



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO  
COMPARATIVO ENTRE FENILHIDRAZONAS E CHALCONAS  
COMO DERIVADOS DO PARACETAMOL**

RAIMUNDO FERREIRA GOUVEA PIMENTEL BELEZA FILHO

Belém-PA

2014

RAIMUNDO FERREIRA GOUVEA PIMENTEL BELEZA FILHO

**SÍNTESE, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO  
COMPARATIVO ENTRE FENILHIDRAZONAS E CHALCONAS  
COMO DERIVADOS DO PARACETAMOL**

Dissertação apresentado ao colegiado do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, como requisito para o exame de qualificação para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas pela Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges.

Belém- PA

2014

RAIMUNDO FERREIRA GOUVEA PIMENTEL BELEZA FILHO

**SÍNTESE, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO  
COMPARATIVO ENTRE FENILHIDRAZONAS E CHALCONAS  
COMO DERIVADOS DO PARACETAMOL**

Monografia apresentado ao colegiado do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, como requisito para o exame de qualificação para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas pela Universidade Federal do Pará.  
Orientador: Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges.

BANCA EXAMINADORA

1. \_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges – Orientador)
  
2. \_\_\_\_\_  
(Profa. Dra. Osmarina Pereira da Paixão e Silva – Faculdade de Farmácia – UFPA)
  
3. \_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. Fábio Molfetta – Faculdade de Química – UFPA)

Belém- PA

2014

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Profº Dr. Rosivaldo dos Santos Borges, pela orientação, compreensão e amizade.

Aos nossos filhos, pelo incentivo constante.

*O conhecimento é a semente de uma planta; deve ser posto em chão de livros fértil, alimentado à luz da vida e regado a informações.*  
Sandro Romero

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
1.1.	Proposta.....	12
1.2.	Objetivos.....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1.	Estrutura e Propriedades.....	14
2.2.	Mecanismos de Hepatotoxicidade.....	14
2.2.1.	Formação da <i>N</i> -Acetil- <i>p</i> -Benzoquinona Imina (NAPQI).....	14
2.2.2.	Reatividade da NAPQI.....	15
2.3.	Biotransformação do Paracetamol.....	16
2.4.	Inibição Farmacológica da Cicloxigenase.....	18
2.5.	Modificações Estruturais do Paracetamol.....	20
2.5.1.	Homólogos Dimetilados.....	20
2.5.2.	Homólogos Metilados.....	22
2.5.3.	Análogos Fluorados.....	24
2.5.4.	Homólogos Mono e Dialquilados.....	24
2.5.5.	Análogos Heteroatômicos.....	26
2.5.6.	Derivados Acil-Etér-Alquílico.....	27
2.5.7.	Nitroderivados do Paracetamol.....	28
2.5.8.	Associação molecular <i>p</i> -aminofenol e salicilatos.....	29
2.5.9.	Derivados Amídicos e Lactamas.....	30
2.5.10.	Regioisômeros.....	32
2.6.	Planejamento de Fármacos usando Bioisosterismo.....	33
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1.	Modelagem Molecular.....	34
3.2.	Energia dos Orbitais de Fronteira (HOMO e LUMO).....	34
3.3.	Logaritmo do Coeficiente de Partição (CLog P).....	34
3.4.	Energia de Hidratação (EH).....	35
3.5.	Potencial de ionização (PI).....	35
3.6.	Mapas de Potencial Eletrostático Molecular (MEPs).....	35
3.7.	Estudos Comparativos.....	35
3.8.	Metodologia Sintética.....	36
3.9.	Identificação e caracterização dos derivados hidrazônicos.....	36
3.10.	Compostos Sintetizados.....	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1.	Estudo comparativo entre hidrazona e chalcona.....	37
4.2.	Síntese de Derivados Hidrazônicos.....	44
4.3.	Determinação e caracterização estrutural.....	45
4.4.	Relação Estrutura e Propriedade.....	49
5.	CONCLUSÃO.....	54
6.	REFERÊNCIAS.....	55

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fórmula estrutural do paracetamol.....	12
<b>Figura 2:</b> Metabolismo oxidativo do paracetamol.....	14
<b>Figura 3:</b> Principais metabólitos oxidados do paracetamol.....	15
<b>Figura 4:</b> Vias de biotransformação do paracetamol.....	17
<b>Figura 5:</b> Formação das prostaglandinas via reação de peroxidação do ácido araquidônico.....	19
<b>Figura 6:</b> Reatividade do Intermediário reativo NAPBQ com nucleófilos.....	21
<b>Figura 7:</b> Reatividade do intermediário reativo NAPBQI com nucleófilos.....	21
<b>Figura 8:</b> Paracetamol e derivados monometilados.....	22
<b>Figura 9:</b> Paracetamol e derivados fluorados.....	24
<b>Figura 10:</b> Mecanismos de redução de mono e dissustituídos análogos.....	25
<b>Figura 11:</b> Paracetamol e derivados acil-éter-alcúlico.....	28
<b>Figura 12:</b> Paracetamol e derivados acílicos e dialquilados.....	29
<b>Figura 13:</b> Derivados da associação molecular.....	30
<b>Figura 14:</b> Paracetamol e derivados amídicos e lactamas.....	31
<b>Figura 15:</b> Regioisômeros do paracetamol.....	33
<b>Figura 16:</b> Estruturas químicas da hidrazona (S1) e chalcona (C1).....	35
<b>Figura 17:</b> Metodologia sintética de obtenção dos derivados de hidrazonas.....	36
<b>Figura 18:</b> Derivados de hidrazonas benzilidênicas.....	36
<b>Figura 19:</b> Estrutura da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).....	37
<b>Figura 20:</b> Numeração da estrutura básica da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).....	38
<b>Figura 21:</b> HOMO da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).....	39
<b>Figura 22:</b> LUMO da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).....	40
<b>Figura 23:</b> Estruturas de ressonância da fenilhidrazona.....	40
<b>Figura 24:</b> Estruturas de ressonância da chalcona.....	41
<b>Figura 25:</b> MEPs da cargas de Mülliken.....	41
<b>Figura 26:</b> MEPs e cargas do potencial eletrostático.....	42
<b>Figura 27:</b> Densidade de spin da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).....	43
<b>Figura 28:</b> Espectro de infravermelho de S1.....	45
<b>Figura 29:</b> Espectro de infravermelho de S1 teórico.....	46
<b>Figura 30:</b> Espectro de infravermelho de S2.....	46
<b>Figura 31:</b> Espectro de infravermelho de S3.....	47
<b>Figura 32:</b> Espectro de infravermelho de S4.....	47
<b>Figura 33:</b> Espectro de infravermelho de S5.....	48
<b>Figura 34:</b> Espectro de infravermelho de S10.....	48
<b>Figura 35:</b> Espectro de infravermelho de S11.....	49
<b>Figura 36:</b> Espectro de infravermelho de S12.....	49
<b>Figura 37:</b> Mecanismo de interação do ácido araquidônico na PGES.....	52
<b>Figura 38:</b> Mecanismo teórico de inibição da PGES pelo paracetamol.....	52
<b>Figura 39:</b> Mecanismo teórico de inibição da PGES pelos derivados do paracetamol.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Propriedades dos derivados monometilados do PAR.....	22
<b>Tabela 2:</b> Hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade de derivados dimetilados.....	23
<b>Tabela 3:</b> Propriedades farmacológicas dos metabólitos do ácido araquidônico.....	23
<b>Tabela 4:</b> Atividade comparativa dos derivados 3,5 e 2,6 dimetilados do PAR.....	25
<b>Tabela 5:</b> Propriedades dos derivados 3,5 dissustituídos do PAR.....	26
<b>Tabela 6:</b> Efeito analgésico , antiinflamatório e gastrotóxico de derivados 2,6 dissustituídos.....	27
<b>Tabela 7:</b> Propriedades teóricas do paracetamol e derivados.....	32
<b>Tabela 8:</b> Propriedades estruturais e de solubilidade dos derivados do paracetamol.....	37
<b>Tabela 9:</b> Propriedades estruturais e de solubilidade dos derivados do paracetamol.....	43
<b>Tabela 10:</b> Propriedades estruturais e de solubilidade dos derivados de fenilhidrazonas.....	44
<b>Tabela 11:</b> Propriedades estruturais e de solubilidade dos derivados do paracetamol.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS.

PAR:	Paracetamol.
PGES:	Prostaglandinas.
NAPSQI:	<i>N</i> – acetil – <i>p</i> – benzoquinona imina.
NAC:	<i>N</i> – acetilcisteína.
QSAR:	Quantificação da Relação Estrutura Atividade.
ALT:	Alanina amino transferase.
GSH:	Glutathiona reduzida.
GSSG:	Glutathiona oxidada.
LPO:	Peroxidação lipídica.
PBQ:	<i>p</i> – Benzoquinona.
AST:	Aspartato amino transferase.
PAR–GLUC	Gluc: Cojugado Paracetamol glucoronídeo.
PAR-S:	Conjugado Paracetamol sulfato.
3OH-PAR:	3 hidróxi Paracetamol.
NADP:	Nicotinamina adenina dinucleotídeo.
PGH:	Prostaglandina H síntase.
AA:	Ácido araquidônico.
ROOH:	Peróxido lipídeo.
IP:	Intraperitoneal
IG:	Intragástrica.
TO:	Tensão oxidativa.
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona-imina
UDPGA	Ácido uridina-5-difosforo-glucoronico
PAPS	3-fosfoadenosina-5-fosfosulfato
COX	ciclooxigenase
TBARS	acido-2-tiobarbiturico
PI	potencial de ionização

## RESUMO

A prostaglandina endoperóxido-sintase (PGES) e o citocromo P-450 são enzimas chaves em humanos, responsáveis pelos efeitos analgésicos e toxicidade do acetaminofen, respectivamente. O acetaminofen (ACP) ou paracetamol é um fármaco analgésico e antipirético de venda livre, amplamente utilizado e parece ser seguro, se utilizada em doses terapêuticas normais, mas altas doses de ACP produzem lesão hepática e/ou renal em seres humanos e em animais de experimentação. Até o momento, os projetos de desenvolvimento de novos derivados paracetamol tiveram pouco impacto na aplicação clínica de um derivado mais seguro do ACP. Assim, neste trabalho uma série de derivados de ACP baseados na analogia entre chalconas e hidrazonas foi investigada usando cálculos de química quântica no nível de teoria DFT/B3LYP, com o conjunto de base 6-31G\*. O HOMO, IP, BDE<sub>OH</sub> e contribuição da densidade de spin para a oxidação inicial de um elétron ou um átomo de hidrogênio a partir de abstração do grupo hidroxila fenólica foi relacionada com a reatividade do radical tirosil produzindo *N*-acetil-*p*-benzosemiquinona imina (NAPSQI). A segunda abstração de hidrogênio foi relacionada com a reação química entre o grupo amida e o radical hidroxil formando *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI). Os valores mais baixos de BDE<sub>OH</sub> foram relacionados com os valores mais elevados de extinção do radical tirosil e a estabilidade está relacionada com a densidade de spin para as abstrações iniciais do elétron ou hidrogênio. Os valores mais elevados de BDE<sub>NH</sub> foram relacionados com a formação de NAPQI e os baixos valores de LUMO com a reatividade de NAPQI como sistema Michael. Os resultados mostraram que alguns análogos podem ser uma boa estratégia para o desenvolvimento de fármacos mais seguros como compostos analgésicos. Os compostos foram sintetizados e suas propriedades antioxidantes foram estimadas utilizando o método de química teórica. Alguns compostos podem ser bons antioxidantes. Um mecanismo de interação entre os derivados de hidrazonas e a PGES foi proposto usando propriedades moleculares.

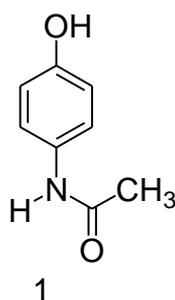
## ABSTRACT

The prostaglandin-endoperoxide synthase (PGES) and cytochrome P-450 are key enzymes in human, which are responsible for analgesic effect and toxicity of acetaminophen, respectively. Acetaminophen or paracetamol is a widely used over-the-counter analgesic and antipyretic drug and appears to be safe if used in normal therapeutic doses, but large doses of ACP produce hepatic and/or renal injury in humans and in experimental animals. At moment, the design of new acetaminophen derivatives has few impacts for its clinical applications of safe acetaminophen derivative. Thus, in this work a series of acetaminophen derivatives based on chalcone and hydrazone analogy was been investigated using quantum chemical calculations at the DFT/B3LYP theory level, with the 6-31G\* basis sets. The HOMO, IP,  $BDE_{OH}$ , and spin density contribution for the oxidation of an initial electron or hydrogen atom abstraction from the phenolic hydroxyl group was related with the quenching reactivity of tyrosyl radical to give *N*-acetyl-*p*-benzosemiquinone imine (NAPSQI). The second hydrogen abstraction was related with the chemistry reaction between amide group and hydroxyl radical to give *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI). The lowest  $BDE_{OH}$  values were related with higher quenching values of the tyrosyl radical and the stability was related with the spin density for the initial electron or hydrogen abstractions. The highest  $BDE_{NH}$  values were related with small NAPQI formation and LUMO values with reactivity of NAPQI-like Michael system. Our results showed that some analogous may be a good strategy for safer drug design of analgesic compounds. The compounds were synthesized and their antioxidant property was estimated using theoretical methods. Some compounds can be good antioxidant. A proposed mechanism for the interaction between hydrazone derivatives and PGES was realized using molecular properties.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Proposta

O paracetamol **1** (Figura 1), acetaminofen ou *N*-acetil-*p*-aminofenol (PAR), foi introduzido na terapêutica depois de uma descoberta acidental da acetanilida, ao mesmo tempo em que os salicilatos eram descobertos. É utilizado desde 1878 até hoje em muitos países como analgésico e antipirético, sendo comercializado sozinho ou associado com outras bases medicamentosas, no alívio de sintomas relacionados a processos inflamatórios dolorosos, dores crônicas e odontológicas, sendo ainda bastante difundido em pediatria (The Merck Index, 1976). É extensamente usado e livremente comercializado na maioria dos países. No Reino Unido, aproximadamente 3,2 milhões de tabletes de PAR são consumidos todo ano, perfazendo uma média de 55 tabletes/pessoa (Jones, 1998).



**Figura 1:** Fórmula estrutural do paracetamol

Como agente analgésico e antipirético, o PAR tem provado eficácia clínica no alívio temporário de dores leves a moderadas associadas a resfriado comum, dor de cabeça, dor de dente, dores musculares, dor nas costas, dores leves de artrite, cólicas menstruais e redução da febre, sendo eficaz em bebês, crianças e adultos (Flower e Vane, 1972).

O PAR demonstrou inibir a ação do pirógeno endógeno no centro regulador de calor no cérebro por bloqueio da formação e liberação de prostaglandinas no sistema nervoso central, uma vez que a febre ocorre quando a enzima prostaglandina endoperóxido sintase (PGES) elevada atua na área pré-óptica do hipotálamo anterior, resultando em diminuição da perda de calor e aumento do ganho de calor (Harvinson e Nelson, 1986; Stoyanovsky e Caderbaum, 1999; Flower e Vane, 1972; Lister e Mclean, 1997).

Apesar de todos os efeitos benéficos, este composto demonstrou alta toxicidade, não apenas em função da dose e concentração plasmática alcançada, mas pela reatividade dos intermediários formados pelo metabolismo oxidativo, pois neste metabolismo oxidativo o PAR é biotransformado através de um sistema enzimático oxidativo de função mista, contendo citocromo P-450 formando os intermediários semiquinona e quinona imina, denominados *N*-acetil-*p*-benzosemiquinona imina (NAPSQI) e *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI), respectivamente. De fato, estudos demonstraram que a NAPQI é o intermediário responsável pela toxicidade do PAR e apesar dos diversos derivados sintetizados e avaliados, nenhum deles apresentou maior segurança ou eficácia que o PAR. No entanto, nosso grupo dispõe de novos derivados mais potentes e com maior margem de segurança. Assim, neste trabalho pretende-se desenvolver uma nova estratégia de derivados do paracetamol aplicando os princípios da vinilologia e do regioisomerismo.

## 1.2. Objetivos

### **Geral:**

O objetivo geral do trabalho é planejar, sintetizar e avaliar novos derivados do paracetamol usando técnicas de vinilologia e regioisomerismo.

### **Específicos:**

Planejar novos derivados do paracetamol usando a associação das técnicas bioestéricas de grupos funcionais;

Determinar usando parâmetros teóricos as propriedades moleculares responsáveis pela atividade e toxicidade de novos derivados do paracetamol;

Sintetizar através de métodos clássicos novos derivados aplicando as técnicas de vinilologia e regioisomerismo;

Estimar a capacidade antioxidante através de métodos teóricos;

Descrever os aspectos relacionados com a estrutura e propriedade dos novos compostos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Estrutura e Propriedades

O PAR se apresenta como um pó branco e cristalino, com fórmula molecular  $C_8H_9O_2$ , peso molecular igual a 151,16g/mol e pKa a 25°C é 9,51. A solubilidade de 1g da substância em 70mL de água a 25°C e 20mL a 100°C, 10mL de álcool etílico, 50mL de clorofórmio, 40mL de glicerina e fracamente solúvel em éter etílico. O composto estável entre pH 4 e 7 a 25°C, sendo estável também à temperatura, luz e umidade (Flower e Vane, 1972).

### 2.2. Mecanismos de Hepatotoxicidade

#### 2.2.1. Formação da *N*-Acetil-*p*-Benzoquinona Imina (NAPQI)

Após a ingestão de doses alta de PAR, o principal evento é a hepatotoxicidade centrolobular dependente do sistema citocromo P-450 no homem e em animais de laboratório (Mitchell *et al.*, 1973; Hinson, 1980), avaliada pelo aumento dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) plasmática, acompanhada pela formação de *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina **3** (NAPQI), um intermediário eletrofílico reativo responsável pela toxicidade observada (Albano *et al.*, 1985; Van de Straat *et al.*, 1988), embora um segundo intermediário, a *N*-acetil-*p*-benzosemiquinona imina (NAPSQI) tenha sido proposto também (de Vries, 1981; e Hinson, 1990; Bessems *et al.*, 1998) (Figura 2). Além do derivado não tóxico catecólico, o 3-hidroxiacetamol **4** (3-OH-PAR) formado pode ser visto como um metabólito secundário (Hinson *et al.*, 1980; Forte *et al.*, 1984; Harvison *et al.*, 1988).

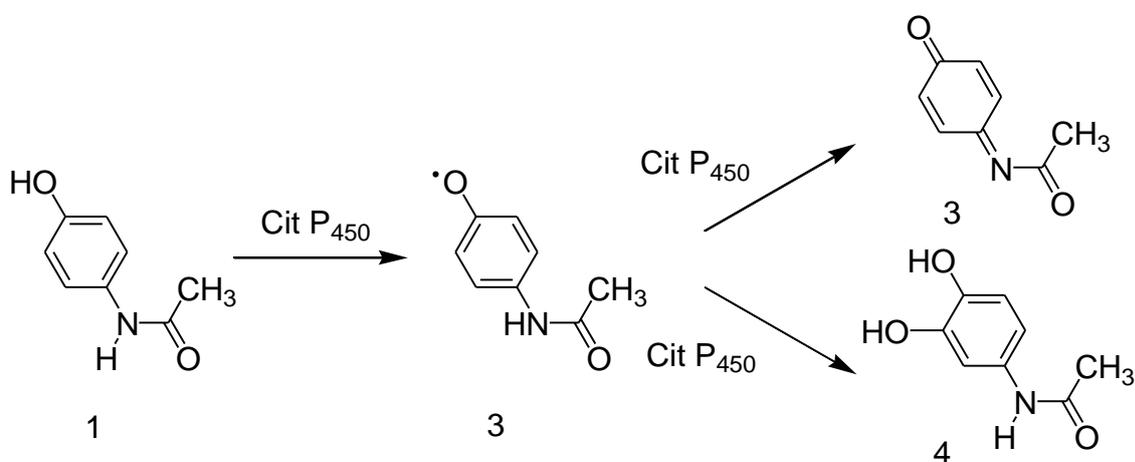
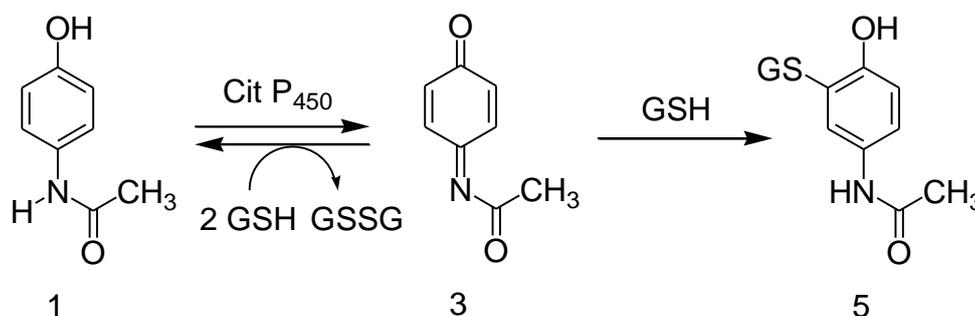


Figura 2: Metabolismo oxidativo do paracetamol

### 2.2.2. Reatividade da NAPQI

Em doses normais de PAR, na maioria das espécies, inclusive no homem, uma quantidade pequena de intermediários reativos NAPQI é formada. Na presença de glutathiona reduzida (GSH), por exemplo, em hepatócitos isolados de rato, a NAPQI, pode ser reduzida de volta para PAR ou ligada covalentemente com GSH para formar conjugados 3-glutathiona-S-il-paracetamol **5** (PAR-SG) (Moldéus, 1978; Van de Straat *et al.*, 1986) sem efeitos adversos significativos (Figura 3). No entanto, após uma sobredose ou quando o sistema microsomal P-450 está aumentado, os níveis de GSH hepático são diminuídos mais extensivamente e pode não mais compensar uma produção aumentada de NAPQI, o que tem sido evidenciado especialmente através da relação em que a depleção mitocondrial de GSH está diretamente correlacionada com a toxicidade hepática (Vendemiale *et al.*, 1996).



**Figura 3:** Principais metabólitos oxidados do paracetamol

As vias mais prováveis de reação da NAPQI são a formação de adutos com proteínas (Nelson, 1995), oxidação de sulfidril de proteínas (Tirmenstein e Nelson, 1990), ligação covalente com DNA no fígado e rins (Hongslo *et al.*, 1994), rompendo a homeostase celular. Deste modo, em ratos, camundongos e humanos, uma overdose de PAR pode resultar em severa necrose hepática centrolobular (Vermeulen *et al.*, 1992). Porém, a necrose tubular renal também foi encontrada (Emeigh Hart *et al.*, 1996). Embora a falência renal aguda seja incomum, altas doses podem levar a falência hepática fulminante (Eguia & Materson, 1997). Além disso, ratos apresentaram necrose epitelial pulmonar de células não ciliadas bronquiolar (Jeffery e Haschek, 1988) e adutos covalentes com proteínas formados nos pulmões (Bartolone *et al.*, 1989; Lubek *et al.*, 1988; Wells *et al.*, 1995).

Os efeitos danosos agudos no sangue no homem foram encontrados, principalmente nas plaquetas, após a ingestão de grandes quantidades de PAR (Fischereder e Jaffe, 1994).

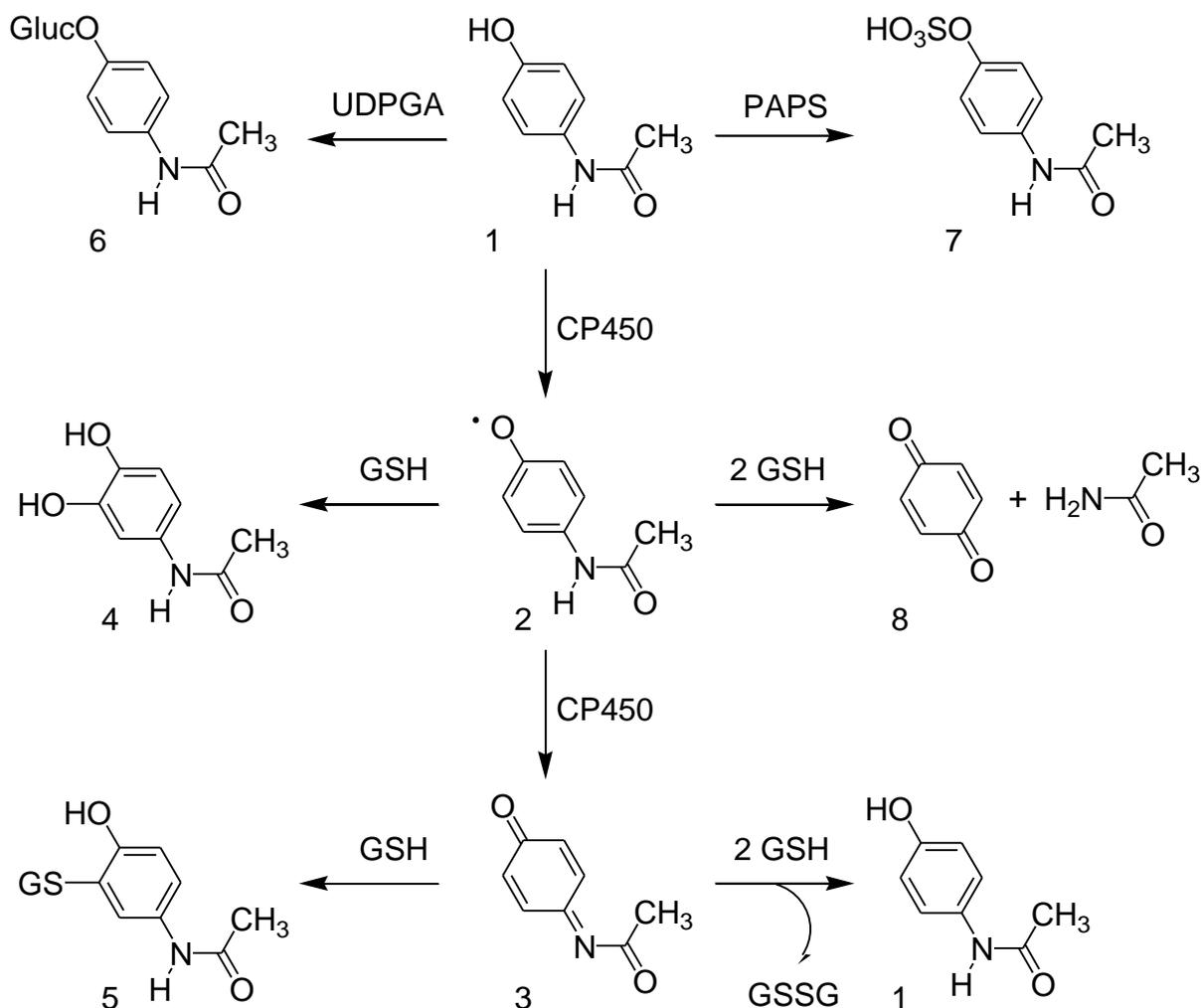
Além disso, a exposição de humanos ao uso terapêutico crônico de PAR, a longo prazo está correlacionada com o aumento do risco de doença renal crônica (Sandler *et al.*, 1989).

Várias condições fisiopatológicas podem ocasionar um desequilíbrio entre a produção e a proteção contra radicais de oxigênio livre. Este desequilíbrio é chamado estresse oxidativo (EO) (Sies, 1986), o qual está frequentemente aumentado quando ocorre uma condição diminuída do potencial de redução e quando a capacidade para lidar com oxidantes endógenos e exógenos está prejudicada. Os mecanismos de iniciação do EO podem ser mediados por espécies reativas de oxigênio ou pela ação oxidante direta de um metabólito reativo, como na hepatotoxicidade induzida pelo PAR. Isto pode ser demonstrado na alteração da relação de NADPH/ NADP<sup>+</sup> (Keller e Hinson, 1991), GSH/GSSG (Subrahmanyam *et al.*, 1987), ProtSH/ProtSSProt (Albano *et al.*, 1985).

Os fenômenos posteriores decorrem do fato que NAPQI pode oxidar grupos tiólico de cisteína presentes no GSH ou proteínas tiólicas, produzindo ligações dissulfetos GSSG (Birge *et al.*, 1991). O aumento da oxidação de grupos tiol das proteínas tem sido mostrado em hepatócitos, o qual representa um importante parâmetro na toxicidade mediada por PAR (Adamson e Harman, 1993). A oxidação de GSH por NAPQI pode acontecer via diversos mecanismo, como propostos por vários autores para NAPQI e seus homólogos 2,6- diCH<sub>3</sub>-NAPQI e de 3,5-diCH<sub>3</sub>-NAPQI (Nelson *et al.*, 1991; Novak *et al.*, 1986; Novak *et al.*, 1989).

### **2.3. Biotransformação do Paracetamol**

A absorção de doses terapêuticas baixas de PAR é normalmente completa, a biodisponibilidade sistêmica no meio plasmático e meia-vida é mais ou menos 75% em 1,5 a 2,5 horas, respectivamente (Bessems e Vermeulen, 2001). Os metabólitos urinários identificados e discutidos em vários artigos de revisão do PAR **1** (Thomas, 1993), são principalmente metabolizados por glucuronidação e sulfatação, constituindo-se nas principais vias de metabolização. Estes importantes conjugados, PAR-glucuronídeo (PAR-Gluc) **6** e PAR-sulfato (PAR-S) **7**, são considerados mais solúveis em água que o composto original, sendo eliminados do fígado e sangue principalmente pela via urinária (ambos) e um pouco pela via biliar (PAR-Gluc) (Figura 4). Aproximadamente 30 e 55% do PAR administrado é excretado na urina como PAR-S e PAR-Gluc, respectivamente (Tone *et al.*, 1990).



**Figura 4:** Vias de biotransformação do paracetamol

No entanto, em vários animais de laboratório, uma quantia pequena de PAR é provavelmente metabolizada via um terceiro caminho, isto é, a oxidação pelo sistema microsomal citocromo P-450 (CP-450), enzima contendo uma oxidase de função mista, para formar a *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI) **3**. Um aduto de NAPQI e glutatona via adição 1,4 de Michael e o correspondente conjugado de cisteína e mercapturato **5** são os produtos ácidos formados, encontrados na urina humana depois da ingestão de PAR (Prescott, 1980). Embora uma reação de oxidação secundária de hidroxilação do PAR, formando o 3-hidroxiacetamol (3OH-PAR) **4** provavelmente aconteça também no homem por ter sido encontrado na urina de pacientes envenenados com PAR (Knox e Jurand, 1977). Além disso, em animais e provavelmente em humanos, foi demonstrado que as enzimas com atividade peroxidase, como prostaglandina sintase e mieloperoxidase, talvez tenham a habilidade de catalisar o metabolismo do PAR (Bessems e Vermeulen, 2001).

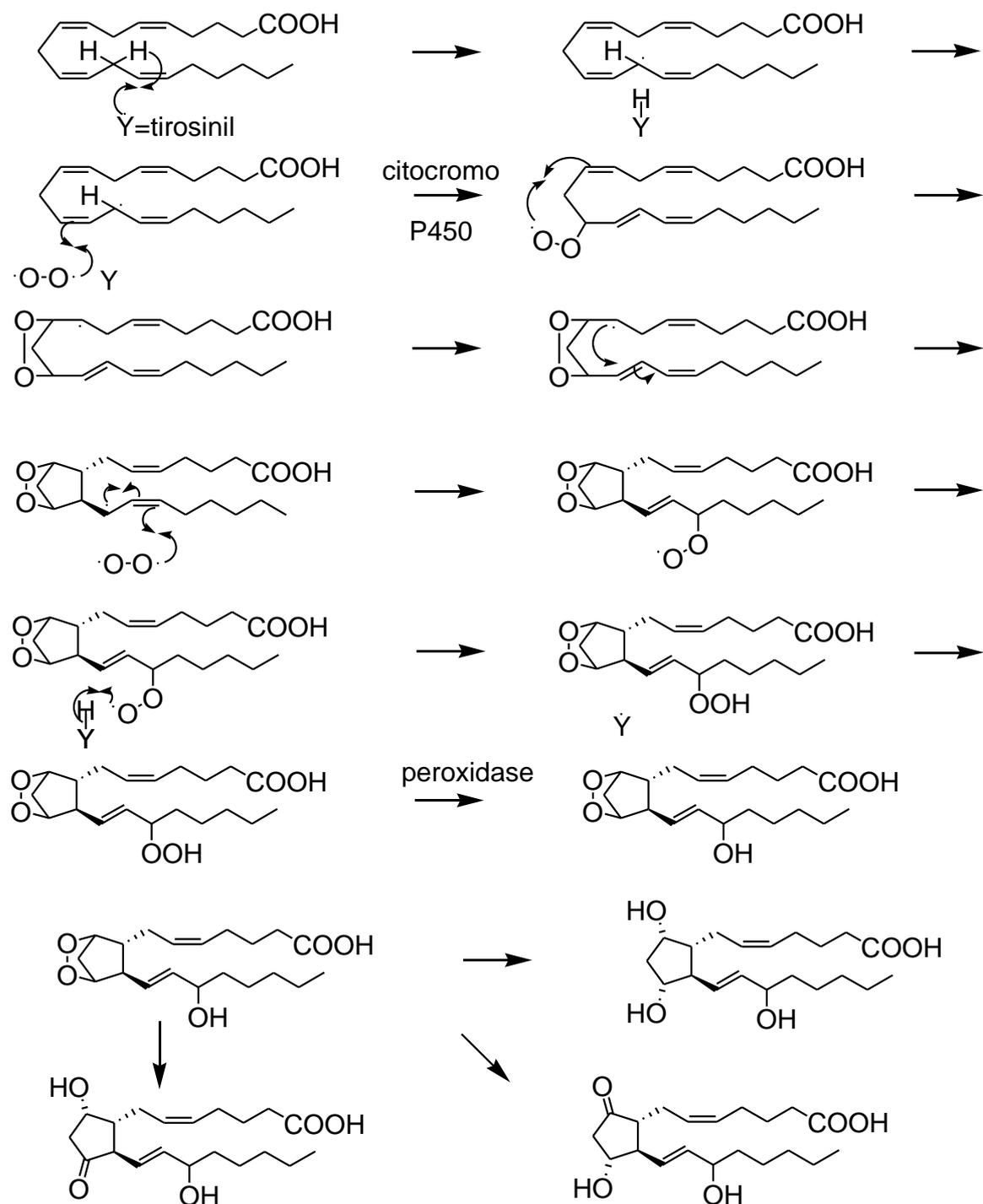
A administração de ratos com etanol com provável indução de CYP2E1 mostrou nos

microssomas hepáticos um aumento da ligação com proteína em aproximadamente 97%, mas a conjugação com cisteína em apenas 33% (Zhou *et al.*, 1997). Outras enzimas podem ser relevantes no processo de ativação do PAR na fase de bioativação, dentre estas se destaca o grupo das peroxidases, incluindo mieloperoxidase, cloroperoxidase e lactoperoxidase (Nelson, 1981; Potter *et al.*, 1986; Potter e Hinson, 1989), bem como a função peroxidase da PGES (Harvison *et al.*, 1986a; Potter e Hinson, 1987; Harvison *et al.*, 1988; Eling e Curtis, 1992). De fato, nos glóbulos brancos, por exemplo, as mieloperoxidasas se mostraram bioativadoras de uma grande variedade de fármacos. Em outros tecidos com baixa atividade de P-450, a PGES pode ser também responsável pela bioativação, tal como nos rins, onde a toxicidade do PAR pode ser resultante da ativação por esta via enzimática (Pirmohamed *et al.*, 1996).

A PBQ foi recentemente apontada como responsável pela interação com proteínas microtubulares *in vitro*, podendo levar a interferência no funcionamento do aparelho fuso mitótico da célula, causando a segregação de cromossomo anormal e indução de aneuploidia (Pfeiffer e Metzler, 1996). De fato, a aneuploidia é considerada um evento crítico no processo de transformação da célula neoplásica (Eastmond, 1993). Além disso, uma proteína nuclear arilada foi descrita, depois da administração de PAR (Khairallah *et al.*, 1995), concluindo-se que o PAR pode induzir o rompimento da lâmina nuclear. Além disso, o PAR extingue o radical tirosil em uma subunidade da enzima ribonucleotídeo redutase, diminuindo a velocidade da polimerização do DNA que é necessária para preencher lacunas nas fitas de DNA (Hongslo *et al.*, 1990; Hongslo *et al.*, 1994).

#### **2.4. Inibição Farmacológica da Ciclooxygenase**

A inibição da ciclooxigenase (COX) pelo PAR pode estar relacionada com a sua capacidade de reagir com o radical tirosil presente na prostaglandina-endoperoxidase sintase (PGES) (Kulmacz *et al.*, 1991). Esta enzima apresenta duas atividades distintas: a atividade ciclooxigenase catalisa a oxigenação do ácido araquidônico (AA) para seu hidroperóxido endoperoxido (ROOH; PGG<sub>2</sub>) (Bessemis e Vermeulen, 2001). A outra atividade é peroxidase ou hidroperoxidase, que catalisa a redução do hidroperóxido-endoperoxido do AA (PGH<sub>2</sub>) para a hidróxido-endoperoxido (ROH; PGH<sub>2</sub>) (Moldéus *et al.*, 1982; Kulmacz *et al.*, 1991; Kulmacz *et al.*, 1994) (Figura 5).



**Figura 5:** Formação das prostaglandinas via reação de peroxidação do ácido araquidônico

A ação terapêutica do PAR pode estar baseada tanto na inibição da atividade COX quanto na função peroxidase da PGES, uma vez que ambas previnem as prostaglandinas de serem formadas, desse modo abaixando a temperatura do corpo até níveis mais normais de febre (atividade antipirética) e melhorando a sensação de dor (atividade analgésica) (Flower e Vane, 1972; Mattamal *et al.*, 1979; Malmberg e Yaksh, 1982; Harvison *et al.*, 1986a).

Embora a atividade de peroxidase seja só um aspecto de PGES, vários laboratórios têm tentado investigar o mecanismo de ativação do PAR usando peroxidases específicas, por exemplo, estudando as possíveis relações de estrutura-atividade entre os potenciais de oxidação, a coplanaridade da cadeia lateral da *N*-acetil, etc.) para vários análogos de PAR (Harvison *et al.*, 1986a; Harvison *et al.*, 1986b; Harvison *et al.*, 1988; Barnard *et al.*, 1993; Park e Kitteringham, 1994; Bessems *et al.*, 1995; Bessems *et al.*, 1998).

## 2.5. Modificações Estruturais do Paracetamol

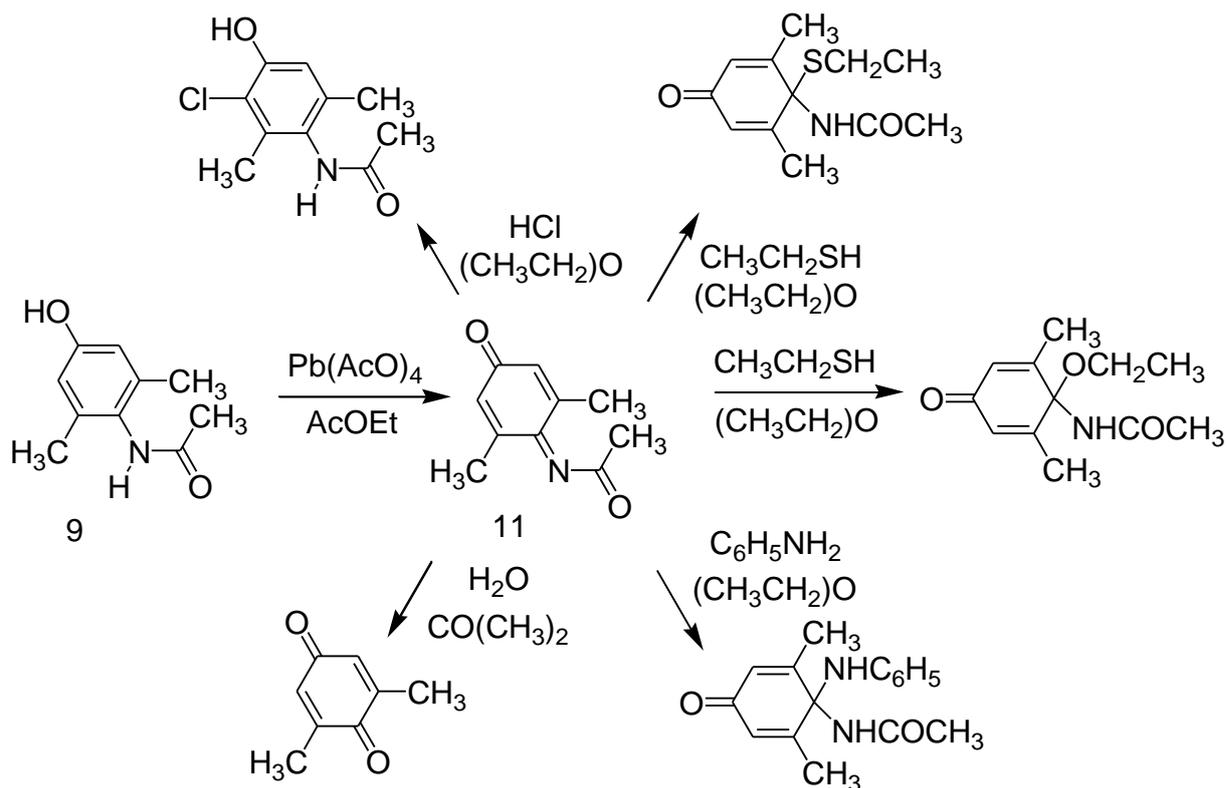
A toxicidade do paracetamol fomentou o desenvolvimento e estudo de homólogos e análogos mais seguros, mas até o momento sem nenhum sucesso. Os estudos contribuíram para a obtenção de dados da relação estrutura e atividade desse fármaco.

### 2.5.1. Homólogos Dimetilados

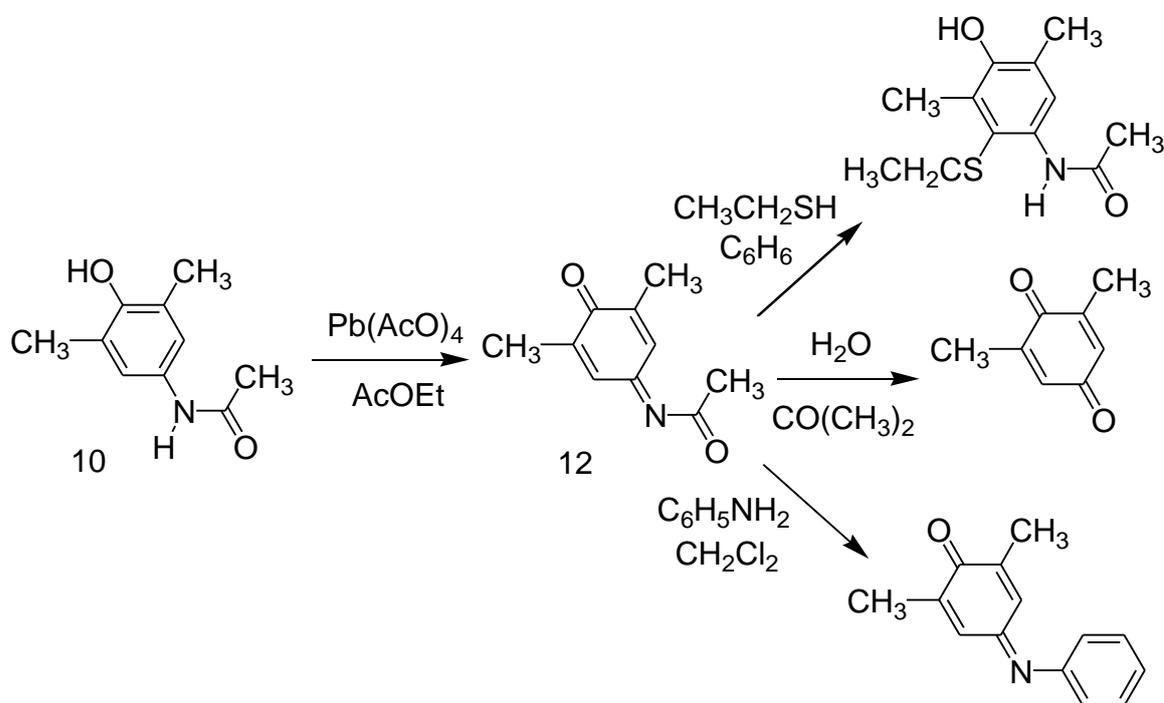
O mecanismo de toxicidade do sistema quinona-imina foi realizada através de reatividade do derivados análogos dimetilados do paracetamol ao reagirem com nucleófilos (Fernando *et al.*, 1980) e a toxicidade foi avaliada por Calder *et al.* (1991). Os compostos 2,6-dimetil-PAR **9** e 3,5-dimetil-PAR **10** foram oxidados com tetraacetato de chumbo para formar *N*-acetil-2,6-dimetil-*p*-benzoquinona imina e *N*-acetil-3,5-dimetil-*p*-benzoquinona imina, respectivamente.

A reação do composto **11** com HCl formou o 3-cloro-2,6-dimetil-4-hidroxi-acetanilida, enquanto que a reação com anilina, etanotiol e etanol formou os adutos tetraédricos, através da adição ao carbono *ípsilon* da imina, em oposição aos produtos de adição esperados da quinona-imina, como um reagente eletrofílico via adição de Michael, enquanto que não houve reação com a água (Figura 6).

Enquanto que o composto **12** reagindo com água e anilina levou a substituição do carbono da imina, gerando 2,6-dimetil-*p*-benzoquinona e 3,5-dimetil-*N*-fenil-*p*-benzoquinona-imina, enquanto que o etanotiol formou o composto 3,5-dimetil-2-tioetil-4-hidroxi-acetanilida.



**Figura 6:** Reatividade do Intermediário reativo NAPBQ com nucleófilos



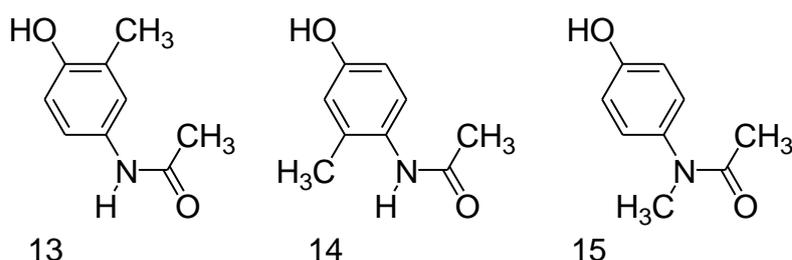
**Figura 7:** Reatividade do intermediário reativo NAPBQI com nucleófilos

A hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade foram avaliadas através do grau de necrose celular com as doses administradas em ratos e camundongos pelas vias intraperitoneal (IP) e

intragástrica (IG), onde os compostos 3,5 substituídos apresentaram maior toxicidade em doses crescentes, seguido pelos derivados 2,6 substituídos, comparados ao paracetamol e o *N*-metilparacetamol (Calder *et al.*, 1991). Estes resultados demonstraram que provavelmente a reatividade química pode ser elucidada através de cálculos moleculares (Alves *et al.*, 2003).

### 2.5.2. Homólogos Metilados

Derivados monometilados do PAR preparados por Nelson *et al* (1986) mostraram uma diminuição, tanto a atividade analgésica, quanto o potencial citotóxico, quando comparados o paracetamol e 3-metilparacetamol, demonstrando que estas atividades estão diretamente relacionadas, sendo observado também que o composto 2-metilparacetamol possui atividade muito menor e que o *N*-metilparacetamol é praticamente inativo (Figura 8 e Tabela 1). A toxicidade está de acordo com a prova de função hepática, medida pelos níveis de transaminase (Harvison *et al.*, 1986).



**Figura 8:** Paracetamol e derivados monometilados

**Tabela 1:** Propriedades dos derivados monometilados do PAR.

Composto	Atividade Analgésica ED 50 mg/kg	Dose Mg/kg	Necrose Hepática	ALT plasma em 24 h – Um/ml
Paracetamol <b>1</b>	84,3 (27-108)	750	3,25 ± 0,25	4030 ± 501
3-metil <b>13</b>	177,1 (138-195)	750	0,80 ± 0,25	690 ± 189
2-metil <b>14</b>	94,6 (77-116)	750	2,75 ± 0,25	3251 ± 905
N-metil <b>15</b>	> 200	1000	0	32 ± 8

Fonte: J. Med. Chem., 1986.

Estes resultados mostram que estas duas atividades são dependentes da formação do intermediário aceto-imido-*p*-benzoquinona, uma vez que sem uma reação de *N*-desmetilação o derivado *N*-metil (14) não pode formar o intermediário tipo quinona-inina, o que explica

sua baixa atividade, enquanto que os derivados 2- (14) e 3-metil (13) devem formar quinona-imina, mas diferindo sua reatividade química quando comparados com o PAR (Tabela 2). De fato de alguma forma os compostos metilados 13 e 14 devem causar algum tipo de impedimento estereoquímico durante o processo de metabolismo.

**Tabela 2:** Hepatotoxidade e a nefrototoxicidade de derivados dimetilados

Composto	Concentração	Necrose Celular			
		Ratos IP	Ratos IG	Camundongos IP	Camundongos IG
Paracetamol <b>1</b>	2 Mm	+	0	+++	++
	5 Mm	-	+	-	+++
	10 mM	-	+++	-	++++
2,6-dimetil <b>9</b>	2 mM	-	0	-	0
	5 mM	-	0	-	0
	10 mM	-	+	-	0
3,5-dimetil <b>10</b>	2 mM	-	+	-	++
	5 mM	-	++	-	+++
	10 Mm	-	++	-	++++
N-metil <b>15</b>	2 mM	0	-	0	-

Fonte: Biochen Pharmacol,1986.

A atividade antioxidante pode explicar a capacidade de formar o intermediário reativo NAPQI e a atividade analgésica. Os valores de voltametria cíclica em diferentes condições de pH, demonstraram uma relação direta da potência citotóxica e atividade analgésica com o potencial de oxidação, pois os mais baixos valores são mais ativos (Tabela 3). No entanto, estes valores não explicam a diferença na hepatotoxicidade.

**Tabela 3:** Propriedades farmacológicas dos metabólitos do ácido araquidônico

Composto	Variação do Potencial de Redox (V) em pH					
	0	3	6	7,4	9	12
Paracetamol <b>1</b>	0,72	0,61	0,46	0,39	0,33	0,22
3-metilparacetamol <b>13</b>	0,67	0,53	0,43	0,36	0,38	0,10
2-metilparacetamol <b>14</b>	0,75	0,63	0,54	0,45	0,39	0,26
N-metilparacetamol <b>15</b>	0,84	0,78	0,74	0,68	0,63	0,53

Fonte: J. Med. Chem.,1986.

### 2.5.3. Análogos Fluorados

A hepatotoxicidade e ação analgésica do paracetamol seis análogos fluorados (16-21) (Figura 9) que demonstraram baixa atividade analgésica em ratos, mas o composto 20 era 3,5 vezes mais ativo e menos tóxico que o paracetamol. O potencial de oxidação dos compostos 19 e 20 foram os mais altos. Apesar da relação entre as propriedades físico-químicas com as propriedades toxicológicas, metabólicas e farmacológicas nenhum destes compostos chegou à fase clínica (Barnard *et al.*, 1993).

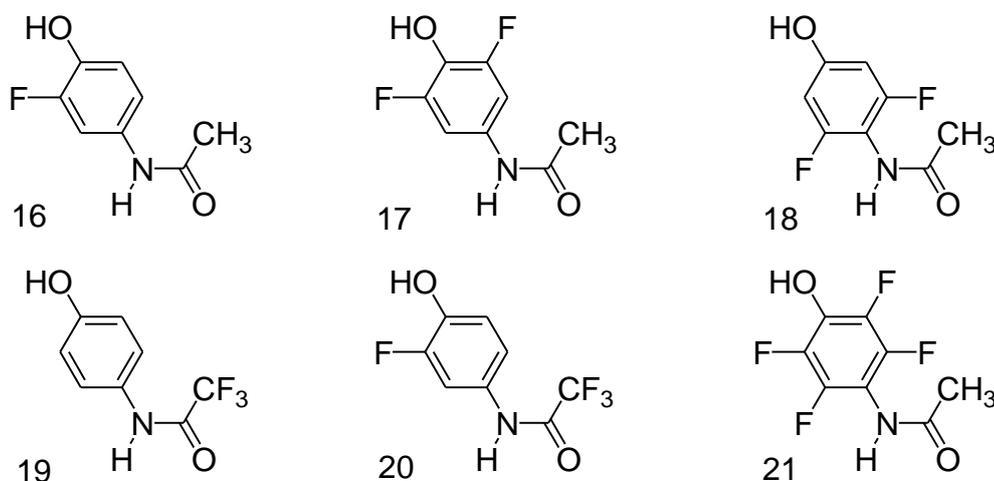


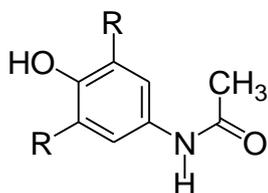
Figura 9: Paracetamol e derivados fluorados

### 2.5.4. Homólogos Mono e Dialquilados

A toxicidade dos derivados 3-monoalquil e 3,5-dialquil foram relacionados com os parâmetros de lipofilicidade, como o coeficiente de partição óleo/água (Log P), sendo observado que os derivados contendo os substituintes volumosos, com maior valor de LogP, diminuem a oxidação primariamente e secundariamente o ataque a aceto-imida-*p*-benzoquinona, e que esta propriedade pode ser regida pela lipofilicidade e efeitos estereoquímicos (Van de Straat *et al.*, 1987) (Tabela 4). Compostos substituídos por grupos elétron doadores nas posições 3,5 decrescem o potencial de ionização, aumentam a inibição da ciclooxigenase e diminuem a toxicidade, enquanto que os compostos substituídos por grupos elétron atraentes não alteram a toxicidade, mas diminuem a atividade biológica. As substituições na posição 3-alkil são equipotentes ao paracetamol, 2-alkil são potencialmente mais fracas e 3,5-dialquil apresentam a mesma potência analgésica e menor toxicidade. Enquanto que a *N*-alkilação destituiu tanto da toxicidade quanto da atividade analgésica (Van

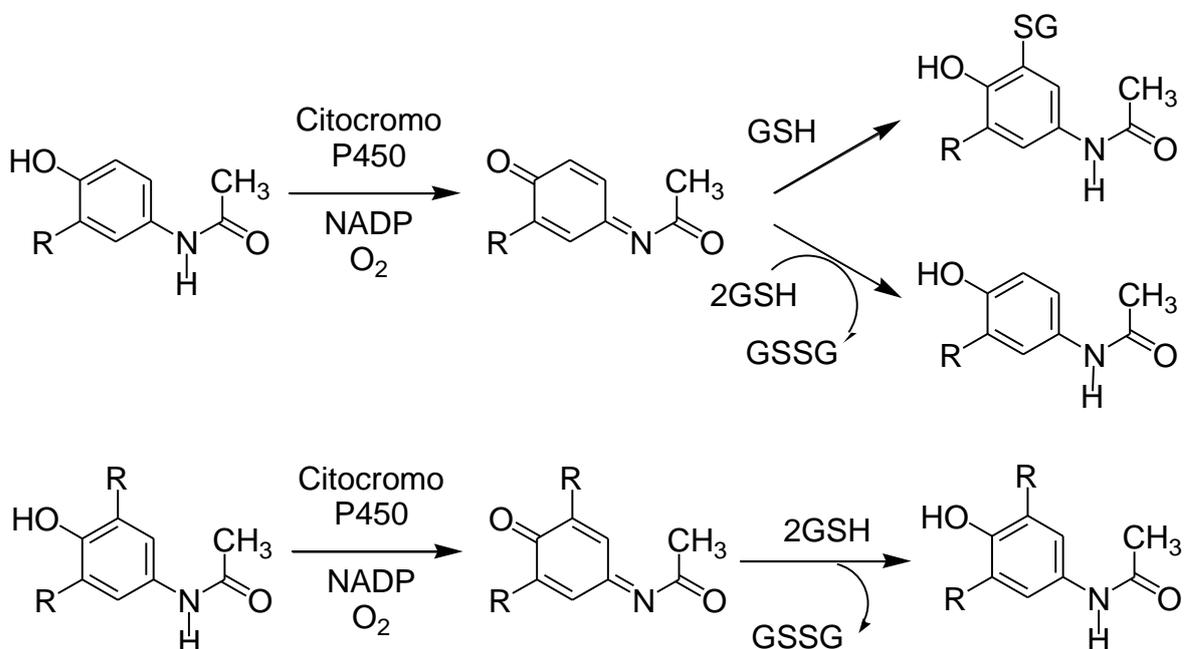
de Straat *et al.*, 1986).

**Tabela 4:** Atividade comparativa dos derivados 3,5 e 2,6 dimetilados do PAR.



Compostos	R	R	Controle %	Tratados %	Log P
1	H	H	28 ± 6	60 ± 6	0,311
13	CH <sub>3</sub>	H	20 ± 7	54 ± 4	0,793
22	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	–	–	1,306
23	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	–	–	1,707
24	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	H	–	–	2,357
10	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	14 ± 4	17 ± 3	1,108
25	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	–	–	1,870
26	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	–	–	2,671
27	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	11 ± 4	15 ± 2	3,180

Fonte: Toxicol. Appl. Pharmac., 1987.



**Figura 10:** Mecanismos de redução de mono e dissustituídos análogos

De acordo com a Figura 10, as diferenças de toxicidade destes compostos podem estar

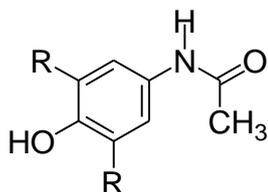
relacionadas tanto pelas reações de produção de adutos quanto pela depleção dos níveis de glutathiona reduzida (Van de Straat *et al.*, 1986).

### 2.5.5. Análogos Heteroatômicos

Outro estudo das propriedades químicas envolvendo compostos modificados do paracetamol, através da introdução além de grupos alquílicos, de halogenetos, oxigenados e sulfetos, nas posições 3 e 5 (Tabela 5), os quais demonstraram mais uma vez que o parâmetro eletrônico é o principal responsável pela atividade é o potencial de ionização.

Substituições de grupos elétron doadores nas posições 3,5 decrescem o potencial de ionização, aumentam a inibição da ciclo-oxigenase e diminuem a toxicidade, enquanto que com grupos elétron atraentes diminuem a atividade biológica, mas reduzem fracamente a toxicidade (Bessems *et al* 1995). Bessems e col. (1998) estudaram este grupo de compostos pelo método *ab initio* e demonstraram que a saída do hidrogênio ligado ao grupo fenol é muito mais favorecida do que o a saída do hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo amida em 125 kJ/mol, sendo confirmada experimentalmente, através do espectro de ESR (Espectro de Ressonância de Spin) e computacionalmente pelo método DFT (Diniz *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2006).

**Tabela 5:** Propriedades dos derivados 3,5 dissustituídos do PAR.



Compostos	R	p.f.	Potencial de Oxidação	IC <sub>50</sub> (mM)	LDH (%)
1	H	–	0,28 V	0,35 ± 0,08	50,6 ± 2,8
10	CH <sub>3</sub>	162 °C	0,21 V	0,16 ± 0,00	15,0 ± 0,9
28	OCH <sub>3</sub>	141 °C	0,12 V	0,20	12,4 ± 0,5
29	SCH <sub>3</sub>	135 °C	0,12 V	0,14 ± 0,03	14,5 ± 1,2
17	F	180 °C	0,32 V	1,14 ± 0,07	42,3 ± 0,9
30	Cl	157 °C	0,34 V	0,56 ± 0,13	36,0 ± 3,5
31	Br	171 °C	0,32 V	0,48 ± 0,07	26,1 ± 3,2
32	I	188 °C	–	1,11 ± 0,16	14,7 ± 1,4
	Branco	–	–	–	8,2 ± 1,0

Fonte: Chem. Biol. Inter., 1995.

### 2.5.6. Derivados Acil-Etér-Alquílico.

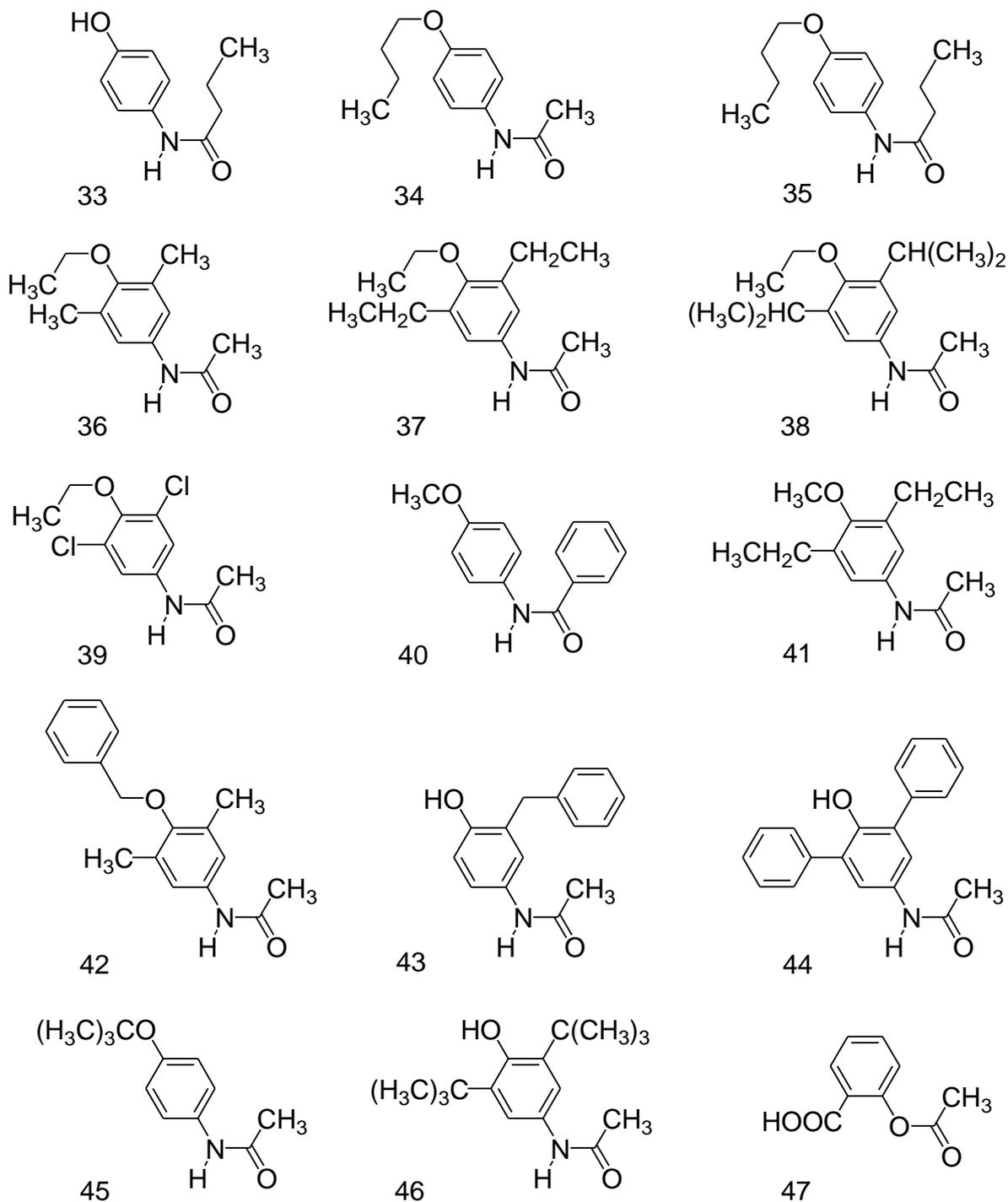
O estudo de novos AINEs derivados nas funções acil-éter exibiu pequeno ou nenhum efeito gastrotóxico (Tabela 6 e Figura 11). A síntese foi baseada na estrutura química do paracetamol, tendo em vista a elevada gastrotoxicidade da aspirina. Os compostos exibiram maiores atividades analgésicas e antiinflamatórias e menor gastrotoxicidade quando comparados com a aspirina. Das treze combinações, onze demonstraram possuir atividade analgésica 2-10 vezes comparado a potência da aspirina. Significativamente, todas as combinações mostraram baixíssima gastrotoxicidade quando comparadas com a aspirina (Duffy *et al.*, 2001).

**Tabela 6:** Efeito analgésico, antiinflamatório e gastrotóxico de derivados 2,6 dissustituídos.

Compostos	Atividade Analgésica ED 50 (mol/kg)	Antiinflamatório ED 30 (mol/kg)	Gastrotoxicidade
33	$2,4 \times 10^{-4}$	Inativo	1,4
34	$3,5 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$	1,2
35	$2,1 \times 10^{-4}$	Inativo	1,7
36	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,16 \times 10^{-4}$	1,2
37	$5,1 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	1,6
38	$4,2 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	2,3
39	$1,1 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	2,1
40	$3,9 \times 10^{-4}$	Inativo	1,1
41	$3,7 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	1,8
42	Inativo	Inativo	1,3
43	$1,4 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	1,3
44	—	—	1,5
45	$2,4 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-4}$	—
46	$4,9 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4}$	2,6
Aspirina 47	$9,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	9,5

Fonte: Pharm. & Pharmacol., 2001

O estudo da relação estrutura-atividade usando cálculos quânticos no nível DFT/B3LYP/6-31G(d) mostrou boa correlação entre o potencial de ionização e os resultados biológicos, mostrando a importância do caráter doador de elétrons do PAR e análogos acil-éter. O aumento das propriedades estereoquímicas, como volume e superfície molecular decresce a atividade anti-inflamatória.

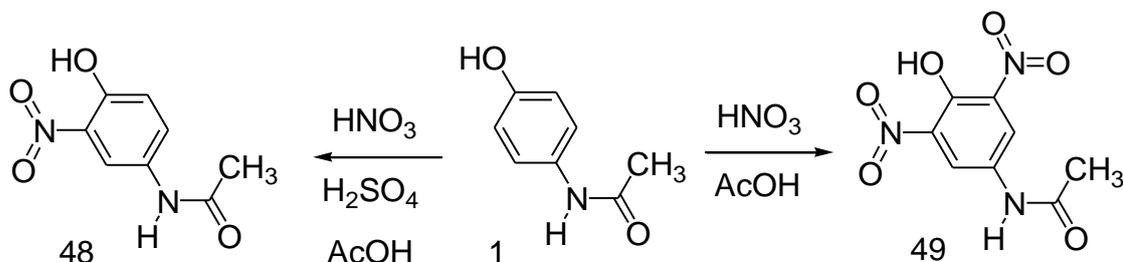


**Figura 11:** Paracetamol e derivados acil-éter-alquílico.

### 2.5.7. Nitroderivados do Paracetamol

Um eficiente protocolo foi desenvolvido para a síntese dos derivados 3-nitro- e 3,5-dinitro-paracetamol através de uma reação de nitração regioseletiva. As estruturas dos compostos nitrados foram confirmadas por ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$

e comparadas com o paracetamol. A nitração ocorre preferencialmente na posição *orto* ao grupo fenol do paracetamol como produtos principais e com altos rendimentos. A reação usando a mistura de HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na proporção (1:5) em ácido acético produziu como produto majoritário o composto 3-nitro-paracetamol, enquanto que a reação do HNO<sub>3</sub> em ácido acético produziu como produto principal o 3,5-dinitro-paracetamol. Os compostos apresentaram um aumento de sua acidez na seguinte ordem: paracetamol < 3-nitro-paracetamol < 3,5-dinitro-paracetamol, devido ao efeito retirador de elétrons do grupo nitro (Costa *et al.*, 2001). Os estudos de modelagem molecular mostrou também que o grupo nitro aumenta a hidrofiliicidade das moléculas. Infelizmente, os compostos apresentaram maior toxicidade e menor atividade nas doses de 100 e 250 mg quando comparados ao paracetamol na dose de 10 mg. Estes dados de atividade biológica e modelagem molecular ainda não foram publicados.



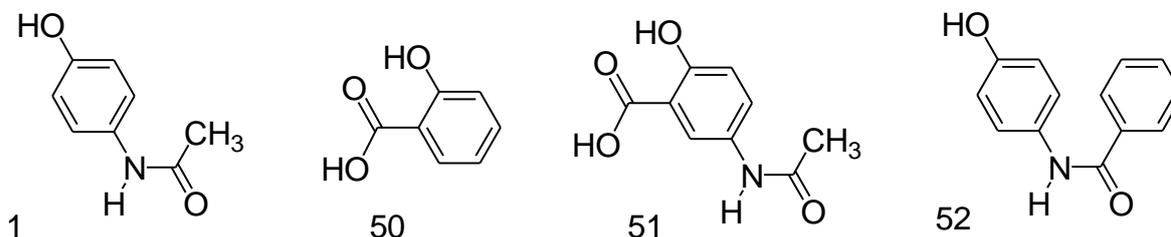
**Figura 12:** Paracetamol e derivados acílicos e dialquilados

### 2.5.8. Associação molecular *p*-aminofenol e salicilatos

Em outro estudo teórico e experimental descrevendo o desenvolvimento e avaliação do efeito sequestrante de radical livres de derivados da associação molecular do paracetamol e ácido salicílico. Inicialmente, os métodos teóricos foram empregados na a seleção de farmacos antioxidantes e em seguida a atividade antioxidante foi determinada através de métodos de avaliação tais como a capacidade antioxidante frente ao radical 1,1-de difenilo-2-picrilhidrazila e o nível de peroxidação lipídica iniciada pelo Fe<sup>2+</sup> ascorbato em eritrócitos humanos medidas através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

O derivado da associação molecular (51) exibiu uma inibição mais potente do que o ácido salicílico, enquanto que o composto substituído pelo grupamento benzofila (52) exibiu uma inibição mais potente do que o paracetamol. Os parâmetros moleculares relacionados a distribuição de eletrônica e estrutural, (potencial de ionização e orbital molecular ocupado de

mais alta energia – HOMO) apresentou boa correlação com o ação antioxidante dos compostos estudados nos diferentes testes efetuados (Borges *et al.*, 2013).



**Figura 13:** Derivados da associação molecular

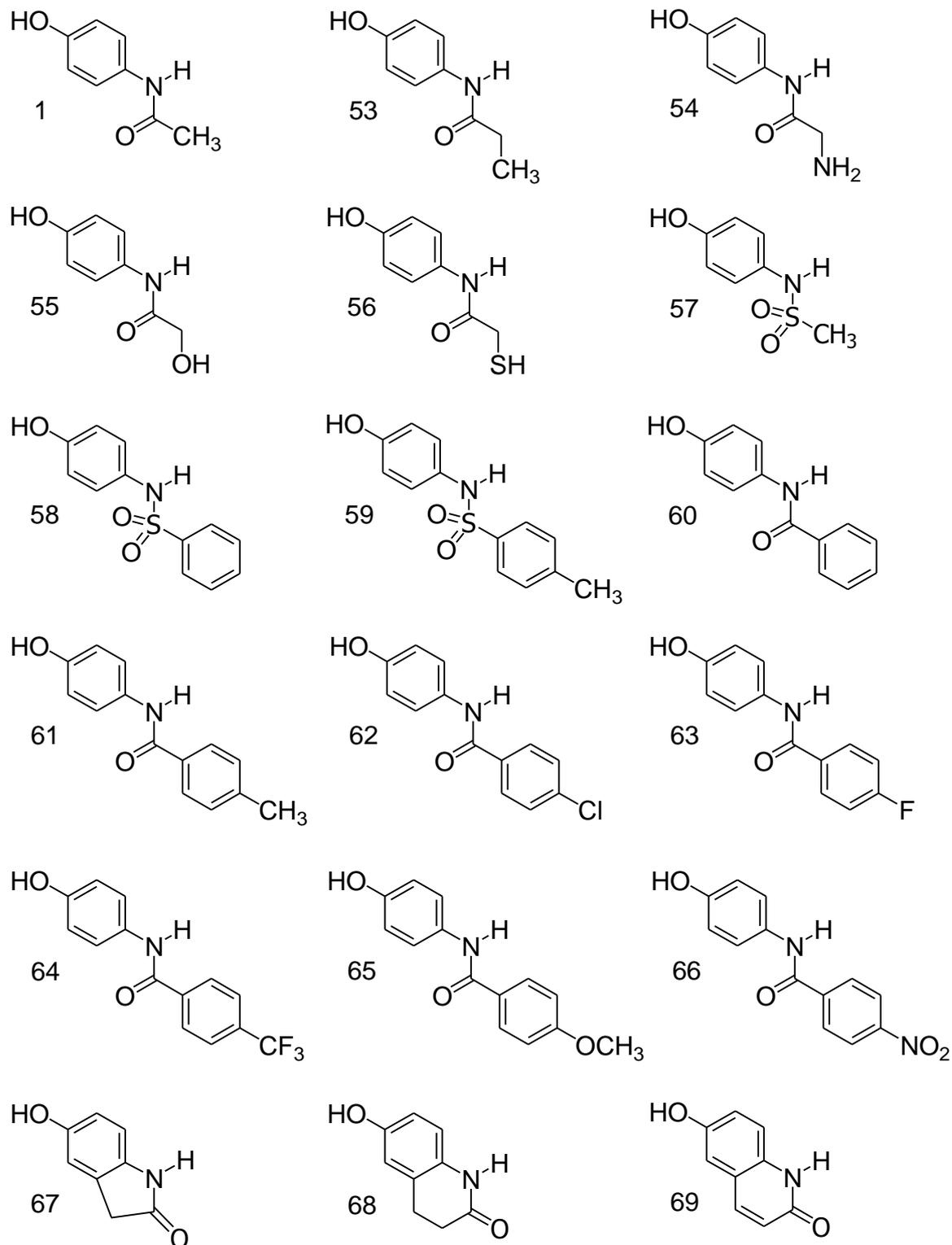
### 2.5.9. Derivados Amídicos e Lactamas

Outro estudo desenvolvido por nosso grupo, visando o planejamento de novos derivados do paracetamol a partir de duas enzimas chaves: a prostaglandina-endoperóxide sintase (PGES) e o sistema citocromo P-450, responsáveis em humanos e animais experimentais pelo efeito analgésico e o metabolismo, respectivamente. Deste modo, uma série de derivados amídicos e lactamas do paracetamol substituídos com propionamida e seus análogos isómeros clássicos e os não clássicos sulfonamidas, benzilamidas e  $\gamma$ - ou  $\delta$ -lactamas foram investigados usando cálculos de química quântica no nível de teoria DFT/B3LYP, com o conjunto de base 6-31G\*.

Os valores de HOMO, potencial de ionização (PI), energia de dissociação da ligação fenólica ( $EDL_{OH}$ ) e energia de estabilização do radical ( $\Delta E_{iso}$ ) para a oxidação dos derivados, através da abstração de um elétron ou um átomo de hidrogênio do grupo hidroxila fenólico, foi relacionado com a reatividade química do radical tirosil formando moléculas do tipo *N*-acetil-*p*-benzosemiquinona imina (NAPSQI). Enquanto que a segunda abstração de hidrogênio foi relacionada com a reação química entre o grupo amida de derivados NAPSQI com radical hidroxil formando moléculas do tipo *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI).

Os baixos valores de  $EDL_{OH}$  e  $\Delta E_{iso}$  foram relacionados com altos valores de sequestro do radical tirosil, assim como com a contribuição de densidade de spin das formas cátion radical e semiquinone, enquanto que os altos valores da  $EDL_{NH}$  foram relacionados com menor formação de NAPQI e os valores de LUMO com a reatividade tipo sistema

Michael do NAPQI. Os resultados mostram que propionamida e lactamas podem ser boas estratégias para o desenvolvimento de fármacos analgésicos mais seguros derivados do paracetamol.



**Figura 14:** Paracetamol e derivados amídicos e lactamas

**Tabela 7:** Propriedades teóricas do paracetamol e derivados.

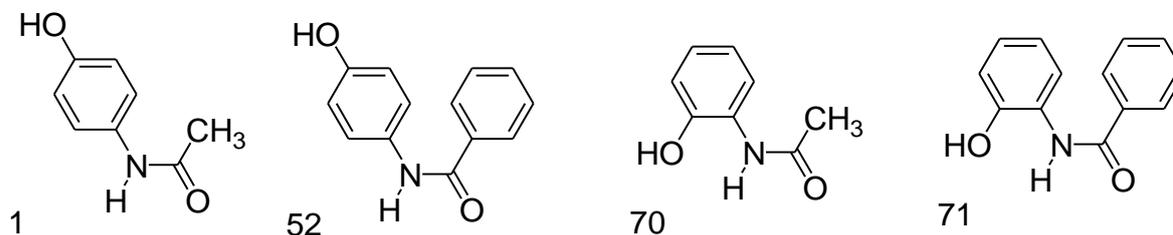
Compounds	HOMO (eV)*	IP (kcal mol <sup>-1</sup> )*	BDE <sub>OH</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )*	$\Delta$ E <sub>iso</sub>	BDE <sub>NH</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	LUMO (eV)**
<b>1</b>	-5,45	170,76	81,68	-4,38	79,00	-3,69
<b>53</b>	-5,43	169,87	81,57	-4,49	78,80	-3,67
<b>54</b>	-5,26	165,61	80,95	-5,11	81,68	-3,36
<b>55</b>	-5,39	169,09	81,61	-4,45	81,01	-3,27
<b>56</b>	-5,59	172,63	78,38	-7,68	83,02	-3,93
<b>57</b>	-6,35	192,24	82,47	-3,59	66,19	-3,74
<b>58</b>	-5,82	176,76	83,16	-2,90	65,09	-3,64
<b>59</b>	-5,77	175,12	82,94	-3,12	65,29	-3,59
<b>60</b>	-5,46	167,24	81,69	-4,37	76,14	-3,69
<b>61</b>	-5,41	165,19	81,48	-4,58	76,15	-3,62
<b>62</b>	-5,58	169,13	82,13	-3,93	75,48	-3,82
<b>63</b>	-5,52	168,38	81,91	-4,15	75,44	-3,75
<b>64</b>	-5,65	171,78	82,43	-3,63	75,66	-3,91
<b>65</b>	-5,35	161,63	81,24	-4,83	75,77	-3,54
<b>66</b>	-5,79	175,00	82,98	-3,08	75,34	-2,79
<b>67</b>	-5,49	171,97	80,28	-5,78	76,78	-3,74
<b>68</b>	-5,51	171,01	80,82	-5,24	80,36	-3,63
<b>69</b>	-5,64	173,24	82,30	-3,76	84,19	-4,06

\* Análogos do paracetamol. \*\* Derivados de NAPQI.

### 2.5.10. Regioisômeros

Outro planejamento molecular baseado na estrutura do ligante foi realizado usando método de química quântica no nível DFT para regioisômeros do paracetamol como candidatos analgésicos. Os descritores moleculares HOMO, PI, EDL<sub>OH</sub> e densidade de spin foram relacionados com a reatividade química do radical tirosil formando moléculas do tipo *N*-acetil-*o*-benzosemiquinona imina (NAOSQI) através da abstração de elétron ou hidrogênio. Os resultados mostraram a molécula ortobenzamol (71) como a mais promissora. Este composto foi sintetizado, avaliado em modelos de nocicepção como contorsal abdominal, edema de pata e placa quente, e os resultados confirmaram a predição do estudo teórico. Todos os resultados biológicos sugerem uma atividade antinociceptiva mediada por

receptores opióides. De fato, os resultados mostraram que no tempo de 90 e 120 min, o novo composto teve um efeito comparável a morfina, o fármaco padrão do teste (Queiroz *et al.*, 2012).



**Figura 15:** Regioisômeros do paracetamol

## 2.6. Planejamento de Fármacos usando Bioisosterismo

Langmuir (1919) observou que moléculas ou íons que têm número e arranjo idênticos de elétrons apresentam propriedades físico-químicas semelhantes, tal com  $N_2$  e CO, os quais chamou de isósteros, enquanto que o estudo do arranjo eletrônico de moléculas foi chamado isosterismo. Posteriormente, Erlenmeyer definiu como isósteros os átomos, íons ou moléculas que contêm idênticas camadas periféricas de elétrons (isoeletrônicos), os quais ocorrem mais frequentemente entre átomos que estão na mesma coluna periódica, onde as camadas externas de elétrons são idênticas ou quase idênticas e entre átomos com pequena variação em tamanho e massa. Grimm (1925) formulou regras para a substituição entre alguns grupos isostéricos, que são conhecidas como regra do hidreto, onde os grupos isostéricos ficariam nas colunas, formados pelo elemento anterior da linha horizontal e adicionando um átomo de hidrogênio (ou hidreto), continuando este processo até não ser mais possível. Friedman (1951) verificou-se que compostos quimicamente isósteros apresentam, não raro, atividade farmacológica semelhante. Esses foram chamados de bioisósteros, e ao seu estudo deu-se o nome de bioisosterismo. Burger (1970) classificou os isósteros ou bioisósteros em duas grandes categorias: os clássicos e os não-clássicos. Assim, a vinilogia e o regioisomerismo é uma técnica não clássica, que quando confrontados com sua molécula de origem mostram um composto cuja configuração eletrônica com pequenas ou grandes variações no arranjo estereoquímico principalmente pelo aumento da distancia entre os grupos funcionais, com mudanças nas propriedades de solubilidade, mas que preservam uma similaridade na reatividade química ao composto protótipo. Em geral, não apresentam o mesmo número de átomos e as mesmas características estereoquímicas e eletrônicas dos isósteros clássicos, mas produzem atividades biológicas similares (THOMAS, 2003).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Modelagem Molecular**

Os métodos utilizados são: o método semi-empírico PM3, empregados na otimização da geometria e obtenção de parâmetros eletrônicos, métodos teóricos para caracterização de parâmetros moleculares não eletrônicos e métodos estatísticos para classificação dos parâmetros moleculares responsáveis pela atividade biológica estudada usando pacotes computacionais como Hyperchem e ChemOffice (Eszter *et al.*, 2002; Furter & Moore, 2001).

#### **3.2. Energia dos Orbitais de Fronteira (HOMO e LUMO)**

O HOMO é um parâmetro relacionado com a capacidade doadora de elétrons que caracteriza o composto como nucleofílico, é o orbital molecular ocupado de maior energia. A maior ou menor nucleofilicidade estão relacionados com o maior ou menor valor em módulos, respectivamente. Enquanto que o LUMO está relacionado com a capacidade aceptora de elétrons que caracteriza um eletrofilo, é o orbital molecular desocupado de mais baixa energia, logo, baixos valores de LUMO indicam maior eletrofilicidade. Seus valores são expressos em elétron-volts (eV) (Korolkovas, 1968), e avaliam a estrutura química de uma substância, que por possuir regiões ricas ou deficientes em elétrons podem reagir como radicais livres. É um importante parâmetro que contribui para uma maior compreensão da reatividade química de um candidato com atividade antioxidante (Kubinyi, 2002).

#### **3.3. Logaritmo do Coeficiente de Partição (CLog P)**

Este parâmetro determina a solubilidade da molécula e sua capacidade de vencer as barreiras biológicas e mover-se nas diferentes biofases. O coeficiente de partição de uma determinada espécie química é definido como sendo a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando dissolvida em sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa, e está associado à mudança de energia livre provocada pela substância sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema (Kubinyi, 2002). Esta propriedade desempenha papel fundamental na bioatividade de compostos, embora seja apenas uma das várias propriedades físico-químicas que, atuando conjuntamente, determinam a expressão da atividade biológica de compostos, úteis na estimativa da absorção de fármacos dentro do organismo.

### 3.4. Energia de Hidratação (EH)

A energia de hidratação está relacionada com a capacidade dos fármacos absorverem ou liberarem energia, quando em contato com solvente aquoso. Sua importância está relacionada ao transporte e distribuição pelas diferentes biofases plasmáticas, bem como pela atração e interação do fármaco com seu receptor. Os valores de EH são expressos em kilocalorias por mol (kcal/mol). Valores negativos indicam uma reação exotérmica, enquanto que valores positivos indicam uma reação endotérmica. Representa um importante parâmetro complementar para a compreensão dos comportamentos ligante com um receptor e de um componente que precisa vencer as barreiras biológicas em comparação com outras moléculas com propriedades farmacocinéticas conhecidas (Miyamoto & Kollman, 1993).

### 3.5. Potencial de ionização (PI)

O potencial de ionização (PI) de um átomo ou molécula é a energia necessária para remover um elétron de sua estrutura atômica ou molecular. O PI é calculado pela diferença de energia da molécula neutra e seu respectivo cátion radical, segundo a equação:

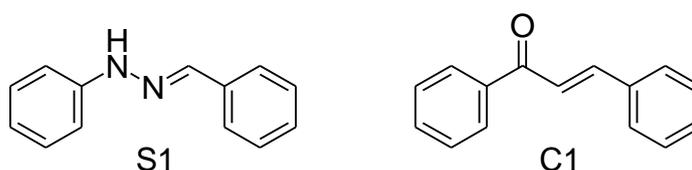
$$PI = [E_{ParXH^{+}}] - [E_{ParXH}]$$

### 3.6. Mapas de Potencial Eletrostático Molecular (MEPs)

Os mapas de potenciais eletrostáticos são representados por valores numéricos classificados por cores que fornecem uma medida total da molécula assim como a posição de potenciais eletrostáticos negativos ou positivos. As regiões de potencial eletrostático positivo indicam o excesso de carga positiva, conduzindo a repulsão de possível carga positiva de outra molécula, enquanto que as regiões de potencial negativo indicam as áreas de excesso de carga negativa, conduzindo a atração da carga positiva.

### 3.7. Estudos Comparativo

Este estudo visa avaliar as diferenças de reatividade química entre os grupos eletrorretiradores da chalcona **C1** com os grupos eletrondoadores da hidrazona **S1** (Figura 16).



**Figura 16:** Estruturas químicas da hidrazona (S1) e chalcona (C1).

### 3.8. Metodologia Sintética

A preparação ocorre através da reação em agitação magnética entre os aldeídos substituídos (R1) com a fenilhidrazina (R2) usando etanol como solvente e ácido sulfúrico como catalizador (Figura 17) para a produção dos derivados de fenilhidrazonas (P).

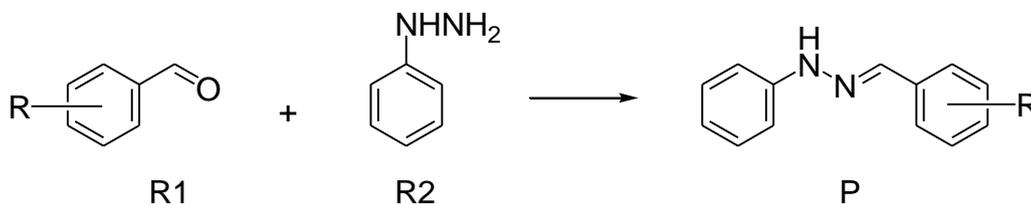


Figura 17: Metodologia sintética de obtenção dos derivados de hidrazonas.

### 3.9. Identificação e caracterização dos derivados hidrazônicos

Os compostos foram identificados e caracterizados usando ponto de fusão, teste de solubilidade, espectro de infravermelho (IV).

### 3.10. Compostos Sintetizados

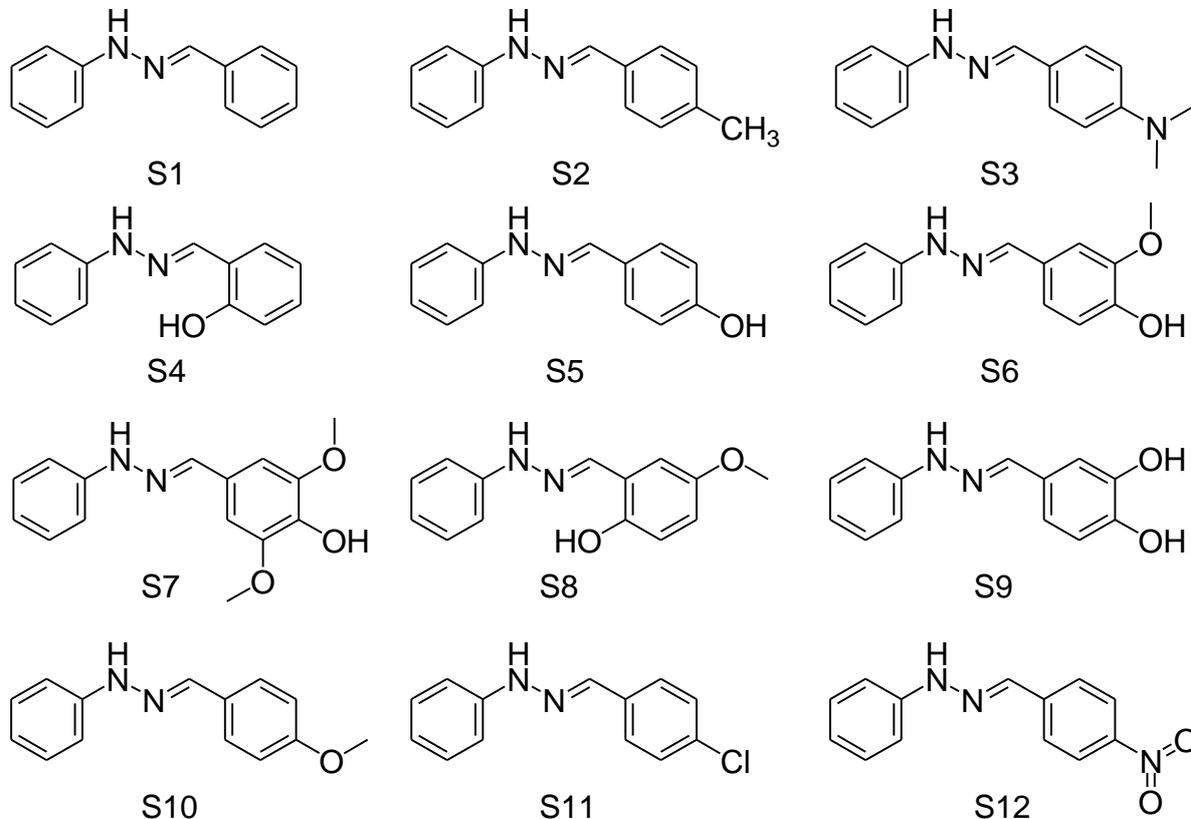


Figura 18: Derivados de hidrazonas benzilidênicas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estudo comparativo entre hidrazona e chalcona

Os derivados do paracetamol foram planejados usando a técnica do bioisosterismo não-clássico através da substituição de um grupo carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada (aceptor de elétrons) por hidrazona (doador de elétrons) (Figura 19), visando modificar as propriedades eletrônicas e de solubilidade, mas preservando as propriedades estruturais responsáveis pelas características estereoquímicas e conformacionais. O principal propósito deste estudo é mostrar as relações bioisostéricas entre estes grupos funcionais, bem como as diferenças de reatividade química em possíveis receptores biológicos. Estas propriedades são apresentadas na Tabela 8.

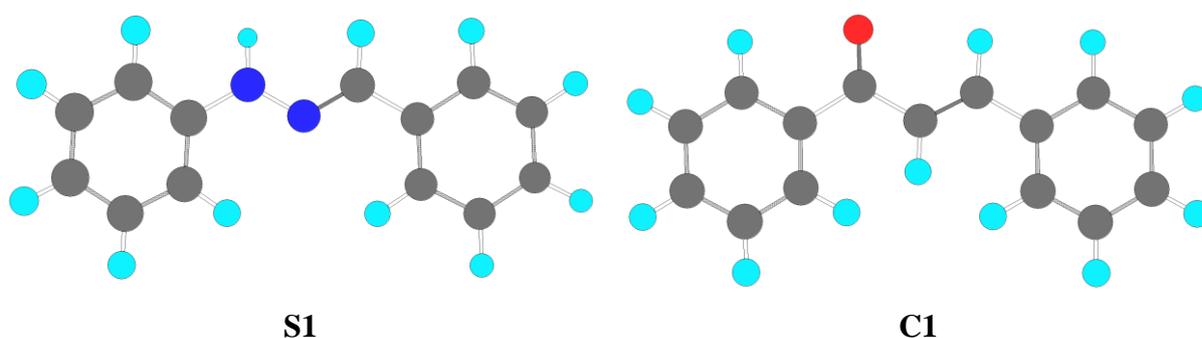


Figura 19: Estrutura da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).

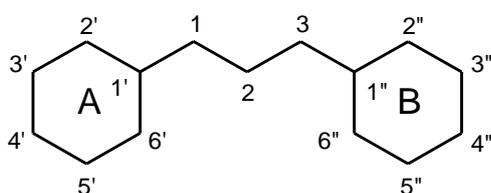
De fato, como mostrado na Tabela 8, os valores do momento dipolar mostram que a fenilhidrazona (1,7148) apresenta maior polaridade que a chalcona (3,0044).

Tabela 8. Propriedades estruturais e de solubilidade dos derivados do paracetamol.

Propriedades/Compostos	Fenilhidrazona	Chalcona
Momento Dipolar (D)	1,7148	3,0044
Energia de Hidratação (kcal/mol)	-7,78	-3,43
CLogP	3,31	3,62
Peso Molecular (u.m.a.)	196,25	208,26
Volume Molecular ( $\text{Å}^3$ )	666,76	685,93
HOMO (eV)	-5,09	-6,32
LUMO (eV)	-1,12	-2,11
GAP (eV)	3,97	4,20

A energia de hidratação (-7,78 kcal/mol) está de acordo com a maior polaridade da fenilhidrazona, mostrando que ela apresenta maior capacidade de absorver ou liberar energia em contato com solvente aquoso que a chalcona (-3,43 kcal/mol). Os valores negativos indicam uma reação exotérmica, mas a fenilhidrazona apresenta maior valor, portanto ela apresenta maior solubilidade do que a chalcona em solvente aquoso. Estes resultados estão de acordo com os valores do CLogP mostram que a chalcona possui maior lipofilicidade (3,62) que a fenilhidrazona (3,31).

A análise estrutural comparativa entre a fenilhidrazona (S1) e a chalcona (C1) demonstra um aumento do número de grupos aceptores de ligações de hidrogênio nas posições C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>. Na Figura 20 podemos observar que na posição 1, o grupo aceptor de elétrons (carbonila) foi substituído por um grupo doador de elétrons (amina), de modo que o grupo aceptor de hidrogênio torna-se um doador de hidrogênio para a formação de ligações de hidrogênio. Enquanto que na posição 2, o grupo carbeno foi substituído por um grupo imina, com um forte caráter aceptor de hidrogênio.



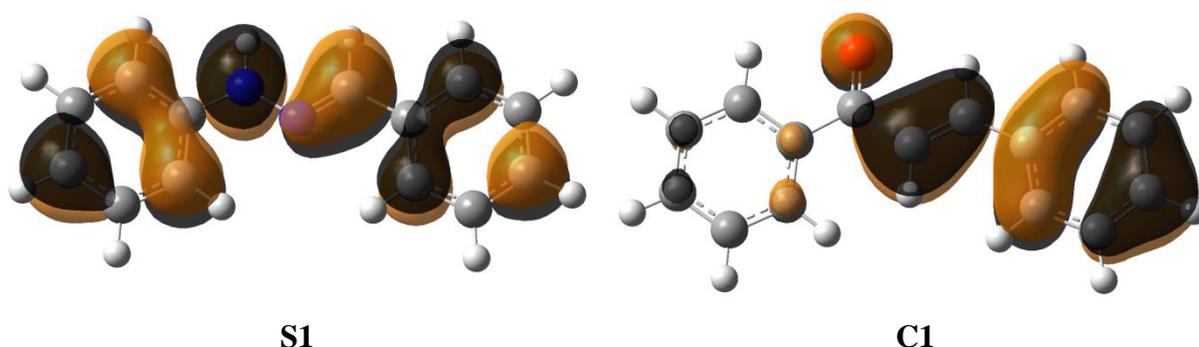
**Figura 20:** Numeração da estrutura básica da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).

Uma terceira posição que pode ser responsável por possível alteração na reatividade química e interação química entre a fenilhidrazona (S1) e a chalcona (C1) é o carbono da posição 3. No entanto, somente os métodos quânticos podem inferir as diferenças nesta posição entre os dois compostos, os quais poderão ser observados através da análise dos orbitais e cargas moleculares, os quais serão realizados mais adiante.

Outras propriedades estruturais que mostram uma relação de similaridade entre estes bioisostéros são o peso e o volume moleculares. Os resultados demonstram que os compostos têm valores aproximados, com perda de um átomo de carbono. Estas propriedades são importantes, pois indicam se os compostos podem ocupar a mesma região espacial do receptor biológico, portanto, moléculas muito diferentes podem ter uma afinidade diferente.

A nucleofilicidade dos análogos foi determinada usando os valores da energia de HOMO. A energia de HOMO é um importante parâmetro eletrônico da estrutura molecular. As moléculas que possuem baixos valores de energia de HOMO têm fraca habilidade doadora de elétrons. Ao contrário, altos valores de energia de HOMO implicam que a molécula é boa doadora de elétrons. Os valores de HOMO em fase gasosa foram de -5,09 eV para a fenilhidrazona e -6,32 eV para a chalcona, conseqüentemente, os resultados dos cálculos mostram que a fenilhidrazona é mais nucleofílica que a chalcona, ou seja, apresenta uma melhor capacidade doadora de elétrons.

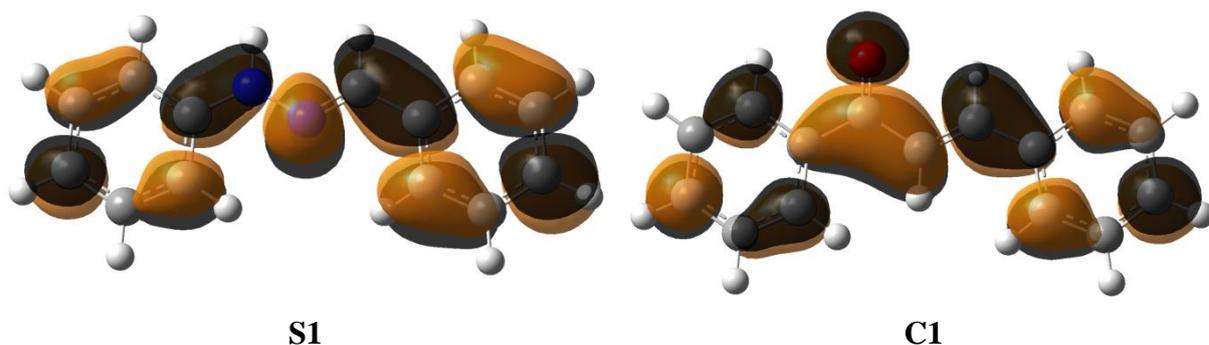
A disposição de HOMO nas moléculas pode indicar qualitativamente seus sítios de aceção de grupos eletrofílicos através de reação de transferência de elétron. A análise gráfica dos coeficientes dos orbitais moleculares de HOMO (Figura 21) demonstra as regiões ricas em elétrons (elétron-doadoras). A análise do orbital molecular de mais alta energia mostra os grupamentos que estão contribuindo para a formação deste orbital, portanto, se a molécula interagir com seu sítio receptor como doador de elétron deverá ser por esta região. Ao mesmo tempo, se a molécula doar um elétron, os grupos que contribuem por efeito indutivo ou efeito de ressonância para a formação do HOMO, deverá participar na estabilização do elétron desemparelhado. Assim, podemos observar uma significativa contribuição, principalmente da fenilhidrazona comparado com a chalcona. Outro grupo com significativa diferença é a posição C3 como possível acceptor de Michael, seguida pela posição C1, com grande contribuição para a fenilhidrazona. Desse modo, podemos observar que a fenilhidrazina apresenta maior caráter nucleofílico que a chalcona.



**Figura 21:** HOMO da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).

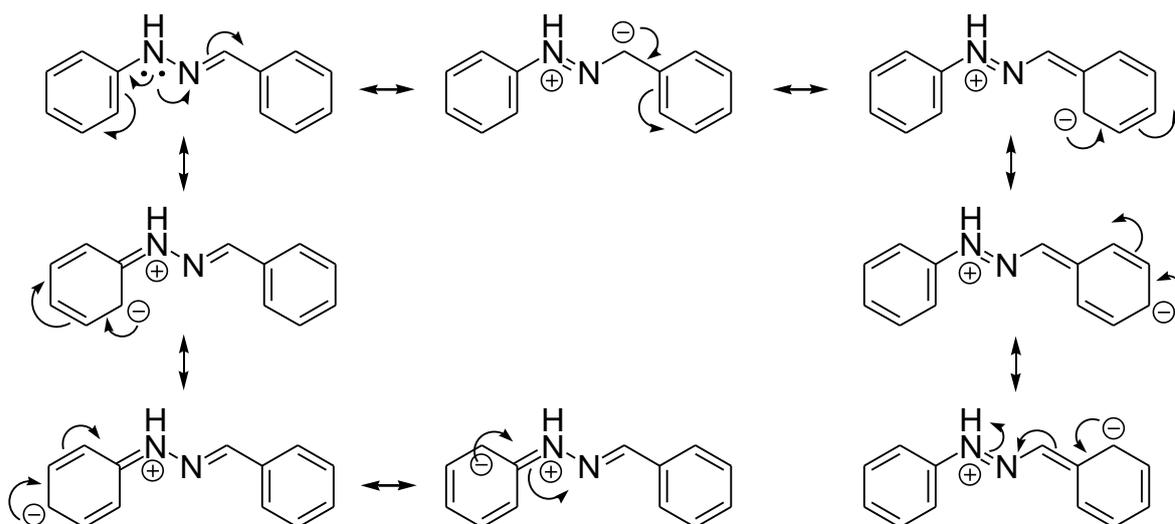
Por outro lado, a disposição de LUMO nas moléculas pode indicar qualitativamente seus sítios de aceção de grupos nucleofílicos através de reação de ataque por grupos ricos em

elétrons. A análise gráfica dos coeficientes dos orbitais moleculares de LUMO (Figura 22) demonstra as regiões deficientes em elétrons (elétron-aceptoras). A análise do orbital molecular de mais baixa energia apresenta os grupamentos que estão contribuindo para a formação deste orbital, portanto, se a molécula interagir com seu sítio receptor como aceptor de elétron deverá ser por esta região. Assim, podemos observar uma significativa assimetria, principalmente na chalcona, onde a posição C3 é o possível ponto aceptor de Michael.



**Figura 22:** LUMO da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).

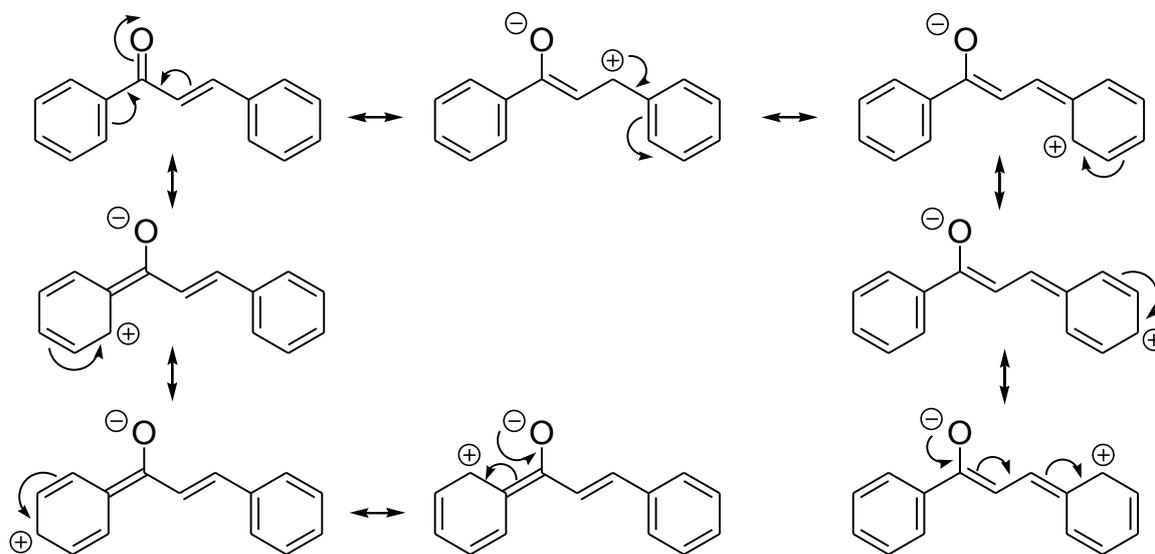
As estruturas de ressonância do fenilhidrazona e chalcona mostram diferenças de cargas, de acordo com a nucleofilidade e eletrofilicidade. A Figura 23 mostra que a fenilhidrazona apresenta sete estruturas de ressonância deslocalizadas a partir do grupo amino doador com regiões ricas em elétrons nas posições *orto* e *para*, assim como no carbono imina da hidrazona.



**Figura 23:** Estruturas de ressonância da fenilhidrazona.

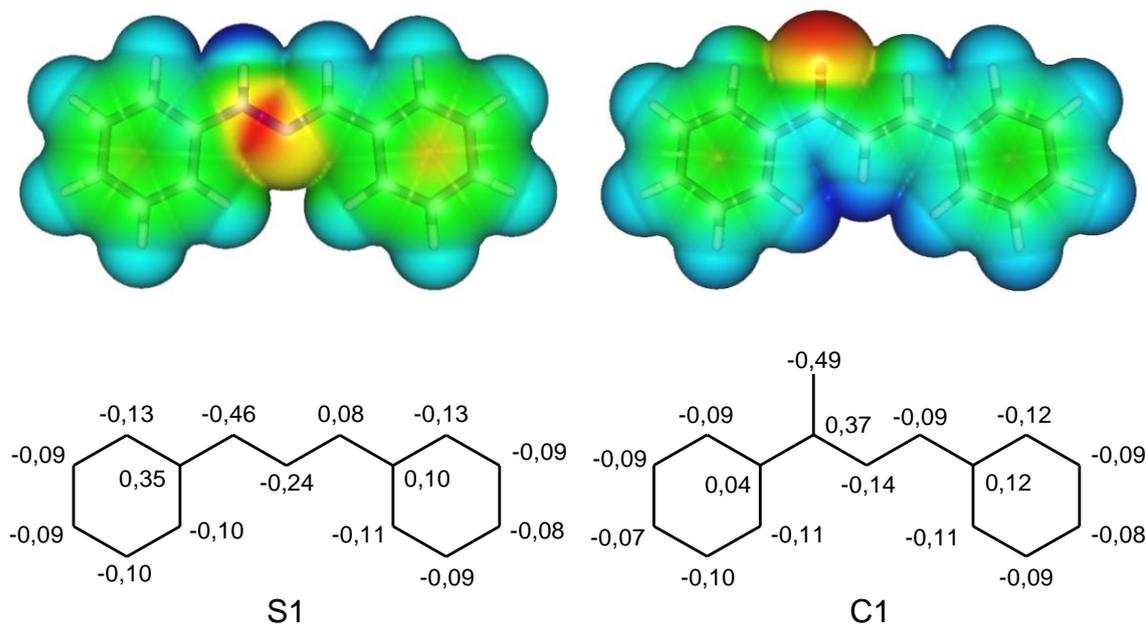
Ao contrário, a Figura 24 mostra que a chalcona também apresenta sete estruturas de ressonância, exceto pela mudança da carga, onde as posições *orto* e *para* apresentam regiões

deficiente em elétrons, assim como no carbono  $\beta$ - do alceno conjugado a carbonila.



**Figura 24:** Estruturas de ressonância da chalcona.

De fato, os mapas do potencial eletrostático e as cargas moleculares mostram diferenças na polaridade dessas moléculas. No entanto, como observado na Figura 25 não houve diferença significativa tanto no MEPs quanto nas cargas moleculares de Mülliken.

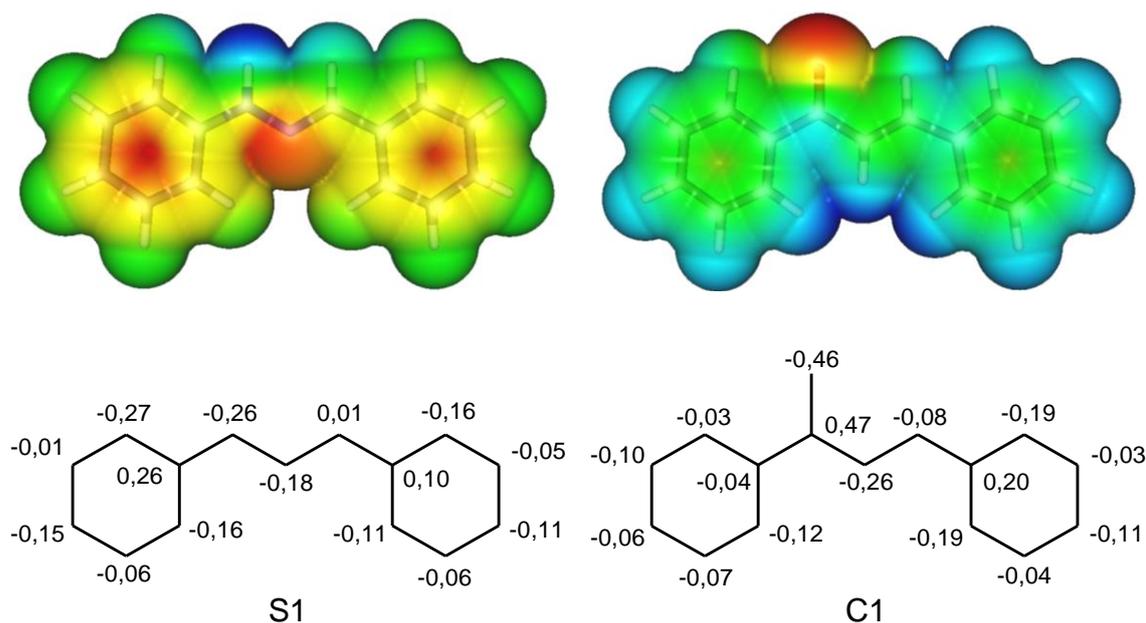


**Figura 25:** MEPs da cargas de potencial eletrostático.

Os resultados para o MEPs são qualitativamente diferentes quando calculados pelo método do potencial eletrostáticos molecular, como observado na Figura 26, uma vez que os valores numéricos são classificados por cores que fornecem uma medida total da molécula

assim como a posição de potenciais eletrostáticos negativos ou positivos, onde as regiões de potencial eletrostático positivo indicam o excesso de carga positiva representadas pelas cores azul (altos valores) e verde (baixos valores), enquanto que as regiões de potencial negativo indicam as áreas de excesso de carga negativa, representadas pelas cores vermelho (altos valores) e amarelo (baixos valores).

Entretanto os valores não são quantitativamente diferentes, pois houve pouca variação dos valores nas cargas obtidas pelo método do potencial eletrostáticas quando comparados com os valores das cargas de Mülliken.



**Figura 26:** MEPs e cargas do potencial eletrostático.

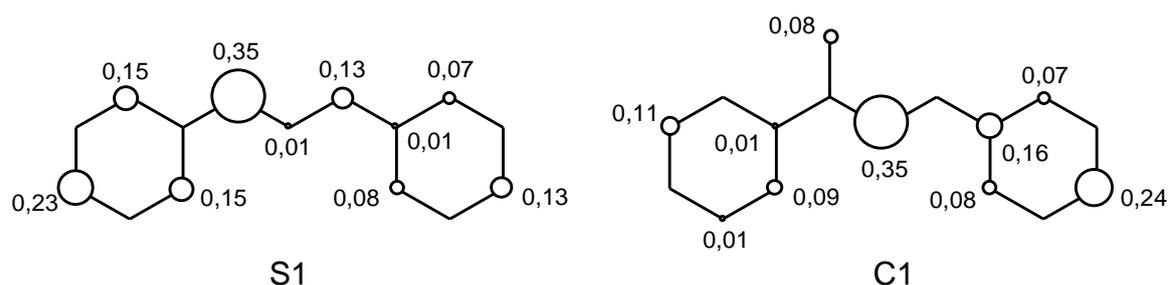
As diferenças entre a nucleofilicidade e eletrofilicidade entre os análogos foi determinada usando os valores da energia de HOMO, LUMO e GAP, como observado anteriormente, mostraram a maior caráter elétron doador da fenilhidrazona e maior caráter elétron aceptor da chalcona. No entanto, estes valores apresentaram baixo desvio padrão. Entretanto, o valor calculado do potencial de ionização mostrou uma diferença de quase 30 kcal/mol, com valores de 153,57 kcal/mol para o fenilhidrazona e 183,54 kcal/mol para a chalcona, com um alto valor de desvio-padrão (Tabela 9).

**Tabela 9.** Propriedades estruturais e de solubilidade dos derivados do paracetamol.

Propriedades/Compostos	Fenilhidrazona	Chalcona	Média	DesPad
HOMO (eV)	-5,09	-6,32	-5,70	0,86
LUMO (eV)	-1,12	-2,11	-1,65	0,70
GAP (eV)	3,97	4,20	4,08	0,16
PI (kcal/mol)	153,57	183,54	168,55	21,19

Outra propriedade importante para avaliação da nucleofilicidade e eletrofilicidade destes derivados são os cálculos da densidade de spin gerados após a abstração do elétron formando um intermediário radicalar do tipo cátion radical, de modo que o elétron desemparelhado se distribui sobre toda molécula sendo estabilizada por grupos doadores de elétrons e desestabilizado por grupos aceptores de elétrons.

As distribuições de densidade de spin para o cátion radical mostraram contribuições características dos tautômeros nas posições *orto* (2', 6', 2'' e 6'') e *para* (4' e 4'') dos anéis fenila da molécula fenilhidrazona com contribuição significativamente maior no anel A (Figura 27). Enquanto que a molécula chalcona tem maior contribuição no anel B. A maior contribuição da fenilhidrazona está localizada no N<sub>1</sub>, enquanto que na chalcona esta localizado na posição C<sub>2</sub>. Dentre as características estruturais mais importantes é a maior simetria molecular para a hidrazona quando comparada com a chalcona.

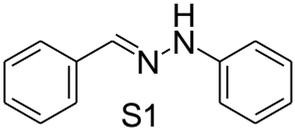
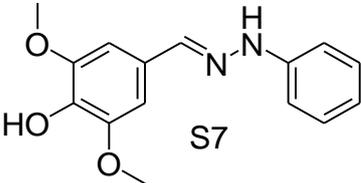
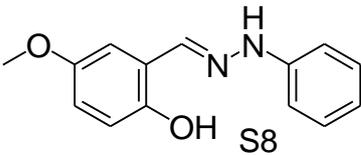
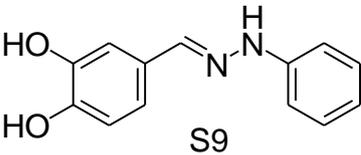
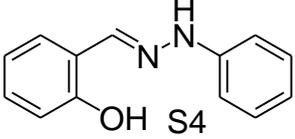
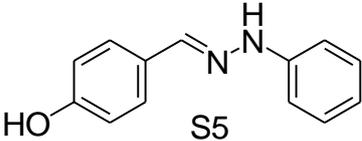
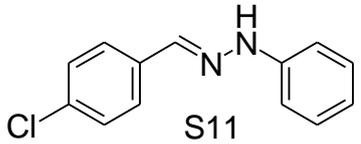
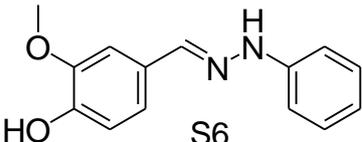
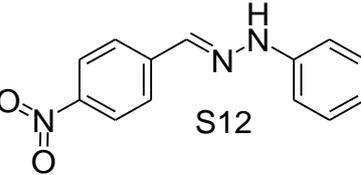
**Figura 27:** Densidade de spin da fenilhidrazona (S1) e chalcona (C1).

Estes resultados mostram que o nitrogênio do grupo amina tem maior participação na estabilização da carga radicalar que o nitrogênio imínico do grupo hidrazona. A maior participação tanto do anel A quanto do B na estabilização da carga parcial positiva é a principal propriedade responsável pelo maior caráter elétron doador da hidrazona comparado a molécula da chalcona.

## 4.2. Síntese de Derivados Hidrazônicos

De acordo com o padrão de estabilização pelo efeito eletrônico o anel B foi substituído nas posições *orto* ou *para* por grupos elétron-doadores, tais como metil, dimetilamina, hidroxila e metoxila. Grupos elétron-retiradores, tais como cloro e nitro também foram considerados. Na Tabela 10 são apresentados 12 compostos com seus respectivos pontos de fusão (PF) em graus Celsius (°C).

**Tabela 10:** Propriedades estruturais e de solubilidade dos derivados de fenilhidrazonas

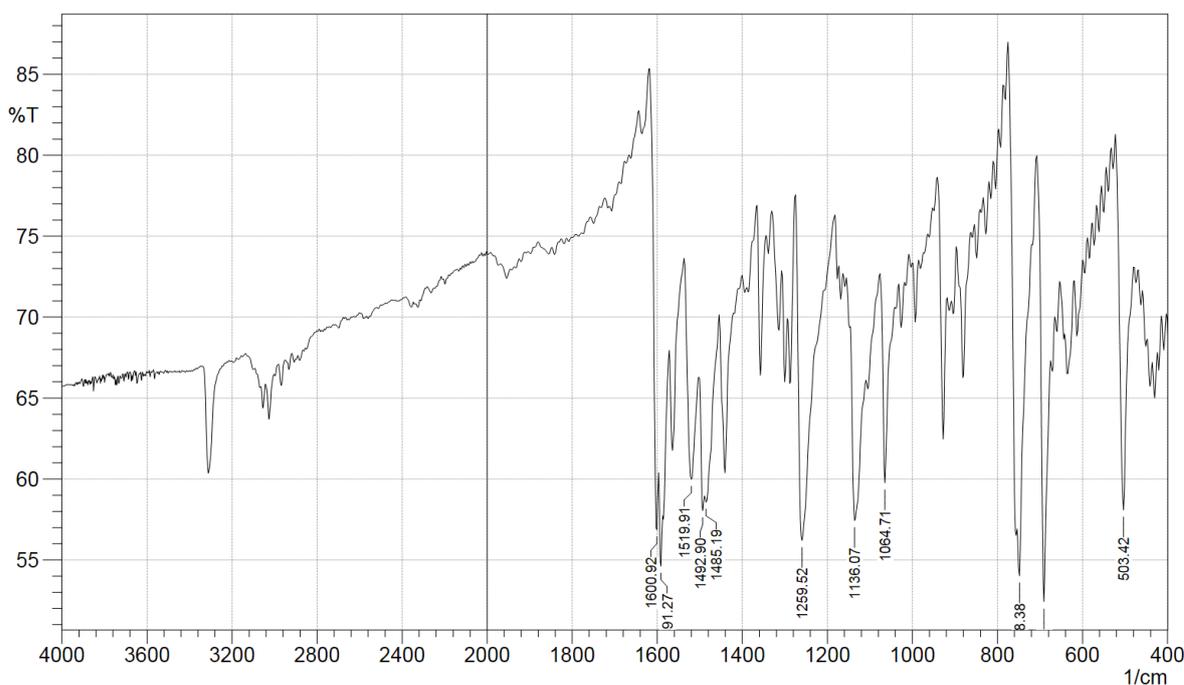
Compostos	PF (°C)	Compostos	PF (°C)
	155,6 – 161,2 [158 – 160]		128,3 – 134,3
	116,5 – 117,3 [110 – 112]		212,5 – 218,1
	151,9 – 156,0		168,5 – 172,6
	145,9 – 147,3		122,2 – 125,6 [120 – 122]
	172,0 – 176,5		126,7 – 128,6 [122 – 124]
	89,6 – 92,8		157,6 – 158,7 [156 – 159]

As moléculas S1-S12 foram preparadas a partir da reação entre a fenilhidrazina com os aldeídos aromáticos: benzaldeído, tolualdeído, dimetilamina-benzaldeído, salicilaldeído, *p*-

hidroxi-benzaldeído, vanilina, siringaldeído, 5-metoxi-2-hidroxi-benzaldeído, aldeído catecúlico, *p*-metoxi-benzaldeído, *p*-cloro-benzaldeído e *p*-nitro-benzaldeído, na presença de ácido clorídrico como catalizador. Os valores de ponto de fusão (PF) foram comparados com os valores descritos na literatura, os quais estão mostrados entre parênteses com suas respectivas referências.

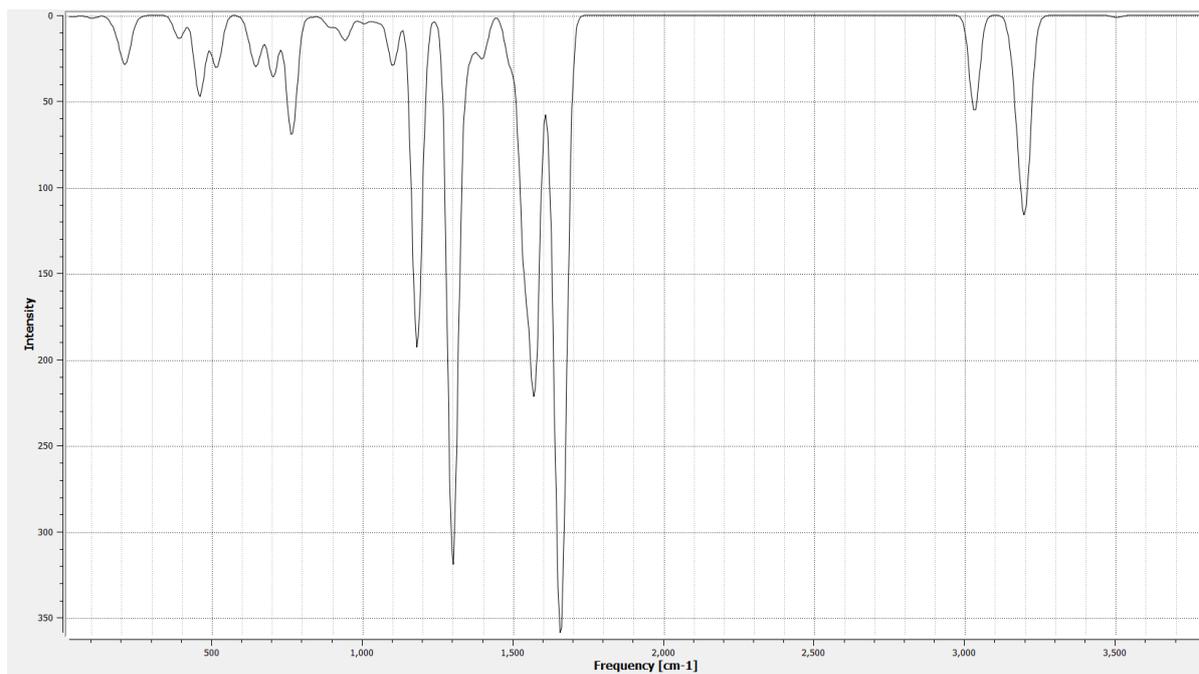
### 4.3. Determinação e Caracterização Estrutural

Os espectros de infravermelho (FTIR) do composto S1 (Figura 28) e dos compostos S2-S5 (Figuras 30 a 33) e S10-S12 (Figuras 34 a 36) suportam as estrutura proposta no estado sólido. As bandas largas acima de  $3300\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao estiramento do hidrogênio intramolecular ligado aos grupos aminas das hidrazonas (HN).



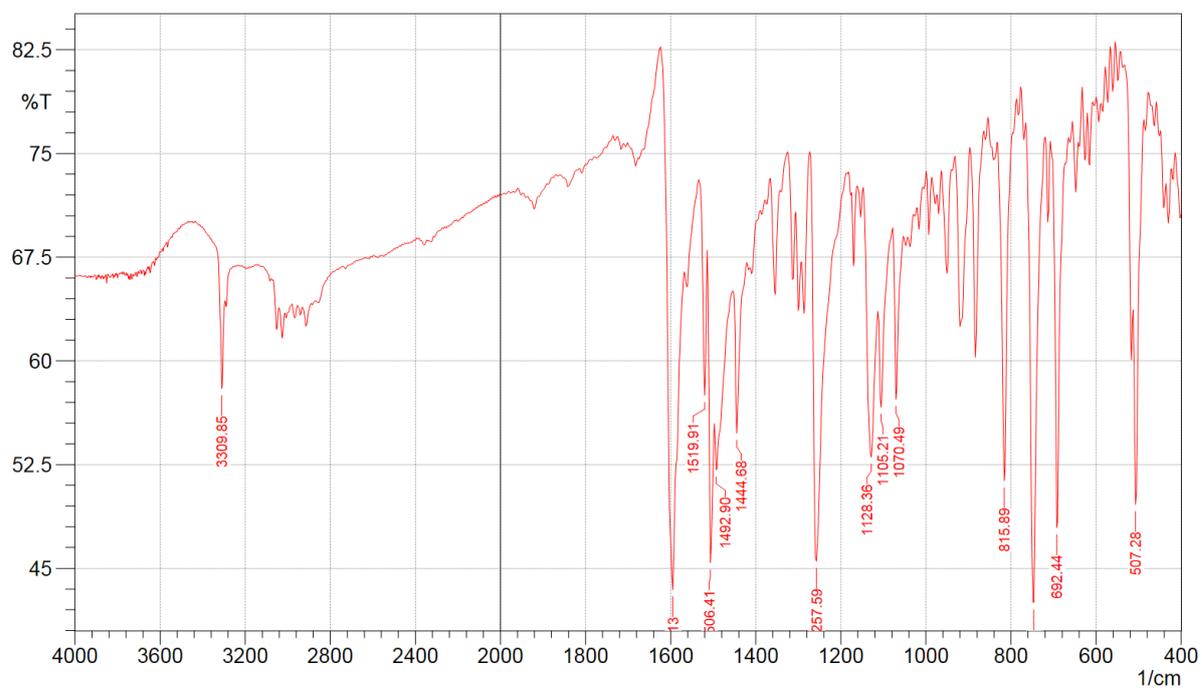
**Figura 28:** Espectro de infravermelho de S1.

Os grupos iminas dos radicais hidrazonas aparecem como uma única banda entre  $1595\text{--}1605\text{ cm}^{-1}$ , como o resultado do estiramento das bandas de iminas (C=N) das hidrazonas; nos casos de compostos S10, S11 e S12 (Figuras 33-35), em cujos espectros destas bandas aparecem com valores inferiores a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , quando comparados com as demais hidrazonas ou a compostos contendo a função carbonila (C = O) onde as bandas são observadas em valores acima de  $1695\text{ cm}^{-1}$ .

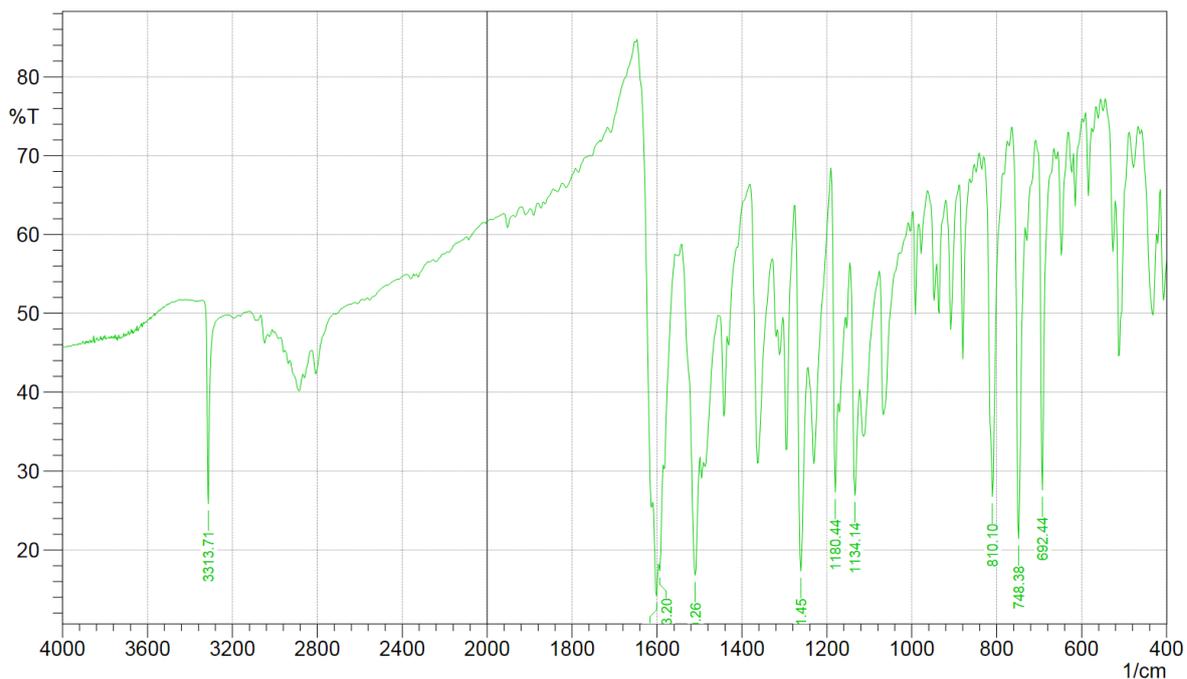


**Figura 29:** Espectro de infravermelho de S1 teórico.

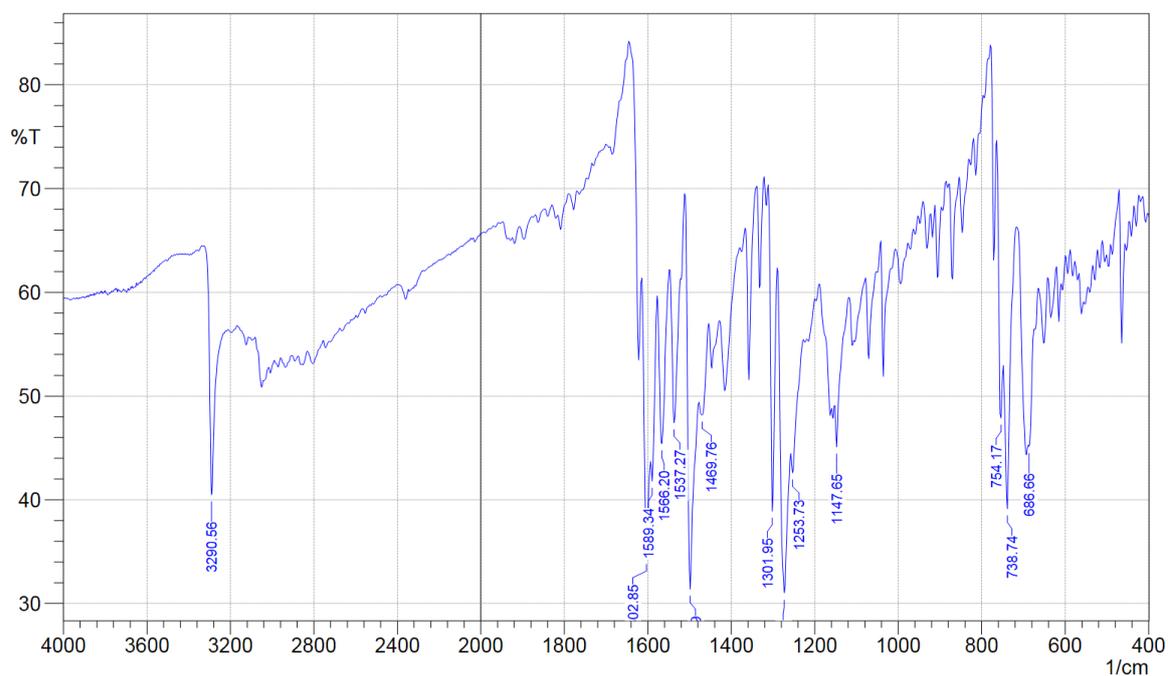
Estes principais picos são observado no espectro de FTIR do composto S1 (Figura 29), onde os estiramentos e deformações dos grupos amina e imina da hidrazona são mostrados claramente nas regiões de N-H e C-N.



**Figura 30:** Espectro de infravermelho de S2.



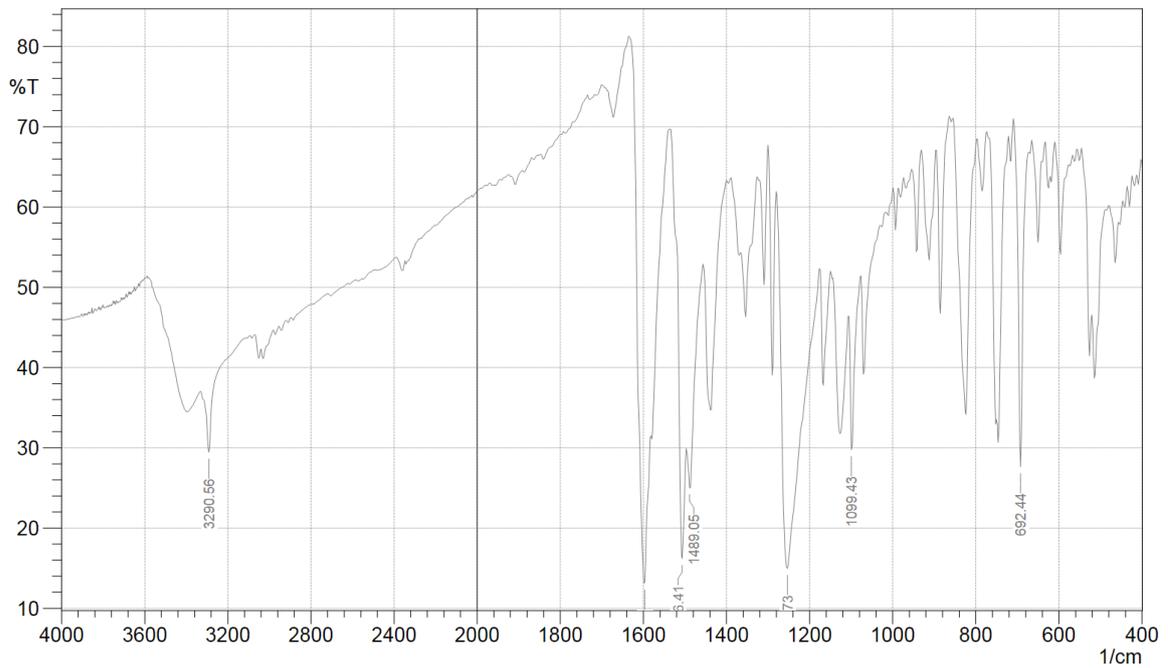
**Figura 31:** Espectro de infravermelho de S3.



**Figura 32:** Espectro de infravermelho de S4.

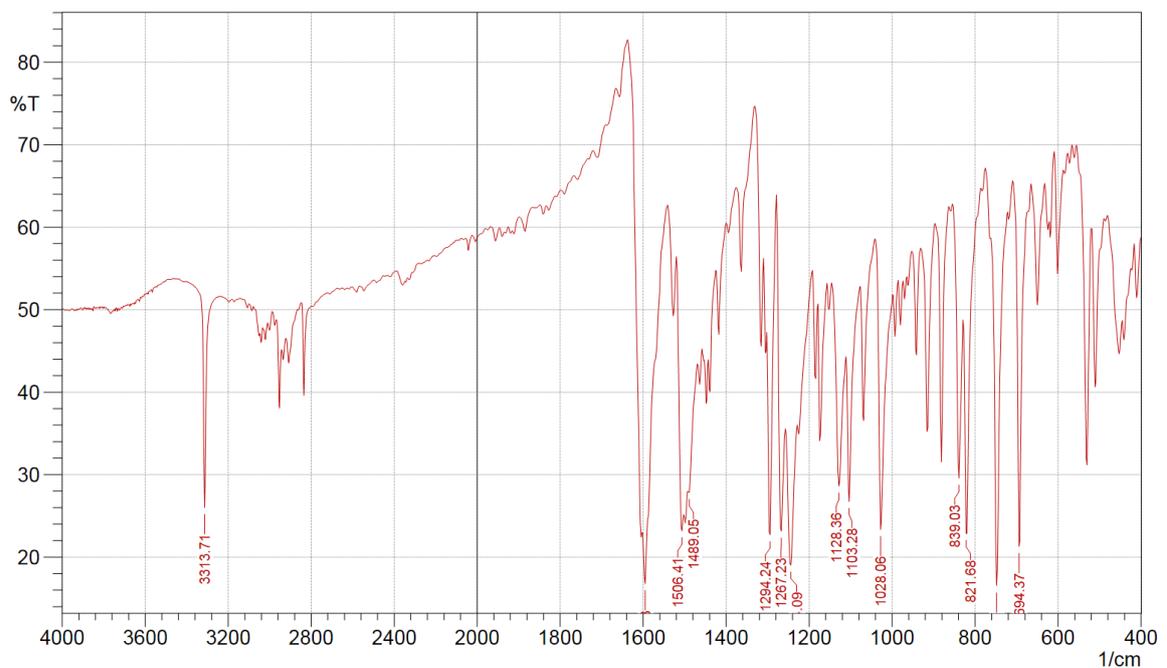
A absorção devido a vibrações de deformação do grupo diazo (N-N) do radical hidrazona, esperado de cerca de  $1.420-1.450\text{ cm}^{-1}$  de acordo com a literatura, sendo observados estes valores entre  $1.480-1.490\text{ cm}^{-1}$ . A deformação das ligações do grupo imina (C=N) ficou com valores acima de  $1.250\text{ cm}^{-1}$ . Enquanto que a deformação das ligações

amina (C-N) ficou com valores acima de  $1.130\text{ cm}^{-1}$ .

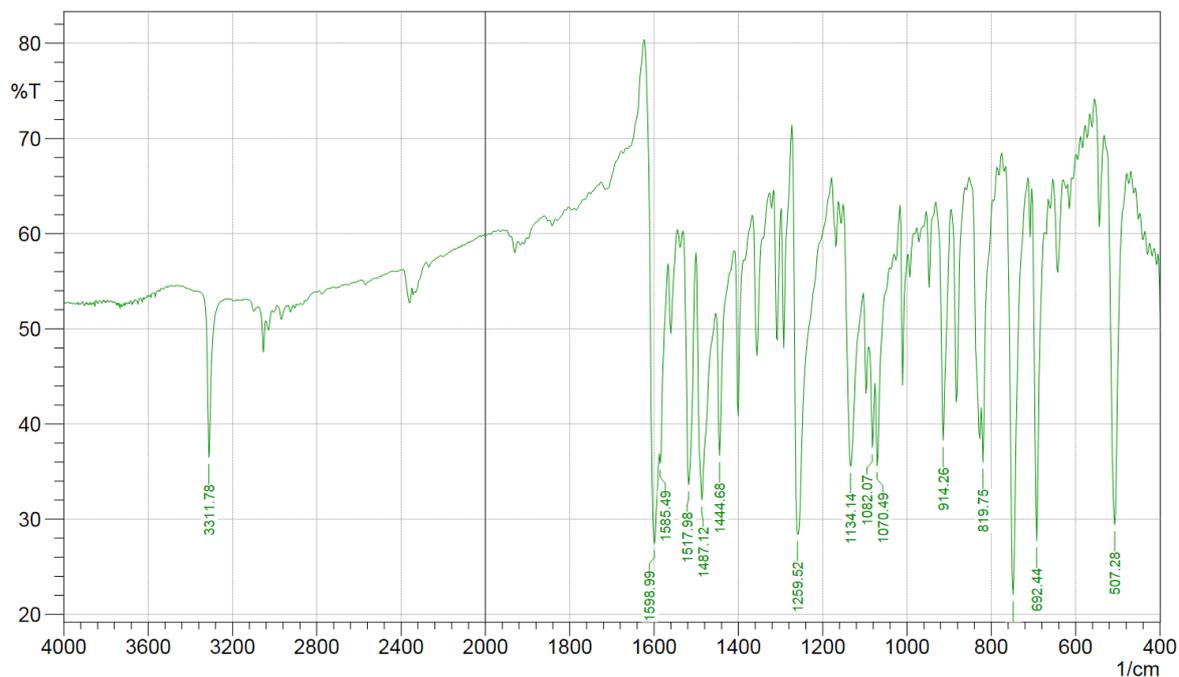


**Figura 33:** Espectro de infravermelho de S5.

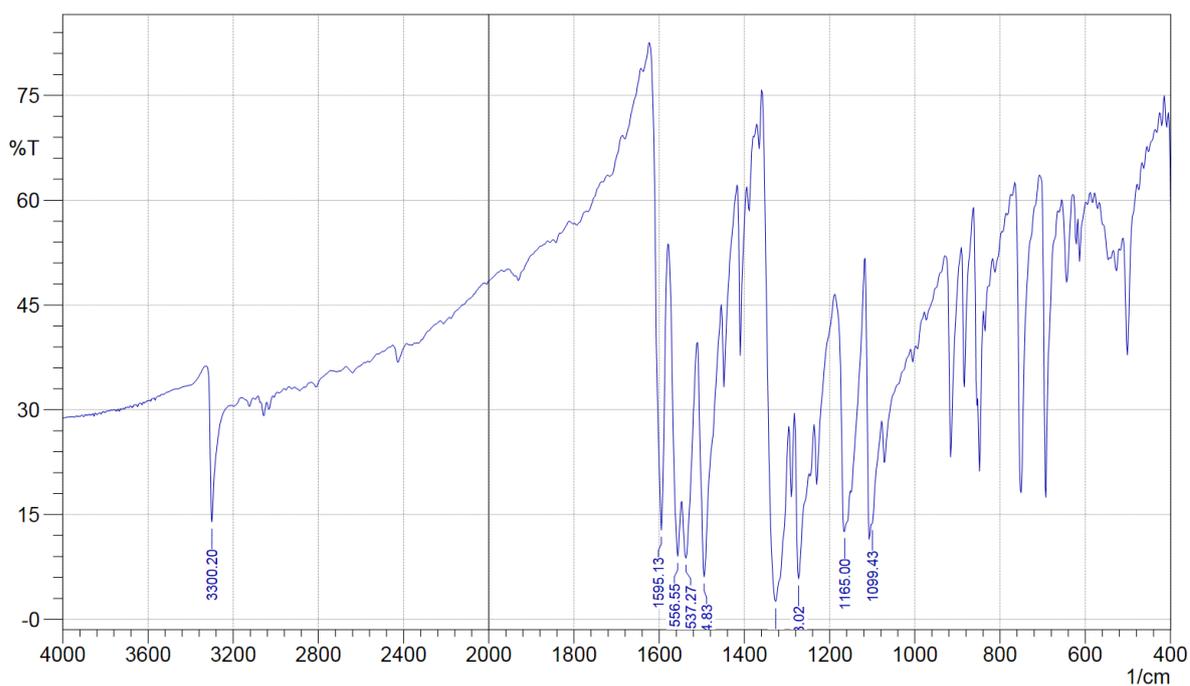
Todos os compostos apresentam a absorção característica devido às vibrações de deformação harmônicas do sistema conjugado de carbono  $\text{sp}^2$  aromático.



**Figura 34:** Espectro de infravermelho de S10.



**Figura 35:** Espectro de infravermelho de S11.



**Figura 36:** Espectro de infravermelho de S12.

#### 4.4. Relação Estrutura e Propriedade

Os estudos da relação entre estrutura química e propriedade antioxidante mostraram que dos doze derivados propostos, onze (S1-S11) apresentaram uma nucleofilicidade maior que o paracetamol, exceto o composto S12 que apresentou um valor menor (Tabela 11).

O aumento a nucleofilicidade deste conjunto de derivados do paracetamol pode estar relacionado ao maior caráter elétron doador do grupo hidrazona e pelo aumento da energia de conjugação dos dois anéis aromáticos, quanto comparados ao grupo fenol e acetamida do paracetamol. Os valores de HOMO apresentam o máximo de -5,76 eV e o mínimo de -4,54 eV, com um valor médio de -4,50 e desvio padrão de 0,52 e valor de  $p < 0,01$ .

**Tabela 11:** Propriedades estruturais e de solubilidade dos derivados do paracetamol

Compostos	HOMO (eV)	LUMO (eV)	PI (kcal/mol)	CLog P	Energia de Hidratação (kcal/mol)
<b>Paracetamol</b>	-5,45	-0,06	170,83	0,49	-10,65
<b>S1</b>	-5,09	-1,12	153,57	3,31	-7,78
<b>S2</b>	-5,01	-1,04	150,72	3,80	-6,56
<b>S3</b>	-4,54	-0,69	137,28	3,84	-6,23
<b>S4</b>	-5,18	-1,23	155,01	3,90	-12,29
<b>S5</b>	-4,90	-0,92	148,29	3,27	-14,68
<b>S6</b>	-4,82	-0,89	145,26	3,12	-15,34
<b>S7</b>	-4,76	-0,89	143,05	2,84	-14,83
<b>S8</b>	-5,05	-1,21	150,80	4,00	-13,83
<b>S9</b>	-4,87	-0,94	146,98	2,87	-20,39
<b>S10</b>	-4,87	-0,89	146,78	3,59	-9,45
<b>S11</b>	-5,25	-1,29	168,15	4,32	-7,45
<b>S12</b>	-5,76	-2,13	167,22	1,55	-12,75

O potencial de ionização (PI) está relacionado à capacidade doadora de elétrons. O aumento desta propriedade no conjunto de derivados do paracetamol pode estar relacionado tanto ao maior caráter elétron doador do grupo hidrazona quanto pelo aumento da energia de conjugação dos dois anéis aromáticos, assim como pelos grupos doadores e aceptores de eletros ligados nas posições *orto* e *para* do grupo benzilideno, quanto comparados ao paracetamol. Os valores de PI apresentam o máximo de 168,15 kcal/mol e o mínimo de 137,28 kcal/mol, com um valor médio de 150,66 e desvio padrão de 9,14 e valor de  $p < 0,01$ .

O coeficiente do logaritmo de partição (CLogP) dos derivados de hidrazona apresentou um aumento médio de aproximadamente 6,87 vezes maior que o paracetamol,

demonstrando um aumento na lipofilicidade ou maior afinidade por solventes apolares sistema (Kubiny, 2002).

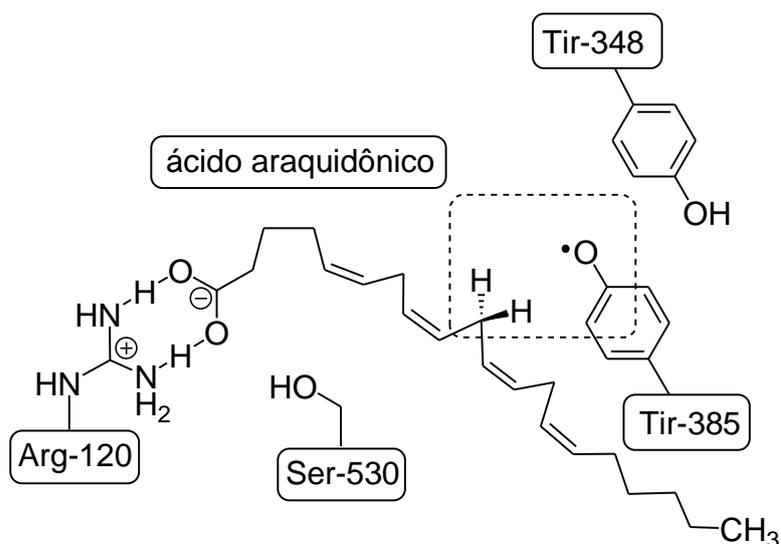
Este parâmetro determina a solubilidade da molécula e sua capacidade de vencer as barreiras biológicas e mover-se nas diferentes biofases. Assim, esta propriedade desempenha papel fundamental nos parâmetros de absorção e concentração do composto em uma determinada biofase.

Outro importante parâmetro que pode ser relacionado com as propriedades farmacocinéticas é a energia de hidratação (EH), uma vez que esta propriedade está relacionada com a capacidade dos fármacos absorverem ou liberarem energia, quando em contato com solvente aquoso. Assim, esta propriedade além de inferir sobre o transporte e distribuição pelas diferentes biofases plasmáticas, pode ser relacionada à atração e interação do fármaco com seu receptor (Miyamoto & Kollman, 1993).

Os valores de EH (kcal/mol) mostraram que os grupos hidroxila e nitro aumentam a afinidade por solvente aquoso, conseqüentemente liberam maior energia, indicando que a reação é exotérmica. De fato, os testes de solubilidade aquosa mostraram que estes compostos apresentam maior solubilidade aquosa em pH alcalino, possivelmente devido a presença de hidrogênios ácidos da posição fenólica. Assim como pelo efeito retirador de elétrons do grupo nitro, aumentando a acidez do hidrogênio amino da hidrazona.

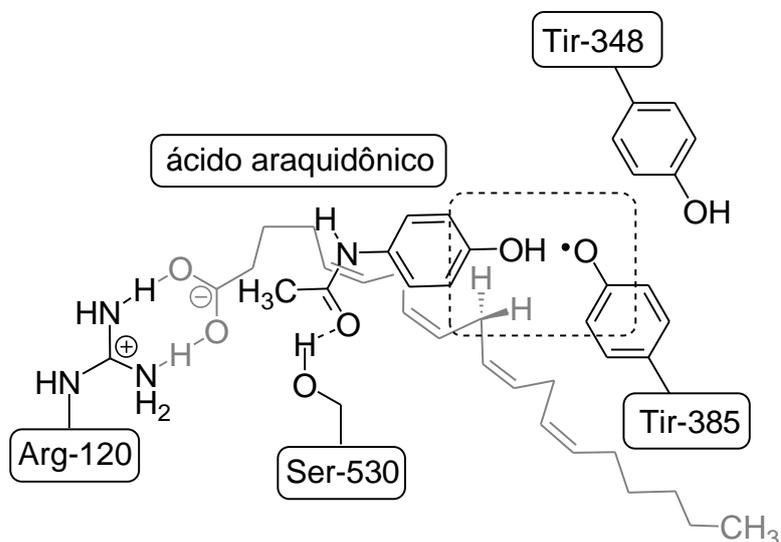
Os parâmetros moleculares que permitem descrever o modo de interação dos derivados de hidrazona podem ser relacionados tanto aos grupos fenólicos quanto ao grupo amino da hidrazona.

Uma vez que o mecanismo de inibição da produção de prostaglandina começa pela fixação do ácido araquidônico (AA) no sítio ativo da prostaglandina endoperoxídeo sintase (PGES) pela porção carboxílica com uma arginina da posição 120 formando um complexo de carga, seguido pela retirada de um átomo de hidrogênio, onde um grupo tirosil da posição 385, responsável pela etapa inicial de oxidação do AA e depois de oxidados tanto o peróxido quanto o álcool endoperoxídeo cíclico PGH<sub>2</sub> são estabilizados pela interação com a serina da posição 530, como mostrado na Figura 37.



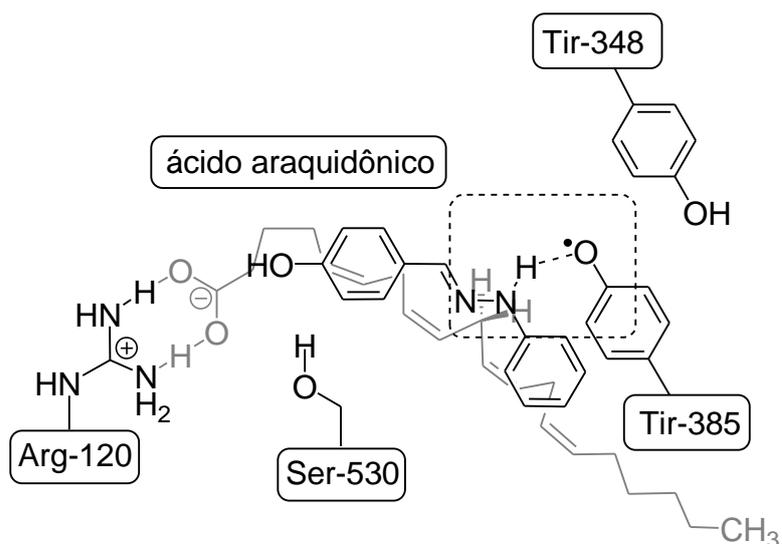
**Figura 37.** Mecanismo de interação do ácido araquidônico na PGES.

Nossos estudos mostram que o paracetamol apresenta seu mecanismo de inibição pela reação com o Tirosil-385 e interação com a serina-530, mas sem interação com a Arginina-120, com a conseqüente formação do complexo de carga entre a amida (paracetamol) e a guanidina (arginina), conforme o modelo simplificado mostrado na Figura 38.



**Figura 38.** Mecanismo teórico de inibição da PGES pelo paracetamol.

Portanto, a aplicação do princípio do bioisosterismo visando avaliar o grupo hidrazona como análogo do fenol com capacidade de interagir e reagir com o Tirosil-385 da PGES com a possibilidade de uma interação adicional com a serina-530 ou arginina-120 através de seu grupo hidroxila presente no anel B, conforme o modelo simplificado mostrado na Figura 30.



**Figura 39.** Mecanismo teórico de inibição da PGES pelos derivados do paracetamol.

Uma vez que a reação clássica da PGES é a oxidação do ácido araquidônico, parece que alguns compostos com atividade inibidora desta enzima apresentam atividade antioxidante sobre a enzima, desse modo a atividade antioxidante dos derivados fenilhidrazona foi realizada.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou a síntese, a avaliação antioxidante e estudo comparativo entre fenilhidrazonas e chalconas como novos derivados do paracetamol. A modelagem molecular foi empregada com sucesso no estudo das propriedades químicas teóricas do entre fenilhidrazonas e chalconas, assim como para a determinação das propriedades moleculares das fenilhidrazonas como derivados do paracetamol, para o estudo da relação estrutura e atividade.

Os resultados mostraram que o grupo amina da hidrazona tem maior participação na capacidade nucleofílica das fenilhidrazonas que o grupo imina da hidrazona. Enquanto que o grupo carbonila tem maior participação na capacidade eletrofílica das chalconas. Os grupos apresentam cargas negativas e positivas tanto do anel A quanto do B com igual número de estruturas de ressonância. Fenilhidrazonas tem maior caráter elétron-doador, enquanto as chalconas maior caráter elétron-aceptor.

As fenilhidrazonas foram obtidas com altos rendimentos, sendo que algumas foram caracterizadas pela primeira vez. As propriedades estão de acordo com os dados descritos na literatura, quando comparado os espectros de infravermelho e ponto de fusão.

Estes compostos apresentam um potencial para ser utilizados como moléculas antioxidantes. Os parâmetros moleculares tanto eletrônicos quanto de solubilidade são muito favoráveis quando comparados ao paracetamol. Os compostos sintetizados mostraram uma maior capacidade doadora de elétrons tanto pela avaliação dos valores do potencial de ionização quanto pela análise dos orbitais moleculares.

O mecanismo de interação entre os derivados de hidrazonas e a PGES foi proposto usando propriedades moleculares, onde o grupo hidrazona pode funcionar como um grupo bioisostérico para o grupo fenol.

## 6. REFERÊNCIAS

ADAMSON G.M & HARMAN A.W. Oxidative stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen. **Biochemical Pharmacology** **38**, p.2289–2294, 1993.

ALBANO E., RUNDGREN M., HARVISON P.J., NELSON S.D. & MOLDEUS P. Mechanisms of *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine cytotoxicity. **Molecular Pharmacology** **28**, p. 306–311, 1985.

AL-MUSTAFA Z.H., AL-ALI A.K., QAW F.S. & ABDUL-CADER Z. Cimetidine enhances the hepatoprotective action of *N*-acetylcysteine in mice treated with toxic doses of paracetamol. **Toxicology** **121**, p.223–228,1997.

ALVES, C. N., DINIZ, J. E. M. & BORGES, R. S. A DFT study for paracetamol and 3,5-disubstituted analogues, **J. Struc. Mol. (THEOCHEM)**, 2003

BARNARD S., STORR R.C., O'NEILL P.M. & PARK B.K. The effect of fluorine substitution on the physicochemical properties and the analgesic activity of paracetamol. **Journal of Pharmacy & Pharmacology** **45**, p.736–744, 1993.

BARTOLONE J.B., BEIERSCHMITT W.P., BIRGE R.B., HART S.G., WYAND S., COHEN S.D. & KHAIRALLAH E.A. Selective acetaminophen metabolite binding to hepatic and extrahepatic proteins: An *in vivo* and *in vitro* analysis. **Toxicology & Applied Pharmacology** **99**, p.240– 249, 1989.

BERGMAN K., MULLER L. & TEIGEN S.W. Series: current issues in mutagenesis and carcinogenesis, No. 65. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory review. **Mutation Research** **349**, p. 263–288, 1996.

BESSEMS J.G.M., DE GROOT M.J., BAEDE E.J., TE KOPPELE J.M. & VERMEULEN N.P.E. Hydrogen atom abstraction of 3,5–disubstituted analogues of paracetamol by horseradish peroxidase and cytochrome P450. **Xenobiotica** **28**, 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. **Chemico-Biological Interactions** **98**, p. 237–250, 1995.

BESSEMS J.G.M., VAN STEE L.L.P., COMMANDEUR J.N.M., GROOT E.J. & VERMEULEN N.P.E. Cytotoxicity of paracetamol and 3,5-dihalogenated analogues: Role of cytochrome *P*-450 and formation of GSH conjugates and protein adducts. **Toxicology in Vitro** **11**, p. 9–19, 1997.

BESSEMS JOS G. M & VERMEULEN NICO P. E. **Critical Reviews in Toxicology** **31** (1), p. 55-138, 2001.

BIRGE R.B., BARTOLONE J.B., COHEN S.D., KHAIRALLAH E.A. & SMOLIN L.A. A comparison of proteins Sthiolated by glutathione to those arylated by acetaminophen. **Biochemical Pharmacology** **42** , p.197–207, 1991.

BLAZKA M.E., GERMOLEC D.R., SIMEONOVA P., BRUCCOLERI A., PENNYPACKER K.R. & LUSTER M.I. Acetaminophen- induced hepatotoxicity is associated with early changes in NF-kappa-B and NF-IL6 DNA binding activity. **Journal of Inflammation** **47**, p. 138–150, 1996.

BLAZKA M.E., WILMER J.L., HOLLADAY S.D., WILSON R.E. & LUSTER M.I. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology & Applied Pharmacology** **133**, p. 43–52, 1995.

BORGES, R. S., ALVES, C. N. & DINIZ, J. E. M A functional density study on the mechanism for the oxidation and oxygenation of paracetamol, **Toxicology**, 2003.

BRUNBORG G., HOLME J.A. & HONGSLO J.K. Inhibitory effects of paracetamol on DNA repair in mammalian cells. **Mutation Research: Genetic Toxicology** **342**, p.157–170, 1995.

CALDER I.C., HART S.J., HEALEY K. & HAM K.N. *N*-hydroxyacetaminophen: A postulated toxic metabolite of acetaminophen. **Journal of Medicinal Chemistry** **24**, p. 988–993, 1981.

CORCORAN G.B., TODD E.L., RACZ W.J., HUGHES H., SMITH C.V. & MITCHELL J.R. Effects of Nacetylcysteine on the disposition and metabolism of acetaminophen in mice. **Journal Of Pharmacology & Experimental Therapeutics** **18**, p.857–863, 1985.

CRAMER D.W., HARLOW B.L., TITUS-ERNSTOFF L., BOHLKE K., WELCH W.R. & GREENBERG E.R. Over-the-counter analgesics and risk of ovarian cancer. **Lancet** **351**, p. 104–107, 1998.

DAHLIN D.C., MIWA G.T., LU A.Y. & NELSON S.D. Nacetyl- *p*-benzoquinone imine: A cytochrome P-450– mediated oxidation product of acetaminophen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **81**, p.1327–1331, 1984.

DE VRIES J. Hepatotoxic metabolic activation of paracetamol and its derivatives phenacetin and benorilate: oxygenation or electron transfer? **Biochemical Pharmacology** **30**, p.399–402, 1981.

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

EASTMOND D.A. Induction of micronuclei and aneuploidy by the quinone-forming agents benzene and ophenylphenol. **Toxicology Letters** **67**, p.105–118, 1993.

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

ELING T.E. & CURTIS J.F. Xenobiotic metabolism by prostaglandin-H synthase. **Pharmacology & Therapeutics** **53**, p. 261–273, 1992.

EMEIGH HART S.G., WYAND D.S., KHAIRALLAH E.A. & COHEN S.D. Acetaminophen nephrotoxicity in the CD - 1 mouse. II. Protection by probenecid and AT-125 without diminution of renal covalent binding. **Toxicology & Applied Pharmacology** **136**, p.161–169, 1996.

ESZTER H., VERECZKEY L. & MONOSTORY K. Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. **Biol. And Bioph. Research Comm. (291) 4**, p. 1089 – 1094, 2002

FERNANDO C.R., CALDER I.C. & HAM K.N. Studies on the mechanism of toxicity of acetaminophen. Synthesis and reactions of N-acetyl-2,6-dimethyl- and Nacetyl - 3,5-dimethyl-p-benzoquinone imines. **Journal of Medicinal Chemistry 23**, p.1153–1158, 1980.

FISCHEREDER M. & JAFFE J.P. Thrombocytopenia following acute acetaminophen overdose. **American Journal of Hematology 45**, p. 258–259, 1994.

FLAKS A. & FLAKS B. Induction of liver cell tumours in IF mice by paracetamol. **Carcinogenesis** , p. 363–368, 1983.

FLAKS B., FLAKS A. & SHAW A.P. Induction by paracetamol of bladder and liver tumours in the rat. Effects on hepatocyte fine structure. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica – Section A, Pathology 93**, p.367–377, 1985.

FLOWER R.J. & VANE J.R. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). **Nature 240**, p. 410– 411, 1972.

FORTE A.J., WILSON J.M., SLATTERY J.T. & NELSON S.D. The formation and toxicity of catechol metabolites of acetaminophen in mice. **Drug Metabolism & Disposition 12**, p. 484–491, 1984.

FUTTER, L.E., AL-SWAYEH, O.A. & MOORE, P.K. A comparison of the effect of nitroparacetamol and paracetamol on liver injury. **British J. Pharmacol 132.**, p. 10 – 12, 2001.

GEMBORYS M.W. & MUDGE G.H. Formation and disposition of the minor metabolites of acetaminophen in the hamster. **Drug Metabolism & Disposition 9**, p.340– 351, 1981.

GOEPTAR A.R., SCHEERENS H. & VERMEULEN N.P.E. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. **Critical Reviews in Toxicology 43**, p.25–65, 1995.

HALMES N.C., SAMOKYSZYN V.M., HINTON T.W., HINSON J.A. & PUMFORD N.R. The acetaminophen regioisomer 3'-hydroxyacetanilide inhibits and covalently binds to cytochrome P450 2E1. **Toxicology Letters** **9**, p. 65–71, 1998.

HARNAGEA-THEOPHILUS E., MILLER M.R. & RAO N. Positional isomers of acetaminophen differentially induce proliferation of cultured breast cancer cells. **Toxicology Letters** **104**, p.11–18, 1999.

HARVISON P.J., EGAN R.W., GALE P.H. & NELSON S.D. Acetaminophen as a cosubstrate and inhibitor of prostaglandin H synthase. **Advances in Experimental Medicine and Biology (Biological Reactive Intermediates III)** **197**, p. 739–747, 1986a.

HARVISON P.J., FORTE A.J. & NELSON S.D. Comparative toxicities and analgesic activities of three monomethylated analogues of acetaminophen. **Journal of Medicinal Chemistry** **1**, p. 1737–1743, 1986b.

HARVISON P.J., GUENGERICH F.P., RASHED M.S. & NELSON S.D. Cytochrome P-450 isozyme selectivity in the oxidation of acetaminophen. **Chemical Research in Toxicology** **64**, p. 47–52, 1988

HINSON J.A., POHL L.R. & GILLETTE J.R. N-Hydroxyacetaminophen: A microsomal metabolite of N-hydroxyphenacetin but apparently not of acetaminophen. **Life Sciences** **24**, p.2133–2138, 1979

HINSON J.A., POHL L.R., MONKS T.J., GILLETTE J.R. & GUENGERICH F.P. 3-Hydroxyacetaminophen: A microsomal metabolite of acetaminophen. Evidence against an epoxide as the reactive metabolite of acetaminophen. **Drug Metabolism & Disposition** **24** p. 289–294, 1980.

HINSON J.A., POHL L.R., MONKS T.J. & GILLETTE J.R. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Life Sciences** **29**, p.107–116, 1981.

HINSON J.A., PUMFORD N.R. & ROBERTS D.W. Mechanisms of acetaminophen toxicity: immunochemical detection of drug-protein adducts. **Drug Metabolism Reviews** p.73–92, 1995.

HINSON J.A., ROBERTS D.W., BENSON R.W., DALHOFF K., LOFT S. & POULSEN H.E. (Mechanism of paracetamol toxicity [letter]. **Lancet** p.732, 1990.

HINSON J.A., ROBERTS D.W., HALMES N.C., GIBSON J.D. & PUMFORD N.R. Immunochemical detection of drug-protein adducts in acetaminophen hepatotoxicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology (Biological Reactive Intermediates V)** p.47–55, 1996.

HOFFMANN K.J., AXWORTHY D.B. & BAILLIE T.A. Mechanistic studies on the metabolic activation of acetaminophen in vivo. **Chemical Research in Toxicology** p.204–211, 1990.

HOFFMANN K.J., STREETER A.J., AXWORTHY D.B. & BAILLIE T.A. Identification of the major covalent adduct formed *in vitro* and *in vivo* between acetaminophen and mouse liver proteins. **Molecular Pharmacology** p.566–573, 1985a.

HOFFMANN K.J., STREETER A.J., AXWORTHY D.B. & BAILLIE T.A. Structural characterization of the major covalent adduct formed in vitro between acetaminophen and bovine serum albumin **Chemico-Biological Interactions** p.155–172, 1985b.

HONG M., COHEN S.D. & KHAIRALLAH E.A. Translocation of the major cytosolic acetaminophen (APAP) protein adducts into the nucleus **Toxicologist** p.427 (Abstract 1691), 1994.

HONGSLO J.K., BJORGE C., SCHWARZE P.E., BROGGER A., MANN G., THELANDER L. & HOLME J.A. Paracetamol inhibits replicative DNA synthesis and induces sister chromatid exchange and chromosomal aberrations by inhibition of ribonucleotide reductase. **Mutagenesis** p.475–480, 1990.

HONGSLO J.K., SMITH C.V., BRUNBORG G., SODERLUND E.J. & HOLME J.A. (Genotoxicity of paracetamol in mice and rats , **Mutagenesis** p.93–100, 1994.

HOWIE D., ADRIAENSSENS P. & PRESCOTT L.F. Paracetamol metabolism following overdose: Application of high performance liquid chromatography, **Journal of Pharmacy and Pharmacology** p.235–237 1977.

JEFFERY E.H. & HASCHEK W.M. Protection by dimethylsulfoxide against acetaminophen-induced hepatic, but not respiratory toxicity in the mouse. **Toxicology & Applied Pharmacology**, p. 452–461, 1988.

JONES A.L. Mechanism of action and value of *N*-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: **A critical review - Clinical Toxicology** **36**, p.277–285, 1998.

KELLER R.J. & HINSON J.A. Mechanism of acetaminophen- stimulated NADPH oxidation catalyzed by the peroxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. **Drug Metabolism and Disposition**, p.184–187, 1991.

KHAIRALLAH E.A., BRUNO M.K., HONG M. & COHEN S.D. Cellular consequences of protein adduct formation. **Toxicologist** p.15-86, 1995.

KNOX J.H. & JURAND J. Determination of paracetamol and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography using reversed-phase bonded supports. **Journal of Chromatography** p.1651–670, 1977.

.KOYMANS L., VAN LENTHE J.H., VAN DE STRAAT R., DONNÉ-OP DEN 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** p 60–66, 1989.

KULMACZ R.J., PALMER G. & TSAI A.L. Prostaglandin H synthase: perturbation of the tyrosyl radical as a probe of anticyclooxygenase agents. **Molecular Pharmacology** p. 833–

837, 1991.

KULMACZ R.J., PENDLETON R.B. & LANDS W.E.M. Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin-endoperoxide synthase - Interpretation of reaction kinetics. **The Journal of Biological Chemistry** **269**: P. 5527–5536, 1994.

KYLE M.E., SAKAIDA I., SERRONI A. & FARBER J.L. Metabolism of acetaminophen by cultured rat hepatocytes. Depletion of protein thiol groups without any loss of viability. **Biochemical Pharmacology** p.1211–1218, 1990.

LARRAURI A., FABRA R., GÓMEZ-LECHÓN M.J., TRULLENQUE R. & CASTELL J.V.) Toxicity of paracetamol in human hepatocytes. Comparison of the protective effects of sulfhydryl compounds acting as glutathione precursors. **Molecular Toxicology** p.301–311, 1987.

LISTER C.F. & MCLEAN A.E.M. Inhibition of DNA synthesis by paracetamol in different tissues of the rat in vivo. **Toxicology**, p. 49–57, 1997.

LIU J., LIU Y., MADHU C. & KLAASSEN C.D. Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics** p.1607–1613, 1993.

LOEW G.H. & GOLDBLUM A. (Metabolic activation and toxicity of acetaminophen and related analogs. A theoretical study. **Molecular Pharmacology** 27:375–386. 1985.

LUBEK B.M., AVARIA M., BASU P.K. & WELLS P.G. Pharmacological studies on the in vivo cataractogenicity of acetaminophen in mice and rabbits. **Fundamental & Applied Toxicology** p.596–606, 1988.

MALMBERG A.B. & YAKSH T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science** p.1276–1279, 1982.

MATTAMAL M.B., ZENSER T.V., BROWN W.B., HERMAN C.A. & DAVIS B.B.

Mechanism of inhibition of renal prostaglandin production by acetaminophen. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** p.405–409, 1979.

MEHENDALE H.M. Toxicodynamics of low level toxicant interactions of biological significance: inhibition of tissue repair. **Toxicology** p. 251–266, 1995.

MERCK AND CO., **The Merck Index**. 9 th edn, Rahway, NJ, p. 6, 1976.

MILLER M.R., WENTZ E. & ONG S. Acetaminophen alters estrogenic responses *in vitro*: Inhibition of estrogen- dependent vitellogenin production in trout liver cells. **Toxicological Sciences** p. 30–37, 1999.

MINER D.J. & KISSINGER P.T. Evidence for the involvement of N-acetyl-p-quinoneimine in acetaminophen metabolism. **Biochemical Pharmacology** p. 3285–3290, 1979.

MITCHELL J.R., JOLLOW D.J., POTTER W.Z., DAVIS D.C., GILLETTE J.R. & BRODIE B.B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. **Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics**, p.185–194, 1973.

MOLDÉUS, P. Paracetamol metabolism and toxicity in isolated hepatocytes from rat and mouse. **Biochemical Pharmacology** p. 2859–2863, 1978.

MOLDÉUS P., ANDERSSON B., RAHIMTULA A. & BERGGREN M. Prostaglandin synthetase catalyzed activation of paracetamol. **Biochemical Pharmacology** p.1363–1368. 1982.

MOLDÉUS P. & RAHIMTULA A. - Metabolism of paracetamol to a glutathione conjugate catalyzed by prostaglandin synthetase. **Biochemical & Biophysical Research Communications** p. 469–475, 1980.

MYERS T.G., THUMMEL K.E., KALHORN T.F. & NELSON S.D. Preferred orientations in the binding of 4'- hydroxyacetanilide (acetaminophen) to cytochrome- P450 1A1 and 2B1

isoforms as determined by C-13- NMR and N-15-NMR relaxation studies. **Journal of Medicinal Chemistry** p.860–867, 1994.

NELSON S., DC DAHLIN E.A. Peroxidase-mediated formation of reactive metabolites of acetaminophen. **Molecular Pharmacology** p.195–199, 1981.

NELSON S.D., TIRMENSTEIN M.A., RASHED M.S. & MYERS T.G. Acetaminophen and protein thiol modification. **Advances in Experimental Medicine & Biology** p. 579–588 1991.

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

NOVAK M., PELECANOU M. & POLLACK L. Hydrolysis of the model carcinogen *N*-(pivaloyloxy)-4- methoxyacetanilide: Involvement of *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine. **Journal of the American Chemical Society** - p.112–120, 1986.

NOVAK M., BONHAM G.A., MULERO J.J., PELECANOU M., ZEMIS J.N., BUCCIGROSS J.M. & WILSON T.C. Hydrolysis of *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imines: pH dependence of the partitioning of a tetrahedral intermediate. **Journal of the American Chemical Society** p.4447–4456, 1989.

O'BRIEN P.J., KHAN S. & JATOE S.D. Formation of biological reactive intermediates by peroxidases: halide mediated acetaminophen oxidation and cytotoxicity, In: **Advances in Experimental Medicine and Biology (Biological Reactive Intermediates IV – Molecular and cellular effects and their impact on human health)**, 2<sup>a</sup> ed. CM Witmer, RR Snyder, DJ Jollow, GF Kalf, JJ Kocsis and IG Sipes (New York: Plenum Press), p. 51–64, 1990.

PARK B.K. & KITTERINGHAM N.R. Effects of fluorine substitution on drug metabolism: Pharmacological and toxicological implications. **Drug Metabolism Reviews** p.605–643, 1994.

PATIERNO S.R., LEHMAN N.L., HENDERSON B.E. & LANDOLPH J.R. Study of the ability of phenacetin, acetaminophen, and aspirin to induce cytotoxicity, mutation, and

morphological transformation in C3H/10T1/2 clone 8 mouse embryo cells. **Cancer Research** p.1038–1044, 1989.

PFEIFFER E. & METZLER M. Interaction of p-benzoquinone and p-biphenoquinone with microtubule proteins in vitro. **Chemico-Biological Interactions** p. 37– 53. 1996.

PIRMOHAMED M., MADDEN S. & PARK B.K - Idiosyncratic drug reactions. Metabolic bioactivation as a pathogenic mechanism. **Clinical Pharmacokinetics** p. 215–230 1996.

POTTER D.W. & HINSON J.A. The 1- and 2-electron oxidation of acetaminophen catalyzed by prostaglandin H synthase. **Journal of Biological Chemistry** - p. 974–980, 1987.

POTTER D.W. & HINSON J.A. - Acetaminophen peroxidation reactions. **Drug Metabolism Reviews** - p. 341–358, 1989.

POTTER D.W., MILLER D.W. & HINSON J.A.) Horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of acetaminophen to intermediates that form polymers or conjugate with glutathione. **Molecular Pharmacology** p. 155–162, 1986.

POTTER W.Z., DAVIS D.C., MITCHELL J.R., JOLLOU D.J., GILLETTE J.R. & BRODIE B.B. (Acetaminophen-induced hepatic necrosis. III. Cytochrome P-450-mediated covalent binding *in vitro* - **Journal of Pharmacological & Experimental Therapeutics** p.203–210, 1973.

POTTER W.Z., THORGEIRSSON S.S., JOLLOU D.J. & MITCHELL J.R. (Acetaminophen-induced hepatic necrosis. V. Correlation of hepatic necrosis, covalent binding and glutathione depletion in hamsters. **Pharmacology** p.129–143, 1974

PRESCOTT L.F. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. **British Journal of Clinical Pharmacology** p. 291S-298S, 1980.

PRESCOTT L.F. Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. **Drugs** p.290–314, 1983.

PUMFORD N.R., HALMES N.C., MARTIN B.M., COOK R.J., WAGNER C. & HINSON J.A.) Covalent binding of acetaminophen N-10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in mice. **Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics** p.501–505, 1997.

PUMFORD N.R., ROBERTS D.W., BENSON R.W. & HINSON J.A. Immunochemical quantitation of 3-(cystein-S-yl)acetaminophen protein adducts in subcellular liver fractions following a hepatotoxic dose of acetaminophen. **Biochemical Pharmacology** p. 573–579, 1990.

RANNUG U., HOLME J.A., HONGSLO J.K. & SRAM R. International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. An evaluation of the genetic toxicity of paracetamol. **Mutation Research** p. 179–200, 1995.

RAY S.D., KAMENDULIS L.M., GURULE M.W., YORKIN R.D. & CORCORAN G.B. Ca<sup>2+</sup> antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. **FASEB Journal**, p.453–463, 1993.

RAY S.D., MUMAW V.R., RAJE R.R. & FARISS M.W. Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. **Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics** p.1470–1483, 1996.

RAY S.D., SORGE C.L., TAVACOLI A., RAUCY J.L. & CORCORAN G.B. Extensive alteration of genomic DNA and rise in nuclear Ca<sup>2+</sup> in vivo early after hepatotoxic acetaminophen overdose in mice. **Advances in Experimental Medicine & Biology** p.699–705,1991.

ROBERTS D.W., BUCCI T.J., BENSON R.W., WARBRITTON A.R., MCRAE T.A., PUMFORD N.R. & HINSON J.A. Immunohistochemical localization and quantification of the 3-(cystein-S-yl)acetaminophen-protein adduct in acetaminophen hepatotoxicity. **American Journal of Pathology** p. 359–371,1991.

SALMINEN W.F.J., ROBERTS S.M., PUMFORD N.R. & HINSON J.A.) Immunochemical

comparison of 3'-hydroxyacetanilide and acetaminophen binding in mouse liver. **Drug Metabolism and Disposition** p.267–271, 1998.

SANDLER D.P., SMITH J.C., WEINBERG C.R., BUCKALEW V.M., JR., DENNIS V.W., BLYTHE W.B. & BURGESS W.P. Analgesic use and chronic renal disease. **New England Journal of Medicine** p. 1238–1243, 1989.

SHEN W., KAMENDULIS L.M., RAY S.D. & CORCORAN G.B. Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca(2+)-endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death. **Toxicology & Applied Pharmacology** - p. 32–40, 1992.

SIES H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int. Ed. Engl.*, p. 1058 – 1071, 1986.

STOYANOVSKY DETCHO A. & CEDERBAUM ARTHUR I. Metabolites of Acetaminophen trigger Ca<sup>2+</sup> release from liver microsomes. **Toxicology Letters**, p. 23-29, 1999.

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

TIRMENSTEIN M.A. & NELSON S.D. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols: Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. **The Journal of Biological Chemistry** p. 3059–3065, 1990.

TIRMENSTEIN M.A. & NELSON S.D. Hepatotoxicity after 3'-hydroxyacetanilide administration to buthionine sulfoximine pretreated mice. **Chemical Research in Toxicology** p. 214–217, 1991.

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

TOPINKA J., SRAM R.J., SIRINJAN G., KOCISOVA J., BINKOVA B. & FOJTIKOVA I. Mutagenicity studies on paracetamol in human volunteers. II. Unscheduled DNA synthesis and micronucleus test. **Mutation Research** p.147–152, 1989.

VAN DE STRAAT R., DE VRIES J., DE BOER H.J.R., VROMANS R.M. & VERMEULEN N.P.E. Relationship between paracetamol binding to and its oxidation by two cytochrome P-450 isozymes - a proton nuclear magnetic resonance and spectrophotometric study. **Xenobiotica**, p.1–9, 1987a.

VAN DE STRAAT R., DE VRIES J. & VERMEULEN N.P.E. Role of hepatic microsomal and purified cytochrome P-450 in one-electron reduction of two quinone imines and concomitant reduction of molecular oxygen. **Biochemical Pharmacology** p. 613–619, 1987b.

VAN DE STRAAT R., DE VRIES J., GROOT E.J., ZIJL R. & VERMEULEN N.P.E. Paracetamol, 3-monoalkyl- and 3,5-dialkyl derivatives: comparison of their hepatotoxicity in mice. **Toxicol. Appl. Pharmac**, p. 183-189, 1987c.

VAN DE STRAAT R., DE VRIES J., KULKENS T., DEBETS A.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. **Biochemical Pharmacology** p. 3693–3699, 1986.

VAN DE STRAAT R., VROMANS R.M., BOSMAN P., DE VRIES J. & VERMEULEN N.P.E. Cytochrome P-450-mediated oxidation of substrates by electron-transfer; role of oxygen radicals and of 1- and 2-electron oxidation of paracetamol. **Chemico-Biological Interactions** p. :267–280, 1988.

VENDEMIALE G., GRATTAGLIANO I., ALTOMARE E., TURTURRO N. & GUERRIERI F. Effect Of Acetaminophen Administration On Hepatic Glutathione Compartmentation and Mitochondrial Energy Metabolism In the Rat. **Biochemical Pharmacology** p. 1147–1154, 1996.

VERMEULEN N.P.E., BESSEMS J.G.M. & VAN DE STRAAT R. Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. **Drug Metabolism Reviews** p. 367–407, 1992.

WELLS P.G., WILSON B., WINN L.M. & LUBEK B.M. In vivo murine studies on the biochemical mechanism of acetaminophen cataractogenicity. **Canadian Journal of Physiology & Pharmacology** p. 1123–1129, 1995.

ZHOU L.X., ERICKSON R.R. AND HOLTZMAN J.L. Studies comparing the kinetics of cysteine conjugation and protein binding of acetaminophen by hepatic microsomes from male mice. **Biochimica et Biophysica Acta 1335**: p. 153–160, 1997.