination of paracetamol and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography using reversed-phase bonded supports. **J. Chromatography**. 1651-670, 1977.
- KOROLKOVAS, A. **Fundamentos da Farmacologia Molecular**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara S. A., p.783, 1982.
- KOYMANS, L.; VAN LENTHE, J.H.; VAN DE STRAAT, R.; DONNÉ-OP, D.; KELDER, G.M.; VERMEULEN, N.P.E. A theoretical study on the metabolic activation of paracetamol by cytochrome P-450: indications for a uniform oxidation mechanism. **Chemical Research in Toxicology**. 60-66, 1989.
- KROLL, M.H.; SCHAFFER, A.I. Biochemical mechanisms of platelet activation. **Blood**; 74, 1181-95, 1989.

- KUDOLO, G.B.; DELANEY, D.; BLODGETT, J. Short-term oral ingestion of Ginkgo biloba extract (Egb 761) reduces malondialdehyde levels in washed platelets of type 2 diabetic subjects. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 68: 29-38, 2005.
- KUBINYI, H. Nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character: the bilinear model. **Farmaco.** 34(3): 248-76, 1979.
- KULMACZ, R.J.; PALMER, G.; TSAI, A.L. Prostaglandin H synthase: perturbation of the tyrosyl radical as a probe of anticyclooxygenase agents. **Molecular Pharmacology.** 833-837, 1991.
- KULMACZ, R.J.; PENDLETON, R.B.; LANDS, W.E.M. Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin-endoperoxide synthase - Interpretation of reaction kinetics. **J. Biol. Chem.** 269: 5527-5536, 1994.
- LARRAURI, A.; FABRA, R.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; TRULLENQUE, R.; CASTELL, J.V. Toxicity of paracetamol in human hepatocytes. Comparison of the protective effects of sulfhydryl compounds acting as glutathione precursors. **Molecular Toxicology.** 301-311, 1987.
- LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Phys. Rev. B** 37: 785-789, 1998.
- LEE, H.; LEE, K.; JUNG, J.K.; CHO, J.; THEODORAKIS, E.A. Synthesis and evaluation of 6-hydroxy-7-methoxy-4-chromanone- and chroman-2-carboxamides as antioxidants. **Biorg. Med. Chem. Lett.** 15: 2745-2748, 2005.
- LEMANSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELINSKI, R.; SOFFERS, A.E.M.F., RIETJENS, I.M.C.M. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Rad. Biol. & Med.**, 31(7): 869-881, 2001.
- LEONARDS, J.R. Presence of acetylsalicylic acid in plasma following oral ingestion of aspirin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 110: 304-308, 1962.
- LISTER, E.; WILSON, P. **Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity**, Crop Research Institute, Lincoln, New Zealand, 2001.
- LUBEK, B.M.; AVARIA, M.; BASU, P.K.; WELLS, P.G. Pharmacological studies on the in vivo cataractogenicity of acetaminophen in mice and rabbits. **Fundamental & Applied Toxicology.** 596-606, 1988.

- LUO, X.P.; LEHOTAY, D.C. Determination of hydroxyl radicals using salicylate as a trapping agent by gas chromatography-mass spectrometry. **Clin. Biochem.** 30: 41-46, 1997.
- MAHARAJ, H.; MAHARAJ, D.S. Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against MPP⁺-induced mitochondrial damage and superoxide anion generation. **Life Sciences.** 78, 2438 – 2443, 2006.
- MAHARAJ, D.S.; SARAVANAN, K.S.; MAHARAJ, H.; MOHANAKUMAR, K.P.; DAYA, S. Acetaminophen and aspirin inhibit superoxide anion generation and lipid peroxidation, and protect against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. **Neurochemistry International.** 44, 355–360, 2004.
- MASUTANI, H. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. **Int. J. Hematol.** 71: 25-32, 2000.
- MICHAEL, S.L.; PUMFORD, N.R.; MAYEUS, P.R.; NIESMAN, M.R.; HINSON, J.A. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. **Hepatology.** 30: 186-195, 1999.
- MICHELSON, A.D. Platelets. San Diego: Academic Press; 2002.
- MILLER, J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application for monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science** 84: 407-412, 1993.
- MINER, D.J.; KISSINGER, P.T. Evidence for the involvement of N-acetyl-p-quinoneimine in acetaminophen metabolism. **Biochemical Pharmacology** . 3285–3290, 1979.
- MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P.A. What determines the strength of noncovalent association of ligands to proteins in aqueous solution? **Proc Natl Acad Sci USA.** 90(18): 8402-8406, 1993.
- MOFFIT, J.S.; ALEKSUNES, L.M.; KLAASSEN, C.D.; MANAUTOU, J.E. Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in clofibrate-mediated hepatoprotection from acetaminophen. **Toxicology** 230(2-3):197-206, 2007.
- MOLDÉUS, P.; RAHIMTULA, A. Metabolism of paracetamol to a glutathione conjugate catalyzed by prostaglandin synthetase. **Biochemical & Biophysical Research Communications.** 469–475, 1980.

- MOLDÉUS, P.; ANDERSSON, B.; RAHIMTULA, A.; BERGGREN, M. Prostaglandin synthetase catalyzed activation of paracetamol. **Biochemical Pharmacology**. 1363-1368, 1982.
- MOHANAKUMAR, K.P.; MURALIKRISHNAN, D.; THOMAS, B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. **Brain Res.**, 864, 281-290, 2000.
- MYERS, T.G.; THUMMEL, K.E.; KALHORN, T.F.; NELSON S.D. Preferred orientations in the binding of 4'-hydroxyacetanilide (acetaminophen) to cytochrome-P450 1A1 and 2B1 isoforms as determined by C-13-NMR and N-15-NMR relaxation studies. **J. Med. Chem.** 860-867, 1994.
- NAHUM, C.N.; BORGES, R.S.; DA SILVA, A.B.F. Density Functional Theory Study of Metabolic Derivatives of the Oxidation of Paracetamol **Int. J. Quantum Chem.** 106: 2617-2623, 2006.
- NAPPI, A.J.; VASS, E. Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta** 1380:55-63, 1998.
- NELSON, S.D.; TIRMENSTEIN, M.A.; RASHED, M.S.; MYERS, T.G. Acetaminophen and protein thiol modification. **Advances in Experimental Medicine & Biology** 579-588 1991.
- NELSON, S.D. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. **Drug Metabolism Reviews**. 147-177, 1995.
- NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATKI, T.; STEGEMAN, J.J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALUS, I.C.; NEBERT, D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**. 6: 1-42, 1996.
- NICHOLLS, D.G.; CASTILHO, R.F.; WARD, M.W.; Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J. Neurochem.** 72 (4): 1394-1401, 1999.
- OLAS, B.; WACHOWICZ, B. Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. **Thrombosis Res.** 106: 143-148, 2002.

- ORHAN, H.; SAHIN, G. In vitro effects of NSAIDS and paracetamol on oxidative stress-related parameters of human erythrocytes. **Exp. Toxic. Pathol.** 53, 133-140, 2001.
- PACE-ASCIAK, C.R.; SMITH, W.L.; Enzymes in the biosynthesis and catabolism of eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and hydroxyl fatty acid. In: **The Enzymes**. 16: 543-603, 1983.
- PARR, R.G.; YANG, W. Density Functional Theory of Atoms and Molecules; Oxford University Press: New York, 1989.
- PARKINSON, A. Biotransformation of Xenobiotics. In Casarett & Doull's toxicology the basic cience of poisons. (Klaassen, C. D. ed) McGraw-Hill Inc. New York. 113-186, 1996.
- PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: A rational approach in drug design. **Chem. Reviews**. 96-8: 3147-3176, 1996.
- PIRMOHAMED, M.; MADDEN, S.; PARK, B.K. Idiosyncratic drug reactions. Metabolic bioactivation as apathogenic mechanism. **Clinical Pharmacokinetics**. 215-230, 1996.
- POTTER, D.W.; HINSON, J.A. Acetaminophen peroxidation reactions. **Drug Metabolism Reviews**. 341-358, 1989.
- PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**. 30-4: 277-290, 1995.
- PRESCOTT, L.F. Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. **Drugs**. 290-314, 1983.
- PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Rad. Biol. & Med.** 27: 1173-1181, 1999.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. & Med.** 26: 1231-1237, 1999.
- RICE-EVANS, C.; BAYSAL, E.; FLYNN, D.; KONTOGHIORGHES, G. Ironmediated free radical effects on erythrocytes: the role of desferrioxamine. **Biochem Soc Trans.** 14: 368-9, 1986.
- RICE-EVANS, C.; BAYSAL, E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. **Biochem. J.** 244: 191-196, 1987.

- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. The reactive antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids., **Free Rad. Res.** 22: 375-383, 1995.
- RIETJENS, I.V.M.; BOERSMA, M.G., DE HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H.M.; CNUBBEN, N.H.P.; VAN ZANDEN, J.J.; VAN DER WOUDE, H.; ALINK, G.M.; KOEMAN, J.H. The pro-oxidant chemistry of natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Env. Toxicol. Pharmacol.** 11: 321-333, 2002.
- ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 151-70, 1991.
- ROTH, G.J.; MAJERUS, P.W. The mechanism of the effect of Aspirin on human platelets: 1 Acetylation of a particulate fraction protein. **J. Clin. Invest.** 56: 624- 632, 1975.
- RUMBLE, R. H.; ROBERTS, M. S. Determination of aspirin and its major metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography without solvent extraction. **J. Chromatography.**, 225, 252-260, 1981.
- SAIRAM, K.; SARAVANAN, K.S.; BANERJEE, R.; MOHANAKUMAR, K.P. Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. **Brain Res.** 966: 245-252, 2003.
- SANDLER, D.P.; SMITH, J.C.; WEINBERG, C.R.; BUCKALEW, V.M.; J.R.; DENNIS, V.W.; BLYTHE, W.B.; BURGESS, W.P. Analgesic use and chronic renal disease. **New England J. Med.** 1238-1243, 1989.
- SANTOS, M.T.; VALLES, J.; MARCUS, A.J.; SAFIER, M.; BROEKMAN, J.; ISLAM, N.; ULLMAN, H.L.; EIROA, A.M.; AZNAR, J. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. **J. Clin. Invest.** 87: 571-80, 1991.
- SATO, Y.; TAKAHASHI, T.; SUSUKI, Y. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-soluble radical initiator. **Biochemistry.** 34: 8940-8949, 1995.
- SCHLICHTING, I.; BERENDZEN, J.; CHU, K.; STOCK, A.M.; MAVES, S.A.; BENSON, D.E.; SWEET, R.M.; RINGE, D.; PETSKO, G.A.; SLIGAR, S.G. The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution. **Science.** 287:1615-1622. 2000.

- SCHIMMEL, M.; BAUER, G. Proapoptotic and redox-state related signaling of reactive oxygen species generated by transformed fibroblasts. **Oncogene**. 21: 5886-5896, 2002.
- SCHÖNEBOOM, J.C.; LIN, H.; REUTER, N.; THIEL, W.; COHEN, S.; OGLIARO, F.; SHAIK, S. The elusive oxidant species of cytochrome P450 enzymes: characterization by combined quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) calculations. **J. Am. Chem. Soc.** 10,124(27) 8142-8151, 2002.
- SEYMEEN, H.O.; CIVELEK, S.; SEVEN, A.; YIGIT, G.; HATEMI, H.; BURÇAK, G. Iron supplementation in Experimental Hyperthyroidism: Effects on oxidative stress in skeletal muscle tissue. **Yonsei Medical Journal**. 45-3: 413-418. 2004
- SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.** 47: 61-71, 1990.
- SIES, H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Rad. Biol & Med.** 14: 313-323, 1993.
- SILVESTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectométrica de Compostos Orgânicos**, 5 ed. Rio de Janeiro, 1994.
- SIMÃO, A.N.C.; SUZUKAWA, A.A.; CASADO, M.F.; OLIVEIRA, R.D.; GUARNIER, F.A.; CECCHINI, R. Genistein abrogates pré-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-azobis (amidinopropane). **Life Sciences**. 78: 1202-1210, 2006.
- SINZINGER, H.; VIRGOLINI, I.; PESKAR, B.A. Response of thromboxane b2, amlondialdehyde and platelets sensitivity to 3 weeks low-dose aspirin (ASA) in healthy volunteers. **Thrombosis Res.** 53: 261-269,1989.
- SIMMONS, D.L.; BOTTING, R.M.; HLA, T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition **Pharmacol. Rev.** 56: 387-437, 2004.
- SMITH, W.L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. **Biochem. J.** 259: 315-324, 1989.
- SMITH, W.L.; MARNETT, L.J.; DEWITT, D.L., Prostaglandins and thromboxane biosynthesis, **Pharmac. Ther.** 49: 153-179, 1991.
- SPANOS, G.A.; WROLSTAD, R.E. Influence of Variety, Maturity, Processing, and Storage on the Phenolic Composition of Pear Juice? **J. Agric. Food Chem.** 38: 817-824, 1990.

SPORTOLETTI, G.; **PCT Int. Appl.** 34, 1986.

STATISTICA *Enterprise, Data Miner*, SEPATH and GTrees are trademarks of StatSoft, Inc. Copyright StatSoft, Inc., 1984-2007.

STEWART, J.J.P. In *Semiempirical Molecular Orbitals Methods*, New York, 1990.

SUHAIL, M.; AHMAD, I. In vivo effects of acetaminophen on rat RBC and role of vitamin E. **Indian. J. Exp. Biol.** 33(4): 269-271, 1995.

SUBRAHMANYAM, V.V.; MCGIRR, L.G.; O'BRIEN, P.J. Glutathione oxidation during peroxidase catalysed drug metabolism. **Chem. Biol. Interact.** 61(1): 45-59, 1987.

TEISMANN, P.; FERGER, B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. **Synapse** 39:167-174, 2001.

THE MERCK INDEX, 12th edition, 1996

THOMAS, G. *Química Medicinal- Uma Introdução*. São Paulo: Guanabara, 2003. p.267-268.

THOMAS, S.H. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. **Pharmacology & Therapeutics.** 91-120, 1993.

TIRMENSTEIN, M.A.; NELSON, S.D. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols: Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. **J. Biol. Chem.** 3059-3065, 1990.

TONE, Y.; KAWAMATA, K.; MURAKAMI, T.; HIGASHI, Y.; YATA, N. Dose-dependent pharmacokinetics and firstpass metabolism of acetaminophen in rats. **J. Pharmacobio-Dynamics.** p. 327-335, 1990.

TROOST, F.J.; SARRIS, W.H.; HAENEN, G.R.; BAST, A.; BRUMMER, R.J. New method to study oxidative damage and antioxidants in the human small bowel: effects of iron applications. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 285: 354-359, 2003.

TSUJIMOTO, Y.; SAITOH, K.; KASHIMA, M.; SHIOZAWA, A.; KAZUKA, M.; HASHIZUME, H.; KIMURA, K.; YAMAZAKI, M.; FUJII, A. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on lipid peroxidation by hydroxyl radical. **Gen. Pharmacol.** 31: 405-408, 1998.

- VACA, C. E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mut. Res.** 195: 137-149, 1988.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. The mechanism of action of aspirin. **Thrombosis Res.** 110: 255-258, 2003.
- VAN DE STRAAT, R.; DE VRIES, J.; KULKENS, T.; DEBETS A.J.J.; VERMEULEN, N.P.E. Paracetamol, 3-monoalkyl- and 3,5-dialkyl derivatives. Comparison of their microsomal cytochrome P-450 dependent oxidation and toxicity in freshly isolated hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.** 35: 3693-3699, 1986.
- VAN DE STRAAT, R.; DE VRIES, J.; GROOT, E.J.; ZIJL, R.; VERMEULEN, N.P.E. Paracetamol, 3-monoalkyl- and 3,5-dialkyl derivatives: comparison of their hepatotoxicity in mice. **Toxicol. Appl. Pharmac.** 89: 183-189, 1987.
- VAN DE STRAAT, R.; DE VRIES, J.; DE BOER, H.J.R.; VROMANS, R.M.; VERMEULEN, N.P.E. Relationship between paracetamol binding to and its oxidation by two cytochrome P-450 isozymes - a proton nuclear magnetic resonance and spectrophotometric study. **Xenobiotica**, 1-9, 1987.
- VAN DE STRAAT, R.; DE VRIES, J.; VERMEULEN, N.P.E. Role of hepatic microsomal and purified cytochrome P-450 in one-electron reduction of two quinone imines and concomitant reduction of molecular oxygen. **Biochemical Pharmacology** 613-619, 1987.
- VAN DE STRAAT, R.; VROMANS, R.M.; BOSMAN, P.; DE VRIES, J.; VERMEULEN, N.P.E. Cytochrome P-450-mediated oxidation of substrates by electron-transfer; role of oxygen radicals and of 1- and 2-electron oxidation of paracetamol. **Chemico-Biological Interactions.** 267-280, 1988.
- VENDEMIALE, G.; GRATAGLIANO, I.; ALTOMARE, E.; TURTURRO, N.; GUERRIERI, F. Effect Of Acetaminophen Administration On Hepatic Glutathione Compartmentation and Mitochondrial Energy Metabolism In the Rat. **Biochemical Pharmacology.** 1147-1154, 1996.
- VERMEULEN, N.P.E.; BESSEMS, J. G. M.; VAN DE STRAAT, R. Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. **Drug Metabolism Reviews** . 367-407, 1992.
- WEBER, V.; COUDERT, P.; RUBAT, C.; DUROUX, E.; E-GOYET, D.V.; GARDETTE, D.; BRIA, M.; ALBUISSON, E.; LEAL, F.; GRAMAIN, J.C.; COUQUELET, J.; MADESCLAIRE, M. Novel 4,5-Diaryl-3-hydroxy-2(5H)-furanones as Anti-Oxidants and Anti-Inflammatory Agents. **Biorg. & Med. Chem.** 10: 1647-1658, 2002.

- WELLS, P.G.; WILSON, B.; WINN, L.M.; LUBEK, B.M. In vivo murine studies on the biochemical mechanism of acetaminophen cataractogenicity. **Canadian J. Physiology & Pharmacology**. 1123-1129, 1995.
- WERMUTH, C.G. The practice of medicinal chemistry. London: Academic Press, 1996.
- WINTERBOURN, C.C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods Enzymol**; 186: 264-72, 1990.
- XU, J.J.; DIAZ, D.; O'BRIEN, P.J. Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential, **Chem. Biol. Inter**. 150: 115-128, 2004.
- YANG, F.; BEARD, D. A. Thermodynamically based profiling of drug metabolism and drug-drug metabolic interactions: a case study of acetaminophen and ethanol toxic interaction. **Biophys Chem**. 20;120(2): 121-134, 2006.
- YAGI, K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. **Free Radical and Antioxidant Protocols**, 108, 101-106, 1998.
- ZHOU, L.X.; ERICKSON, R.R.; HOLTZMAN, J.L. Studies comparing the kinetics of cysteine conjugation and protein binding of acetaminophen by hepatic microsomes from male mice. **Biochimica & Biophysica Acta**. 1335: 153-160, 1997.

ANEXO 1 – Comitê de Ética em Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**

Ao: Prof^o. Rosivaldo dos Santos Borges

Carta: 065/06 CEP-CCS/UFPA.

Belém, 07 de julho de 2006.

Senhor Pesquisador, temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa intitulado "Modelagem Molecular, Síntese, Avaliação Biológica e Toxicidade de Inibidores fenólicos Derivados da Associação Paracetamol e Aspirina na PGES/COX" sob o protocolo nº: 076/06 CEP-CCS/UFPA, foi apreciado e aprovado na reunião do dia 30 de junho de 2006. Você tem como compromisso a entrega do relatório até o dia 30 de Dezembro de 2006 no CEP-CCS/UFPA situado no Campus universitário do Guamá no Complexo de sala de aula do CCS – sala 13 (Altos), (em frente ao estacionamento do Curso de Odontologia).

Atenciosamente,

Prof. M. Sc. Wallace Raimundo Araújo dos Santos
Coordenador do CEP-CCS/UFPA

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-CCS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ CCS – Sala 14 - Campus Universitário, nº 01. Guamá – CEP: 66075-110 - Belém-Pará. Tel./Fax: 3201-8028 E-mail: cepccs@ufpa.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)