

Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

*TOXICIDADE IN VITRO E IN VIVO DO ORTOBENZAMOL,
ANÁLOGO DO PARACETAMOL.*

Luana Melo Diogo de Queiroz



2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO ORTOBENZAMOL,
ANÁLOGO DO PARACETAMOL.**

Autor: Luana Melo Diogo De Queiroz

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. María Elena Crespo López

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

BELÉM - PA

2014

LUANA MELO DIOGO DE QUEIROZ

**TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO ORTOBENZAMOL,
ANÁLOGO DO PARACETAMOL.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Aprovado em: 23/01/ 2014

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. María Elena Crespo López
ORIENTADORA

Prof^a. Dr^a. Barbarella de Matos Macchi
1º EXAMINADOR

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira
2º EXAMINADOR

Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes
3º EXAMINADOR

Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa
4º EXAMINADOR

FONTE FINANCIADORA

Esta tese foi realizada no Laboratório de Farmacologia Molecular, em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Contamos também com a parceria internacional do Departamento de Neuroquímica y Neurofarmacología, do Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (Espanha), no qual foi realizado estágio de doutorado sanduíche com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Dedico este trabalho aos meus pais
Antônio César Duarte de Queiroz
e Àurea Mônica Melo Diogo e, ao
meu “filho” Nick.

Obrigada pelo amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

A Deus por introduzir pessoas e oportunidades maravilhosas em minha vida. Pela força, proteção, iluminação e determinação fundamentais para o alcance dos meus objetivos.

A minha mãe Mônica pela amizade, cumplicidade e companheirismo eterno. Por apoiar minhas decisões, acreditar no meu sucesso e ser co-autora de todas as minhas conquistas.

Ao meu pai Antônio César pelo amor e por ser a minha referência de honestidade, justiça, bondade e generosidade. Obrigada pelo importante exemplo de caráter e apoio em todas as escolhas que fiz.

A minha família, meu alicerce, pelos valores morais e religiosos e, por todos os demais valores ensinados que transcendem a cada geração. Por primar pela educação, que indubitavelmente constitui-se na peça fundamental para a construção do que sou.

Aos meus “filhos” de coração Nick e Nina que alegram o meu viver, me fortalecem e me curam de qualquer desânimo. Em especial ao mais velho Nick, meu companheiro desde a graduação.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular: Allan Malaquias, Daniela Bastos, Danielle Santana, Déborah Oliveira, Enéas Fontes, Gabriela Arrifano, Layse Gama, Mauro Almeida e Rogério Monteiro por todo apoio concedido, pela convivência harmoniosa e pelo companheirismo. Obrigada por tornarem menores os obstáculos encontrados ao longo desta tese. “*A alegria compartilhada é uma alegria dobrada*” (Jhon Ray).

A minha orientadora a professora Dr^a Elena Crespo, meu especial agradecimento. Obrigada pela inestimável orientação que possibilitou meu crescimento científico, por todos os ensinamentos e, sobretudo pela preocupação para com a minha formação como pesquisadora e pelo exemplo de ética.

Ao professor Dr. Rosivaldo Borges, pela síntese do ortobenzamol no Núcleo de Estudos e Seleção de Moléculas Bioativas da Faculdade de Farmácia, do Instituto de Ciências da Saúde da UFPA.

Ao professor Dr. Ricardo Vieira, pela parceria para a determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos no Laboratório de Análises Clínicas, do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA.

A pesquisadora Dr^a Cristina Suñol pela parceria internacional que, através do estágio de doutorado sanduíche, foi realizado o estudo da neurotoxicidade do ortobenzamol no

Departamento de Neuroquímica y Neurofarmacología, do Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona na Espanha.

Aos meus amigos da Faculdade de Farmácia da UFPA: Marcos Valério, Lúcia Siqueira e Orenzio Soler pelo incentivo e apoio.

Ao Instituto de Pesquisa Evandro Chagas de Belém-PA, pelo fornecimento dos animais.

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular pela oportunidade de doutoramento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro concedido durante a realização desta tese.

A LIÇÃO DO BAMBU CHINÊS

“Depois de plantada a semente deste incrível arbusto, não se vê nada, por aproximadamente cinco anos, exceto o lento desabrochar de um diminuto broto, a partir do bulbo. Durante cinco anos, todo o crescimento é subterrâneo, invisível a olho nu, mas uma maciça e fibrosa estrutura de raiz, que se estende vertical e horizontalmente pela terra está sendo construída. Então, no final do quinto ano, o bambu chinês, cresce até atingir a altura de 25 metros.

Muitas coisas na vida pessoal e profissional são iguais ao bambu chinês: Você trabalha, investe tempo, esforço, faz tudo o que pode para nutrir seu crescimento, e, às vezes não vê nada por semanas, meses, ou anos. Mas se tiver paciência para continuar trabalhando, persistindo e nutrindo, o seu quinto ano chegará, e, com ele, virão crescimento e mudanças que você jamais esperava... O bambu chinês nos ensina que não devemos facilmente desistir de nossos projetos, de nossos sonhos... Especialmente no nosso trabalho, um projeto fabuloso que envolve mudanças de comportamento, de pensamento, de cultura e de sensibilização. Devemos sempre lembrado bambu chinês, para não desistirmos facilmente diante das dificuldades que surgirão.

É preciso muita fibra para chegar às alturas e, ao mesmo tempo, muita flexibilidade para se curvar ao chão.

(Folclore Chinês)

RESUMO

TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO ORTOBENZAMOL, ANÁLOGO DO PARACETAMOL.

O paracetamol (PAR) é um dos medicamentos de venda livre mais utilizado em todo o mundo. Entretanto, doses elevadas do PAR produzem toxicidade hepática e/ou renal. No intuito de minimizar a toxicidade do PAR e obter melhor atividade analgésica e antiinflamatória, um estudo prévio realizou modificações na estrutura química do PAR por modelagem molecular, dando origem ao ortobenzamol (OBZ) - análogo do PAR. Assim, o OBZ foi sintetizado e avaliado em modelos de nocicepção e inflamação em animais. O estudo demonstrou atividade analgésica central do OBZ, com potência superior ao PAR. Além disso, nos testes de inflamação, essa droga apresentou inibição significativa no processo inflamatório. Entretanto, para que o OBZ possa ser considerado uma alternativa terapêutica nova e importante para o tratamento da dor e/ou da inflamação é necessário determinar sua toxicidade. Assim, este estudo objetivou avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do OBZ e, compará-la com a do PAR. Para isso, a neurotoxicidade foi avaliada *in vitro* em culturas primárias de neurônios corticais, através de ensaios de viabilidade celular, determinação dos níveis de glutathione total e reduzida, assim como a possível capacidade neuroprotetora frente ao estresse oxidativo. Foram realizados estudos *in vivo* em camundongos, iniciados pela determinação da dose efetiva mediana (DE₅₀) do PAR, a fim de compará-la com a do OBZ nos modelos de toxicidade estudados. Determinou-se o estresse oxidativo hepático e cerebral pela análise dos níveis de peroxidação lipídica e nitritos. A possível disfunção hepática e renal foi determinada, por meio da análise dos níveis plasmáticos das enzimas aspartato aminotransferase (AST), de alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT) e, da creatinina no sangue. Avaliaram-se alterações nos parâmetros clínicos através do hemograma, leucograma e plaquetograma e, realizou-se a determinação da toxicidade aguda. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o ortobenzamol é mais seguro que o paracetamol. Registrou-se ao ortobenzamol ausência de neurotoxicidade, menor potencial hepatotóxico e hematotóxico, ausência de nefrotoxicidade e, ainda, foi classificado como um xenobiótico de baixa toxicidade após a avaliação da toxicidade aguda. Portanto, o ortobenzamol pode ser considerado como uma futura alternativa terapêutica segura ao paracetamol, no tratamento da dor e inflamação.

Palavras-chave: Ortobenzamol. Paracetamol. Toxicidade.

ABSTRACT
TOXICITY *IN VITRO* AND *IN VIVO* OF ORTOBENZAMOL, ANALOG
PARACETAMOL.

Paracetamol (PAR) is the non-prescription medicine most used worldwide. However, high doses of PAR produce hepatic and / or renal toxicity. In order to minimize the toxicity of PAR and get better analgesic and anti - inflammatory activity, a previous study conducted by modifying the chemical structure of PAR through molecular modeling, gave rise to ortobenzamol (OBZ) - analog of PAR. Thus, the OBZ was synthesized and evaluated in models of nociception and inflammation in animals. The study showed central analgesic activity of OBZ, with superior potency when compared to PAR. In addition, tests showed a significant inhibition in the inflammatory process. However, to the OBZ be able to be considered as an important new therapeutic option for the treatment of pain and / or inflammation is necessary to determine its toxicity. Given that, this study aimed to evaluate the toxicity *in vitro* and *in vivo* OBZ and compare it with the PAR. For this purpose, *in vitro* neurotoxicity was evaluated in primary cultures of cortical neurons through cell viability assays, determination of the levels of total and reduced glutathione, as well as the possible neuroprotective capacity against oxidative stress. *In vivo* studies were performed in mice, initiated by determining the median effective dose (ED₅₀) of PAR in order to compare it with the OBZ at toxicity models studied . It was determined the liver and brain oxidative stress by analyzing the levels of lipid peroxidation and nitrites. The possible hepatic and renal dysfunction was determined by analyzing plasma enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT) levels and creatinine in the blood. We evaluated changes in clinical parameters through the CBC, WBC and platelet parameters and was held to determine the acute toxicity. The results of this study showed that in the tested doses, ortobenzamol is safer than paracetamol. The ortobenzamol displayed absence of neurotoxicity, less hepatotoxic and hematotoxic potential, absence of nephrotoxicity and also was rated as a xenobiotic with low toxicity after evaluation of acute toxicity. Therefore, the ortobenzamol can be considered as a safer alternative to the treatment of pain and inflammation when compared to paracetamol.

Keywords: Ortobenzamol. Paracetamol. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reações de peroxidação lipídica com espécies reativas.....	24
Figura 2- Principais vias de biotransformação do paracetamol.....	27
Figura 3-Viabilidade celular de culturas primárias de neurônios corticais (células já diferenciadas), expostas por 2 dias a Ortobenzamol (acima) ou Paracetamol (abaixo).....	44
Figura 4- Viabilidade celular de culturas primárias de neurônios corticais (células não diferenciadas), expostas por 7 dias a Ortobenzamol (acima) ou Paracetamol (abaixo).....	45
Figura 5-Viabilidade celular de culturas de células corticais expostas ao paracetamol (100µM) ou ortobenzamol (10µM) por 2 dias (acima) ou por 7 dias (abaixo) e/ou a concentrações de H ₂ O ₂ nas últimas 3 horas de incubação.....	47
Figura 6 - Efeito inibitório de doses crescentes de paracetamol sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% i.p.....	48
Figura 7- Peroxidação lipídica do tecido cerebral (acima) e hepático (abaixo) de camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	49
Figura 8- Concentração de nitritos no tecido hepático de camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol e paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	50
Figura 9- Níveis plasmáticos de aspartato amino transferase (AST) em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	51
Figura 10- Níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	52
Figura 11- Níveis plasmáticos de gama glutamil transferase (GGT) em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	52
Figura 12- Níveis plasmáticos de creatinina em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	53
Figura 13- Células vermelhas totais em amostras de sangue de camundongos, tratados	

com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	54
Figura 14- Quantificação das hemoglobinas em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	55
Figura 15- Porcentagem do hematócrito em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	55
Figura 16- Volume corpuscular médio em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	56
Figura 17- Porcentagem de distribuição das células vermelhas totais em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	56
Figura 18- Hemoglobina corpuscular média em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	57
Figura 19- Concentração da hemoglobina corpuscular média em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	57
Figura 20- Leucócitos totais sanguíneos em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	58
Figura 21- Linfócitos sanguíneos em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	59
Figura 22- Monócitos sanguíneos em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	59
Figura 23- Granulócitos sanguíneos em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	60
Figura 24- Plaquetas sanguíneas em camundongos tratados com diferentes	

concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	60
Figura 25- Volume plaquetar médio sanguíneo em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	61
Figura 26- Porcentagem de distribuição do volume plaquetar sanguíneo em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE ₅₀) de cada droga.....	61
Figura 27- Isolamento do grupo (1), piloereção (2) e esturpor (3) observados no período de 4 horas após administração de 2000 mg/Kg de paracetamol.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Viabilidade Celular em culturas de neurônios corticais, expostas por 2 ou 7 dias ao paracetamol ou ortobenzamol.....	101
Tabela 2- Níveis de glutathione total e reduzida em culturas de neurônios corticais, expostas por 8 dias ao paracetamol ou ortobenzamol.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
5-HT1A	Receptor de serotonina do tipo 1
5-HT2	Receptor de serotonina do tipo 2
5-HT3	Receptor de serotonina do tipo 3
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Monofosfato cíclico de 3'5'-adenosina
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CB	Receptor canabinoide
CB1	Receptor canabinoide subtipo 1
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CIT P450	Citocromo P450
COX	Ciclooxigenase
CYP	Enzimas do citocromo P450
DE₅₀	Dose efetiva mediana
DNA	ácido desoxirribonucleico
E.P.M.	Erro padrão da média
ER[•]	Espécie reativa
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GGT	Gama glutamiltransferase
GMPc	Guanosina monofostato cíclico
GSH	Glutathiona reduzida
GSP	Glutathiona-peroxidase
GSSG	Glutathiona oxidada
GSTs	Glutathiona-S-transferases
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO[•]	Radical hidroxila

HOCl	Ácido hipocloroso
HO-PAR	3-hidroxi-paracetamol
I.P.	Via intraperitoneal
L•	Radical lipídico de carbono
L-NAME	L -nitro -arginina metil éster
LO•	Radical lipídico alcóxil
LOO•	Radical peróxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malondialdeído
MIN	Minutos
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
NAC	N-acetilcisteína
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NAPQI	<i>N</i> -acetil- <i>p</i> -benzoquinonaimina
NAPSQI	<i>N</i> -acetil-benzosemiquinonaimina
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NO•	Óxido nítrico
NO₂-	Nitritos
NO₃-	Nitratos
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂	Oxigênio
O₂•-	Superóxido
OBZ	Ortobenzamol
ONOO⁻	Peroxinitritos
PAPS	Enzima fosfoadenosil-fosfosulfato
PAR	Paracetamol
PBQ	<i>p</i> -benzoquinona
PBS	Solução salina tamponada
PGD₂	Prostaglandina da série D ₂
PGE₂	Prostaglandina da série E ₂
PGF₂	Prostaglandina da série F ₂
PGG₂	Endoperóxido hidroperóxido cíclico
PGH₂	Endoperóxido cíclico alcoólico

PGs	Prostaglandinas
RL	Radicais livres
RNA	ácido ribonucleico
S	Segundos
S.C.	Subcutânea
SH	Tióis
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido-dismutase
SULT	Sulfotransferases
TXA₂	Tromboxano A ₂
UDPGA	Enzimas uridina difosfato do ácido glicurônico
UGT	Urodino glicuroniltransferase
V.O.	Via oral
V/V	Volume/volume
VR1	Receptor vanilóide subtipo 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Paracetamol.....	21
1.1.1	Aspectos gerais.....	21
1.1.2	Farmacocinética do paracetamol.....	23
1.1.3	Farmacodinâmica do paracetamol.....	25
1.1.4	Toxicidade do paracetamol.....	27
1.2	Ortobenzamol.....	36
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Geral.....	39
2.2	Específicos.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1	Estudo <i>in vitro</i> : toxicidade do ortobenzamol e do paracetamol em culturas primárias de neurônios corticais.....	40
3.1.1	Análise da Viabilidade Celular.....	40
3.1.2	Determinação dos níveis de Glutathione Reduzida.....	41
3.1.3	Determinação dos níveis de glutathione total.....	42
3.1.4	Desafio com peróxido de hidrogênio.....	42
3.2	Estudo <i>in vivo</i> : toxicidade do ortobenzamol e do paracetamol em camundongos tratados por via oral.....	43
3.2.1	Animais.....	43
3.2.2	Determinação da dose efetiva mediana do paracetamol.....	43
3.2.3	Tratamentos <i>in vivo</i> para análise do estresse oxidativo e dos parâmetros clínicos.....	44
3.2.4	Determinação do estresse oxidativo hepático e cerebral.....	44
3.2.5	Determinação de proteínas.....	45
3.2.6	Determinação dos parâmetros laboratoriais de rotina.....	46
3.2.7	Determinação bioquímica de alteração hepática e renal.....	46
3.2.8	Determinação dos níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT).....	47
3.2.9	Determinação dos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST).....	47
3.2.10	Determinação dos níveis plasmáticos de Gama GLutamyl Transferase (GGT) ...	48
3.2.11	Determinação dos níveis plasmáticos de Creatinina.....	48
3.2.12	Parâmetros hematológicos: eritrograma, leucograma e plaquetograma.....	48
3.2.13	Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i>	49
3.3	Análise estatística.....	49
4	RESULTADOS.....	50

4.1	Estudo <i>in vitro</i> : toxicidade do ortobenzamol e do paracetamol em culturas primárias de neurônios corticais	50
4.1.1	Viabilidade Celular.....	50
4.1.2	Níveis de glutathiona reduzida e total	53
4.1.3	Capacidade neuroprotetora frente ao estresse oxidativo: Desafio com Peróxido de Hidrogênio	53
4.2	Estudo <i>in vivo</i> : toxicidade do ortobenzamol e do paracetamol em camundongos tratados por via oral.	55
4.2.1	Dose efetiva mediana (DE ₅₀) do paracetamol	55
4.2.2	Estresse oxidativo cerebral e hepático.....	56
4.2.3	Alterações sorológicas.....	58
4.2.4	Toxicidade aguda.....	68
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE.....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Paracetamol

1.1.1 ASPECTOS GERAIS

O paracetamol, também chamado de acetaminofeno ou *N*-acetil-*p*-aminofenol, é um analgésico e antitérmico amplamente utilizado para o tratamento da dor e febre (DUGGAN e SCOTT, 2009). Seu potencial analgésico e antitérmico assemelha-se ao dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como a aspirina. No entanto, difere destes por apresentar fraca ação anti-inflamatória, antiagregante plaquetária e gastrotóxica (MOORE e MARSHALL, 2003; KIS et al, 2005).

A acetanilida, antipirético precursor do paracetamol e da fenacetina foi descoberta por Cahn e Hepp em 1880 e, introduzida na medicina em 1886 com o nome de Antifebrina. Entretanto, a acetanilida demonstrou ser excessivamente tóxica e apresentou efeitos como metemoglobinemia e hemólise, que impulsionaram a busca por derivados menos tóxicos (BERTOLINI et al, 2006; BRUNE et al, 2009).

Na busca por compostos menos tóxicos o para-aminofenol foi avaliado na hipótese de que o organismo oxidava a acetanilida a este composto. Todavia, não houve redução na toxicidade sendo testados então, diversos derivados químicos do para-aminofenol (BESSENS e VERMEULEN, 2001).

A fenacetina resultou no derivado mais satisfatório. Foi introduzida para fins terapêuticos em 1887 sendo extensamente empregada em misturas analgésicas, até ser associada com a nefropatia causada por analgésicos. No início de 1870 a fenacetina foi retirada do mercado devido ao aumento de nefropatia renal associada ao uso desse fármaco. Entretanto, o problema não era a sua toxicidade, por si própria, e sim a frequência e a utilização de doses elevadas que continuavam mesmo após a hospitalização por doença renal (ABBOTT e FRASER, 1998).

A razão mais comum para o uso da fenacetina era dor de cabeça, no entanto alguns pacientes justificavam seu uso devido aos seus efeitos psicotrópicos (ABBOTT e HELLEMANS, 2000). Ao investigar as propriedades cinéticas da fenacetina em seres humanos, Prescott et al, (1970) observaram que seus efeitos estavam associados com uma sensação de irrealidade classificada como "agradável" logo após a administração das preparações que eram rapidamente absorvidas. Assim não houve dúvida de que a fenacetina

possuía efeitos psicotrópicos e que esses efeitos podiam apoiar a sua auto-administração (ABBOTT e HELLEMANS, 2000). Posteriormente, a fenacetina foi substituída nos Estados Unidos pelo seu metabolito ativo, o paracetamol.

O paracetamol foi sintetizado pela primeira vez em 1878 por Morse e foi usado clinicamente em 1887 por Von Mering (BOSCH et al, 2009).

Brodie e Axelrod (1949) demonstraram que o maior metabólito responsável pela ação analgésica e antipirética da acetanilida e da fenacetina era o paracetamol, enquanto que a metemoglobinemia era produzido por outro metabólito, o fenilhidroxilamina (BERTOLINI et al, 2006).

Em 1955 o paracetamol foi introduzido no mercado pela primeira vez com o nome comercial de Tylenol, pelo laboratório McNeil nos Estados Unidos, e em 1956 no Reino Unido, como Panadol pelo laboratório Glaxo-SmithKline (LEE, 2008). O paracetamol é o único “analgésico anilínico” que permanece em uso (BRUNE et al, 2009).

O paracetamol ganhou ampla popularidade atribuída ao fato de ser bem tolerado, não apresentar muitos dos efeitos colaterais dos salicilatos (como os sangramentos digestivos, por exemplo) e a possibilidade de aquisição sem prescrição médica (BERTOLINI et al, 2006; BRUNE et al, 2009).

Desta forma, a toxicidade do paracetamol exige uma atenção especial, pois este é um dos medicamentos de venda livre mais utilizado em todo o mundo, como analgésico e antipirético. Clinicamente, é considerado como primeira escolha para o tratamento da dor leve e moderada (PREESCOTT, 2000a).

Além da possibilidade de aquisição sem prescrição médica, o amplo consumo de paracetamol se deve às suas propriedades analgésica e antitérmica serem semelhantes a dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), razão pela qual frequentemente é classificado neste grupo. Porém, apresenta uma importante vantagem sobre estes fármacos, pois muitos efeitos adversos observados nos AINEs não são relevantes com o uso do paracetamol (DUGGAN e SCOTT, 2009). Este fármaco apresenta fraca ação anti-inflamatória e anti agregante plaquetária e não produz dano à mucosa gastrintestinal (PRESCOTT, 2000a; STEINER e VOELKER, 2009).

Na década de 1980, o paracetamol chegou a vender mais do que a aspirina nos Estados Unidos (BERTOLINI et al, 2006; BRUNE et al, 2009). Dentre os motivos para esses dados, a associação da aspirina com a Síndrome de Reye relatada em crianças entre os anos de 1982 e 1987, levou os americanos a adotarem o paracetamol como uma alternativa segura para esta faixa etária, aumentando consideravelmente seu consumo (LEE, 2004).

O paracetamol ($C_8H_9O_2$, peso molecular de 151,16 g/mol) é um pó branco, cristalino e inodoro. A solubilidade de 1g da substância em 70 mL de água e 50 mL de clorofórmio a 25°C, caracteriza-o como uma molécula de média polaridade. Seu pKa de 9,51 é estável entre pH 4 e 7 a 25°C, demonstrando sua natureza fracamente ácida (THE MERCK INDEX, 1996).

Este fármaco é indicado para o tratamento de febre e para o alívio de dores de intensidade leve a moderada, tais como cefaléia, mialgias, dismenorréia e dor dental (MEOTTI et al, 2006). Para produzir analgesia leve, o paracetamol é o fármaco preferido quando os pacientes são hipersensíveis ao ácido acetilsalicílico ou toleram mal os salicilatos (STEINER e VOELKER, 2009).

Seu emprego também é preferível ao ácido acetilsalicílico em pacientes com distúrbios de coagulação sangüínea ou com história de úlcera péptica. Pode ser utilizado durante todos os estágios da gravidez, quando em doses terapêuticas, e sua categoria de risco para a gestação é a B. Possui contra-indicações nos casos de pacientes com hipersensibilidade ao paracetamol e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (STEINER e VOELKER, 2009). Além disso, poucas interações medicamentosas clinicamente importante têm sido descritas com o paracetamol (RUMACK, 2002; TOES et al, 2005).

A dose oral em pacientes adultos para o tratamento da dor e febre é de 650-1000mg a cada 4 horas, conforme necessário, até uma dose máxima diária recomendada de 4 g. A dose pediátrica oral é 10-15 mg/ kg a cada 4-6 h, até um máximo de 5 doses por dia. Recomenda-se aumentar a dose para o intervalo de 6 horas em pacientes com insuficiência renal moderada e, a cada 8 horas em pacientes com insuficiência renal grave (BERTOLINI et al, 2006).

1.1.2 FARMACOCINÉTICA DO PARACETAMOL

A absorção do paracetamol após sua administração oral depende do tempo de esvaziamento gástrico, sendo absorvido no intestino delgado de forma rápida e praticamente total. Quando administrado com alimentos, a taxa de absorção do paracetamol diminui como resultado da alteração da motilidade gastrintestinal. Para alívio rápido da dor deve-se evitar a ingestão de alimentos, principalmente aqueles ricos em carboidratos (WARD e ALEXANDER-WILLIAMS, 1999; STILLINGS et al, 2000).

Renner et al, (2007) descrevem que a cafeína acelera a absorção do paracetamol e, o uso de medicamentos procinéticos (tais como metoclopramida) aceleram o esvaziamento gástrico, conseqüentemente aumentando a taxa de absorção do paracetamol (NIMMO et al, 1973).

A concentração plasmática atinge o pico em cerca de 30 a 60 minutos e a meia vida é de cerca de 2 horas após a ingestão de doses terapêuticas em adultos e, de 2 a 5 horas em neonatos. Tais valores são prolongados nas doses excessivas, havendo uma correlação direta com a dose ingerida (GRAHAM et al, 1999).

Após a absorção intestinal, o paracetamol é transportado pelo sangue, com ligação variável às proteínas plasmáticas, atingindo valores menores (20-50%) nas intoxicações agudas. É distribuído nos mais variados líquidos corporais, de forma relativamente uniforme (PRESCOTT, 2000a; WARD e ALEXANDER-WILLIAMS, 1999).

A biodisponibilidade oral do paracetamol é estimada entre 63-89% em adultos (RAWLINS et al, 1977). O início da sua atividade analgésica em indivíduos em jejum, após a administração oral, é de aproximadamente 30 minutos e a duração do efeito analgésico é de cerca de 4 horas (BERTOLINI et al, 2006).

Ele não é ionizado em pH fisiológico e apresenta a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, bem como a barreira placentária, onde é metabolizado pelos hepatócitos fetais (BESSEMS e VERMEULEN, 2001; FLOUVAT et al, 2004).

O metabolismo do paracetamol ocorre principalmente no fígado, enquanto que a eliminação ocorre quase que inteiramente através do rim. Após a absorção, aproximadamente 90% do fármaco é metabolizado no fígado para formar metabólitos não-tóxicos, que serão excretados na urina. Os metabólitos urinários do paracetamol são formados das reações de glicuronidação e sulfatação, constituindo-se nas principais vias de biotransformação (PRESCOTT, 2000a).

Em indivíduos adultos, 60 a 90% do fármaco são conjugados, formando glicuronatos ou sulfatos inativos e atóxicos, excretados pelos rins. Em prematuros, recém-nascidos e lactentes jovens, a maior porcentagem do paracetamol é conjugada com o sulfato (PRESCOTT, 2000a; BERTOLINI et al, 2006). A formação destes conjugados é mediada pelas enzimas uridina difosfato do ácido glicurônico (UDPGA) e fosfoadenosil-fosfosulfato (PAPS) (GODEJOHANNA et al, 2004; JENSEN et al, 2004).

A uridino glicuroniltransferase (UGT) é uma superfamília que reconhece uma série de grupos funcionais e utiliza um substrato em comum, o ácido uridínico 5-difosfato-glicurônico (UDP-glicurônico), em suas reações de conjugação. É dividida em duas famílias (UGT1 e UGT2) e três sub-famílias (UGT1A, UGT2A, UGT2B), estas possuem uma série de proteínas ativas. As formas UGT2B15, UGT1A1, UGT1A6 e UGT1A9 estão envolvidas na metabolização do paracetamol (BOCK et al, 1993; MUTLIB et al, 2006).

A reação de glicuronidação por elas exercida transfere ácido glicurônico do 5 ácido UDP-glicurônico para o paracetamol, este conjugado com o ácido glicurônico, é um composto que pode então ser excretado (BESSEMS e VERMEULEN, 2001).

A reação de sulfatação ocorre através das sulfotransferases (SULT), que são enzimas que catalisam a conjugação do sulfato com substâncias endógenas e exógenas. Os seres humanos possuem 11 diferentes SULTs, dentre elas, a SULT 1A1 que, preferencialmente, catalisa a sulfatação de pequenos fenóis planos, como o paracetamol. Após a conjugação com o sulfato, o paracetamol é excretado (BESSEMS e VERMEULEN, 2001).

Apenas 1 a 4% da droga são excretados de forma inalterada na urina. O restante (5 a 10%) sofre oxidação por enzimas da via do citocromo P-450 (CYP P-450). O sistema microsomal hepático P450 é composto por uma série de monoxigenases que oxidam compostos endógenos e exógenos (BESSEMS e VERMEULEN, 2001; HAZAI et al, 2002).

Através da eliminação renal, 90 a 100% do fármaco ingerido em doses terapêuticas são encontrados na urina como conjugado, após 24 horas da administração oral (WARD e ALEXANDER-WILLIAMS, 1999; BESSEMS e VERMEULEN, 2001).

1.1.3 FARMACODINÂMICA DO PARACETAMOL

Embora a síntese e o uso do paracetamol tenham mais de 120 anos, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido (BOTTING, 2003; BOTTING e AYOUB, 2005; CORLEY e RAWLS, 2009). Desde então, várias teorias têm sido descritas para explicar o efeito analgésico e antipirético deste fármaco.

A principal hipótese (e até o momento, a mais estudada) é a inibição da síntese de prostaglandinas (PGs) (BRIAN, 2008). O paracetamol possui atividades antipiréticas e analgésicas semelhante às dos AINEs. Esta classe de fármacos atua através da inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que conseqüentemente inibe a formação de PGs. Entretanto, o paracetamol é considerado um AINE atípico devido a sua fraca ação anti-inflamatória. Supõe-se que embora haja algum efeito sobre a enzima COX, este efeito é diferente do observado com os AINEs (GRAHAM e SCOTT, 2005). Assim, muitos estudos têm sido realizados sobre a ação do paracetamol na inibição desta enzima (BOTTING, 2003).

O paracetamol atua na COX, levando-a a uma forma oxidada cataliticamente inativa. A atividade inibitória do paracetamol sobre a COX pode estar relacionada a sua capacidade de reagir com o radical tirosil presente na PGs (KULMACZ et al, 1991). Ainda, outro local de ação do paracetamol 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).

Desta forma, o paracetamol inibe o sistema enzimático da ciclooxigenase que converte ácido araquidônico em PGs, tromboxano (TXA₂) e prostaciclina (PGI). As PGs, especialmente a PGE₂, sensibilizam o nociceptor periférico às ações de histamina e bradicinina. A primeira promove reação inflamatória local e a última estimula terminações nervosas, levando à nocicepção. Sendo assim, o paracetamol evita a sensibilização dos receptores de dor (ARONOFF et al, 2006).

Contudo, tal atuação do paracetamol sobre a COX é inibida na presença de grandes concentrações de peróxidos, como no caso dos locais onde ocorre a inflamação. Como o sistema nervoso central apresenta baixas concentrações de peróxidos, estariam justificados os seus efeitos analgésicos e antipiréticos através de uma ação direta no sistema nervoso central, assim como seu fraco efeito anti-inflamatório estaria explicado, pois os peróxidos estão elevados no local da inflamação (GRAHAM, 2005; KIS et al, 2005; MUNSTERHJELM et al, 2005).

Essa limitada inibição da ciclooxigenases, especialmente nas regiões periféricas, levou diversos autores a propor um mecanismo de ação central para o paracetamol (CARLSSON et al, 1988; PILETTA et al, 1991; BANNWARTH et al, 1995).

Inúmeros sistemas neurotransmissores podem estar envolvidos na atividade analgésica central do paracetamol. Desta forma, os mecanismos propostos para explicar a ação analgésica do paracetamol incluem: ação mediada pelo sistema serotoninérgico (TJOLSEN et al, 1991a; BONNEFONT et al, 2003), modulação dos receptores de opióides (PINI et al, 1997; RAFFA et al, 2000; 2004) e interação com receptores canabinóides subtipo 1 (CB1) (BERTOLINI et al, 2006).

Segundo Pini et al, (1996), as vias serotoninérgicas (5-HT) parecem desempenhar um papel importante no mecanismo de ação central dessa droga e a depleção dos níveis de serotonina no cérebro reduzem o efeito analgésico do paracetamol (TJOLSEN et al, 1991a; BONNEFONT et al, 2003). A serotonina exerce seu efeito antinociceptivo central em áreas cerebrais definidas através de seus subtipos de receptor, nomeadamente 5-HT1A (EIDE e HOLE, 1991), 5-HT2 (ALHAIDER, 1991) e 5-HT3 em nível espinhal (PELLISSIER et al, 1995).

Estudos em animais alegam que os receptores 5-HT3 podem estar envolvidos no efeito antinociceptivo do paracetamol (PICKERING et al, 2006; 2008). Este interfere na via serotoninérgica descendente da dor, pois antagonistas seletivos para 5-HT3 bloquearam o

efeito analgésico do paracetamol em voluntários (SANDRINI et al, 2003). Ainda, o paracetamol é capaz de produzir aumento significativo na concentração de serotonina (5-HT) no cérebro e redução no número de receptores 5-HT₂ em membranas corticais (PINI et al, 1997).

Quanto ao papel dos receptores opióides, o pré-tratamento com naloxona (antagonista opióide) aboliu a atividade antinociceptiva do paracetamol, tanto no teste da placa quente como na primeira fase do teste da formalina, sem afetar a concentração sérica do paracetamol (PINI et al, 1997).

Ottani et al, (2006) investigaram o envolvimento do sistema endocanabinóide no efeito antinociceptivo do paracetamol. Usando o teste da placa quente em ratos, esses autores mostraram que a atividade antinociceptiva do paracetamol foi inibida por antagonistas dos receptores canabinóides CB1.

Outra via de atuação proposta para o paracetamol seria sobre os receptores espinhais *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Esse efeito envolve uma ação inibitória nos mecanismos de liberação do óxido nítrico. Esta possibilidade se deve aos achados que a administração central do N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (*L*-NAME), inibidor da enzima óxido nítrico sintase, também potencializou o efeito antinociceptivo do paracetamol sugerindo que a inibição da síntese de óxido nítrico pode estar envolvida tanto na ação central como periférica do paracetamol (GODFREY et al, 2007).

1.1.4 TOXICIDADE DO PARACETAMOL

O estresse oxidativo possui um papel central na toxicidade do paracetamol (JONES, 1998; BESSEMS e VERMEULEN, 2001; MARSCHALL et al, 2007; KANBUR et al, 2009).

O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (pro-oxidantes) e a capacidade do sistema de defesa antioxidantes do organismo em neutralizá-la (SIES, 1997).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas constantemente nos sistemas vivos pela metabolização do oxigênio consumido, para produzir radicais livres derivados do oxigênio (EROS) que, em concentrações normais no organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (CHEESEMAN e SLATER, 1996).

A quantidade de EROS produzido é considerado ser de cerca de 2% do total de oxigênio consumido durante a respiração (FLOYD, 1999). Um excesso na produção de ROS

apresenta efeitos prejudiciais e resulta no dano celular de macromoléculas vitais, como lipídios, proteínas e os ácidos nucleicos (BILINSKI et al, 1989; CABISCOL et al, 2000; YAKES e VAN HOUTEN, 1997). Assim, passam a ser relacionados com uma variedade de doenças, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento precoce (ESTERBAUER et al, 1992; CHIRICO et al, 1993; MORIEL et al, 1999; CHISOLM e STEINBERG, 2000).

Os radicais livres são espécies químicas, possuindo elétron desemparelhado por isso muito reativa e, com meia-vida curta. No sistema biológico, muitas destas espécies são radicais de oxigênio ou de nitrogênio, denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) a exemplo dos radicais hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}\bullet$), ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), com destaque para o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) (CHEESEMAN e SLATER, 1996).

Entretanto, embora não sejam radicais livres, o oxigênio (O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl), o óxido nitroso (N_2O_3), o ácido nitroso (HNO_2), os nitritos (NO_2^-), os nitratos (NO_3^-) e os peroxinitritos (ONOO^-) podem induzir reações radicalares no organismo sendo por isso, também considerados por alguns autores como espécies reativas (CHEESEMAN e SLATER, 1996; COFFEY et al, 2001).

A principal produção *in vivo* de ERO é através da respiração aeróbica, entretanto também podem ser produzidas através da oxidação de ácidos graxos, estimulação da fagocitose por patógenos ou lipopolisacarídeos, pelo metabolismo da arginina e pelo metabolismo de xenobióticos via citocromo P-450 (CHEESEMAN e SLATER, 1996).

Por sua vez, o radical óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) pode ser produzido por diversas células no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase (constitutiva ou induzida) a partir de arginina, oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), gerando também nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado (NADP^+) e citrulina (COFFEY et al, 2001).

O óxido nítrico tem um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. Está relacionado com a modulação do tônus vascular e, é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas. Constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune (COFFEY et al, 2001).

No entanto, o óxido nítrico é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. Embora considerado pouco reativo, é capaz de gerar moléculas de maior reatividade, que também atuam no mecanismo de defesa e, quando

liberados no meio extracelular, podem causar lesões oxidativas aos tecidos dos hospedeiros (COFFEY et al, 2001).

Quando há um desequilíbrio na produção de EROS, estas espécies reagem com o óxido nítrico produzindo composto instável, capaz de formar espécies ainda mais danosas às células (KAMINSKI et al, 2001). Como exemplo, o óxido nítrico ao reagir com o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzido pelos fagócitos, gera peroxinitrito ($ONOO^-$). Este por sua vez, pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos, a exemplo da tirosina gerando nitrotirosina e as bases do DNA, em particular a guanina, na qual o produto principal é a 8-nitroguanina (HALLIWELL et al, 2000)

A célula possui um sistema antioxidante para equilibrar a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio durante o metabolismo aeróbio. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Eles podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (como o α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, e compostos fenólicos como os flavonóides e poliflavonóides) (FINKEL e HOLBROOK, 2000).

Os antioxidantes endógenos podem agir enzimaticamente no combate às EROS, a exemplo da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) ou, não-enzimaticamente, a exemplo da melatonina e glutaciona (GSH) (SAVASKAN et al, 2007).

A glutaciona (GSH) é considerada o maior agente antioxidante nas células, em virtude do seu papel central na defesa contra o estresse oxidativo, biotransformação e eliminação de xenobióticos (PASTORE et al, 2003; DICKINSON e FORMAN, 2002)

A porção tiol (SH) da GSH, é altamente polarizável e a torna um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. A habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutaciona um bom redutor (PASTORE et al, 2003; DICKINSON e FORMAN, 2002).

A GSH é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular, sendo encontrada em concentrações milimolares (mM) na maioria das células. Em eritrócitos humanos, a sua concentração é de aproximadamente 2mM e, de mais de 10 mM nos hepatócitos (PASTORE et al, 2003; DICKINSON e FORMAN, 2002)

No mecanismo de defesa antioxidante, a enzima glutaciona peroxidase (GPx) utiliza a GSH como substrato e, catalisa a redução do H_2O_2 para produzir glutaciona oxidada (GSSG) e H_2O . A redução de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), é realizada da mesma forma, gerando

álcool (LOH) e GSSG. Posteriormente, a GSSH é reduzida pela ação da enzima glutationala redutase, que utiliza o NADPH como substrato (SAVASKAN et al, 2007).

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. O excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Logo, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH (SHAN e JONES, 1990; GILBERT e LEAN, 1990; HALLIWEL, 1993).

Além disso, a GSH participa na detoxificação de xenobióticos através da sua conjugação com agentes eletrofílicos, em uma reação catalisada pela enzima glutationala S-transferase (GST). A principal via de excreção destes conjugados é após sua conversão a ácidos mercaptúricos. Entretanto, a excessiva formação de conjugados pode resultar em depleção da glutationala e no estresse oxidativo (SHAN e JONES, 1990; GILBERT e LEAN, 1990; HALLIWEL, 1993).

O estresse oxidativo pode resultar na destruição oxidativa das membranas celulares e em lesões teciduais. A severidade deste processo pode levar à morte celular. Na maioria das vezes, esta relação se dá pela propriedade que os radicais livres têm de reagir com os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (AGPI), ocasionando a peroxidação lipídica (LPO) (BENZIE, 1996).

A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação oxidativa dos RL sobre os AGPI das membranas celulares e pode ser dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação (Figura 1). As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são iniciadores do processo de peroxidação lipídica (BENZIE, 1996).

Assim, a LPO se inicia com o ataque da espécie reativa (ER^{\bullet}) sobre o ácido graxo poliinsaturado, gerando a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno e, formando um radical de carbono (L^{\bullet}). Em meio aeróbio, este composto se combina com o oxigênio (O_2) formando o radical peroxila (LOO^{\bullet}), o qual pode abstrair um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando outro radical (L^{\bullet}), promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio forma o hidroperóxido lipídico (LOOH) (PORTER *et al.*, 1995).

A última fase ocorre, quando os radicais livres são extintos por reação com a glutationala, dismutação ou clivagem, formando ligações covalentes com resíduos de

aminoácidos ou rearranjos, gerando grupos epóxidos (LOR), aldeídos (LCHO) como o malonaldeído e 4-hidroxinonenal, cetonas (LCOR) e álcool (LOH) (PORTER *et al.*, 1995).

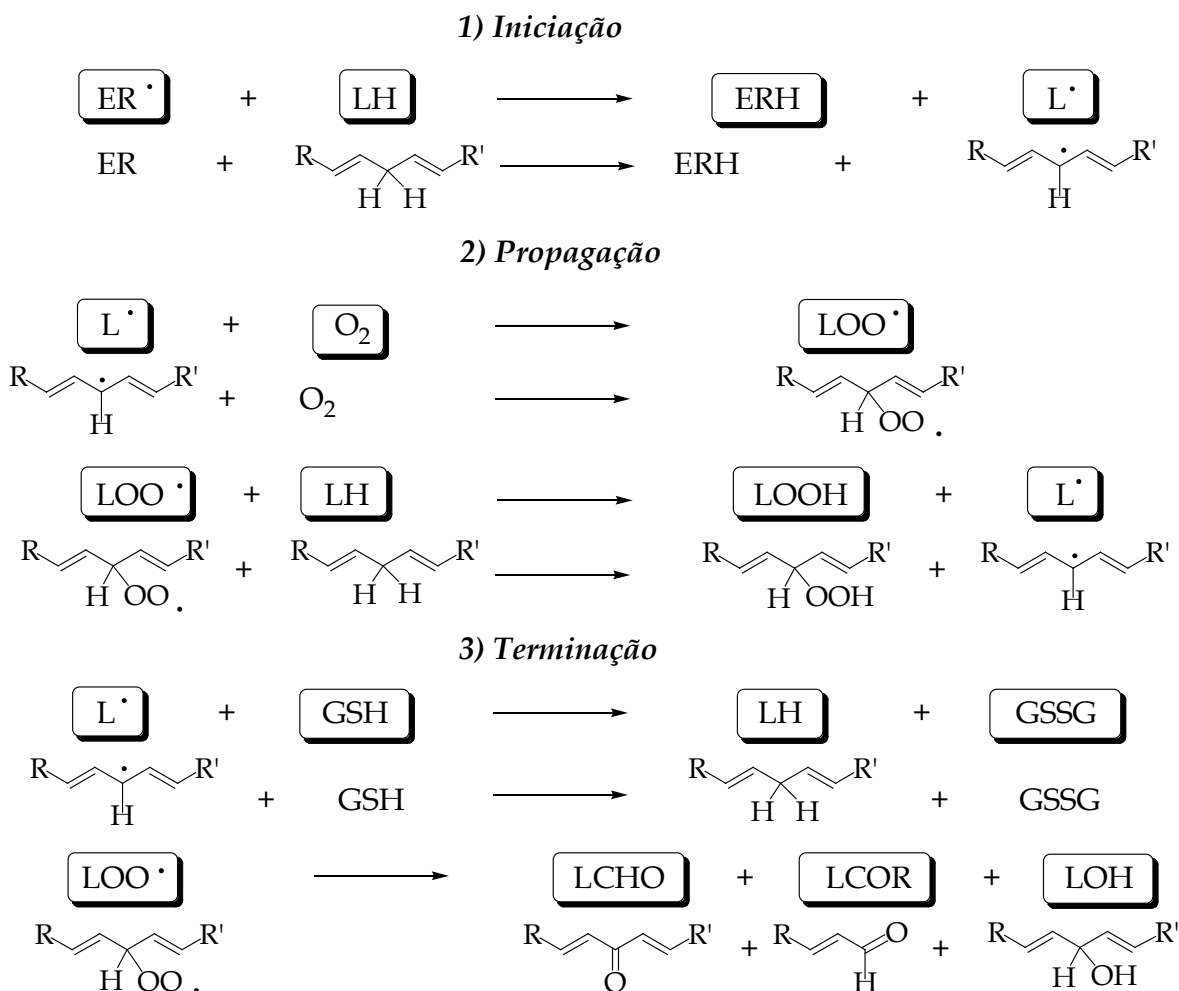


Figura 1: Reações de peroxidação lipídica com espécies reativas.
Fonte: Porter et al, 1995 (Com adaptações).

Em resumo, o processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo polinsaturado e propagada por radicais peróxilas. A terminação pode resultar na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos. Estes podem ser detectados em amostras biológicas e a sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em células e tecidos (ESTERBAUER et al, 1984; ESTERBAUER et al, 1992).

A LPO é um efeito citotóxico que pode desencadear uma seqüência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou

saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (VACA et al, 1988; BABER e HARRIS, 1994).

Por razões bioquímicas, fisiológicas e anatômicas, o cérebro é particularmente suscetível ao estresse oxidativo. Este órgão possui alta taxa de atividade metabólica oxidativa; altas quantidades de substrato prontamente oxidável (em particular os lipídios dos ácidos graxos poliinsaturados de membrana) e baixo nível das enzimas antioxidantes catalase e glutathione (CHEESEMAN. e SLATER, 1996).

Além disso, o cérebro utiliza 20% do oxigênio inspirado (gerando maior produção de radicais livres por massa tissular) e a atividade da catalase é 10% inferior quando comparada àquela do fígado (FLOYD,1999). Somadas, todas estas características o tornam mais vulnerável ao ataque oxidativo.

O paracetamol é capaz de aumentar a produção das EROS, através do seu metabolismo pelo citocromo P450 e, o estresse oxidativo, possui importante papel na indução da sua toxicidade (GHOSH et al, 2010).

Foi demonstrado que elevadas doses de paracetamol provocam efeitos tóxicos no sistema nervoso central associados ao estresse oxidativo, com diminuição de antioxidantes endógenos (MICHELI et al, 1990; NENCINI et al, 2007).

Estudo prévio de neurotoxicidade em ratos tratados oralmente com dose única (3g/Kg) de paracetamol, revelou diminuição significativamente dos níveis de glutathione (31%), do ácido ascórbico (37%) e da superóxido dismutase (32%), acompanhados da elevação dos níveis de malonaldeído (110%) e da GSSG (138%), após seis horas do tratamento (NENCINI et al, 2007).

In vitro também foi demonstrado efeito neurotóxico do paracetamol. Em culturas de neurônios corticais de ratos expostas a concentrações crescentes de paracetamol, foi observada a morte dos neurônios de forma concentração dependente (a partir de 1mM), com diminuição dos níveis de GSH (POSADAS et al, 2010). Desta forma, estes achados apontam para o dano oxidativo no cérebro, provocado por dose tóxica de paracetamol.

Entretanto, o efeito tóxico mais conhecido do paracetamol é a hepatotoxicidade. Doses tóxicas (acima de 4g/dia) podem causar dano hepático e renal com eventual morte por insuficiência hepática fulminante (MOORE e MARSHALL, 2003). A hepatotoxicidade ocasionada por paracetamol é considerada a principal causa de falência hepática fulminante no mundo ocidental (LEE, 2008).

Nos Estados Unidos, a dose excessiva de paracetamol é a principal causa das chamadas para os centros de controle de envenenamento (> 100000 casos /ano) e responde

por mais de 56.000 atendimentos de emergência, 2.600 internações hospitalares e uma estimativa de 500 mortes por insuficiência hepática aguda em cada ano (LEE, 2004; LEE, 2008).

No Brasil ainda não existem dados estatísticos concretos relacionados aos efeitos tóxicos do paracetamol, entretanto, uma análise de Julho de 2007 do grupo de estudos sobre insuficiência hepática aguda dos Estados Unidos, com 1033 pacientes adultos, demonstrou que a intoxicação por paracetamol representa 46% dos casos de insuficiência hepática aguda, seguido de causas indeterminadas (15%) e idiossincrásicas adversas a medicamentos (12%) (FONTANA, 2008; LEE, 2008).

O mecanismo de toxicidade hepática se deve a biotransformação do paracetamol em metabólitos altamente reativos, capazes de lesar principalmente as células hepáticas (OSCIER, 2009).

Durante a metabolização hepática, a maior parte do paracetamol sofre conjugação com ácido glucurônico e sulfato, para posterior excreção não tóxica por via renal. A formação destes conjugados é mediada pelas enzimas uridina difosfato do ácido glicurônico (UDPGA) e fosfoadenosil-fosfosulfato (PAPS) (GODEJOHANNA et al, 2004; JENSEN et al, 2004).

Entretanto, menor quantidade é metabolizada pelo citocromo P450. Nesse caso, esta pequena porção produz um composto altamente reativo chamado *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI) (OSCIER e MILNER, 2009). As enzimas do citocromo P450 são as mais importantes biotransformadoras de fármacos no fígado, especificamente a CYP2E1 e CYP2A6, demonstrando ser as enzimas mais eficientes na bioativação de NAPQI (BESSEMS e VERMEULEN, 2001; HAZAI et al, 2002).

A formação de NAPQI ocorre por reação do ferro-hidroxil, um dos estados reativos do citocromo P450 (Cit P450), através de três formas (Figura 2): 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 NAPQI (KOYMANS et al, 1989; MYERS, et al, 1994).

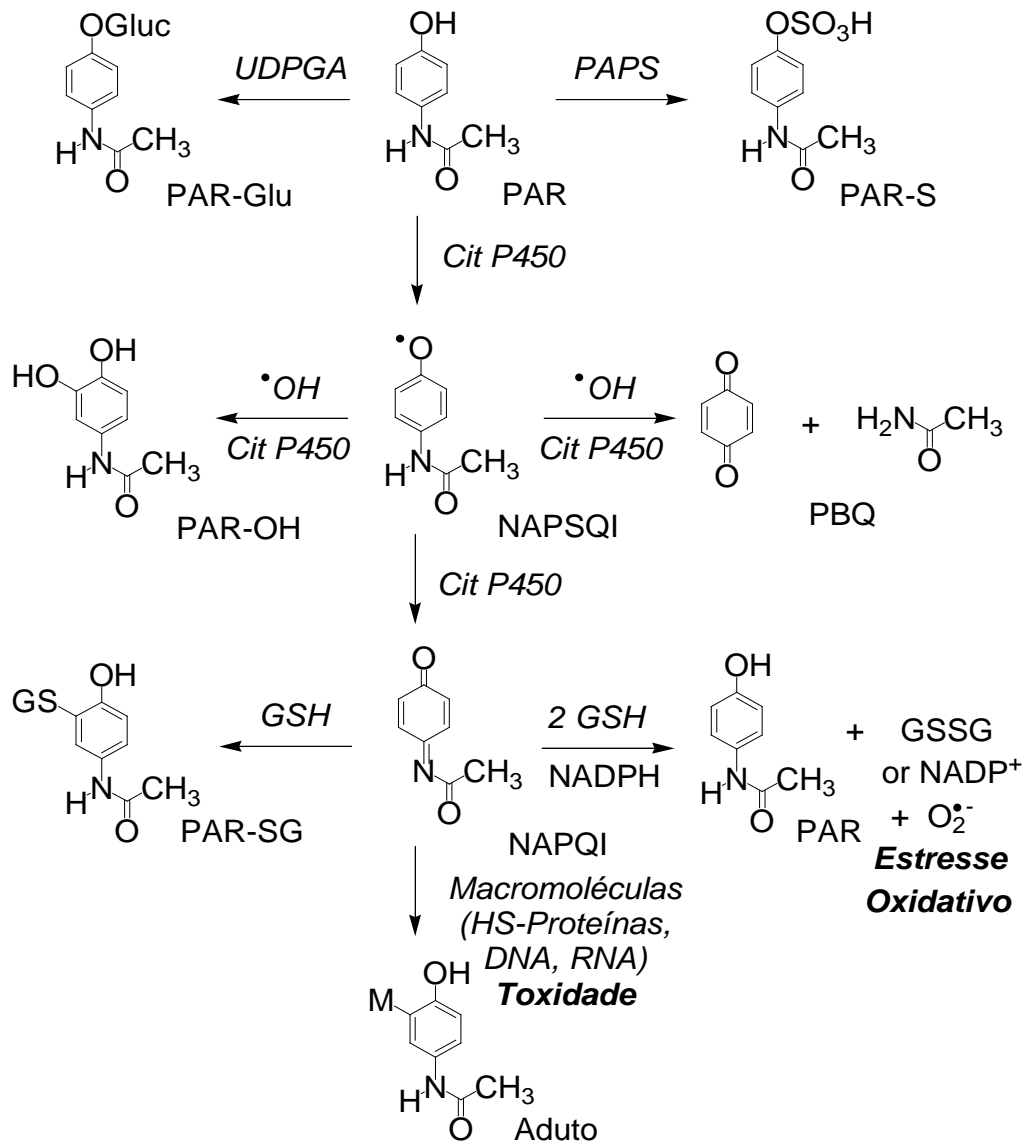


Figura 2: Principais vias de biotransformação do paracetamol.

Paracetamol (PAR); uridina difosfato do ácido glicurônico (UDPGA); fosfoadenosil-fosfosulfato (PAPS); citocromo P450 (Cit P450); *N*-acetil-*p*-benzosemiquinona imina (NAPSQI); 3-hidroxi-paracetamol (HO-PAR); *p*-benzoquinona (PBQ); *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI); 3-glutationa-*S*-il-paracetamol (PAR-SG).

Fonte: Adaptado de Thomas (1993).

Os principais metabólitos tóxicos do paracetamol oriundo da bioativação do citocromo 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; HINSON, 1990; BESSEMS et al,1998; HANNEMANN et al,2007). No entanto, é consenso que a NAPQI é o principal reagente metabólico eletrofílico formado pela biotransformação oxidativa do paracetamol tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Baixas quantidades de NAPQI são formadas com o uso terapêutico de PAR. Na presença de glutathiona reduzida (GSH), a NAPQI pode ser reduzida ao PAR ou ligar-se covalentemente com GSH, reação catalisada pela enzima glutathiona S-transferase (GST), gerando conjugados 3-glutathiona-S-il-paracetamol (PAR-SG) sem efeito adverso significativo (VAN DE STRAAT *et al.*, 1986).

Em doses elevadas (tóxicas) há maior porcentagem do fármaco a ser metabolizada por essa via, depletando os estoques hepáticos de glutathiona reduzida (GSH). 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.

O mecanismo intracelular de lesão dos hepatócitos ocorre por ligações covalentes da NAPQI com proteínas celulares fundamentais, especialmente na mitocôndria (JAMES *et al.*, 2003; JAESCHKE & BAJT, 2006). Esse mecanismo leva a disfunção mitocondrial com formação de reativos intermediários do oxigênio e peroxinitritos dentro da mitocôndria, depleção do ATP e alteração na permeabilidade da membrana (KON *et al.*, 2004).

Ainda, com a depleção de glutathiona, a função da enzima glutathiona-S- peroxidase passa a ter sua atividade diminuída, resultando no acúmulo de peróxidos nos hepatócitos (JONES, 1998; BESSEMS e VERMEULEN, 2001; MARSCHALL *et al.*, 2007; KANBUR *et al.*, 2009).

Logo, o paracetamol pode causar hepatotoxicidade dose-dependente causando grave lesão hepatocelular aguda (PRESCOTT, 2000a; JAMES *et al.*, 2003; LEE, 2004; OSCIER e MILNER, 2009).

No homem, os efeitos hematológicos mais danosos foram encontrados, principalmente nas plaquetas, após a ingestão de grande quantidade de PAR (FISCHEREDER & JAFFE, 1994). A hepatotoxicidade do paracetamol é também marcada pela presença de níveis séricos elevados de aminotransferases (até 400 vezes o limite superior do normal), concomitante com hipoprotrombinemia, acidose metabólica e insuficiência renal (BESSEMS e VERMEULEN, 2001).

1.2 Ortobenzamol

A toxicidade do paracetamol tem motivado o desenvolvimento e estudo de homólogos e análogos mais seguros e, muitos derivados foram desenvolvidos na tentativa de diminuir sua toxicidade e de manter suas propriedades terapêuticas (HARVISON et al, et al, 1986; VAN DE STRAAT et al, 1987; BARNARD et al, 1993; BESSEMS et al, 1995; DUFFY et al, 2001).

Embora estes esforços ainda não resultarem em novos compostos mais seguros, introduzidos no mercado farmacêutico, os estudos contribuíram para a obtenção de dados sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica do paracetamol (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).

Esses dados podem ser utilizados no planejamento de novos derivados a partir de um composto protótipo. Assim, partindo-se de um protótipo de estrutura química e ação biológica conhecida, o estudo de novas substâncias químicas com potencial atividade farmacológica, possibilita o descobrimento de novos candidatos à fármacos. Com esta estratégia é possível obter fármacos seletivos, de ação prolongada, de reduzida toxicidade, entre outros (BARREIRO et al, 2006).

Nesse sentido, para obter um fármaco com menor toxicidade e maior atividade analgésica e anti-inflamatória, foram realizadas mudanças na estrutura química do paracetamol através de um planejamento racional, utilizando a técnica de produção de regioisômeros ou isômeros posicionais (QUEIROZ et al, 2012), a partir de estudos prévios (BORGES, 2007).

O planejamento foi auxiliado pelo computador, usando métodos avançados de modelagem molecular de fármacos. Dentre os análogos estudados, o ortobenzamol (OBZ) obteve os melhores resultados teóricos com maior potencial para as atividades analgésica e anti-inflamatória, e ainda menor toxicidade teórica quando comparado ao paracetamol. Assim, o ortobenzamol foi sintetizado e avaliado experimentalmente em modelos de nocicepção e inflamação em animais (QUEIROZ et al, 2012).

Os ensaios foram realizados com a dose efetiva mediana (DE_{50}) de 22,5 mg/Kg, determinada por regressão linear sobre a porcentagem de inibição de contorções abdominais, induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos (QUEIROZ et al, 2012).

Os resultados da avaliação biológica da atividade antinociceptiva realizada em animais, mostraram que o ortobenzamol exerce uma atividade analgésica central na ordem de

5,65 – 35,5 vezes mais potente que o paracetamol, em condições experimentais semelhantes (QUEIROZ et al, 2012).

Ainda, nos testes de inflamação o ortobenzamol apresentou atividade anti-edematogênica, inibindo a formação de edema, induzido pela administração de óleo de cróton na orelha de camundongos, em 43,37% quando comparado ao grupo controle (QUEIROZ, 2010).

O componente ativo do óleo de croton é o 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA). Quando o TPA é aplicado na superfície da orelha do animal, ocorre uma reação aguda flogística edematosa, desencadeada pela produção de mediadores químicos pró-inflamatórios como metabólitos do ácido araquidônico (GRIFFITHS et al, 1988; GÁBOR, 2002; SUBRAMANIAN et al, 2008). Assim, é possível que o ortobenzamol atue inibindo a ciclooxigenase (COX) e/ou a fosfolipase A₂, o que indiretamente interfere com o processo de geração de prostaglandinas, gerado pelo metabolismo do ácido araquidônico quando aplicado o óleo de cróton (OTUKI et al, 2005).

O ortobenzamol também foi eficaz em inibir tanto o influxo de leucócitos totais, quanto o de neutrófilos para a cavidade peritoneal, 4 horas após a indução de peritonite em ratos pelo agente flogístico carragenina, confirmando assim sua interferência significativa na redução do processo inflamatório (QUEIROZ, 2010).

Logo, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o ortobenzamol apresenta potente atividade anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação induzidos por diferentes agentes flogísticos.

É importante ressaltar que, apesar de classificado como anti-inflamatório não esteroideal, tem sido descrito na literatura que o paracetamol não é indicado para esta finalidade devido sua fraca ação sobre a inflamação (AL-SWAYCH et al, 2000). O paracetamol é fraco inibidor da ciclooxigenase onde os níveis de peróxidos são elevados, como por exemplo, nos tecidos inflamados e não inibe a ativação de neutrófilos (HANEL e LANDS, 1982; MARSHALL et al, 1987; ABRAMSON e WEISSMANN, 1989; RAFFA et al, 2000).

Diferentemente, o ortobenzamol reduziu significativamente dois importantes componentes do processo inflamatório: a formação do edema induzido pelo óleo de cróton na orelha de camundongos e a migração de leucócitos induzida na cavidade peritoneal de ratos após estímulo pela carragenina (QUEIROZ, 2010).

Sabe-se que a oferta de medicamentos está intrinsecamente relacionada com a pesquisa e o desenvolvimento (BRASIL, 1998). Assim, considerando o excelente efeito do

ortobenzamol nos ensaios biológicos de nocicepção e inflamação, e a obtenção de efeitos expressivamente maiores que este fármaco, foi solicitado o registro de patente deste composto no Setor de Propriedade Intelectual da UFPA (protocolo 265/2009) e no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI).

Entretanto, para que um novo fármaco possa chegar a ter aplicabilidade clínica, é necessário estudar previamente sua possível toxicidade, especialmente quando consideramos fármacos de venda livre.

Desta forma, frente à possibilidade de uma alternativa terapêutica nova para o tratamento da dor e da inflamação, estudos adicionais que determinem a toxicidade do ortobenzamol são essenciais.

Assim, o principal objetivo deste trabalho é analisar a possível toxicidade do ortobenzamol. Como este composto é um análogo do paracetamol, a escolha das vias a estudar é justificada pela toxicidade já descrita do paracetamol e pelas características obtidas da atividade biológica do ortobenzamol (QUEIROZ et al, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do ortobenzamol e compará-la àquela do paracetamol.

2.2 Específicos

- Comparar a possível neurotoxicidade e/ou neuroproteção *in vitro* do ortobenzamol e do paracetamol, através da:
 - análise da viabilidade celular de culturas primárias de neurônios corticais expostas às drogas
 - mensuração dos níveis de glutathione total e reduzida de culturas primárias de neurônios corticais expostas às drogas
 - avaliação da viabilidade celular em desafio com peróxido de hidrogênio de culturas primárias de neurônios corticais expostas às drogas
- Determinar a Dose Efetiva mediana (DE₅₀) do paracetamol no teste de contorção abdominal para poder compará-la com aquela do ortobenzamol em todos os testes a seguir;
- Comparar o possível estresse oxidativo cerebral e hepático provocado pela exposição *in vivo* ao ortobenzamol ou paracetamol através da análise dos:
 - Níveis de peroxidação lipídica
 - Níveis de nitritos (indicador indireto da produção de óxido nítrico)
- Comparar os parâmetros clínicos de animais expostos a ortobenzamol e paracetamol, através da análise de:
 - níveis séricos de aspartato aminotransferase e a alanina aminotransferase (indicativo de disfunção hepática)
 - níveis séricos de creatinina (indicativo de disfunção renal)
 - alterações hematológicas
- Comparar a toxicidade aguda *in vivo* do ortobenzamol e do paracetamol

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudo *in vitro*: toxicidade do ortobenzamol e do paracetamol em culturas primárias de neurônios corticais

As culturas primárias de neurônios corticais foram obtidas a partir dos embriões de 16 dias (E16) de camundongos fêmeas (NMRI) grávidas, provenientes de Charles River, Iffa Credo (Saint Germain-sur-l'Arbreste, França) (BABOT et al, 2007; SUÑOL et al, 2008; BRIZ et al, 2010;).

Todos os ensaios conduzidos nessas culturas foram realizados no Departamento de Neuroquímica e Neurofarmacologia do Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB, Espanha) onde, o manejo e uso dos mesmos, foram de acordo com o protocolo DMA 1852 da Universidade de Barcelona, aprovado pelo Governo da Catalunha, Espanha.

As culturas foram preparadas a partir de córtex cerebrais dissecados e cortados mecanicamente (BABOT et al, 2007; SUÑOL et al, 2008; BRIZ et al, 2010). As células foram, então, dissociadas por tripsinização suave (0,02%) a 37 °C durante 10 minutos, seguido por trituração em uma solução de DNase 0,004%, contendo inibidor de tripsina obtido da *Glycine max* (Kunitz inibidor) (0,05%).

Posteriormente, as células foram suspensas em meio DMEM contendo 5 mM de KCl, 31mM de glucose e 0,2 mM de glutamina, suplementado com *p*-aminobenzoato, insulina, penicilina, e 10% de soro bovino fetal. A suspensão de células ($1,5 \times 10^6$ células por mililitro) foi semeada em placas de 96 poços, pré revestidas com poli-D-lisina e incubada em estufa (5% de CO₂ e 95% de O₂) a 37° C. Uma mistura de 5µM de 5-fluoro-2-desoxiuridina e 20 µM de uridina foi adicionada após 1-2 dias *in vitro* (DIV) para prevenir a proliferação glial.

As soluções-mãe de ortobenzamol e paracetamol foram preparadas em dimetilsulfoxido (DMSO) e posteriormente diluídas em meio DMEM, de forma que a concentração final de DMSO nas culturas foi de 0,5%.

3.1.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Ensaio com culturas não diferenciadas e diferenciadas foram incluídos, com o objetivo de avaliar possíveis efeitos neurotóxicos e/ou maior vulnerabilidade durante o desenvolvimento. O processo de diferenciação neuronal se inicia em poucas horas após o início do cultivo até 7–8 dias *in vitro*, quando os neurônios cultivados são considerados

maduros. Assim, todas as culturas foram mantidas por 8 dias depois do início da cultura para, então, ser testada a viabilidade celular.

Ao longo desses 8 dias, as culturas foram expostas a concentrações finais crescentes de paracetamol (0 – 10 mM) ou ortobenzamol (0 – 1 mM) durante os últimos 7 dias (exposição que se inicia na cultura não diferenciada) ou nos últimos 2 dias (exposição na cultura quase totalmente diferenciada). Durante os períodos de exposição, o meio de cultura não foi alterado. Os grupos controles receberam veículo (DMSO 0,5%) e foram testados da mesma forma.

Após os 8 dias de cultura, a viabilidade celular foi determinada pelos métodos de Mosmann (1983). Brevemente, o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) mede a transformação deste substrato, pela atividade da enzima mitocondrial succinato-deshidrogenase, em um composto formazan colorido, que pode ser quantificado espectrofotometricamente. Para isso, as células foram incubadas com MTT (50mg/ 10ml) a 37°C durante 1h e, posteriormente, desagregadas com SDS a 10%. A intensidade de cor foi medida a 560nm. Os resultados foram expressados como a percentagem de MTT reduzido em comparação com valores controles.

3.1.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA

A avaliação dos níveis de glutatona reduzida foi realizada como descrito por Kaur et al, (2006).

A avaliação do conteúdo de GSH intracelular foi feita através da reação com monoclorobimano, reagente que atravessa livremente a membrana plasmática íntegra e sofre conjugação com GSH catalisada por diversas isoformas de GST, dando origem a um conjugado fluorescente quando irradiado com luz ultravioleta (BRIVIBA et al,1993; SODERDAHL et al, 2003).

Nas culturas incubadas por 8 dias com paracetamol (0 – 10 mM) e ortobenzamol (0 – 1 mM), foi realizada a leitura do comprimento de onda da excitação a 360 nm por 460 nm emissão, para determinação do branco. Posteriormente, foi adicionado às culturas o monoclorobimano (1mM) e incubadas por 30 minutos. Finalmente, foi realizada uma nova leitura, conforme descrito.

Para cada poço, a fluorescência final com monoclorobimano foi obtida por subtração da respectiva fluorescência obtida no branco. A intensidade da fluorescência é proporcional à

quantidade de GSH presente. Os resultados foram expressados como % de fluorescência *versus* o controle (DMSO 0,5%).

3.1.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL

A glutaciona total (GSH e GSSG) foi quantificada empregando-se o método da glutaciona redutase, proposto por Tietze (1969).

Nesse método, os grupamentos sulfidrilas da GSH interagem com o ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), originando a GSTNB (forma oxidada de GSH) que, na presença da glutaciona redutase e de NADPH, é reduzida novamente em GSH. A GSH reage novamente com DTNB reiniciando o ciclo. Caso haja presença de GSSG, esta é primeiramente reduzida a GSH pela glutaciona redutase e, em seguida, entra no ciclo. Concomitantemente à formação de GSTNB e GSH, há a liberação de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), um composto de coloração amarela que é detectado em 412 nm. Sendo assim, a intensidade de cor produzida pelo TNB é diretamente proporcional à atividade da glutaciona redutase sobre a GSTNB e GSH intracelular.

Após o tratamento das culturas por 7 dias (como descrito acima) com paracetamol (0 – 10 mM) e ortobenzamol (0 – 1 mM), as células foram homogeneizadas em tampão fosfato-EDTA (100 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,4, contendo 1 mM EDTA). O homogenado foi precipitado com ácido perclórico a 3% (p/v) e centrifugado (16,000 × g, 5 min., a 4 °C).

O sobrenadante foi incubado com o tampão PE (0,8 mM DTNB e 0,32 U/mL glutaciona redutase) e, a reação foi iniciada pela adição de 0,6 mM NADPH. A cinética da reação de DTNB foi monitorizada a 412 nm, durante 2 minutos. Os níveis absolutos de GSH total em cada amostra foram calculados com base em padrões de 0 a 25 nmol.

3.1.4 DESAFIO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O modelo de desafio com peróxido de hidrogênio foi usado para avaliar a possível capacidade antioxidante/neuroprotetora do ortobenzamol, comparada com o paracetamol (TRIPATHY e GRAMMAS, 2009).

Após o tratamento das culturas por 7 e 2 dias (como descrito acima) com 100 µM de paracetamol e 10 µM de ortobenzamol, concentrações crescentes (0 – 1 mM) de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram adicionadas nas culturas neuronais no 8º dia *in vitro*. Três horas

depois da adição do H₂O₂, as culturas foram processadas para avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT como descrito acima. Os resultados foram expressados como a porcentagem de MTT reduzido em comparação com valores controles.

3.2 Estudo *in vivo*: toxicidade do ortobenzamol e do paracetamol em camundongos tratados por via oral.

3.2.1 ANIMAIS

Para todos os testes *in vivo*, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos *swiss* adultos pesando entre 30g - 40g, provenientes do Instituto Evandro Chagas (Belém-PA) e mantidos em gaiolas de polietileno no Biotério Setorial do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA), sob condições controladas de temperatura (22 ± 3°C) e ciclo de claro/escuro de 12 horas com livre acesso a água e ração.

O manejo e uso dos animais foram de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisas com Animais de Experimentação da UFPA (CEPAE-UFPA, Parecer BIO021-11).

Antes da realização de cada teste *in vivo*, os animais foram deixados em jejum por um período de 12 horas. A administração das soluções de tratamento (paracetamol ou ortobenzamol) preparadas em óleo de milho foi realizada em dose única pela via oral (v.o.), através de cânula orogástrica, em volume de 0,1mL/10g de peso corporal.

3.2.2 DETERMINAÇÃO DA DOSE EFETIVA MEDIANA DO PARACETAMOL

Com o intuito de poder realizar comparações adequadas entre o paracetamol e o ortobenzamol, foi determinada a Dose Efetiva Mediana (DE₅₀) do paracetamol no teste de contorções abdominais, induzidas pela administração intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,6% (KOSTER et al., 1959).

O paracetamol foi administrado nas doses de 100, 150, 200 e 250 mg/kg. O grupo controle negativo recebeu o veículo utilizado para solubilizar o paracetamol (óleo de milho). Todos os grupos foram constituídos por 10 animais e tratados uma hora antes da administração do estímulo nociceptivo.

A reação do animal a esse estímulo foi o desenvolvimento de movimentos repetidos de contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras. Esse conjunto de reações é denominado contorções abdominais. A intensidade da nocicepção foi quantificada como o número total de contorções abdominais durante o período de observação

de 20 minutos, sendo iniciada a contagem 10 minutos após a administração do ácido acético. Durante o tempo de observação, os animais foram contidos em funis de vidro com diâmetro de aproximadamente 22 centímetros.

A dose efetiva mediana (DE_{50}) foi determinada por interpolação semi-logarítmica a partir dos resultados encontrados, em que se calculou a porcentagem de inibição da nocicepção para cada dose.

3.2.3 TRATAMENTOS *IN VIVO* PARA ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO E DOS PARÂMETROS CLÍNICOS

Camundongos como os descritos no item 3.2 foram tratados por via oral com ortobenzamol ou paracetamol com doses até 10 vezes a dose efetiva mediana ($10 \times DE_{50}$) de cada droga. Os grupos controles receberam veículo (óleo de milho) e foram testados da mesma forma.

Quarenta e oito horas depois, esses animais foram anestesiados com ketamina (72mg/Kg) e xilazina (9 mg/kg), por via intraperitoneal. A anestesia foi confirmada através da análise do relaxamento muscular, decúbito ventral, presença de analgesia pinçando delicadamente o espaço interdigital e diminuição dos reflexos protetores nos animais.

3.2.4 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO E CEREBRAL.

Os animais anestesiados foram sacrificados para a retirada do cérebro e do fígado. Ambos os órgãos foram imediatamente limpos com solução salina 0,9% gelada, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos testes.

3.2.4.1 *Determinação da peroxidação lipídica hepática e cerebral*

O nível de peroxidação lipídica dos tecidos foi determinado pela quantificação de malonaldeído (MDA), importante produto de decomposição de peróxidos derivados de ácidos graxos polinsaturados e seus ésteres relacionados.

Este aldeído reage com o agente cromógeno, N-metil-2-fenilindol (NMFI) a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. A condensação de uma molécula de MDA com duas moléculas de NMFI produz um cromóforo estável que na presença do ácido metanosulfônico, tem absorvância máxima a 586 nm (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990).

Dessa forma, os tecidos foram descongelados lentamente em um banho de gelo e homogeneizados em água destilada por agitação sônica a 4°C , na concentração aproximada de

1:10 (g/mL). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2,500g durante 10 minutos a 4 °C e os sobrenadantes divididos em alíquotas para a determinação das proteínas totais pelo método de Bradford (1976).

À 325 µL de NMF1 10,3 mM diluído em metanol (1:3) e 75 µL de ácido metanosulfônico foram adicionados 100 µL das soluções padrões ou dos sobrenadantes das amostras. Após uma incubação a 45° C por 40 minutos, foi realizada a leitura em um comprimento de onda de 586 nm.

Para construir a curva de calibração foram utilizadas diluições de concentrações conhecidas a partir de uma solução padrão de MDA. Os resultados foram expressos em pmol de MDA/ mg de proteínas.

3.2.4.2 Avaliação da produção óxido nítrico: determinação dos níveis de nitritos nos tecidos cerebral e hepático

A concentração de nitritos presente na amostra foi detectada através da técnica colorimétrica baseada na reação de Griess (GREEN et al., 1981). Nessa reação, o reagente de Griess, se combina com os nitritos para formar um composto colorido. A intensidade da cor púrpura produzida é proporcional à quantidade de cromógenos formados e, conseqüentemente, à quantidades de nitritos existentes. Essa quantidade foi medida através da absorbância a 550 nm.

Para tal, os tecidos foram descongelados em banho de gelo e homogeneizados, por agitação sônica, em água destilada fria em uma concentração 1:10 (g/mL). Foram centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, e as alíquotas dos sobrenadantes foram armazenadas a – 20 °C, para determinar as proteínas totais pelo método de Bradford (1976) ou para calcular os níveis de nitritos.

Cinquenta µL de cada amostra foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos, com 50 µL de reagente de Griess composto de sulfanilamida a 1 %, ácido fosfórico 5 % e naftil-etilen-diamina, na proporção 1:1. Após a incubação, foi medida a absorbância a 550 nm. A concentração de nitritos foi calculada por comparação com as absorbâncias de soluções padrão de concentrações conhecidas de nitrito sódico em água.

3.2.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas presentes nas amostras foi quantificada através do método de Bradford (1976).

O método se baseia na ligação do reagente Coomassie Blue (reagente de Bradford) com as proteínas. Essa reação gera um composto de cor azul com intensidade proporcional à concentração de proteínas presentes na amostra e, pode ser medida por leitura da absorvância a 595 nm (BRADFORD, 1976).

Em um tubo de ensaio contendo 1 ml do reagente de Bradford e 75µl de água destilada, foi adicionada 25 µl da amostra. Após 2 minutos de incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram calculados com base na comparação com uma curva padrão de concentrações crescentes de proteína sérica bovina, e expressos em mg de proteínas.

3.2.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS LABORATORIAIS DE ROTINA

O sangue total foi obtido a partir da punção cardíaca dos animais anestesiados. As amostras de sangue coletadas com EDTA foram levadas ao Laboratório de Análises Clínicas do ICB-UFPA, no tempo máximo de 2 horas, para o processamento dos parâmetros laboratoriais hematológicos e bioquímicos.

O processamento das amostras iniciou-se com a análise hematológica, por meio da determinação do hemograma e, posteriormente, as amostras de sangue total foram centrifugadas a 3.500g durante 10 minutos, para separar o plasma à determinação dos parâmetros bioquímicos. O plasma isolado foi congelado a -20°C, e a determinação bioquímica realizada no prazo máximo de 30 dias. A análise dos valores hematológicos e bioquímicos foi feita a partir da comparação dos grupos tratados em relação ao grupo controle.

3.2.7 DETERMINAÇÃO BIOQUÍMICA DE ALTERAÇÃO HEPÁTICA E RENAL

Os parâmetros bioquímicos foram determinados no plasma das amostras de sangue, através de kits enzimáticos colorimétricos. A leitura foi feita no aparelho espectrofotômetro semi automático BIO 2000 (BioPlus), a partir de 100 µL de plasma.

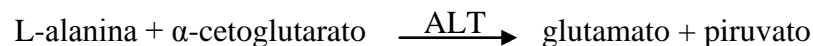
A alteração da função hepática foi quantificada mediante a determinação bioquímica de alterações nos níveis séricos dos marcadores específicos para dano hepático: a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST).

Também foram quantificados os níveis séricos da enzima Gama-Glutamil Transferase (GGT), sensível indicador enzimático de doença hepatobiliar.

O dano renal foi medido pela determinação de mudanças dos níveis séricos de creatinina.

3.2.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)

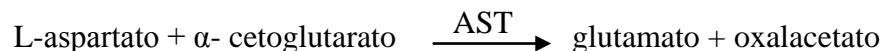
A quantificação de alanina aminotransferase (ALT) foi feita através da utilização de kit de ensaio cinético Transaminase Pirúvica (Labtest) no plasma. O kit utilizado promove a transferência do grupo amina da alanina para cetoglutarato e, os produtos dessa reação, são piruvato e glutamato, conforme equação abaixo:



O piruvato formado reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando hidrazona. A intensidade da coloração de hidrazona formada em meio alcanino é diretamente proporcional a quantidade de piruvato, que é determinado em função da enzima. O ensaio tem 4 fases e a reação foi lida em espectrofotometria em um comprimento de onda de 490 nm.

3.2.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

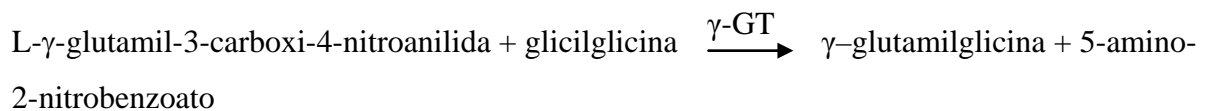
A determinação de Aspartato Aminotransferase (AST) foi feita no plasma, através de kit Transaminase Oxalacética (Labtest). O kit atua transferindo o grupo amina e o produto dessa reação de transaminação são oxaloacetato e glutamato. O oxaloacetato formado é medido através da formação de hidrazona, conforme equação abaixo:



A hidrazona formada em meio alcalino, tem intensidade proporcional à quantidade de oxalacetato, que é determinado em função da atividade enzimática. O processo é dividido em 4 etapas, de acordo com metodologia descrita por Reitman e Frankel (1957). A reação foi lida por espectrofotometria em um comprimento de onda de 500 nm.

3.2.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE GAMA GLUTAMIL TRANSFERASE (GGT)

A determinação de Gama Glutamil Transferase foi dada a partir da utilização de kit destinado à determinação da enzima no plasma (Katal). O princípio de ação do kit é baseado na propriedade de que a enzima GGT catalisa a reação de transferência do grupamento glutamil do L- γ - glutamilgliciglicina para a glicilacina, conforme equação abaixo:



A concentração da enzima é determinada a partir da velocidade de transformação do 5-amido-2 nitrobenzoato que é diretamente proporcional a quantidade de γ -GT na amostra. Formado um composto de coloração avermelhada, a reação então foi lida por espectrofotometria em um comprimento de onda de 405 nm.

3.2.11 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CREATININA

A determinação quantitativa da creatinina no sangue foi realizada através de método cinético-colorimétrico, com a utilização do kit de Ensaio de Creatinina (Labtest). No ensaio, a creatinina presente no plasma reage com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de coloração amarelo-avermelhado, que é medido imediatamente.

A esta amostra é adicionado um acidificante, que diminui o pH para 5, promovendo a decomposição do picrato de creatinina e é também medida espectrofotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina.

3.2.12 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS: ERITROGRAMA, LEUCOGRAMA E PLAQUETOGRAMA

Os valores do hemograma completo (eritrograma, leucograma e plaquetograma) realizados no laboratório de Análises Clínicas do ICB/UFPA, foram processados através do equipamento analisador automático ABX MICROS 60 (fabricante Horiba), ajustado para leitura de amostra veterinária. A leitura foi feita por bioimpedância, a partir de 100 μ L de sangue total, onde foram analisados o eritrograma (células vermelhas totais, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, distribuição das células vermelhas), o leucograma

(leucócitos totais, linfócitos, monócitos e granulócitos) e contagem de plaquetas (plaquetas, volume plaquetar médio e distribuição do volume plaquetar).

3.2.13 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO*

A determinação da toxicidade oral aguda foi realizada conforme o Guia OECD-425/2008 “Up-and-Down-Procedures” (OECD, 2008).

Camundongos como os descritos no item 1 foram selecionados randomicamente e mantidos isolados em gaiolas (ciclo de claro/escuro de 12 horas, 22±3 °C, até 30% de humidade e com livre acesso a água e ração) no mínimo 5 dias antes da administração das drogas, para permitir a aclimação às condições laboratoriais.

Os animais foram desprovidos de alimentação entre 3 a 4 horas antes do tratamento.

O protocolo segue uma pauta sequencial estrita que se inicia com um animal tratado por via oral, através de cânula orogástrica, com uma única dose de 2000 mg/Kg da droga. Se o animal sobreviver, esta dose deve ser administrada em quatro animais adicionais sequencialmente até que um total de cinco animais sejam testados. Este Guia considera que se três ou mais animais sobrevivem a este teste, a dose letal mediana (DL_{50}) da droga testada, será maior do que 2.000 mg/Kg, classificando-a como pertencente aos agentes xenobióticos de classe 5 ou de baixa toxicidade (OECD, 2008).

Para determinação do resultado (sobrevivência ou morte), os camundongos foram observados individualmente, durante as primeiras 4 horas após o tratamento, periodicamente durante as primeiras 24 horas e, diariamente, em um total de 14 dias. Após 1-2 horas do tratamento, o livre acesso a ração e água foi restaurado. As mudanças comportamentais observadas nos animais foram registradas durante 4 horas ininterruptas após o tratamento.

3.3 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± e.p.m. (erro padrão da média), onde n representa o número de animais ou de culturas. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0,05$), 1% ($P < 0,01$) ou 0,1% ($P < 0,001$). Para comparação das médias foram utilizados Análise de variância one-way (ANOVA) seguida de um método de múltiplas comparações (Teste de Tukey).

4 RESULTADOS

4.1 **Estudo *in vitro*: toxicidade do ortobenzamol e do paracetamol em culturas primárias de neurônios corticais**

4.1.1 VIABILIDADE CELULAR

As concentrações das drogas testadas nos ensaios de viabilidade celular variaram até 10 mM. Entretanto, após o descobrimento de que a DE_{50} estabelecida *in vivo* para o paracetamol (127 mg/Kg; ver tópico 4.2.1) é muito diferente da do ortobenzamol (22,5 mg/Kg; QUEIROZ et al, 2012), os dados foram transformados e plotados como logaritmo das quantidades de mg/L (Tabela 1, APÊNDICE) com o intuito de facilitar a comparação em relação às respectivas DE_{50} .

Assim, a exposição de culturas primárias de neurônios corticais (células já diferenciadas) ao ortobenzamol por dois dias não causou diferenças significativas na viabilidade celular (Figura 3, acima). Nesse caso, a concentração máxima testada foi de 213 mg/L ou 1 mM (equivalente a 9,5 vezes a DE_{50} do ortobenzamol) que foi o limite da solubilidade da droga no meio de cultura.

Diferentemente, a exposição ao paracetamol nessas condições foi capaz de causar redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 3 mM ou 453 mg/L (valor de 2,66 na Figura 3 abaixo), equivalente a 3,5 vezes a DE_{50} *in vivo* do paracetamol.

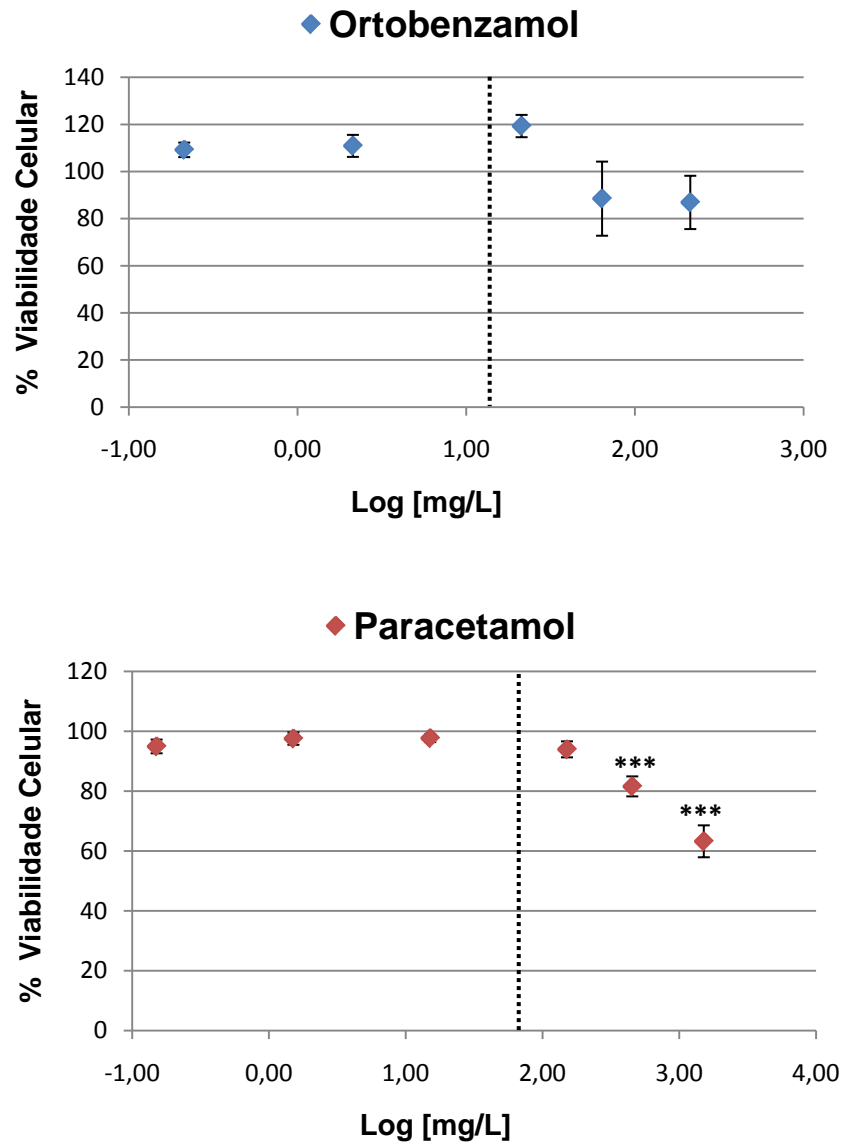


Figura 3-Viabilidade celular de culturas primárias de neurônios corticais (células já diferenciadas), expostas por 2 dias a Ortobenzamol (acima) ou Paracetamol (abaixo). As linhas ponteadas indicam a localização aproximada da DE₅₀ para cada droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (n=6-21). *** $P < 0,001$ vs controle.

A exposição por sete dias das culturas de neurônios corticais (células não diferenciadas) às drogas, também foi capaz de causar diminuição da viabilidade celular de forma significativa (Figura 4). Como seria esperado, essa incubação por sete dias se revelou mais tóxica para as células que a incubação por dois dias, especialmente no caso do ortobenzamol (Figura 4).

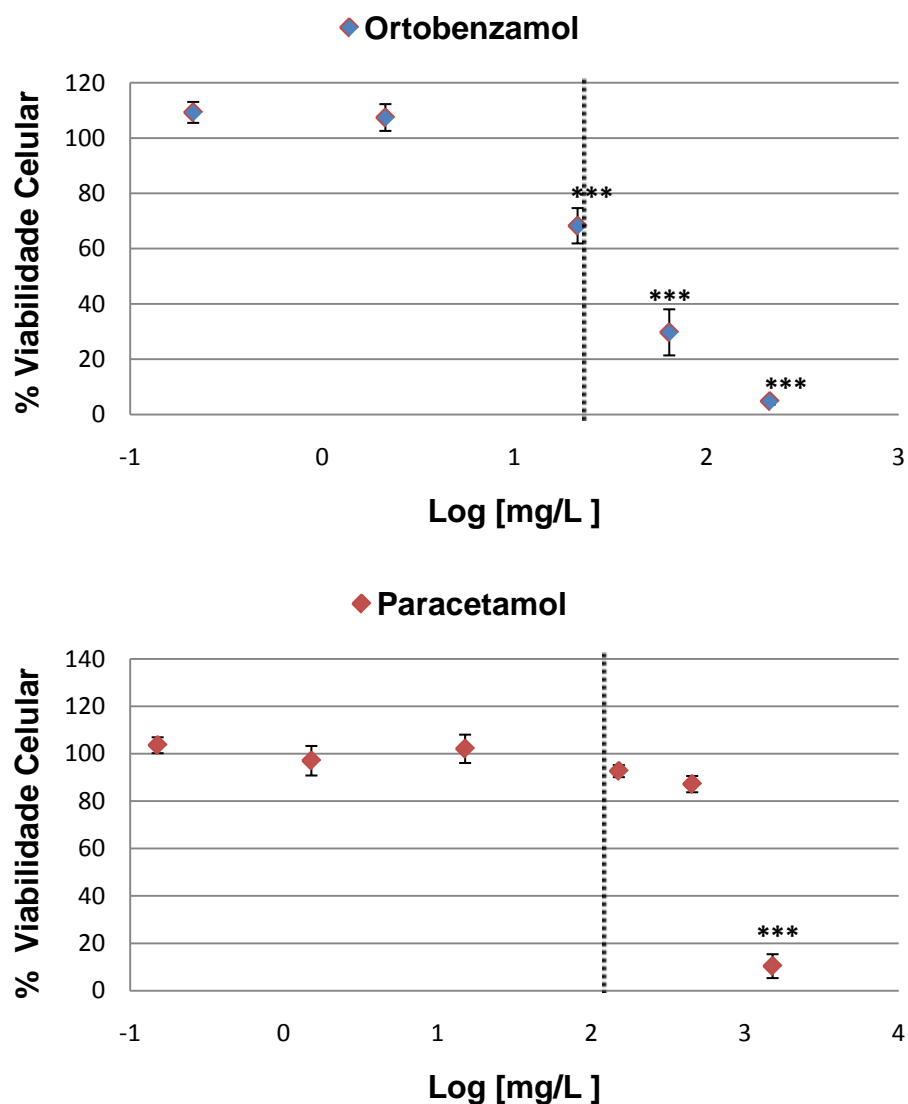


Figura 4- Viabilidade celular de culturas primárias de neurônios corticais (células não diferenciadas), expostas por 7 dias a Ortobenzamol (acima) ou Paracetamol (abaixo). As linhas ponteadas indicam a localização aproximada da DE₅₀ para cada droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (n=6-21). *** $P < 0,001$ vs controle.

4.1.2 NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA E TOTAL

Os níveis de glutathiona reduzida das culturas de neurônios corticais em diferenciação sofreram redução significativa com a exposição ao ortobenzamol, na concentração máxima testada (1mM) (Tabela 2).

Não foram identificadas alterações significativas nos níveis de glutathiona total nas culturas de neurônios corticais expostas ao paracetamol e ortobenzamol, em comparação ao veículo (Tabela 2).

Tabela 2: Níveis de glutathiona total e reduzida em culturas de neurônios corticais em diferenciação, expostas por 8 dias ao paracetamol ou ortobenzamol. Dados apresentados como média \pm desvio padrão (n=6-15). *** $P < 0,001$ quando comparado ao veículo.

Concentração	% Glutathiona Reduzida		% Glutathiona Total	
	Paracetamol	Ortobenzamol	Paracetamol	Ortobenzamol
Veículo	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
100 μ M	96,86 \pm 7,67	113,18 \pm 12,31	105,30 \pm 32,14	109,9 \pm 15,77
1 Mm	89,97 \pm 13,27	23,42 \pm 14,98***	68,25 \pm 22,88	87,20 \pm 14,13

4.1.3 CAPACIDADE NEUROPROTETORA FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO: DESAFIO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Para testar a possível capacidade neuroprotetora das drogas frente ao estresse oxidativo, foram selecionadas as concentrações de 100 μ M (ou 15,1 mg/L, equivalente a 0,11 vezes a DE_{50}) de paracetamol e 10 μ M (ou 2,13 mg/L, equivalente a 0,09 vezes a DE_{50}) de ortobenzamol, que não tiveram efeito tóxico na viabilidade celular (Figuras 3 e 4, segundo e terceiro pontos para o ortobenzamol e o paracetamol, respectivamente, começando pela esquerda dos gráficos).

A exposição prévia às drogas por dois (Figura 5, acima) ou sete dias (Figura 5, abaixo) não conseguiu proteger as culturas de neurônios corticais do desafio com peróxido de hidrogênio, não sendo registradas diferenças significativas entre os grupos para cada uma das concentrações de H_2O_2 testadas.

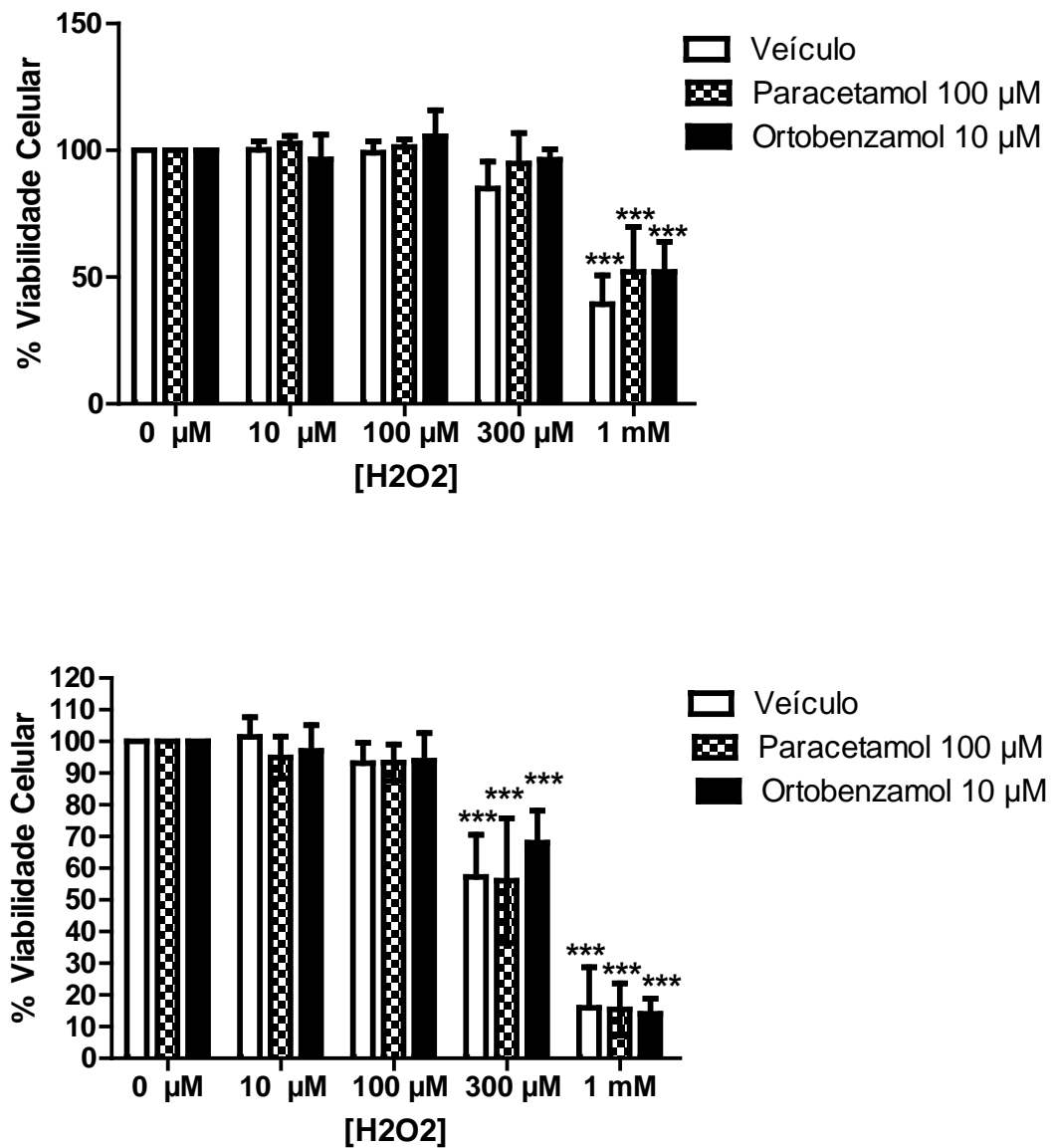


Figura 5-Viabilidade celular de culturas de células corticais expostas ao paracetamol (100μM) ou ortobenzamol (10μM) por 2 dias (acima) ou por 7 dias (abaixo) e/ou a concentrações de H₂O₂ nas últimas 3 horas de incubação. Dados apresentados como média ± desvio padrão (n=15). ****P*<0,001 quando comparado aos grupos 0μM.

4.2 Estudo *in vivo*: toxicidade do ortobenzamol e do paracetamol em camundongos tratados por via oral.

4.2.1 DOSE EFETIVA MEDIANA (DE₅₀) DO PARACETAMOL

A administração oral de paracetamol (PAR) nas doses testadas (100 - 250 mg/ Kg) uma hora antes da aplicação i.p. de ácido acético 0,6% (teste de contorções abdominais) reduziu o número de contorções abdominais entre 41% a 84%, quando comparadas ao grupo controle. A partir dos dados obtidos foi calculada a regressão linear ($R^2=0,9964$), encontrando-se uma DE₅₀ de 127 mg/ Kg (Figura 6).

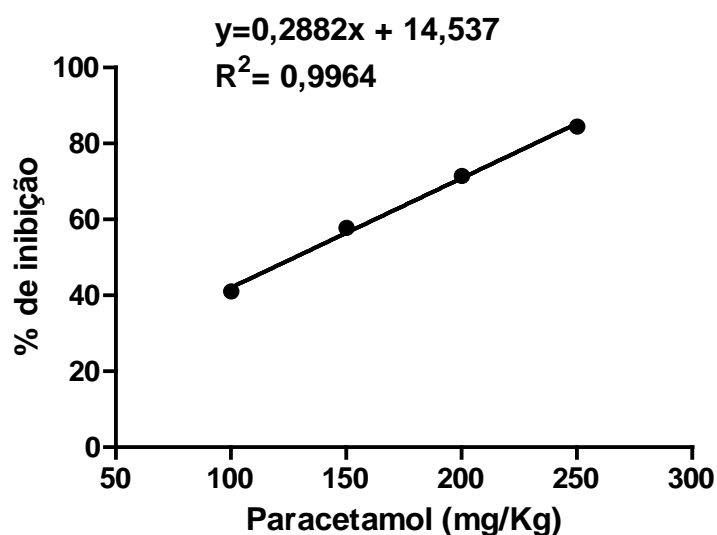


Figura 6 - Efeito inibitório de doses crescentes de paracetamol sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% i.p. (n=10). A linha representa a regressão linear calculada a partir dos dados. R^2 = coeficiente de correlação.

4.2.2 ESTRESSE OXIDATIVO CEREBRAL E HEPÁTICO

4.2.2.1 Determinação da peroxidação lipídica cerebral e hepática

Quando foi avaliada a peroxidação lipídica do cérebro, nenhum dos grupos experimentais apresentou alteração nos níveis deste marcador (Figura 7, acima). Neste teste, apenas as doses de 10x DE₅₀ do ortobenzamol e do paracetamol foram capazes de aumentar os níveis malonaldeído no tecido hepático, quando comparados ao grupo controle (Figura 7, abaixo).

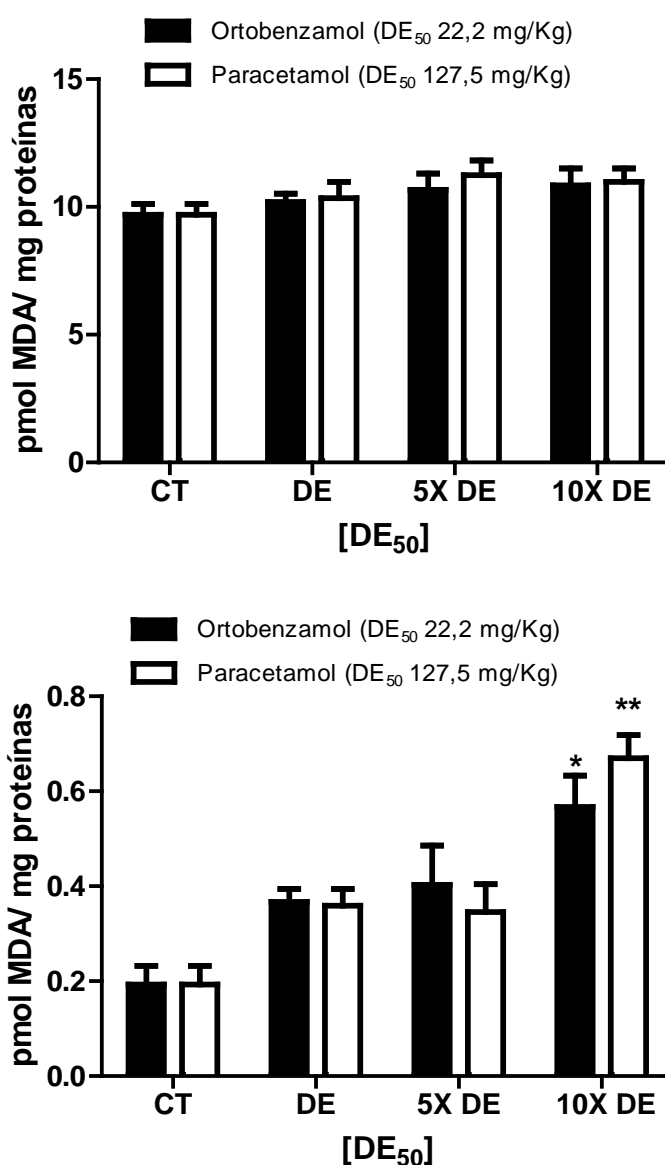


Figura 7- Peroxidação lipídica do tecido cerebral (acima) e hepático (abaixo) de camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (n=3-6) * $P < 0,05$ ou ** $P < 0,01$ vs grupo controle (CT).

4.2.2.2 Determinação dos níveis de nitritos no tecido hepático.

Apenas a dose de 10x DE₅₀ do paracetamol foi capaz de aumentar os níveis nitritos no tecido hepático, quando comparados ao grupo controle (Figura 8).

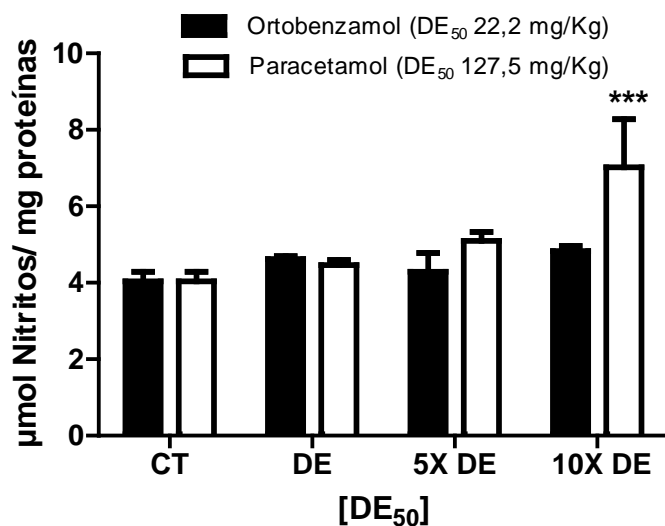


Figura 8- Concentração de nitritos no tecido hepático de camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol e paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6) ***P<0,001 vs todos os grupos.

4.2.3 ALTERAÇÕES SOROLÓGICAS

4.2.3.1 Enzimas hepáticas e creatinina

Os parâmetros bioquímicos observados e, amplamente utilizados na clínica para a detecção de alterações na função hepática e renal, são as elevações das enzimas aspartato aminotransferase (AST), de alanina aminotransferase (ALT), de gama glutamiltransferase (GGT) e da creatinina no sangue.

O resultado obtido sobre os níveis de AST, mostra que houve aumento significativo no grupo tratado com 10x DE₅₀ do paracetamol, quando comparado ao controle. Este tratamento também foi significativo, quando comparado à 10x DE₅₀ correspondente do ortobenzamol (Figura 9).

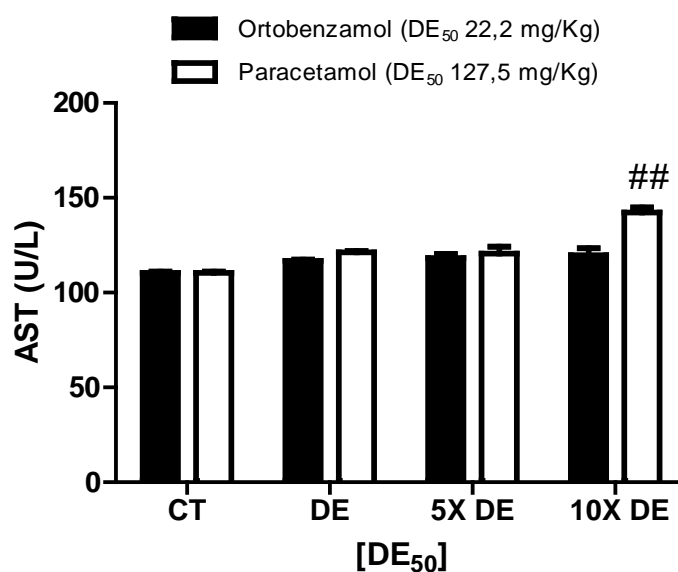


Figura 9- Níveis plasmáticos de aspartato amino transferase (AST) em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6). ##P<0,01 vs controle e a mesma dose do grupo ortobenzamol.

Diferentemente, o resultado encontrado para a ALT mostra que todos os grupos tratados apresentaram elevação significativa nos níveis plasmáticos desta enzima, quando comparados ao controle (Figura 10).

Ainda, o grupo tratado com 10x DE₅₀ do paracetamol também apresenta diferença estatística, quando comparado ao grupo tratado com 10x DE₅₀ do ortobenzamol (Figura 10).

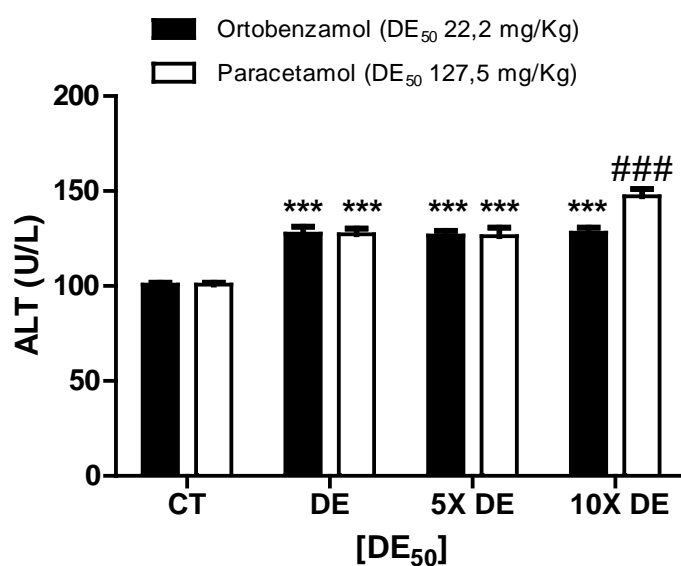


Figura 10- Níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6). *** $P < 0,001$ vs controle. ### $P < 0,001$ vs controle e a mesma dose do grupo ortobenzamol.

A determinação dos níveis de gama glutamil transferase (GGT) mostrou que houve elevação significativa em todos os grupos experimentais tratados com paracetamol, quando comparados ao controle. Diferentemente, os grupos tratados com ortobenzamol apresentaram alteração significativa deste parâmetro somente na dose 10x DE₅₀ (Figura 11).

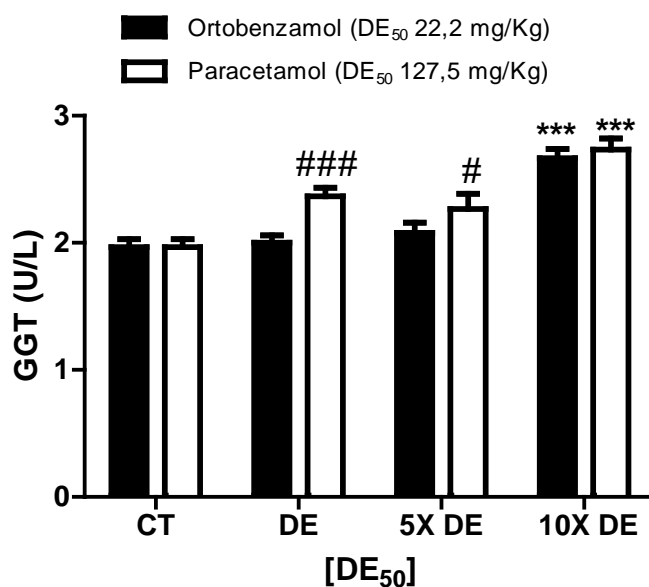


Figura 11- Níveis plasmáticos de gama glutamil transferase (GGT) em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6). *** $P < 0,001$ e * $P < 0,05$ vs controle. ### $P < 0,001$ vs controle e a mesma dose do grupo ortobenzamol.

Com relação aos níveis de creatinina, parâmetro bioquímico utilizado para avaliar a função renal, observou-se que todos os grupos tratados com paracetamol, apresentaram elevação significativa dos níveis de creatinina quando comparados ao controle. Diferentemente, nos grupos tratados com ortobenzamol, apenas a dose de 10x DE₅₀ foi capaz de alterar significativamente este parâmetro (Figura 12).

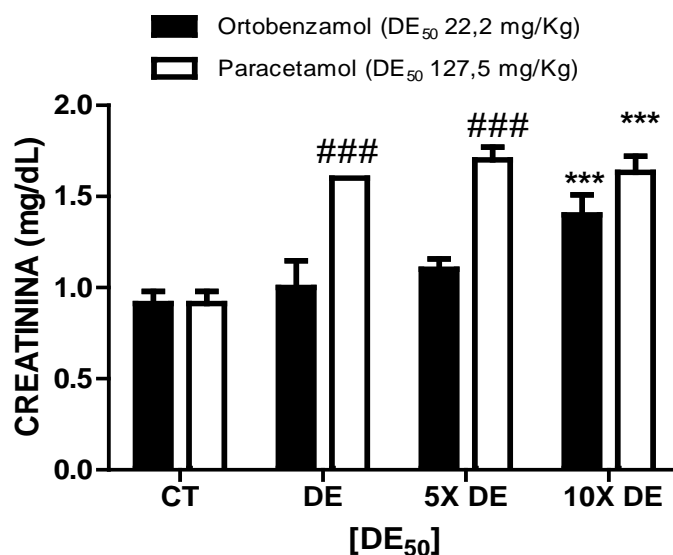


Figura 12- Níveis plasmáticos de creatinina em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6). *** $P < 0,001$ vs controle. ### $P < 0,001$ vs controle e a mesma dose do grupo ortobenzamol.

4.2.3.2 Eritrograma

Concentrações crescentes da DE₅₀ do ortobenzamol e do paracetamol, não alteraram significativamente a quantidade de células vermelhas totais, quando comparadas ao controle (Figura 13).

Seguindo este mesmo comportamento, a quantificação das hemoglobinas presentes nas amostras de sangue dos grupos tratados (Figura 14); a porcentagem do hematócrito (Figura 15); o volume corpuscular médio (Figura 16); a porcentagem de distribuição das células vermelhas (Figura 17); a hemoglobina Corpuscular média (Figura 18) e, a concentração da hemoglobina corpuscular média, não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle.

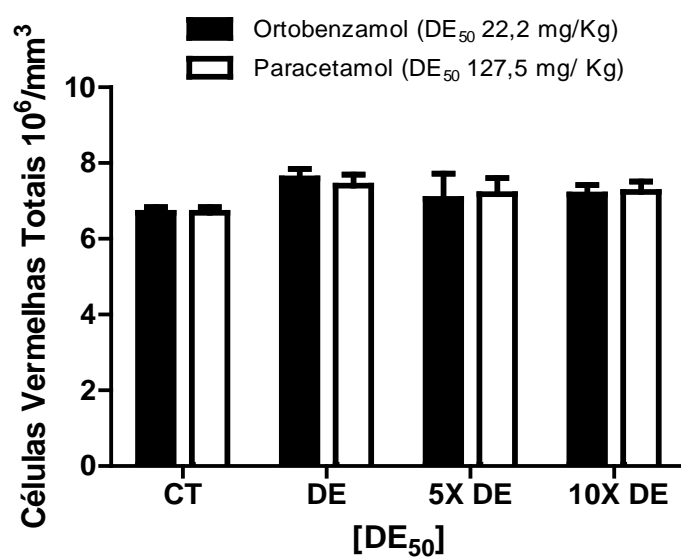


Figura 13- Células vermelhas totais em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (n=3-6).

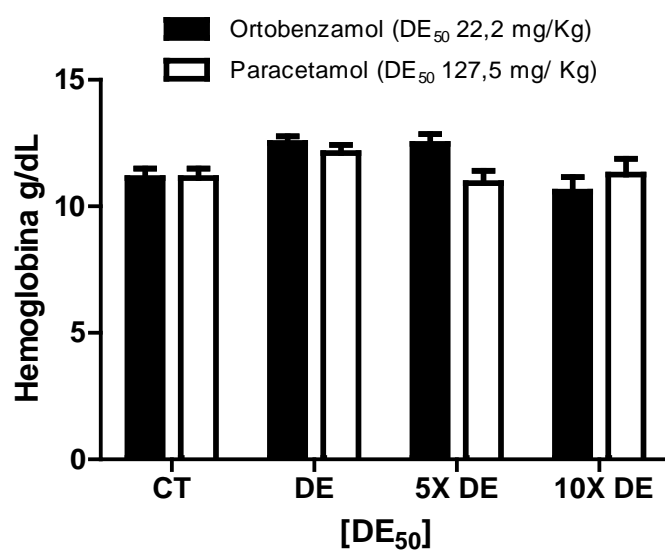


Figura 14- Quantificação das hemoglobinas em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (n=3-6).

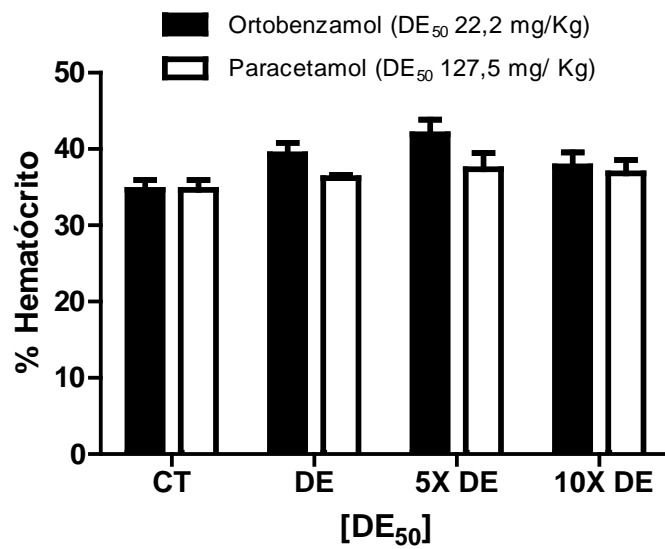


Figura 15- Porcentagem do hematócrito em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6).

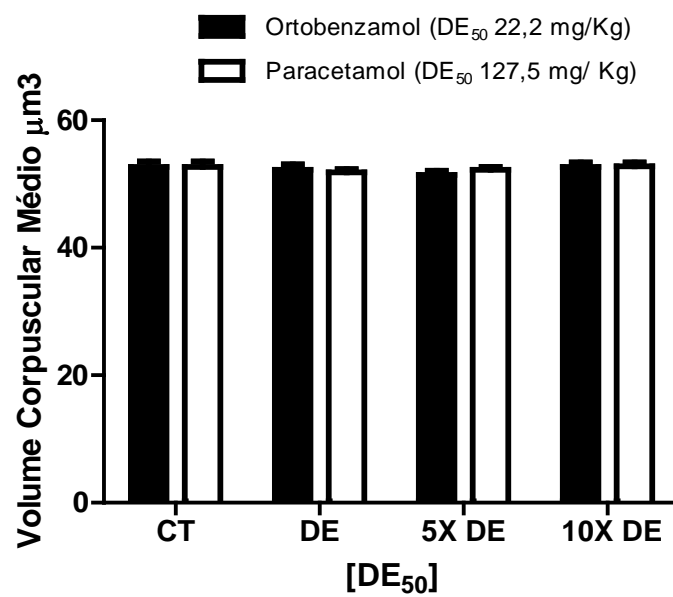


Figura 16- Volume corpuscular médio em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6).

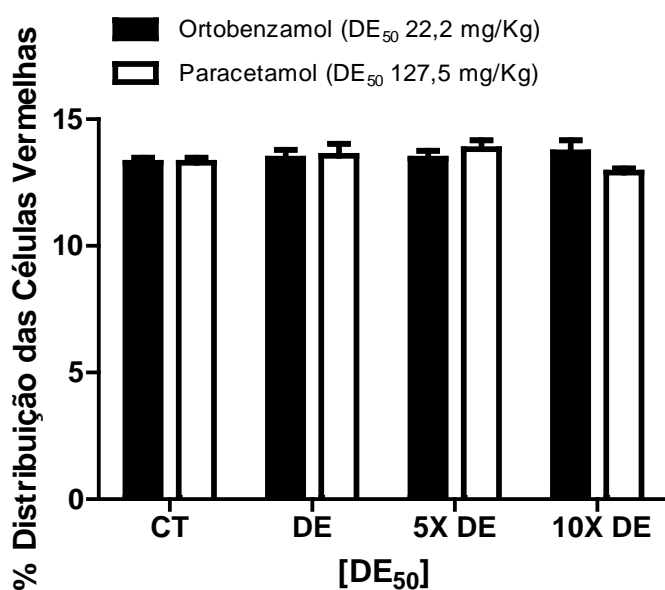


Figura 17- Porcentagem de distribuição das células vermelhas totais em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6).

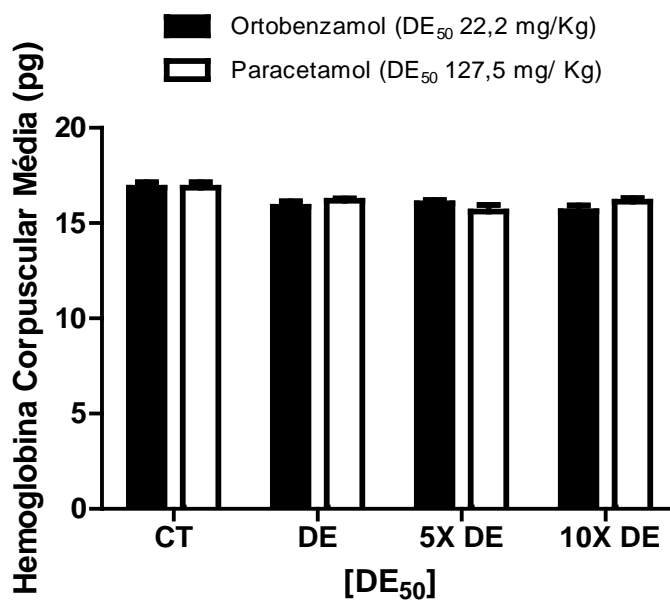


Figura 18- Hemoglobina corpuscular média em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6).

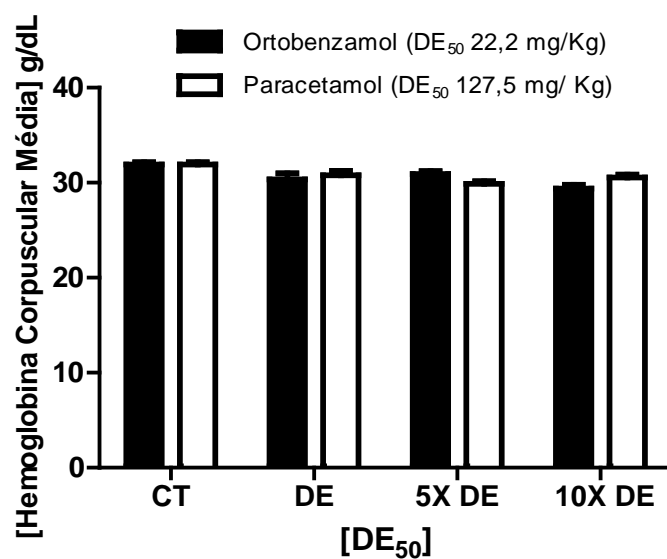


Figura 19- Concentração da hemoglobina corpuscular média em amostras de sangue de camundongos, tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6).

4.2.3.3 Leucograma

O leucograma realizado nas amostras de sangue permitiu a identificação de alterações nos níveis de células brancas dos grupos experimentais.

A doses DE₅₀ e 5xDE₅₀ do paracetamol foram capazes de diminuir significativamente a quantidade de leucócitos totais presentes nas amostras de sangue dos grupos tratados, em comparação ao grupo controle (Figura 20). Os grupos tratados com ortobenzamol não apresentaram este efeito significativo (Figura 20).

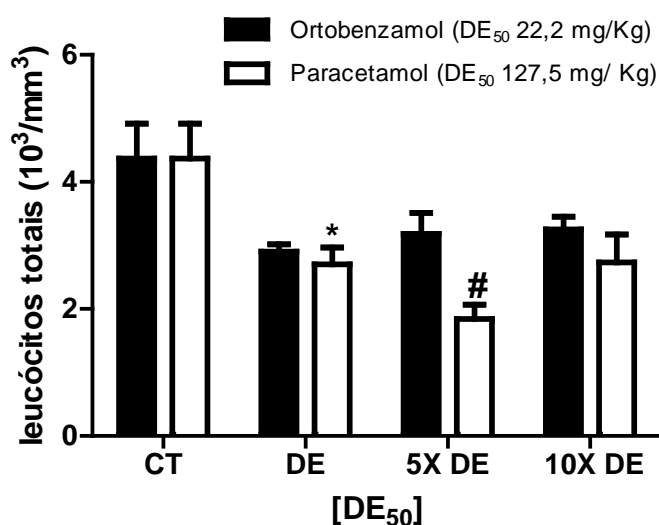


Figura 20- Leucócitos totais sanguíneos em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (n=3-6). * $P < 0,05$ vs controle e # $P < 0,05$ vs controle e a mesma dose do grupo ortobenzamol.

Também houve a diminuição significativa dos linfócitos em todos os grupos de tratamento, quando comparados ao grupo controle (Figura 21). Neste parâmetro ressalta-se a acentuada diminuição dos linfócitos em todos os grupos tratados com paracetamol, a qual apresenta diferença estatística inclusive, quando comparada aos grupos tratados com ortobenzamol.

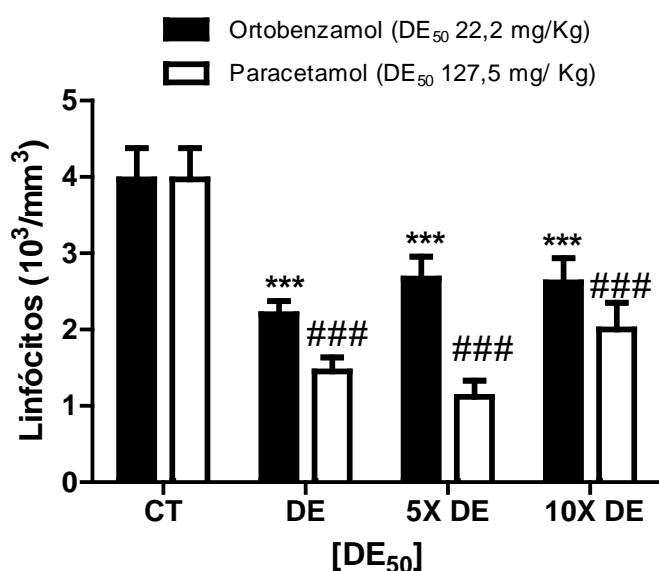


Figura 21- Linfócitos sanguíneos em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (n=3-6). *** $P < 0,001$ vs controle. ### $P < 0,001$ vs controle e à mesma dose do grupo ortobenzamol.

A quantificação de monócitos e de granulócitos sanguíneos, também demonstrou a diminuição significativa destas células nos grupos experimentais, quando comparados ao controle (Figura 22 e 23).

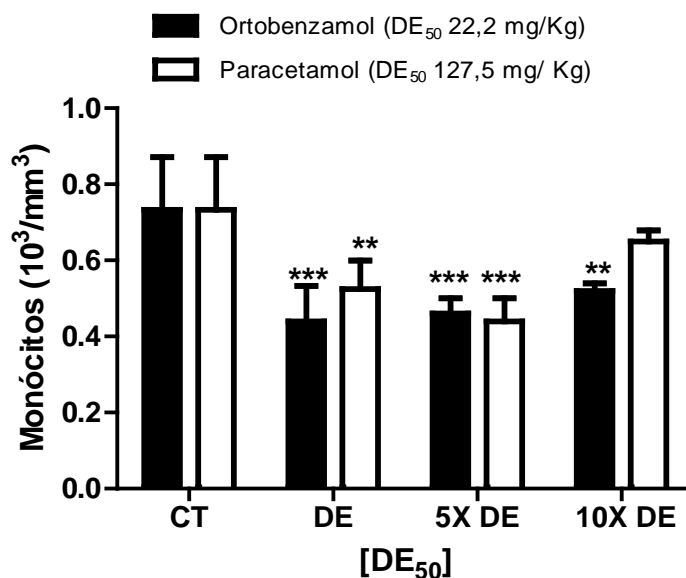


Figura 22- Monócitos sanguíneos em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (n=36).***P<0,001 vs controle.

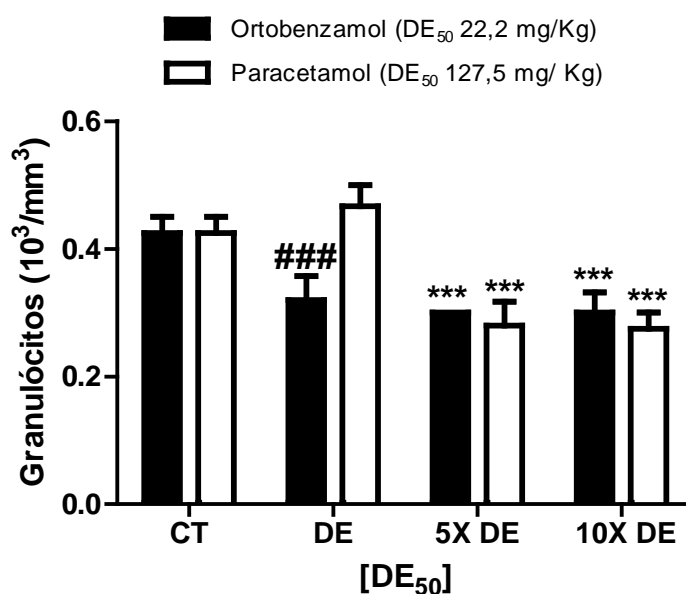


Figura 23- Granulócitos sanguíneos em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (n=3-6).***P<0,001; **P<0,01 ### P<0,001 vs controle e à mesma dose do grupo ortobenzamol.

4.2.3.4 Plaquetograma

Na contagem de plaquetas observou-se uma diminuição significativa das quantidades das plaquetas apenas nos grupos experimentais tratados com paracetamol (Figura 24).

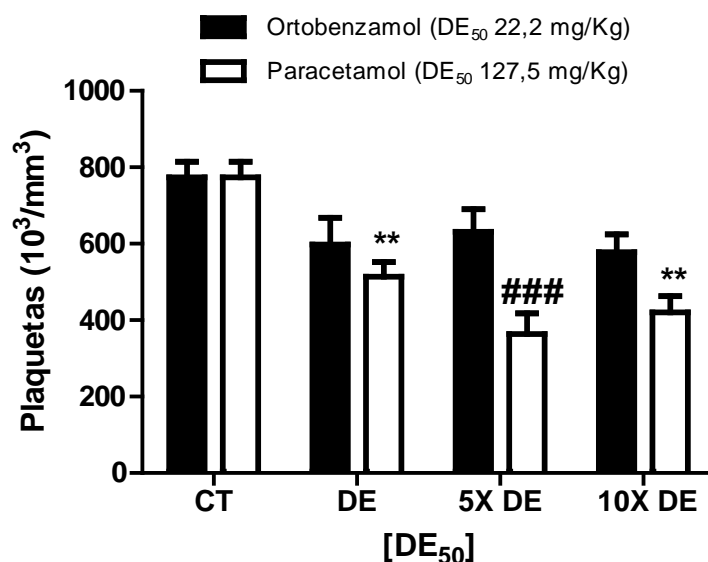


Figura 24- Plaquetas sanguíneas em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6).**P<0,01 vs controle. ### P<0,001 vs controle e a mesma dose do grupo ortobenzamol.

Os grupos tratados não apresentaram alterações no volume plaquetar médio, quando comparado ao controle (Figura 25).

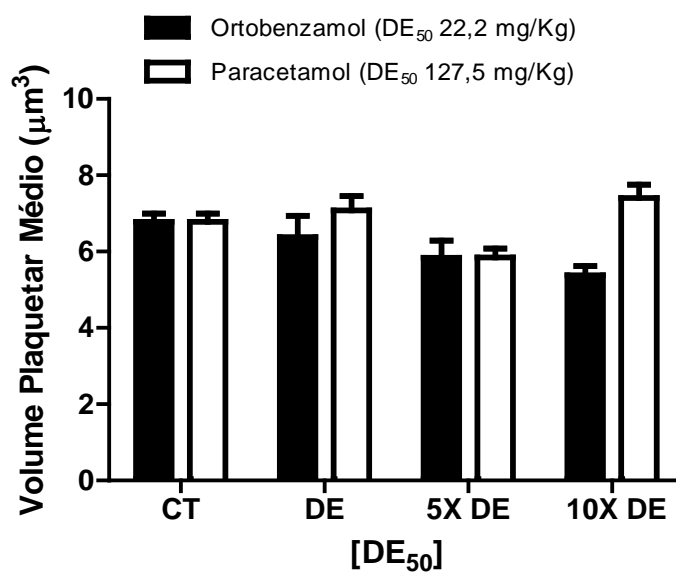


Figura 25- Volume plaquetar médio sanguíneo em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6).

Em todos os grupos experimentais tratados com paracetamol, a porcentagem de distribuição do volume plaquetar obteve diminuição significativa, em comparação ao controle. Nenhuma alteração significativa foi observada nos grupos tratados com ortobenzamol (Figura 26).

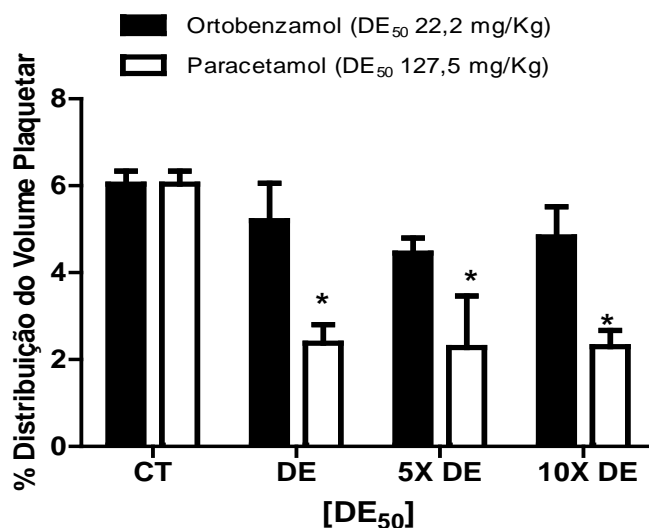


Figura 26- Porcentagem de distribuição do volume plaquetar sanguíneo em camundongos tratados com diferentes concentrações de ortobenzamol ou paracetamol, proporcionais à dose efetiva mediana (DE₅₀) de cada droga. Dados apresentados como média ± erro padrão da média (n=3-6). *P < 0,05 vs controle.

4.2.4 TOXICIDADE AGUDA

Doze horas após a administração com 2.000 mg/Kg de paracetamol, todos os animais tinham falecido (sendo que o primeiro óbito foi registrado 4 horas depois do início do tratamento). Ainda, foram registradas algumas alterações comportamentais nas primeiras 4 horas: agitação durante a primeira hora; piloereção, micção, isolamento do grupo, falta de apetite e apatia na segunda hora e, em adição a estes sintomas, na terceira hora os animais apresentaram esturpor (Figura 27).

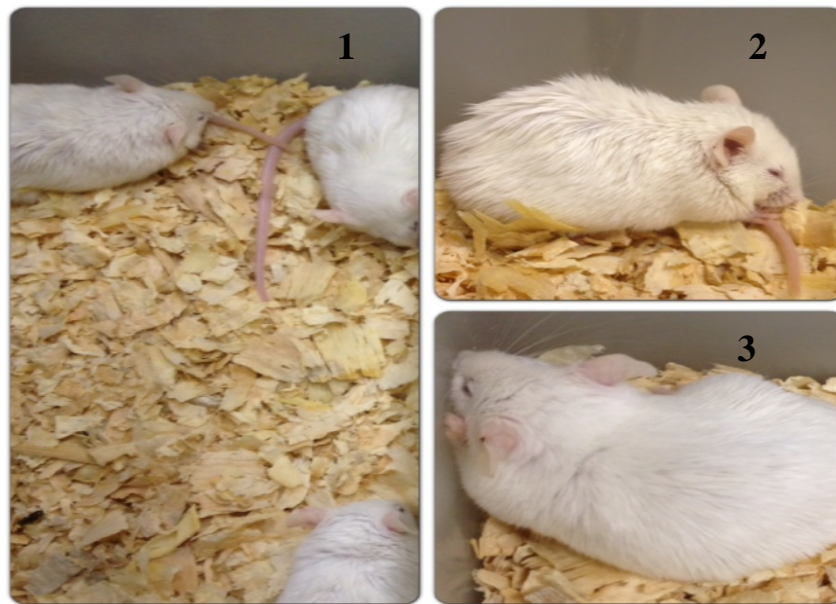


Figura 27– Isolamento do grupo (1), piloereção (2) e esturpor (3) observados no período de 4 horas após administração de 2000 mg/Kg de paracetamol.

O grupo tratado com 2.000 mg/Kg de ortobenzamol não apresentou alterações comportamentais. Ainda, nenhum óbito foi registrado durante o período de observação de 14 dias após o início do tratamento.

Assim, estes dados classificam o ortobenzamol como pertencente aos agentes xenobióticos de classe 5, ou de baixa toxicidade (OECD, 2008).

5 DISCUSSÃO

Este trabalho realizou, pela primeira vez, o estudo de toxicidade do ortobenzamol, um análogo do paracetamol, com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias mais potentes que esse último.

Uma das maiores dificuldades que enfrentamos no presente trabalho foi a ausência de qualquer conhecimento prévio sobre a toxicidade da droga de estudo, o ortobenzamol. Como este composto é um análogo do paracetamol, para avaliar a toxicidade do ortobenzamol selecionamos ensaios biológicos relacionados com a toxicidade já descrita do paracetamol e, ainda, também selecionamos a análise de outros órgãos alvos da droga (como revelado pela atividade biológica exercida pelo ortobenzamol).

Assim, nosso estudo utilizou uma variedade de modelos experimentais classicamente reconhecidos para a determinação de toxicidade em fármacos, incluindo análises de neurotoxicidade (*in vitro* e *in vivo*), hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e de toxicidade aguda.

Em estudo prévio (QUEIROZ et al, 2012), foi demonstrado que o ortobenzamol exerce potente ação analgésica central. Esta ação foi determinada através do teste da placa quente, um modelo bem validado para a detecção de analgésicos opióides, mesmo na presença de comprometimento substancial de desempenho motor (PATTANAYAK et al, 2008). Após a administração oral do ortobenzamol (DE₅₀ 22,5 mg/Kg) em camundongos, observou-se ação analgésica até 35 vezes mais potente que o paracetamol, em condições experimentais semelhantes (QUEIROZ et al, 2012). Ainda, esta ação assemelhou-se ao potencial analgésico da morfina (10 mg/kg), administrada por via subcutânea aos animais, o que é mais um indício do potente efeito central do ortobenzamol. Diante dessa ação sobre o SNC, o presente estudo investigou a capacidade do ortobenzamol em provocar neurotoxicidade.

Deste modo, iniciamos a investigação a partir de estudos *in vitro*, conduzidos em cultura de células neurônios corticais. Esta técnica representa um instrumento importante na investigação da neurotoxicidade, pois permite isolar os efeitos de uma variável específica sobre as células e ainda, responder a questões sobre um tipo celular específico e isolado de outras células (SUÑOL et al, 2008).

Os resultados dos ensaios *in vitro* em culturas de neurônios corticais (células já diferenciadas) expostas por dois dias a concentrações crescentes de paracetamol (até 10 mM) ou ortobenzamol (até 1mM), revelaram que somente a exposição ao paracetamol (a partir de 3mM) foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade celular e que o ortobenzamol

não afetou a viabilidade em nenhuma das concentrações testadas (Figura 3). Confirmando os resultados obtidos neste estudo para o paracetamol, estudo prévio em culturas de neurônios corticais de ratos, incubadas com diferentes concentrações de paracetamol, demonstrou morte celular tempo e concentração dependentes, observadas a partir de 18 horas de exposição, (POSADAS et al, 2010).

Deve-se ressaltar que a concentração citotóxica de paracetamol nos ensaios de viabilidade celular foi de 3 mM (453 mg/L), o que corresponde a 3,5 vezes a DE₅₀ do paracetamol. Diferentemente, as concentrações utilizadas do ortobenzamol nesses mesmos ensaios de até 1mM (213 mg/L), que equivale a 9,5 vezes a DE₅₀, não afetaram significativamente a viabilidade celular, demonstrando uma neurotoxicidade proporcionalmente mais baixa do ortobenzamol em relação ao paracetamol, para neurônios já diferenciados.

Entretanto, culturas não diferenciadas podem apresentar uma maior sensibilidade à ação tóxica dos xenobióticos, como os fármacos, já que o início do desenvolvimento do SNC é considerado um período muito vulnerável (POLLARD, 2007). Para avaliar a toxicidade no neurodesenvolvimento, foram realizados ensaios em culturas de neurônios corticais em diferenciação, com exposição às drogas a partir do segundo dia do início da cultura. Como esperado, nestas condições, ambas as drogas provocaram uma diminuição significativa da viabilidade celular (Figura 4), provavelmente devido ao tempo de exposição maior (7 dias) e/ou a maior suscetibilidade das culturas em relação aos experimentos com culturas diferenciadas.

A resposta observada poderia estar relacionada à imaturidade celular promovendo maior susceptibilidade à toxicidade, visto que durante a diferenciação, os neurônios ainda não possuem neuritos, que expressam transportadores e receptores funcionais para neurotransmissores, assim como, dispõem de mecanismos de defesa pobremente desenvolvidos (SUÑOL et al, 2008).

Assim, nossos resultados seriam um indicativo da necessidade de estudos adicionais mais aprofundados em relação ao uso da droga em tratamentos prolongados e/ou em crianças e grávidas. Estudos *in vivo* em modelos animais durante a gestação seriam importantes para avaliar se o ortobenzamol compromete realmente o período embrionário.

Ainda, este efeito pode ser também atribuído à maior lipofilicidade do ortobenzamol, quando comparada ao paracetamol, que permite que o ortobenzamol atravesse mais facilmente a membrana celular (QUEIROZ et al, 2012), o que acabaria afetando especialmente com tratamentos mais prolongados.

Em relação ao mecanismo molecular subjacente a essa neurotoxicidade, estudos *in vitro* e *in vivo* com o paracetamol, associam a neurotoxicidade ao estresse oxidativo, relatando aumento da produção de radicais livres e diminuição de defesas antioxidantes (MICHELI et al, 1990; NENCINI et al, 2007; POSADAS et al, 2010; SILVA et al, 2012).

A metabolização do paracetamol via CYP2E1 (principal isoenzima do citocromo P-450 envolvida), produz um metabólito eletrofílico altamente reativo, a NAPQI. Este pode ligar-se a grupos sulfidrila de proteínas celulares, incluindo mitocondriais, e induzir o estresse oxidativo (RASHID et al, 2013). Embora em níveis mais baixos que no fígado, o cérebro também expressa a CYP2E1, e o paracetamol pode induzir a sua ativação. Conseqüentemente, há produção de NAPQI neste órgão e a possibilidade de neurotoxicidade pela geração de estresse oxidativo (JOSHI & TYNDALE, 2006; POSADAS et al, 2010). Em doses tóxicas há maior produção de NAPQI, aumento da produção de radicais livres e depleção de glutathiona reduzida (GSH). O resultado desse processo conduz a dano oxidativo que pode levar a morte celular (RASHID et al, 2013).

A exposição de culturas não diferenciadas a ambas as drogas não alterou significativamente a quantidade de glutathiona total (Tabela 2). Entretanto, a concentração máxima de ortobenzamol (1mM, equivalente a 9,5 vezes a DE₅₀) reduziu a proporção de glutathiona reduzida, sugerindo que a neurotoxicidade descrita acima, possa ter sido mediada pelo estresse oxidativo.

O cérebro é altamente susceptível ao estresse oxidativo devido à alta taxa de consumo de oxigênio (o que induz ainda maiores quantidades de radicais livres), à elevada composição em ácidos graxos poli-insaturados (alvos da peroxidação lipídica) e a um menor teor de defesas antioxidantes (como os níveis de GSH) encontradas neste órgão em comparação com outros tecidos (DRINGEN, 2000).

Dentre as células corticais, os neurônios possuem menores concentrações de GSH quando comparado às células astrogliais (LANGEVELD et al, 1996). Em culturas mistas, as células astrogliais exercem um importante papel sobre homeostase cerebral da GSH e na proteção do cérebro contra xenobióticos e estresse oxidativo, pois protegem outros tipos de células neurais contra a toxicidade de compostos reativos através do fornecimento de precursores de GSH às células vizinhas (DRINGEN, 2000). Neste estudo, foram adicionadas às culturas agentes antimitóticos específicos, com o objetivo de impedir a astrogênese e consequente minimização da proteção celular ao estresse oxidativo pela GSH (SUÑOL, 2008), o que ficaria em evidencia especialmente com tratamentos mais prolongados.

Interessantemente, tem sido demonstrado, tanto em modelos clássicos de estresse oxidativo *in vitro* (TRIPATHY & GAMMAS, 2009 a,b) como de doenças neurodegenerativas *in vivo* (MAHARAJ et al, 2004) que baixas concentrações/doses relativas de paracetamol podem apresentar o efeito oposto no SNC, ou seja, um efeito protetor antioxidante. Entretanto, nossos resultados não evidenciaram este efeito antioxidante do paracetamol e do ortobenzamol quando as células foram desafiadas com peróxido de hidrogênio (Figura 5). Embora tenha sido utilizada a mesma concentração do paracetamol (100 µM) descrita previamente com atividade antioxidante (TRIPATHY & GAMMAS, 2009a,b), os estudos prévios *in vitro* diferem deste quanto ao animal utilizado para obtenção das células, tempo de maturação das células para o experimento, tempo de exposição da droga e/ou tipo de célula.

Apesar da grande quantidade de informação que pode ser obtida a partir de culturas isoladas, não pode ser descartada a necessidade dos modelos *in vivo*, devido às limitações inerentes aos estudos *in vitro*. Assim, os camundongos são uma espécie comumente utilizada para avaliações biológicas, pois compartilha com os humanos razoável consistência genética (BANKER & GOSLIN, 1991).

Para avaliar adequadamente a toxicidade *in vivo* entre o paracetamol e o ortobenzamol, utilizou-se as doses eficazes de cada droga. Assim, todos os resultados obtidos foram comparados a partir da dose capaz de produzir 50% de efeito terapêutico em uma população (DE₅₀) de cada droga.

O valor de DE₅₀ correlaciona a potência da droga para uma dada resposta. Quanto menor a DE₅₀, maior é a potência. Esta última representa um parâmetro farmacológico importante no desenvolvimento de novos fármacos.

A DE₅₀ do paracetamol (127 mg/kg; Figura 6) determinada neste estudo através do teste de contorções abdominais, foi superior a DE₅₀ descrita previamente para o ortobenzamol (22,5 mg/Kg) neste mesmo teste (QUEIROZ et al, 2012). As DE₅₀ de cada droga foram determinadas em condições experimentais semelhantes. Sendo assim, o ortobenzamol é 5,65 vezes mais potente que o paracetamol, reafirmando o grande potencial do ortobenzamol em ser um fármaco analgésico.

No nosso trabalho, o modelo murino foi exposto a doses acima do limite da ação terapêutica esperada (até 10 vezes a DE₅₀) de cada fármaco, possibilitando identificar riscos em potencial e estabelecer os efeitos tóxicos dos fármacos.

Como realizado *in vitro*, também *in vivo*, avaliou-se um importante mecanismo mediador da toxicidade do paracetamol, o estresse oxidativo. Este foi avaliado no cérebro (com o intuito de comparar com os dados *in vitro*) e no fígado (principal órgão-alvo da

toxicidade do paracetamol) pela quantificação da peroxidação lipídica, um método direto, cuja intensidade indica o potencial citotóxico das drogas em causar alterações celulares que podem ser encontradas em diversas doenças. A peroxidação lipídica está estreitamente relacionada com o dano tecidual causado pelo paracetamol e, o malondialdeído, é um bom indicador da sua intensidade (GAMALEL - DIN et al, 2003; SENER et al, 2005).

Quando o estresse oxidativo cerebral foi avaliado *in vivo*, através dos níveis de malondialdeído, não foi observada indução de peroxidação lipídica em doses testadas até 10 vezes acima da DE₅₀ de cada droga (Figura 7, acima), sugerindo baixa citotoxicidade. Esse resultado *in vivo* foi especialmente interessante para o ortobenzamol devido a que, comparado ao paracetamol, ele apresenta ação terapêutica central mais potente sendo importante testar a toxicidade nesse órgão.

Por outro lado, a hepatotoxicidade (principal consequência deletéria da toxicidade do paracetamol) foi avaliada *in vivo* através da determinação da peroxidação lipídica, dos níveis de nitritos (indicadores indiretos da produção de óxido nítrico) e de parâmetros clínicos hematológicos.

Neste estudo, apenas as doses 10 vezes superiores a DE₅₀ de paracetamol e do ortobenzamol, provocaram elevação significativa dos níveis de malondialdeído (Figura 7).

Em humanos a toxicidade do paracetamol é bastante comum, e freqüentemente associada com a lesão hepática e renal (NELSON, 1995; GHOSH & SIL, 2007). A produção excessiva de radicais livres que resultam do estresse oxidativo pode danificar diretamente a membrana hepatocelular e nefrocelular, seguida por uma série de cascatas de eventos celulares, tais como a liberação de mediadores inflamatórios e citocinas (JAESCHKE, 2000; HENSLEY et al, 2000; PESSAYRE, 1995).

Ainda, a mitocôndria é o principal alvo da NAPQI (metabólito do paracetamol), cujo dano pode resultar na redução da atividade da Ca²⁺-ATPase e no aumento dos níveis citosólicos de Ca²⁺. Como consequência, há redução da respiração mitocondrial, síntese de ATP e geração de superóxido (JAESCHKE et al, 2003). O superóxido pode reagir com o óxido nítrico e formar peroxinitritos que causam oxidação e nitrosilação de proteínas, intensificando a disfunção mitocondrial. Além disso, o excesso de óxido nítrico depleta a GSH intracelular, aumentando a suscetibilidade ao estresse oxidativo (CLANCY & ABRAMSON, 1995).

Assim, a dose de paracetamol (10x DE₅₀) que provocou um incremento significativo da peroxidação lipídica no tecido hepático (Figura 7, abaixo) também aumentou

significativamente os níveis de nitritos (medida indireta da geração de óxido nítrico) nesse tecido (Figura 8).

O aumento da produção de óxido nítrico pelo paracetamol no tecido hepático é um efeito previamente descrito na literatura. A lesão tecidual pode gerar um processo inflamatório e as células Kupffer, os macrófagos infiltrados, hepatócitos e células renais liberam espécies reativas de oxigênio e grandes quantidades de óxido nítrico, através de mecanismo dependente da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A produção simultânea de óxido nítrico e superóxido durante a inflamação resulta na geração de mais peroxinitritos (HARSTAD & KLAASSEN, 2002; KNOTEK et al, 2001; MICHAEL et al, 1999; YANAGISAWA et al, 1998).

Na mitocôndria, o estresse oxidativo induzido pelo peroxinitrito leva à disfunção mitocondrial, depleção de adenosina trifosfato, transição de permeabilidade e fragmentação do DNA, que contribuem para a necrose hepatocelular (JAESCHKE et al, 2011).

Desta forma, as informações acima mostram que, o aumento da produção do óxido nítrico pelo paracetamol, também é resultante do processo inflamatório causado pela lesão tecidual.

Entretanto, o mecanismo molecular subjacente à lesão hepatocelular induzida pelas duas drogas deste estudo parece ser diferente, pois ao contrário do paracetamol, o ortobenzamol não aumenta a produção de óxido nítrico no tecido hepático (Figura 8).

Isto nos leva a crer que, embora tenha sido observada peroxidação lipídica, a não elevação dos níveis de nitritos no tecido hepático pelo ortobenzamol, pode ser devido à ausência de um processo inflamatório exacerbado como acontece no tratamento com paracetamol. Ainda, também é possível que outros radicais livres estejam mediando a peroxidação lipídica, como por exemplo radicais hidroxila. Estudos adicionais serão necessários para esclarecer melhor o mecanismo molecular do efeito hepatotóxico de elevadas doses de ortobenzamol e as diferenças com aquele do paracetamol.

Adicionalmente, a hepatotoxicidade também foi avaliada neste estudo através de parâmetros hematológicos.

A lesão às células hepáticas causa o extravasamento, através das membranas celulares, de transaminases para a circulação sanguínea. As medições das enzimas hepáticas circulantes no sangue refletem, de forma indireta, a integridade da membrana dos hepatócitos. Assim, os níveis plasmáticos destas enzimas, são indicadores amplamente utilizados para avaliar o risco de hepatotoxicidade (BURKE, 2002).

Em humanos a interpretação dos resultados de testes hepáticos está bem padronizada, a intensidade da elevação plasmática das enzimas hepáticas, assim como, a combinação das enzimas envolvidas, consiste em um parâmetro clínico útil para indicar, por exemplo, necrose dos hepatócitos ou de ductos biliares, assim como presença de colestase (BURKE, 2002).

Infelizmente, em camundongos, valores padrão são divergentes na literatura. Por este motivo, comumente os resultados obtidos são comparados com valores controle do próprio experimento. Entretanto, é possível utilizar o mesmo raciocínio clínico na interpretação dos resultados.

Em nossos resultados, o paracetamol elevou as concentrações plasmáticas da enzima AST, na máxima dose testada, enquanto que para as enzimas ALT e GGT este efeito ocorreu em todas as doses testadas (Figuras 9, 10 e 11)

Por sua vez, as doses testadas do ortobenzamol produziram elevação sérica da enzima ALT e, o aumento dos níveis séricos de GGT foi observado apenas na máxima dose (Figuras 9, 10 e 11).

A enzima ALT está presente em maiores quantidades no fígado e é localizada no citoplasma das células. A localização na fração citosólica do hepatócito permite a sua liberação imediata, mesmo em pequenas alterações na permeabilidade da membrana e, a magnitude pode estar correlacionada com o número de células envolvidas. Elevações dos níveis de ALT estão relacionadas com necrose hepatocelular (BURKE, 2002; OZER et al, 2008).

Os resultados obtidos revelaram que tanto o paracetamol, como o ortobenzamol, foram capazes de elevar os níveis plasmáticos da enzima ALT (Figura 10), e por isso, podemos hipotetizar que este mecanismo pode estar acontecendo com ambas as drogas. Entretanto, a magnitude desse efeito deletério com as doses mais elevadas (10x DE₅₀) foi significativamente menor para o ortobenzamol, demonstrando uma menor toxicidade da droga quando comparada com o paracetamol.

Por sua vez, a AST está presente no fígado, no músculo esquelético e cardíaco, rins e células vermelhas do sangue; em maior quantidade na mitocôndria (80%) e em menor quantidade no citoplasma celular (20%) (BURKE, 2002; OZER et al, 2008).

Somente o paracetamol foi capaz de elevar os níveis plasmáticos desta enzima (Figura 9). Este efeito foi observado na dose que corresponde a 10 vezes a sua DE₅₀. Em presença de hepatotoxicidade induzida por paracetamol, é comum detectar níveis aumentados de AST e ALT no soro (HU et al, 1996; LARSON et al, 2005; GHOSH & SIL, 2007; RAJKAPOOR et al, 2008). Como a maioria da AST circulante é de origem mitocondrial (MORINO et al,

1964), nossos resultados sugerem um maior comprometimento dessa organela com o tratamento do paracetamol.

Adicionalmente, o paracetamol elevou em todas as doses testadas os níveis plasmáticos da enzima GGT (Figura 11). No fígado, a enzima GGT está localizada nos canalículos das células hepáticas e, particularmente, nas células epiteliais que revestem os ductos biliares. O principal valor clínico da avaliação da GGT é no estudo das desordens hepatobiliares, pois o aumento da GGT sérico está associado à doença hepatobiliar, especificamente a colestase intra e extra-hepática (OZER et al, 2008; WORETA & ALQAHTANI, 2014). Desta forma, o efeito observado com o paracetamol neste estudo, seria um indicativo de doença hepatobiliar especialmente considerando que, em humanos, a GGT é elevada em cerca de 90% dos pacientes (McINTYRE, 2004).

Diferentemente, o tratamento com ortobenzamol elevou os níveis plasmáticos de GGT, somente na máxima dose testada (Figura 11), demonstrando menor risco de comprometimento hepatobiliar. A hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol é a principal toxicidade atribuída a este fármaco, a qual pode provocar insuficiência hepática aguda em seres humanos (LARSON et al, 2005). Assim, o conjunto de resultados ora demonstrados, indicam a maior segurança do ortobenzamol ao fígado.

Além da hepatotoxicidade, o paracetamol também é capaz de provocar dano renal, que pode levar à morte. Apesar da nefrotoxicidade ser menos comum do que a hepatotoxicidade, doses tóxicas de paracetamol podem provocar dano tubular renal e insuficiência renal aguda, mesmo na ausência de lesão hepática (CARPENTER & MUDGE, 1981; JONES & VALE, 1993; RAY et al, 1996; WEBSTER et al, 1996; EGUIA & MATERSON, 1997).

Neste contexto, a creatinina é considerada um importante e confiável marcador da função renal e, por este motivo, é muito utilizada para investigar a nefrotoxicidade induzida por fármacos em humanos e em animais. A elevação da concentração de creatinina no sangue pode ser usada como índice de decréscimo da filtração glomerular, observada por comprometimento funcional dos néfrons (ADELMAN et al, 1981).

É conhecido que a nefrotoxicidade induzida pelo paracetamol, pode aumentar os níveis de creatinina no sangue (PRAVEEN et al, 2008; OGUNBAYODE et al, 2010). Neste estudo observou-se que o paracetamol elevou os níveis plasmáticos de creatinina em todas as doses testadas, ao passo que, o ortobenzamol somente apresentou este efeito na máxima dose testada (Figura 12).

Desta forma, este resultado é um indicador de segurança do uso do ortobenzamol para a função renal. Especialmente porque, mesmo em doses terapêuticas, o paracetamol pode

causar nefrotoxicidade diminuindo o fluxo sanguíneo renal, a taxa de filtração glomerular, a excreção de sódio e de prostaglandina E₂, em humanos e animais (PRESCOTT et al, 1989; TRUMPER et al, 1998).

Além disso, os efeitos nefrotóxicos do paracetamol podem ser tanto agudos como crônicos. A toxicidade aguda após a ingestão de altas doses de paracetamol é caracterizada por necrose e danos no túbulo proximal. Enquanto que, a ingestão crônica de doses terapêuticas pode produzir lesão renal, resultando em nefropatia analgésica (BLANTZ, 1996).

O rim não é apenas responsável pela excreção do fármaco inalterado e seus metabólitos, mas também é capaz de realizar reações de biotransformação importantes à homeostase do organismo. Deste modo, cabe destacar a importância clínica deste resultado (significativamente menor nefrotoxicidade com o uso de ortobenzamol quando comparado ao paracetamol), uma vez que a descoberta de fármacos que mantenham a integridade renal constitui um grande avanço científico para a saúde humana.

Assim, a avaliação de parâmetros hematológicos fornece importantes indícios de manifestações tóxicas locais e sistêmicas, podendo auxiliar no diagnóstico e no prognóstico de diversas enfermidades ou exposição a xenobióticos como os fármacos (JAIN, 1993).

Ainda, alterações no número de células circulantes podem indicar o comprometimento da hematopoiese devido a interferências na multiplicação, maturação ou diferenciação celular, processos esses dependentes das células pluripotentes da medula óssea, do microambiente medular e dos fatores reguladores envolvidos (PISONI et al, 2001).

As células sanguíneas exercem função vital, são altamente proliferativas e suscetíveis a intoxicação por xenobióticos e, em conjunto, essas características tornam o sistema hematopoiético um alvo importante para a toxicidade de fármacos (ADENEYE et al, 2008).

Neste estudo, não foram observadas alterações no eritograma após o tratamento com ambas as drogas (Figuras 13 a 19). Logo, a administração aguda do ortobenzamol não provocou danos diretos nas células sanguíneas da série vermelha, na medula óssea ou anormalidades na absorção ou incorporação de nutrientes necessários para a eritropoiese, em grau suficiente para causar anemia detectável. Assim, o ortobenzamol, nas doses testadas (até 10x DE₅₀) não apresentou toxicidade aguda para o equilíbrio fisiológico do sistema hematopoiético.

Diferentemente, a contagem de células brancas demonstrou a diminuição de leucócitos (granulócitos, monócitos e linfócitos) no sangue, provocada por ambas as drogas (Figuras 20 a 23). Esta alteração resulta do recrutamento de leucócitos para um foco inflamatório como resposta fisiológica de defesa e de reparação do dano tecidual, a inflamação.

Como descrito, o mecanismo de hepatotoxicidade induzido pelo paracetamol envolve eventos intracelulares, incluindo a formação de um metabólito reativo (NAPQI), o esgotamento de GSH e formação de aduto de proteína, o que inicia um estresse oxidativo mitocondrial e formação de peroxinitrito. Estes dois últimos são responsáveis pela transição da permeabilidade da membrana, fragmentação do DNA nuclear e morte celular por necrose (JAESCHKE et al, 2012).

Posteriormente, há ativação dos macrófagos residentes (células de Kupffer) com formação citocinas e quimiocinas e, recrutamento de neutrófilos e monócitos para o fígado. Os macrófagos derivados de monócitos e, potencialmente, os neutrófilos irão atuar na remoção de detritos de células necróticas e na promoção da proliferação de hepatócitos (JAESCHKE et al, 2012).

Embora este seja o primeiro estudo toxicológico realizado sobre o ortobenzamol, em estudo prévio, foi demonstrado que o ortobenzamol exerce ação anti-inflamatória, inibindo a migração de neutrófilos, para a cavidade abdominal de ratos em resposta ao estímulo induzido pela carragenina (QUEIROZ et al, 2012). Considerando que os neutrófilos são o tipo mais comum de leucócitos (cerca de 50-70% destas células) (QUINN & GAUSS, 2004), essa inibição da migração de neutrófilos poderia estar contribuindo à menor diminuição destes com o ortobenzamol, quando comparado ao paracetamol.

Os linfócitos fazem parte da resposta imunológica adaptativa que atua de forma mais eficiente e específica. Durante o desenvolvimento de doença hepática inflamatória, há recrutamento intenso de linfócitos e, a localização intra hepática de infiltrados de linfócitos, pode determinar a natureza e a severidade da doença (LALOR et al., 2002; Oo & ADAMS, 2010).

Interessantemente, a diminuição de linfócitos verificada com o uso de ortobenzamol foi menor quando comparada àquela produzida pelo paracetamol (Figura 21), o que indicaria que o ortobenzamol estaria provocando um processo inflamatório de menor magnitude e por isso, com menos consequências tóxicas.

Outra importante componente sanguíneo de defesa avaliada neste estudo foram as plaquetas. Estas células têm como função atuar no controle da coagulação sanguínea e homeostasia e, quando reduzidas em números ou função, aumenta consideravelmente o risco de sangramento (GREENBERG & KALED, 2013).

O plaquetograma realizado neste estudo, demonstrou a diminuição da concentração de plaquetas com todas as doses testadas de paracetamol (Figura 24). Ainda, a distribuição do

volume plaquetar (Figura 25) também apresentou diminuição com esta droga. Este efeito não foi observado com o ortobenzamol.

A literatura registra que, em humanos, é comum observar um processo de trombocitopenia (plaquetas < 150.000) quando há hepatotoxicidade grave por paracetamol e falência hepática aguda (FISCHEREDER & JAFFE, 1994; SCHIØDT et al, 1995; LEE & SCHIØDT, 1999; MAHAJAN & LAT, 2010; BERNAL et al, 2010). A trombocitopenia ocorre em 70% dos pacientes com falência hepática aguda, cuja patogênese não está esclarecida (BERNAL et al, 2010; MAHAJAN & LAT, 2010). De forma rara, alguns casos de trombocitopenia associados ao uso de paracetamol em humanos, podem ocorrer por mecanismos imunogênicos (em doses tóxicas e terapêuticas); por efeito tóxico direto do paracetamol na medula óssea e por síndrome de coagulação intravascular disseminada (BIHARI et al, 1985; KORNBERG & POLLIACK, 1978; SCHEINBERG, 1979; FISCHEREDER & JAFFE, 1994; BOUGIE & ASTER, 2001; BOUGIE et al, 2007).

Embora não tenham sido encontrados valores exatos que determinem a trombocitopenia em camundongos, as informações da literatura descritas acima, mostram que a diminuição de plaquetas pode estar envolvida em processos patológicos graves. Os resultados obtidos demonstram que o paracetamol está diminuindo um importante mecanismo de defesa, enquanto que o ortobenzamol não apresenta este efeito.

Estes dados são especialmente importantes, pois na clínica, o paracetamol é comumente utilizado para alívios da dor e febre ocasionadas pela dengue, doença viral transmitida por mosquito mais importante no mundo (SENEVIRATNE et al, 2006). A infecção gerada pode ser assintomática ou apresentar formas mais graves como a febre hemorrágica da dengue ou síndrome do choque da dengue. A característica fisiopatológica envolve o extravasamento do plasma como resultado do aumento da permeabilidade vascular. Essa característica permite eventos hemorrágicos seguidos de hipoalbuminemia ou hipoproteinemia, trombocitopenia, desequilíbrio da hemostase e, geralmente, evidência de dano hepático indicado por um aumento da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (SENEVIRATNE et al, 2006).

Interessantemente, a indicação do paracetamol para combater os sintomas da dengue, foi atribuída pelo risco de sangramento que os anti-inflamatórios não esteroidais apresentam (em decorrência de alterarem a agregação plaquetária) e pelo risco de agranulocitose causado pela dipirona, droga já proibida em alguns países (WHO, 2009).

Diante do consumo excessivo de paracetamol, associado aos agravos em comum que ele apresenta com a doença, o ortobenzamol poderia vir a ser uma alternativa segura, inclusive, para a dor oriunda da dengue.

Apoiando esta hipótese, a administração oral de 2.000 mg/kg para a avaliação de toxicidade aguda, não resultou na morte de nenhum animal tratado com ortobenzamol (Figura 27).

Além disso, o ortobenzamol demonstrou não induzir alterações comportamentais. Nenhum sinal visível de toxicidade foi registrado durante o período de observação (14 dias consecutivos). Isto indica que o ortobenzamol é bem tolerado por via oral, não interferindo na coordenação motora e nos reflexos. Além de não influenciar em outras atividades fisiológicas relacionadas com o Sistema Nervoso Central (como tremores, convulsões, hipnose, anestesia), ou com o Sistema Nervoso Autônomo (como lacrimação, respiração, cianose, ptose, salivação, micção, piloereção, hipotermia).

Diferentemente, esta dose foi capaz de causar a morte de todos os animais tratados com paracetamol, em até 12 horas após a administração. Em adição, também foram registradas alterações comportamentais (piloereção, esturpor e isolamento do grupo) nesse grupo, durante as primeiras 4 horas de observação.

O paracetamol apresenta a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (BESSEMS e VERMEULEN, 2001) e, há evidências em humanos, que doses tóxicas do paracetamol podem provocar encefalopatia hepática (COLTART et al, 2013). A encefalopatia hepática é uma síndrome neuropsiquiátrica associada com a lesão hepática aguda ou crônica. A insuficiência hepática aguda pode culminar rapidamente no desenvolvimento de edema cerebral e hipertensão intracraniana em até 25% de casos. Apresenta desde sutis anormalidades na função neurocognitiva até a letargia, inversão do ciclo sono-vigília, confusão, estupor e coma (COLTART et al, 2013).

Embora estudos adicionais sejam necessários para afirmar a presença de encefalopatia hepática com a superdosagem paracetamol no nosso modelo e, descartá-la no caso do tratamento com ortobenzamol, a ausência de alterações comportamentais associadas à administração de 2000 mg/kg de ortobenzamol fornece um prognóstico positivo quanto a administração aguda desta droga.

Este fato, em conjunto com a ausência de mortalidade registrada com este tratameto, deixa claramente demonstrada a maior segurança do ortobenzamol, quando comparada com a toxicidade do paracetamol.

Nossos resultados se tornam especialmente importantes quando consideramos também a importância clínica do paracetamol. Este medicamento globalmente muito utilizado como analgésico e antipirético, é considerado como primeira escolha para o tratamento da dor leve e moderada (PREESCOOTT, 2000a). Além disso, pacientes com câncer em quimioterapia, geralmente recebem altas doses de paracetamol para o alívio da dor (INTHISHAM et al, 2009).

Entretanto, o uso indevido deste medicamento, através da ingestão intencional ou acidental de doses supraterapêuticas, geralmente levam à necrose hepática e nefrotoxicidade (BOND et al, 2003). Estudos epidemiológicos têm mostrado as consequências desta toxicidade. A taxa de internação por toxicidade acidental ou intencional por paracetamol é estimada em mais de 26.000 casos por ano (NOURJAH et al, 2006), sendo considerado como a principal causa de insuficiência hepática (LARSON et al, 2005), de transplante hepático (NOURJAH et al, 2006) e, muitas vezes usadas em tentativas de suicídios (WATSON et al, 2003).

Atualmente, as lesões hepáticas e renais induzida por fármacos se tornaram um grande problema clínico. Extensos estudos têm sido realizados nas últimas décadas e, os mecanismos precisos de hepatopatia e nefrotoxicidade induzidos por fármacos são gradualmente elucidados. Assim, a busca por alternativas terapêuticas eficazes e seguras contra a lesão provocada no fígado ou nos rins é fundamental e de grande importância.

Diante do reconhecimento de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade associadas ao uso do paracetamol, esforços científicos que possam disponibilizar uma opção segura a este problema possuem relevante contribuição para a saúde pública.

Nesse sentido, o ortobenzamol possui propriedades analgésicas e antiinflamatórias mais potentes que o paracetamol em modelos *in vivo* de nocicepção e inflamação (QUEIROZ et al, 2012). Os ensaios realizados em modelos *in vivo* neste estudo conferem ao ortobenzamol ausência de neurotoxicidade, menor potencial hepatotóxico e hematotóxico (principalmente sobre as plaquetas), ausência de nefrotoxicidade e, ainda, foi classificado como um xenobiótico de baixa toxicidade após a avaliação da toxicidade aguda. Assim, o ortobenzamol apresentou maior segurança contra as principais toxicidades atribuídas ao paracetamol.

Portanto, os resultados demonstrados nesta pesquisa em associação aos dados prévios apresentados sobre o ortobenzamol, indicam que este análogo poderá contribuir para o desenvolvimento de uma potente e segura alternativa terapêutica ao paracetamol.

6 CONCLUSÃO

A toxicidade avaliada neste estudo, em modelos *in vitro* e *in vivo*, demonstrou que o ortobenzamol apresenta maior segurança quando comparado ao paracetamol. Os resultados obtidos atribuem ao ortobenzamol ausência de neurotoxicidade, menor potencial hepatotóxico e hematotóxico (principalmente sobre as plaquetas) e, ausência de nefrotoxicidade nas doses testadas. Adicionalmente, a avaliação da toxicidade aguda do ortobenzamol permitiu classificá-lo como um xenobiótico de baixa toxicidade.

Portanto, o ortobenzamol pode ser considerado como uma futura alternativa terapêutica segura ao paracetamol, no tratamento da dor e inflamação.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, F. V.; HELLEMANS K. G. C. Phenacetin, acetaminophen and dipyron: analgesic and rewarding effects. **Behavioural Brain Research**. v.112, p. 177–186, 2000.
- ABRAMSON, S. R.; WEISSMANN, G. The mechanisms of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Rheum**. v.32, p. 1–9, 1989.
- ADELMAN, R.D.; SPANGLER, W.L; BEASOM, F.; ISHIZAKI, G.; CONZELMAN, G. M. Frusemide enhancement of neltimicin nephrotoxicity in dogs. **J Antimicrob Chemoth**. v.7, p.431 – 435, 1981.
- ALBANO E.; RUNDGREN M.; HARVISON P.J.; NELSON S.D.P. MOLDEUS,P. Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. **Mol. Pharmacol**.v.28, p. 306, 1985.
- ALHAIDER, A. A. Antinociceptive effect of ketanserin in mice: Involvement of supraspinal 5-HT 2 receptors in nociceptive transmission. **Brain Res**. v.543, 335, 1991.
- AL-SWAYEH, A.; FUTTER, E.; CLIFFORD, H.; MOORE, K. Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and antinociceptive activity.**Br. J. Pharmacol**, v.130, p. 1453–1456, 2000.
- ARONOFF, D.; OATES, J.; BOUTAUD, O. New insights into the mechanism of action of acetaminophen: its clinical pharmacological characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H2 synthases. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. v.79, 9–19, 2006.
- BANKER, G.; GOSLIN, K. Culturing nerve cells, Cambridge, Massachusetts, MIT Press 1991; Cap. 2 Types of nerve cell cultures, their advantages and limitations: 11-40; Cap. 3 Primary dissociated cell cultures of neural tissue: 41-71.
- BANNWARTH, B.; MEMOTES-MAINARD, F.; SCHAEVERBEKE, T.; LEBAT, L.; DEHAIS,J. Central analgesic effects of aspirin-like drugs. **Fundam. Clin. Pharmacol**. 9, 1 - 7, 1995.
- BARBER, A. D. e HARRIS, S. R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Amer. Pharm**. v.34, p.26-35, 1994.
- 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**. v.46, p.841-849, 1993.
- BARREIRO, E. J.; VIEGAS JÚNIOR, C.; DA SILVA, V. Os produtos naturais e química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, p. 326-337, 2006.
- BECKE, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. **J. Chem. Phys**. v.98, p.1372-1377, 1993.
- BENZIE, I. F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut**. 47: 233-261, 1996.
- BERGMAN, K.; MÜLLER, L.; TEIGEN, S.W. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re)view. **Mutation Research**. v.349. p. 263-288, 1996.

BERNAL, W.; AUZINGER, G.; DHAWAN, A.; WENDON, J. Acute liver failure. **Lancet**. v. 376, p. 190–201, 2010.

BERTOLINI, A.; FERRARI, A.; OTTANI, A.; GUERZONI S.; TACCHI R.; LEONE S.; Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. **CNS Drug Reviews**, v. 12, p.250-275, 2006.

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**. v.28, p.855–875, 1998.

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**. v.98, p. 237-250, 1995.

BESSEMS, M.; VERMEULEN, E. Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches **Critical Reviews in Toxicology**. v.31, p.55–138, 2001.

BIHARI, D.; GIMSON, A.E.; WATERSON, M.; WILLIAMS, R. Tissue hypoxia during fulminant hepatic failure. **Crit Care Med**. v.13, p.1034-1039, 1985.

BILINSKI, T.; LITWINSKA, J.; BLASZCZYNSKI, M.; BAJUS, A. Superoxide dismutase deficiency and the toxicity of the products of auto-oxidation of polyunsaturated fatty acids in yeast. **Biochem. Biophys. Acta**. v.1001, p.102-106, 1989.

BLANTZ, R. C. Acetaminophen: Acute and chronic effects on renal function. **Am. J. Kidney Dis**. v.28, p3–6, 1996.

BOCK, K. W.; FORSTER, A.; GSCHAIEMEIER, H.; BRÜCK, M.; MÜNDEL, P.; SCHARECK, W.; FOURNEL-GIGLEUX, S.; BURCHELL, B. Paracetamol glucuronidation by recombinant rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferases. **Biochem. Pharmacol**. v.45, p. 1809–1814, 1993.

BOND, G.R.; WIEGAND, C.B; HITE, L.K. The difficulty of risk assessment for hepatic injury associated with supra-therapeutic acetaminophen use. **Vet Hum Toxicol**. v.45, p.150-153, 2003.

BORGES, R.S. **Planejamento, síntese e avaliação antioxidante de inibidores fenólicos da PGES derivados da associação p-aminofenol e salicilatos**. 2007. 140 p. Tese de doutorado (doutorado em Biologia Celular e Neurociências)- Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Belém, 2007.

BOSCH, M. E.; SÁNCHEZ, A. J. R.; ROJAS F. S.; OJEDA, C. B. Determination of paracetamol: Historical evolution. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v. 34, p.177–186, 2009.

BOTTING, R. COX-1 and COX-3 inhibitors. **Thrombosis Res**. v. 110, p. 269 -272, 2003.

BOTTING, R.; AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol / acetaminophen. **Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids**. v. 72, p.85–87, 2005.

BOUGIE, D. W.; BENITO, A. I.; SANCHEZ-ABARCA, L. I.; TORRES, R.; BIRENBAUM, J.; ASTER, R. H. Acute thrombocytopenia caused by sensitivity to the glucuronide conjugate of acetaminophen. **BLOOD**. v. 109, p.3608-09, 2007.

BOUGIE, D.; ASTER, R. Immune thrombocytopenia resulting from sensitivity to metabolites of naproxen and acetaminophen. **BLOOD**. v. 97, p. 3846-50, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria GM nº. 3916. Política Nacional de Medicamentos**. Brasília. Centro de Documentação. 1998. 40p.

BRIAN J. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. **Pediatric Anesthesia**, v.18, p. 915–921, 2008.

BRIVIBA, K.; FRASER, G.; SIES, H.; KETTERER, B. Distribution of the monochlorobimane–glutathione conjugate between nucleus and cytosol in isolated hepatocytes. **Biochem. J.** v. 294, p. 631–633, 1993.

BRUNE K.; HINZ B.; OTTERNESS, I. Aspirin and Acetaminophen: Should They be Available Over the Counter? **Current Rheumatology Reports**, v. 11, p. 36–40, 2009.

BURKE, M. D. Liver function: test selection and interpretation of results. **Clin Lab Med**. v.22, p. 377–390, 2002.

CABISCOL, E.; PIULATS, E.; ECHAVE, P.; HERRERO, E.; ROS, J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** v.35, p. 93–98, 2000.

CARLSSON, K. H.; MONZEL, W.; JURNA, I. Depression by morphine and the non-opioid analgesic agents, metamizol (pyrone), lysine acetylsalicylate and paracetamol of activity in rat thalamus neurons evoked by electrical stimulation of nociceptive afferents. **Pain**. v.32, p.313–326, 1988.

CARPENTER, H. M., & MUDGE, G. H. Acetaminophen nephrotoxicity: studies on renal acetylation and deacetylation. **J Pharmacol Exp Ther**. v.218, p.161, 1981.

CHIRICO, S.; SMITH, C.; MARCHANT, C.; MITCHINSON, M.J.; HALLIWELL, B. Lipid peroxidation in hyperlipidemic patients. A study of plasma using a HPLC-based thiobarbituric acid test. **Free Radical Res. Comm.**v.19, p.51-57, 1993.

CHISOLM, G.M. e STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: a overview. **Free Radical Biol. Med.** v.28, p.1815-1826, 2000.

CLANCY, R. M. & ABRAMSON, S. B. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.210, p. 93–101. , 1995.

COFFEY, M.J.; COLES, B.; O'DONNELL, V.B. Interactions of nitric oxide-derived reactive nitrogen species with peroxidases and lipoxygenases. **Free Radic. Res.** v.35, p. 447-464, 2001.

COLTART, I.; TRANAH, T. H.; SHAWCROSS D. L. Inflammation and hepatic encephalopathy. **Arch Biochem Biophys.** v.536, p.189–196, 2013.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v. 24, p. 950-954, 1992.

CORLEY, G.; RAWLS, S. M. Opioid, cannabinoid CB1 and NOP receptors do not mediate APAP-induced hypothermia in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v. 92, p.503–507, 2009.

COVER, C.; MANSOURI, A.; KNIGHT, T. R.; BAJT, M. L.; LEMASTERS, J. J.; PESSAYRE, D.; JAESCHKE, H. Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 315, p. 879–887, 2005.

CRESPO, E.; MACIAS, M.; POZO, D.; ESCAMES, G.; MARTIN, M.; VIVES, F.; GUERRERO, J. M.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. **FASEB J.** v.13(12), p.1537-1546, 1999.

DAHLIN, C.; MIWA, T.; LU, Y.; NELSON, S. N-acetyl-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**, v.81, p.1327- 1331, 1984.

DANI, M.; GUINDON, J.; LAMBERT, C.; BEAULIEU, P. The local antinociceptive effects of paracetamol in neuropathic pain are mediated by cannabinoid receptors. **European Journal of Clinical Pharmacology.** v. 573, p. 214–215, 2007.

DEVI, K. P.; SREEPRIYA, M.; BALAKRISHNA, K.; DEVAKI, T. Protective effect of Premna tomentosaextract (L. verbanacae) on acetaminophen-induced mitochondrial dysfunction in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry.** v.272, p.171–177, 2005.

DICKINSON, D.A. e FORMAN, H.J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Bioch. Pharmacol.** v.64, p. 1019-1026, 2002.

DINIZ, J. E. M., BORGES, R. S., NAHUM, C. N. A DFT study for paracetamol and 3,5-disubstituted analogues . **J Mol Struct (TheoChem).** v.673, p.93-97, 2004.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol.** v.62, p. 649-671, 2000.

DUFFY, J.R.; DEARDEN, J.C.; ROSTRON, C. Design, synthesis and biological testing of a novel series of anti-inflammatory drugs. **Pharm. & Pharmacol.** v.53, p.1505-1514, 2001.

DUGGAN, S. T.; SCOTT, L. J. Intravenous Paracetamol (Acetaminophen). **Drugs.** v.69 (1), p.101-113, 2009.

EGUIA, L. & MATERSON, B.J. Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. **Pharmacotherapy.** v.17, p. 363–370, 1997.

EIDE, P. K.; HOLE, K. Different role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in spinal cord in the control of nociceptive responsiveness. **Neuropharmacology**. v.30, p. 72-77, 1991.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipidic peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonanal. **Meth. Enzymol.** v. 186, p. 407-421, 1990.

ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biol. Med.**,v.13, p.341-390, 1992.

ESTERBAUER, H.; LANG, J.; ZADRAVEC, S.; SLATER, T.F. Detection of malonaldehyde high-performance liquid chromatography. **Methods Enzymol.** v.105, p.319-328, 1984.

FARINA, M.; CAMPOS, F.; VENDRELL, I.; BERENQUER, J.; BARZI, M.; PONS, S.; SUÑOL, C. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. **Toxicol. Sci.** v.112, p. 416-426, 2010.

FINKEL, T. e HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v.408, p.239, 2000.

FISCHEREDER, M.; JAFFE, J.P. Thrombocytopenia following acute acetaminophen overdose. **Am. J. Hematology**. 45: 258–259, 1994.

FLOUVAT, B.; LENEVEU, A.; FITOUSSI, S.; DELHOTAL-LANDES B.; GENDRON, A. Bioequivalence study comparing a new paracetamol solution for injection and propacetamol after single intravenous infusion in healthy subjects. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**. v.42, p. 50–7, 2004.

FLOYD, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*. v. 222, p.236–245, 1999.

FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*. 4: 2587-2597, 1990.

FONTANA R. Acute Liver Failure Including Acetaminophen Overdose. **Med Clin N Am**, v. 92, p.761–794, 2008.

FREIRE, A.D.T.; LANDIVAR, L.M.C.; QUEIROZ, A.N.; BORGES, R.S. A theoretical study for oxidative metabolism of salicylates. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**. v.6, p.1140-1142, 2009.

GÁBOR, M. The mouse ear as a model for cutaneous irritation. **J. Toxicol. cut. & ocular toxicol.** v. 21, p. 191–202, 2002.

GAMALEL-DIN, A. M.; MOSTAFA, A. M.; AL-SHABANAH, O. A.; AL-BEKAIRI, A. M.; NAGI, M. N. Protective effect of Arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Pharmacol Res.** v.48, p. 631–635, 2003.

GARDNER, C.R.; HECK, D.E.; YANG, C.S.; THOMAS, P.E.; ZHANG, X.J.; DEGEORGE, G.L.; LASKIN, J.D.; LASKIN, D.L. Role of nitric oxide in acetaminophen induced hepatotoxicity in the rat. **Hepatology**. v.27, p.748–754. 1998.

GHOSH, A. & SIL, P. C. Anti-oxidative effect of a protein from *Cajanus indicus* Lagainst acetaminophen-induced hepato-nephro toxicity. **J Biochem Mol Biol.** v.40, p.1039, 2007.

GHOSH, J.; DAS, J.; MANNA, P.; SIL, P.C. Arjunolic acid, a triterpenoid saponin, prevents acetaminophen (APAP)-induced liver and hepatocyte injury via the inhibition of APAP bioactivation and JNK-mediated mitochondrial protection. **Free Radic Biol Med.** v.48, p.535-53, 2010.

GILBERT, H.F. e MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.** v.63, p. 69-172,1990.

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**, v.1058, p. 191–196, 2004.

GODFREY L.; BAILEY I.; NICK J.; TOMS B.; GEOFFREY D.; CLARKE C.; KITCHEN A.; SUSANNA O.; HOURANI A. Paracetamol inhibits nitric oxide synthesis in murine spinal cord slices. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, p. 68–71, 2007.

GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G. Pratical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research**, v. 455, p. 21-28, 2000.

GOMES, A.Q.B.; QUEIROZ, A.N.; BORGES, R.S. A theoretical study of resveratrol oxidation.**Journal of Computacional and Theoretical Nanoscience.** v.6, p. 1637-1639, 2009.

GRAHAM, G.; SCOTT, K. Mechanism of action of paracetamol. **American Journal of Therapeutics.** v. 12, p.46–55, 2005.

GRAHAM, G.G.; DAY, R.O.; MILLIGAN, M.K.; ZIEGLER, J.B.; KETTLE, A.J. Current concepts of the actions of paracetamol (acetaminophen) and NSAIDs. **Inflammopharmacology.**v. 7, p. 255-263, 1999.

GREEN, L. C.; RUIZ DE LUZURIAGA, K.; WAGNER, D.A. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**v. 78, p.7764–7768, 1981.

GREENBERG, E. M. & KALED, E. S. Thrombocytopenia. **Crit Care Nurs Clin N Am.** v.25, p. 427–434, 2013.

GRIFFITHS R. J.; WOOD B. E.; BLACKHAM S. L.; BLACKHAM A. Pharmacological modification of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammation and epidermal cell proliferation in mouse skin. **Agents and Actions.** v. 25, p.3-4, 1988.

GUTIERREZ, P.L. The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. **Front in Biosc.** v.5, p.629–638, 2000.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis.** v.23, p.118-26, 1993.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M.V.; LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body.**FEBS Lett.** v.486, p.10–13, 2000.

HANEL, A. M.; LANDS, W. E. M. Modification of anti-inflammatory drug effectiveness by ambient lipid peroxides. **Biochem Pharmacol.** v.31, p.3307–3311, 1982.

HANNEMANN, F.; BICHET, A.; EWEN, K.M.; BERNHARDT, R. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1770(3), p. 330-344, 2007.

HANTSON; DE SAINT-GEORGES, L.; MAHIEU, P.; LÉONARD, E.D.; CRUTZEN-FAYT, M.C.; LÉONARD, A. Evaluation of the ability of paracetamol to produce chromosome aberrations in man. **Mutation research.** v. 398, p. 293-300, 1996.

HARSTAD, E.B. & KLAASSEN, C. D. iNOS-null mice are not resistant to cadmium chloride-induced hepatotoxicity. **Toxicology.** v.175, p.83–90, 2002.

HART, S. G.E.; BEIERSCHMITT, W. P.; WYAND, D. S.; KHAIRALLAH, E. A.; COHEN, S.D. Acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice. I. Evidence of a role for in situ activation in selective covalent binding and toxicity. **Toxicol Appl Pharma.** v.126, p.267–275, 1994.

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.

HAZAI E.; VERECZKEY L.; MONOSTORY K. Reduction of toxic metabolit formation os acetaminophen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, p. 1089-1094, 2002.

HEHRE, W.J.; RADOM, L.; SCHLEYER, P.V.R.; POPLE, J.A. **Ab Initio Molecular Orbital Theory.**Wiley: New York, 1986.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K.; GABBITA, S.P., SALSMAN, S., FLOYD, R.A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Bio Med.** v.28, p.1456–1462, 2000.

HINSON, J.A.; ROBERTS, D.W.; BENSON, R.W.; DALKHOFF, K.; LOFT, S.; POULSEN, H.E. Mechanism of paracetamol toxicity. **Lancet.** v. 335, p.732, 1990.

HOGESTATT, E. D.; JONSSON, B.; ERMUND, A.; ANDERSSON, D. A.; BJÖRK, H.; ALEXANDER, J. P.; CRAVATT, B.F. ; BASBAUM, A.L.; ZYGMUNT P. M. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. **Journal of Biological Chemistry.** v.280, p.31405–12, 2005.

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.

HU, J. J.; YOO, J.S.H.; LIN, M.; WANG, E.J.; YANG, C.S. Protective effects of diallyl sulfide on acetaminophen-induced toxicities. **Food Chem Toxicol.** v.34, p.963–969, 1996.

HUBER, C.; BARTHA, B.; HARPAINNER, R.; SCHRÖDER, P. Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants—two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. **Environ Sci Pollut Res.** v.16, p. 206–213, 2009.

INTHISHAM, N.; THANIKACHALAM, P.; JOHN, J.; IGNACIO, S. Reduced exposure of imatinib after coadministration with acetaminophen in mice. **Indian J. Pharmacol.** v.41, p.167–172, 2009.

ISIK, B.; BAYRAK, R.; AKCAY, A.; SOGUT, S. Erdosteine against acetaminophen induced renal toxicity. **Molecular and Cellular Biochemistry.** v.287, p.185–191, 2006.

JAESCHKE, H.; MCGILL, M.R.; WILLIAMS, C.D.; RAMACHANDRAN, A. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity—a clinically relevant model to test the efficacy of natural products. **Life Sci.** v.88, p.737–745, 2011.

JAESCHKE, H. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 255, p. 935–941, 1990.

JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. **J. Gastroenterol. Hepatol.** v.15, p.718–724, 2000.

JAESCHKE, H.; BAJT, M. L. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. **Toxicol. Sci.** v.89, p. 31–41, 2006.

JAESCHKE, H.; GORES, G. J.; CEDERBAUM, A. I.; HINSON, J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of Hepatotoxicity. **Toxicol Sci.** v. 65, p.166 –176, 2002.

JAESCHKE, H.; KNIGHT, T. R.; BAJT, M. L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicol. Lett.** v. 144, p. 279–288, 2003.

JAESCHKE, H.; WILLIAMS, C. D.; RAMACHANDRAN, A.; BAJT, M.L. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. **Liver Int.** v.32, p. 8–20, 2012.

JAIN, N. C.; **Essentials of veterinary hematology.** Philadelphia: Lea e Febiger 1993.

JAMES L.; MAYEUX R.; HINSON J. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug metabolism and disposition,** v. 31, p.1499–1506, 2003.

JENSEN S.; VALENTINE J.; MILNE W.; EVANS 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,** v.34, p. 585–593, 2004.

JONES, A. F. & VALE, J.A. Paracetamol poisoning and the kidney. **J Clin Pharm and Ther.** v.18, p.5–8, 1993.

JONES, A. L. Mechanism of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. **J toxicol.**v.36, p. 277-85, 1998.

JOSHI, M. & TYNDALE, R. F. Induction and recovery time course of rat brain cyp2e1 after nicotine treatment. **Drug Metab Dispos.** v. 34, p. 647–652, 2006.

JUURLINK, B. H. J. & WALZ, W. Neuromethods, vol. 33: **Cell Neurobiology Techniques**. Eds: A.A. Boulton, G.B. Baker, and A. N. Bateson. Human Press Inc. 1985.

KAMINNSKY, H.J.; DEDOISSIS, G.V.Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherosclerosis. **Atherosclerosis.** v.18, p.1-17, 2005.

KANBUR, M.; ERASLAN, G.; BEYAZ, L.; SILICI, S.; LIMAN, B. C.; ALTINORDULU, S.; ATASEVER, A. The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology.** v.61, p. 123–132, 2009.

KAUR, P.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **NeuroToxicology.** v.27, p. 492–50, 2006.

KIS B.; SNIPES J.; BUSIJA D. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. **The Journal of pharmacology and experimental herapeutics,** v.315, p.1-7, 2005.

KNOTEK, M.; ROGACHEV, B.; WANG, W.; ECDER, T.; MELNIKOV, V.; GENGARO, P.E.; ESSON, M.; DINARELLO, C.A.; SCHRIER, R.W. Endotoxemic renal failure in mice: role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase. **Kidney Int.** v.59, p.2243–2249, 2001.

KON, K.; KIM, J. S.; JAESCHKE, H.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. **Hepatology.** v. 40, p.1170–1179, 2004.

KORNBERG, A.; POLLIACK, A. Paracetamol induced thrombocytopenia and haemolytic anaemia. **Lancet.** v. 2, p.1159, 1978.

KOSTER, R., ANDERSON, M., DEBEER, E. J. M. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** v.18, p.412, 1959.

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.** v.2 (1), p.60–66, 1989.

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.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, p. 789-798, 1970.

LALOR, P.F.; SHIELDS, P.; GRANT, A.; ADAMS, D.H. Recruitment of lymphocytes to the human liver. **Immunol. Cell Biol.** v.80, p.52–64, 2002b.

LANGEVELD, C. H.; SCHEPENS, E.; JONGENELEN, C. A. M.; STOOFF, J. C.; HJELLE, O. P.; OTTERSEN, O. P.; DRUKARCH, B. Presence of glutathione immunoreactivity in cultured neurons and astrocytes. **Neuroreport**. v.7, p. 1833-1836, 1996.

LARSON, A.M.; POLSON, J.; FONTANA, R.J.; DAVERN, T.J.; LALANI, E.; HYNAN, L.S.; REISCH, J.S.; SCHIØDT, F.V.; OSTAPOWICZ, G.; SHAKIL, A.O. Acetaminophen induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. **Hepatology**. v.42, p.1364–1372, 2005.

LAZUTKA, J.R.; LEKEVICIUS, R.; DEDONYTE, V.; MACIULEVICIUTE-GERVERS, L.; MIERAUSKIENE, J.; RUDAITIENE, S.; SLAPSYTE, G. Chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in Lithuanian population: effects of occupational and environmental exposures. **Mutat. Res.**v.445, p. 225–239. 1999.

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**. v.37, p.785-789, 1998.

LEE, T.K., O'BRIAN, K., EAVES, G.S., CHRISTIE, K.I AND VARGA, L. Effect of blood storage on radiation-induced micronuclei in human lymphocytes. **Mut. Res.** v.444, p.201-216, 1999.

LEE, W. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: Lowering the Risks of Hepatic Failure. **Hepatology**.v.40, p.6 –9, 2004.

LEE, W. M. Acetaminophen-related acute liver failure in the United States. **Hepatology Research**. v. 38 p.3–8, 2008.

LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical dosage forms – Disperse Systems**. v. 2, 2. ed. Editora Marcel Dekker, p. 399-421, 1996.

LOHR, J.W.; WILLSKY, G.R.; ACARA, M.A. Renal drug metabolism. **Pharmacological Reviews**. v.50, p.107–141, 1998.

MAHAJAN, A.; LAT, I. Correction of Coagulopathy in the Setting of Acute Liver Failure. **Crit Care Nurs Clin N Am**. v.22, p. 315–321, 2010.

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. **Neurochem Int**. v.44, p. 355–360, 2004.

MARSCHALL H.; MARTIN W.; ZOLLNER G.; TRAUNER M. Clinical Hepatotoxicity. Regulation and Treatment with Inducers of Transport and Cofactors. **Mol. Pharmaceutics**,v. 4, p. 895-910, 2007.

MARSHALL, P. J.;KULMACZ, R. J.; LANDS, W. E. M. Constraints on prostaglandin biosynthesis in tissues. **J Biol Chem**. v. 262, p.3510–3517, 1987.

MCINTYRE, N. Clinical Biochemistry of the Liver. **Principles of Medical Biology**. v.15, p.291–316, 2004.

MEOTTI, F. C.; ROSA, J. M.; BAGIO, A. Protective effect crude extract from *Wedelia paludosa* (Asteraceae) on the hepatotoxicity induced by paracetamol in mice. **J Pharm Pharmacol.** v.58, p.137–42, 2006.

MICHAEL, S.L.; PUMFORD, N.R.; MAYEUX, 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.** v.30, p.186–195, 1999.

MICHELI, L.; FIASCHI, A.I.; GIORGI, G.; CERRETANI, D. Modulation of glutathione in various organs of rat induced by acetaminophen. **Eur. J. Pharmacol.** v.183, p. 2444. 1990.

MITCHELL, J. R.; JOLLOU, D. J.; POTTER, W. Z.; GILLETTE, J. R.; BRODIE, B. B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. **J Pharmacol Exp Ther.** v.87, p. 211, 1973.

MOORE P. K.; MARSHALL M. Nitric oxide releasing acetaminophen (nitroacetaminophen). **Digestive and Liver Disease.** v. 35, p. 49-60, 2003.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research.** v.20 (3), p.613-616, 1960.

MORIEL, P.; OKAWABATA, F.S.; ABDALLA, D.S.P. Oxidized lipoproteins in blood plasma: possible marker of atherosclerosis progression. **Life.** v.48, p.413-417,1999.

MORINO, Y.; KAGAMIYAMA, H.; WADA, J. Immunochemical distinction between glutamic-oxalo-acetic transaminases from soluble and mitochondrial fractions of mammalian tissues. **J Biol Chem.** v.239, p.943–4, 1964.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse **In:** WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. *Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols.* Humana Press Inc., Totowa: NJ, v. 225, p.115-121, 2003.

MUNSTERHJELM, E.; MUNSTERHJELM, N.; NIEMI, T. T.; YLIKORKALA, O.; NEUVONEN, P. J.; ROSENBERG, P. H. Dose dependent inhibition of platelet function by acetaminophen in healthy volunteers. **Anaesthesiology.** v.103, p. 712–717, 2005.

MUTLIB, A. E.; GOOSEN, T. C.; BAUMAN, J. N.; WILLIAMS, J. A.; KULKARNI, S.; KOSTRUBSKY, S. Kinetics of acetaminophen glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferases 1A1, 1A6, 1A9 and 2B15. Potential implications in acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Chem. Res. Toxicol.** v.19, p. 701–709, 2006.

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 ¹³C e N-15–NMR relaxation studies. **J. Med. Chem.**v. 37 (6), p. 860–867, 1994.

NELSON, S. D. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. **Drug Metab Rev.** v.27, p.147–177, 1995.

NENCINI, C.; GIORGI, G.; MICHELI, L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. **Phytomedicine**. v. 14, p.129–135, 2007.

NIMMO, J.; HEADING, R.; TOTHILL, P.; PRESCOTT, L. F. Pharmacological modification of gastric emptying: effects of propantheline and metoclopramide on paracetamol absorption. **BMJ**. v.1, p.587–589, 1973.

NOURJAH, P.; AHMAD, S.R.; KARWOSKI, C.; WILLY, M. Estimates of acetaminophen (Paracetamol)-associated overdoses in the United States. **Pharmacoepidemiol. Drug Saf.** v.15, p.398–405. 2006.

OGUNBAYODE, I.; OLUFUNSHO, I.; AWODELE, A. Protective role of ascorbic acid and alpha-tocopherol against acetaminophen-induced nephrotoxicity in rat. **Afr J Pharm Pharmaco.** v.1, p.96–111, 2010.

Oo, Y. H. & ADAMS, D. H. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. **Journal of Autoimmunity** v.34, p.45–54, 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for the Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). Guideline: 425. 2008.

OSCIER, C. D. e MILNER, Q. J. W. Peri-operative use of paracetamol. **Anaesthesia**. v.64, pages 65–72, 2009.

OTTANI, A.; LEONE, S.; SANDRINI, M.; FERRARI, A.; BERTOLINI, A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 531, p. 280–281, 2006.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and a-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**. v.507, p. 253– 259, 2005.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**. v.245, p.194–205, 2008.

PARR, R.G.; YANG, W. **Density Functional Theory of Atoms and Molecules**. Oxford University Press: New York, 1989.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**. v.333, p. 19–39, 2003.

PATTANAYAK1 P.; MAZUMDER P.; SUNITA P. Preliminary studies on antinociceptive activity of *Dendrophthoe falcata (l.f) ettingsh (loranthaceae)*. **Pharmacology on line**, v. 3, p. 370-378, 2008.

PELISSIER, T.; ALLOUI, A.; PAEILE, C.; ESCHALIER, A. Evidence of a central antinociceptive effect of paracetamol involving spinal 5-HT 3 receptors. **Neuroreport**. v.6, p. 1546 -1548, 1995.

PESSAYRE, D. Role of reactive metabolites in drug-induced hepatitis. **J Hepatol**. v.23, 16–24, 1995.

PICKERING, G.; ESTEVE, V.; LORIOT, M. A.; ESCHALIER, A.; DUBRAY, C. Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. v.84, p. 47–51, 2008.

PILETTA, P.; PORCHET, H. C.; DAYER, P. Central analgesic effect of acetaminophen but not of aspirin. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 49, p. 350–354, 1991.

PINI, A.; VITALE G.; OTTANI A.; SANDRINI M. Naloxone-Reversible Antinociception by Paracetamol in the Rat. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.280, p.934–940, 1997.

PISONI, R; RUGGENENTI, P; REMUZZI, G. Drug-induced thrombotic microangiopathy: incidence, prevention and management. **Drug Saf**, v. 24, n. 7, p. 491-501, 2001.

POLLARD, I. Neuropharmacology of drugs and alcohol in mother and fetus. **Semin Fetal Neonat M**. v. 12, p. 106-113, 2007.

PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**. 30-4: 277-290, 1995.

POSADAS, I.; SANTOS, P.; BLANCO, A.; MUÑOZ-FERNANDEZ, M.; CEÑA, V. Acetaminophen Induces Apoptosis in Rat Cortical Neurons. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-14, 2010.

PRESCOTT, L. F. Paracetamol: past, present, and future. **Am J Ther**. v.7, p.143–147, 2000a.

PRESCOTT, F. L. Paracetamol, alcohol and the liver. **J Clin Pharmacol**. v.49, p. 291-301, 2000b.

PRESCOTT, L. F.; STEEL, R. F.; FERRIER, W. R. The effects of particle size on the absorption of phenacetin in man. **Clin Pharmacol Ther**. v.11, p. 496–504, 1970.

PRESCOTT, L.F.; SPEIRS, G.C.; CRITCHLEY, J.A.; TEMPLE, R.M.; WINNEY, R.J. Paracetamol disposition and metabolite kinetics in patients with chronic renal failure. **Eur. J. Clin. Pharmacol**. v.36, p.291–297, 1989.

QUEIROZ, A. N.; GOMES, B. A. Q.; MORAES, W. M.; BORGES, R. S. A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. **Eur J Med Chem**. v.44, p.1644–1649, 2009.

QUEIROZ, L.M.D. **Planejamento, síntese e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do ortobenzamol, análogo do paracetamol**. 2010. 137 p. Dissertação de mestrado (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará. Belém, 2010.

QUEIROZ, L.M.D.; ROCHA, J.R.; LEITAO, A.; MONTANARI, C. A.; SILVA, A.B.F.; SOUSA, P.J.C.; BORGES, R.S. A Combined Study Using Ligand-Based Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Analogues of the Acetaminophen Ortho-Regioisomer with Potent Analgesic Activity. **Chem Biol Drug Des**. p.1-7, 2012.

QUINN, M.T. & GAUSS, K.A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of Leukocyte Biology* v.76, p.760–781, 2004.

RAFFA R. B.; WALKER E. A.; STERIOUS S. N. Opioid receptors and acetaminophen (paracetamol). **Eur J Pharmacol.** v. 503, p.209–210, 2004.

RAFFA, R. B.; STONE, J. R. D. J.; TALLARIDA, R. J. Discovery of self synergistic spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol). **J Pharmacol Exp Ther.** v.295, p.291–294, 2000.

RAJKAPOOR, B.; VENUGOPAL, Y.; ANBU, J.; HARIKRISHNAN, N.; GOBINATH, M.; RAVICHANDRAN, V. Protective effect of *Phyllanthus polyphyllus* on acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science.* v.21, p.57–62, 2008.

RASHID, K.; SINHA, K.; SIL, P. C. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. **Food Chem Toxicol.** v. 62, p. 584–600, 2013.

RAWLINS, M.; HENDERSON, D.; HIJAB, J. R. Pharmacokinetics of paracetamol after intravenous and oral administration. **European Journal of Clinical Pharmacology.** v 11, p. 283–6, 1977.

RAY, S.D.; MUMAW, V.R.; RAJE, R.R.; FARISS, M.W. Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. **J Pharmacol Exp Ther.** v.279, p.1470, 1996.

REITER, R.J.; ACUNO-CASTROVIEJO, D.; TAN, D.X.; BURKHARDT, S. Free radical-mediated molecular damage. **Ann Ny Acad Sci.** v. 939, p.200–215, 2001.

RENNER, B.; CLARKE, G.; GRATAN, T.; BEISEL, A.; MUELLER, C.; WERNER, U.; KOBAL, G.; BRUNE, K. Caffeine accelerates absorption and enhances the analgesic effect of acetaminophen. **Journal of Clinical Pharmacology.** v.47, p.715–726, 2007.

RUMACK, B. Acetaminophen hepatotoxicity: The first 35 years. **Journal Of Toxicology And Clinical Toxicology.** v.40, p. 3–20, 2002.

SANDRINI M.; PINI L.A.; VITALE G. Differential involvement of central 5-HT_{1B} and 5-HT₃ receptor subtypes in the antinociceptive effect of paracetamol. **Inflamm. res.**, v. 52, p. 347–352, 2003.

SAVASKAN, N.E.; UFER, C.; KÜHN, H.; BORCHERT, A. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: From genomic structure to developmental expression and neural function. **Biol. Chem.** v.388, p.1007-1017, 2007.

SCHEINBERG, I. H. Thrombocytopenic reaction to aspirin and acetaminophen. **N Engl J Med.** v.300, p.678, 1979.

SCHIØDT, F.V.; HANSEN, B.A.; RANEK, L.; CLEMMESSEN, J.O.; OTT, P.; LARSEN, F.S. Thrombocytopenia in paracetamol intoxication. **J Hepatol.** v.23, p.125, 1995.

SENER, G.; SEHIRLI, A.O.; CETINEL, S.; YEGEN, B.G.; GEDIK, N.; AYANOGLU-DÜLGER, G., Protective effects of MESNA (2-mercaptoethane sulphonate) against acetaminophen-induced hepatorenal oxidative damage in mice. **J Appl Toxicol.** v.25, p. 20–29. 2005.

SENEVIRATNE, S.L.; MALAVIGE, G.N.; DE SILVA, H.J. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Troy soc trop med h.** v.100, p.608-614, 2006.

SHAFIEI, H.; HAQGU, M.; NEMATOLLAHI, D.; GHOLAMI, M. R. An experimental and computational study on the rate constant of electrochemically generated n-acetyl-p-quinoneimine with dimethylamine. **Int. J. Electrochem. Sci.** v.3, p.1092 – 1107, 2008.

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.** v. 47, p. 61-71, 1990.

SIES, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.** v.82, p.291-295, 1997.

SILVA, E. R.; QUEIROZ, A. N.; ALMEIDA, E. D.; BORGES, R. S. A DFT study of aminophenol stability. **Journal of Computacional and Theoretical Nanoscience.** v.6 p.1694-1696, 2009.

SILVA, J. ERDTMANN, B, HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, M. H.; ROSA, E. J. F.; CARVALHO, N. R.; DOBRACHINSKI, F.; ROCHA, J. T.; MAURIZ, J. L.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SOARES, F. A. A. Acute Brain Damage Induced by Acetaminophen in Mice: Effect of Diphenyl Diselenide on Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. **Neurotox Res.** v. 21, p. 334–344, 2012.

SIVILOTTI, M. L.; YAREMA, M. C.; JUURLINK, D. N.; GOOD, A. M.; JOHNSON, D.W. A risk quantification instrument for acute acetaminophen overdose patients treated with N-acetylcysteine. **Annals of Emergency Medicine.** v.46, p. 263–271, 2005.

SODERDAHL, T.; ENOKSSON, M.; LUNDBERG, M.; HOLMGREN, A.; OTTERSEN, O. P.; ORRENIUS, S.; BOLCSFOLDI, G.; COTGREAVE, I.A. Visualization of the compartmentalization of glutathione and protein–glutathione mixed disulphides in cultured cells. **FASEB J.** v.17, p.124–126, 2003.

SRÁM R.J.; RÖSSNER P.; PELTONEN K.; PODRAZILOVÁ K.; MRACKOVÁ G.; DEMOPOULOS N.A.; STEPHANOU G.; VLACHODIMITROPOULOS D.; DARROUDI F.; TATES A.D. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1,3-butadiene-exposed workers. **Mutat. Res.** v.419, p. 145-154, 1998.

STEIN, C.; CLARK, J. D.; OH, U.; VASKO, M. R.; WILCOX, G. L.; OVERLAND, A. C.; VANDERAH, T. W.; SPENCER, R. H. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. **Brain Research Reviews.** v. 60, p. 90- 113, 2009.

STEINER, T. J.; M. VOELKER. Gastrointestinal tolerability of aspirin and the choice of over-the-counter analgesia for short-lasting acute pain. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.** v. 34, p. 177–186, 2009.

STILLINGS, M.; HAVLIK, I.; CHETTY, M.; CLINTON, C.; SCHALL, R.; MOODLEY, I.; MUIR, N.; LITTLE, S. Comparison of the pharmacokinetic profiles of soluble aspirin and solid paracetamol tablets in fed and fasted volunteers. **Current Medical Research and Opinion.** v.16, p. 115–124, 2000.

SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. Cyclooxygenase-2: A molecular target or cancer prevention and treatment. **Trends in Pharmacol Sci.** v.24, p. 96-102, 2003.

SUBRAMANIANA, B.B.; FONGHSU KUO, A.B.; ADA, E.C.; KOTYLA, T.A.; WILSON, T.A.; YOGANATHAN, S.D.; NICOLOSI, R.A.B. Enhancement of anti-inflammatory property of aspirin in mice by a nano-emulsion preparation. **International Immunopharmacology.** v. 8, p. 1533–1539, 2008.

SUÑOL, C.; BABOT, Z.; FONFRÍA, E.; GALOFRÉ, M.; GARCÍA, D.; HERRERA, N.; IRAOLA, S.; VENDRELL, I. Studies with neuronal cells: from basic studies of mechanisms of neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity. **Toxicol. In Vitro.** v. 22, p. 1350-1355, 2008.

SUÑOL, C.; BABOT, Z.; FONFRÍA, E.; GALOFRÉ, M.; GARCÍA, D.; HERRERA, N.; IRAOLA, S.; VENDRELL, I. Studies with neuronal cells: from basic studies of mechanisms of neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity. **Toxicol In Vitro.** v.5, p.1350-5, 2008.

THE MERCK INDEX, 12th edition, 1996

THOMAS, S.H. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 60 (1), p. 91–120, 1993.

THOMPSON, J. E. A. A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos. Porto Alegre: Artmede editora, p. 345-367, 2006.

THORNTON, J. R.; LOSOWSKY, M. S. Severe thrombocytopenia after paracetamol overdose. **Gut.** v. 31. p.1159-1160, 1990.

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.** v.265, p. 3059–3065, 1990.

TJØLSEN, A.; ROSLAND, J.H.; BERGE, O.G.; HOLE, K. The Increasing-Temperature Hot-Plate Test: An Improved Test of Nociception in Mice and Rats. **J Pharm Meth.**, v. 25, p.241-250, 1991b.

TRIPATHY, D.; GRAMMAS, P. Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. **Journal of Neuroinflammation.** v.6, p.1-9, 2009b.

TRIPATHY, D.; GRAMMAS, P. Acetaminophen protects brain endothelial cells against oxidative stress. **Microvasc. Res.** v.77, p.289–296, 2009a.

TRUMPER, L.; COUX, G.; ELIAS, M.M. Effect of acetaminophen on Na(+), K(+) ATPase and alkaline phosphatase on plasma membranes of renal proximal tubules. **Toxicology and applied pharmacology.** v.164, p.143-148, 2000.

TRUMPER, L.; MONASTEROLO, L.A.; ELIAS, M.M. Probenecid protects against in vivo acetaminophen-induced nephrotoxicity in male Wistar rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.284, p.606–610, 1998.

VACA, C. E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mut. Res.** 195: 137-149, 1988.

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.** v.35, p.3693-3699, 1986.

WARD, B.; ALEXANDER-WILLIAMS, J. M. Paracetamol revisited: A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Acute Pain.** v. 2, p. 140–9, 1999.

WATSON, W.A.; LITOVITZ, T.L.; RODGERS JR. G. C.; KLEIN-SCHWARTZ, W.; YOUNISS, J.; ROSE, S.R.; BORYS, D.; MAY, M.E. Annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. **Am. J. Emerg. Med.** v.21, p.353–421, 2002.

WEBSTER, P.A.; ROBERTS, D.W.; BENSON, R.W.; KEARNS, G.L. Acetaminophen toxicity in children: diagnostic confirmation using a specific antigenic biomarker. **J Clin Pharmacol.** v.36, p.397–402, 1996.

WORETA, T. A. & ALQAHTANI, S. A. Evaluation of Abnormal Liver Tests. **Med Clin N Am.** v. 98, p 1–16, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition. 2009.

YAKES, F.M. e VANHOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.94, p.516-519, 1997.

YANAGISAWA, H.; NODERA, M.; WADA, O. Inducible nitric oxide synthase expression in mercury chloride-induced acute tubular necrosis. **Ind. Health.** v.36, 324–330, 1998.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Resultados de Viabilidade Celular

Tabela 1: % Viabilidade Celular em culturas de neurônios corticais, expostas por 2 ou 7 dias ao paracetamol ou ortobenzamol. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6-21).

CONCENTRAÇÕES			2 DIAS DE EXPOSIÇÃO				7 DIAS DE EXPOSIÇÃO			
			Paracetamol		Ortobenzamol		Paracetamol		Ortobenzamol	
[M]	mg/L	Log [mg/L]	MÉDIA	E.P.M.	MÉDIA	E.P.M.	MÉDIA	E.P.M.	MÉDIA	E.P.M.
0	0		100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
1 μ M	0,151	-0,82102	94,9	2,3			103,6	3,4		
1 μ M	0,213	-0,67162			109,2	3,1			109,3	3,8
10 μ M	1,51	0,178977	97,6	2,1			97,1	6,2		
10 μ M	2,13	0,32838			110,9	4,7			107,4	4,8
100 μ M	15,1	1,178977	97,7	1,3			102,1	6,0		
100 μ M	21,3	1,32838			119,3	4,7			68,3***	6,4
300 μ M	63,9	1,805501			88,5	15,7			29,7***	8,3
1mM	151	2,178977	94,0	2,7			92,7	2,6		
1mM	213	2,32838			86,9	11,3			4,8***	1,2
3mM	453	2,656098	81,6***	3,3			87,2	3,4		
10mM	1510	3,178977	63,2***	5,3			10,4***	5,0		

*** $P < 0,001$ quando comparado ao veículo.