

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese, avaliação antipirética e metabolismo *in vitro* do
propacetamol**

Valter Eduardo Murie

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese, avaliação antipirética e metabolismo *in vitro* do
propacetamol**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientado: Valter Eduardo Murie
Orientador: Prof. Dr. Giuliano Cesar
Clososki

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 18/09/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Murie, Valter Eduardo

Síntese, avaliação antipirética e metabolismo *in vitro* do propacetamol. Ribeirão Preto, 2015.

100 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Clososki, Giuliano Cesar

1. Síntese de fármacos. 2. Propacetamol. 3. Espectrometria de Massas. 4. Metabolismo. 5. Pró-fármaco. 6. Química Medicinal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Valter Eduardo Murie

Síntese, avaliação antipirética e metabolismo *in vitro* do propacetamol

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Valter e Neusa, por todo o amor,
carinho, força, compreensão e companheirismo. Por estarem
sempre ao meu lado olhando e cuidando de mim nos momentos
de alegria e tristeza; por sempre acreditarem em mim e serem meus
exemplos de vida e inspiração.*

Vocês estarão comigo por toda a eternidade.

*A Adriene, minha esposa, companheira e amiga, por todos os sorrisos,
alegrias e felicidades vividos juntos. Por me apoiar durante todo
este trabalho com carinho e compreensão.*

Agradecimentos

Primeiramente, a Jesus Cristo - “Eu sou o pão da vida: aquele que vem a mim não sofrerá fome, aquele que crê em mim não passará sede” (Jo 6, 35) - meu Mestre e Senhor, por me dar fé, sabedoria, me mostrar que a vida é o bem maior e me ensinar que “Ninguém tem amor maior do que aquele que dá a vida pelos amigos” (Jo 15,13)

Ao meu orientador Prof. Dr. Giuliano C. Clososki, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, por sua confiança em meu trabalho e capacidade, pelos conhecimentos transmitidos, por ser exemplo de dedicação e competência, pelo apoio e orientação neste trabalho e pela amizade desenvolvida neste período.

Ao amigo Prof. Dr. Kléber Thiago de Oliveira, por me abrir as portas da pós-graduação, pelo apoio e contribuição em meu amadurecimento científico, pelos ensinamentos transmitidos e por sua amizade.

À querida professora da disciplina de química orgânica dos tempos de graduação, por sua dedicação às aulas, pelos primeiros ensinamentos da disciplina, por despertar meu olhar para o universo das reações e pela amizade.

À Prof.(a) Dra. Glória E. P. Souza pela colaboração e apoio nos ensaios de atividade farmacológica, bem como para a técnica Miriam C. Melo no auxílio na execução dos ensaios com animais.

A todos os docentes do NPPNS pela colaboração e amizade.

Ao Prof. Dr. Anderson R. M. de Oliveira e ao doutorando Lucas M. M. Marques pela colaboração nos ensaios metabólicos.

A todos os funcionários e técnicos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial aos técnicos José Carlos Tomaz, Izabel Cristina Casanova Turatti, Jaqueline Nakau Mendonça e Vinícius Palaretti, exemplos de competência e dedicação ao trabalho, pelo auxílio com as análises espectrais, pela disposição em ajudar e pela amizade. Ao ex-funcionário Felipe Salata Braga, pelo auxílio, colaboração, amizade e convivência no laboratório.

Ao amigo Dr. Fabiano T. Toledo, pelo auxílio nos primeiros anos de laboratório quando eu era apenas um aluno do programa de atualização, pelos ensinamentos teóricos e práticos e experiência laboratorial transmitidos, pelo

exemplo de dedicação e compromisso com o local de trabalho, a ser seguido, e pela amizade.

À amiga Dra. Mônica F. Z. J. Toledo pela colaboração, pelos ensinamentos transmitidos, pelo exemplo a ser seguido de dedicação na pós-graduação e comprometimento com o laboratório de pesquisa, e pela amizade.

Ao amigo Dr. Rafael A. Soldi (Janjão) pela colaboração e apoio, pelos ensinamentos transmitidos, por sua importância dentro do grupo de pesquisa como referência para todos os alunos, pelo exemplo de dedicação e comprometimento e pela amizade.

Aos amigos de laboratório e companheiros de bancada Rodolfo (Risadinha), Artur (Arturzinho), Paula, Bárbara, Gibson e Camila, pelo apoio e força nesta jornada do mestrado, pelo aprendizado tanto nas discussões de química quanto na relação interpessoal e pela amizade e companheirismo que torna nosso grupo forte e unido.

Aos demais alunos do NPPNS pela convivência e aprendizado Leandro (Ceará), João Henrique, Samuel, Simone, Evelyn, Fernanda e Shirley.

A CAPES, CNPq e Fapesp pelo auxílio financeiro.

À minha querida mãe Neusa, por estar sempre ao meu lado, por ser a luz dos meus olhos, por sempre acreditar em mim, por ser minha companheira e por seu amor incondicional. Tudo que sou hoje agradeço a você.

À minha querida esposa Adriene, pelo apoio, companheirismo, amor, compreensão e por estar ao meu lado durante todos estes anos.

Aos meus familiares pelo apoio, carinho e compreensão, cada um a seu modo, que contribuíram em mais esta etapa de minha vida, em especial minha madrinha Neide.

Aos meus amigos Eduardo, Márcio (fenômeno), João (animal), Francine, Francisco (Chicão), Gabriel (Chicotinho) e Marina, pela amizade e por fazerem parte da minha história.

E a todos que me ajudaram de alguma forma, cujo nome não se encontra escrito aqui.

“Seja quem você for, qualquer que seja a posição social que você tenha na vida, seja um nível altíssimo ou mais baixo, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira, você chega lá.”

Ayrton Senna da Silva

Resumo

MURIE, V. E. **Síntese, avaliação antipirética e metabolismo *in vitro* do propacetamol.** 2015. 104f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O propacetamol é um pró-fármaco do acetoaminofeno, administrado por via intravenosa, utilizado para o controle da febre e da dor do período perioperatório em terapias do tipo multimodal. No organismo o propacetamol é hidrolisado rapidamente pelas esterases plasmáticas em dietilglicina e acetoaminofeno, seu metabólito ativo, cujo mecanismo de ação é a inibição da síntese de prostaglandinas resultantes da hidrólise do ácido araquidônico pela enzima ciclo-oxigenase 2. Em altas doses, o acetoaminofeno sofre oxidação pela isoforma CYP2E1 do sistema de enzimas do citocromo P450 biotransformando-se em *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI), um metabólito extremamente reativo e hepatotóxico. Embora seu amplo uso e boa tolerabilidade, observa-se um número reduzido de dados literários sobre o pró-fármaco alvo ou possíveis metabólitos. Assim, inicialmente investigou-se a aplicação de protocolos existentes na literatura visando à síntese do cloridrato de propacetamol, sendo a rota sintética estabelecida em dois passos reacionais. Logo, uma metodologia clássica usando catálise com iodeto foi eficiente em gerar o pró-fármaco com rendimento global de 25%. Além disso, um método assistido por micro-ondas foi testado a fim de melhorar o rendimento e otimizar as condições reacionais. Este protocolo permitiu isolar o pró-fármaco desejado em excelente rendimento comparado a outras abordagens sintéticas descritas na literatura. Este método também apresenta algumas vantagens adicionais como a ausência de catalisador e um menor volume de solvente no meio reacional. Logo, o cloridrato de propacetamol foi sintetizado em 10 minutos a 120°C com 98% de rendimento. Depois de sintetizado, o pró-fármaco foi submetido à avaliação do efeito antipirético mostrando-se eficiente na inibição da febre estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) na dose de 600 mg/kg de massa corpórea, a qual equivale à dose de 300 mg/kg de acetaminofeno. Na última parte deste trabalho foram realizados ensaios de metabolismo *in vitro* por meio de reações microssomais, a fim de identificar a formação de metabólitos via espectrometria de massas por captura de íons (ion trap), os quais mostraram que o principal metabólito foi o acetaminofeno, já que o uso da estratégia de pró-fármacos em química medicinal objetiva a liberação de fármacos pelo metabolismo enzimático. Portanto, os estudos realizados são considerados satisfatórios, visto que a síntese assistida por micro-ondas foi o melhor método para o preparo do cloridrato de propacetamol em excelente rendimento e a atividade antipirética foi confirmada por meio de ensaios farmacológicos *in vivo*. Além disso, o presente trabalho pode contribuir com o estudo de metabolismo *in vitro* usando a espectroscopia de massas como ferramenta analítica na identificação de metabólitos.

Palavras Chave: Síntese de fármacos; propacetamol; espectrometria de massas; metabolismo; pró-fármaco; química medicinal.

ABSTRACT

MURIE, V. E. **Synthesis, antipyretic evaluation and *in vitro* metabolism of the propacetamol.** 2015. 104f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Propacetamol is an acetaminophen prodrug of intravenous administration used to control fever and pain of perioperative period in multimodal analgesia therapy. After injection, it is completely converted by plasma esterases into diethylglycine and acetaminophen, its active metabolite whose mechanism of action is the inhibition of prostaglandins, which arose from hydrolysis of arachidonic acid by cyclooxygenase 2. In overdose, acetaminophen is converted to *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) by biotransformation mediated by P450 enzymes, mainly CYP2E1. This toxic metabolite is highly reactive and responsible for hepatic injury. The propacetamol has a good tolerability and a wide use, although there are restricted number of articles about it and its possible metabolites. We started the work by investigating the application of some methods described in literature to synthesize the propacetamol hydrochloride in two reaction steps. Thus, a classical methodology using iodine as catalyst was efficient to produce the prodrug in 25% global yield. In addition, a microwave-assisted method was tested to enhance the yield and optimize the reaction conditions. To our delight, it has allowed the isolation of the desired prodrug in excellent yield compared to other synthetics approaches described in literature. This method also has some extra advantages such as the absence of catalyst and lower solvent volume in reaction medium. Therefore, propacetamol hydrochloride was synthesized in 10 min at 120°C in 98% reaction yield. The synthesized molecule was undergone a pharmacologic evaluation and the prodrug was efficient in inhibiting fever induced by LPS. The dosage of propacetamol (600mg/kg) was equivalent to acetaminophen (300mg/kg) to inhibit fever until four hours after administration. The last part of this research was the *in vitro* metabolism essay by means of microsome reaction in order to determine the metabolite formation through ion trap tandem mass spectrometry. That essay showed that the main produced metabolite was acetaminophen since the use of prodrug strategy in medicinal chemistry aims the drug release by enzymatic metabolism. In summary, the performed studies may be seen as satisfactory since the microwave-assisted synthesis was the best way to prepare propacetamol hydrochloride in an excellent yield and the antipyretic activity was confirmed by *in vivo* pharmacologic essays. Furthermore, the present work may contribute with an *in vitro* metabolism study using mass spectrometry as analytical tool for metabolite identification.

Keywords: Drug synthesis; propacetamol; mass spectrometry; metabolism; prodrug; medicinal chemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Pró-fármacos acidentais.....	3
Figura 2 Representação do modo de ação de pró-fármacos em superar barreiras biológicas.....	4
Figura 3 Aplicação de <i>soft drugs</i> no anti-inflamatório de etabonato de loteprednol.....	5
Figura 4 Exemplos de pró-fármacos carreadores.....	9
Figura 5 Uso racional da estratégia de pró-fármacos (adaptado de Ettmayer, 2004).10	
Figura 6 Pró-fármaco da dapsona.....	13
Figura 7 Pró-fármaco do metronidazol.....	13
Figura 8 Pró-fármaco alopurinol.....	14
Figura 9 Pró-fármaco aciclovir.....	15
Figura 10 Pró-fármaco acetaminofeno.....	19
Figura 11 Derivados da acetanilida.....	23
Figura 12 Inibição da peroxidase pelo acetaminofeno.....	25
Figura 13 Estrutura da Ferro Protoporfirina IX.....	30
Figura 14 Mecanismo da necrose do hepatócito.....	33
Figura 15 Metabólitos incomuns do acetaminofeno.....	34
Figura 16 Espectro de RMN de ^1H do composto 56 (CDCl_3 , 400 MHz).....	42
Figura 17 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 56 e 106 (CDCl_3 , 100 MHz).....	42
Figura 18 Cromatograma dos produtos da reação de esterificação entre o ácido 2-cloroacético e o acetaminofeno.....	45
Figura 19 Espectro de RMN de ^1H do composto 54 (DMSO-d_6 , 400 MHz).....	48
Figura 20 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 54 (DMSO-d_6 , 100 MHz).....	49
Figura 21 Espectros de UV e Massas do composto 58	51
Figura 22 Cromatograma dos produtos das reações referentes às entradas 1, 2 e 3 da tabela 4. (A) Reação sem solvente, (B) reação em THF e (C) reação em ACN.....	51
Figura 23 Cromatogramas do composto 58 (A) Cromatograma da mistura reacional. (B) Cromatograma dos cristais formados após a acidificação do meio reacional.....	53
Figura 24 Espectro de RMN de ^1H do composto 23 (D_2O , 400 MHz).....	54
Figura 25 Espectro de massas por IES do paracetamol.....	62
Figura 26 Espectro de massas por IES do propacetamol.....	62
Figura 27 Espectro de massas por IES do acetato de 4-acetamidafenila.....	63
Figura 28 Cromatograma dos produtos das reações microssomais: tubo controle (A) e teste (B).....	65
Figura 29 Espectro de UV e massas por IES do paracetamol.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlação entre grupo funcional e tipo de pró-fármaco formado.....	11
Tabela 2. Comparação do tempo de meia-vida e log P do alopurinol e seu pró-fármaco	14
Tabela 3. Tabela de condições para a reação de esterificação do acetaminofeno	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4. Tabela de condições para reação de substituição nucleofílica entre o composto 54 e a dietilamina.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5. Tabela de condições para a reação de substituição nucleofílica entre o composto 54 e a dietilamina em micro-ondas	Erro! Indicador não definido.
Tabela 6. Grupos de animais e seus respectivos tratamentos para a avaliação da atividade antipirética.....	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Número de publicações envolvendo pró-fármaco em intervalos de cinco anos – Web of Science/pesquisa pela palavra prodrug3

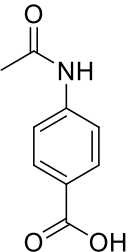
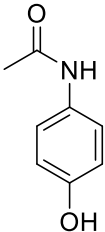
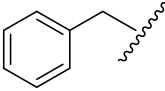
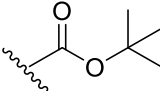
Gráfico 2. Variação da temperatura corpórea em função do tempo da dose de paracetamol 300 mg/kg.....**Erro! Indicador não definido.**

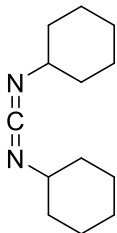
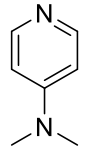
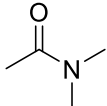
Gráfico 3. Variação da temperatura corpórea em função do tempo para diferentes doses de propacetamol**Erro! Indicador não definido.**

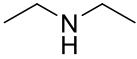
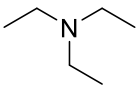
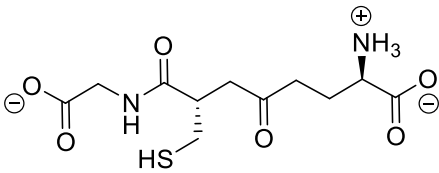
Gráfico 4. Variação da temperatura corpórea em função do tempo da dose de propacetamol em 600 mg/Kg**Erro! Indicador não definido.**

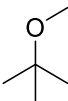
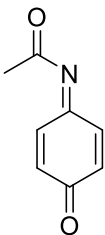
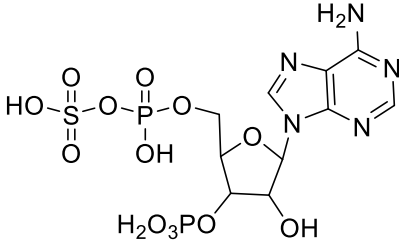
Gráfico 5. Comparação da variação da temperatura corpórea em função do tempo das doses de paracetamol 300 mg/Kg e propacetamol 600 mg/Kg**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN		Acetonitrila
ADME		Absorção, distribuição, metabolismo, excreção
AIF		Fator indutor de apoptose
AMPC		Monofosfato de adenosina cíclico
APAB		Ácido <i>p</i> -acetamidabenzóico
APAP		Ácido acetamidafenólico (acetaminofeno)
ASK		Proteína quinase reguladora do sinal de apoptose
BK		Bradicinina
Bn		Benzila
Boc		<i>tert</i> -Butoxicarbonila
n-Bu		<i>n</i> -Butila
CB		Canabinóide
CCD		Cromatografia em camada delgada
CDK		Proteína quinase dependente de ciclina

CES		Enzima carboxilesterase
CG		Cromatografia gasosa
CG-EM		Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE		Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM		Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
COX		Enzima ciclo-oxigenase
CYP		Citocromo P450
DCC		<i>N,N'</i> -díciclo-hexilcarbodiimida
DCE		Dicloroetano
DCM		Diclorometano
DE		Espaço de diversidade estrutural
DMAP		4-Dimetilaminopiridina
DMF		<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DNA		Ácido desoxirribonucleico
EC		etilcarbonato
IES-EM		Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>

IES-EMAR		Espectrometria de massas de alta resolução por <i>electrospray</i>
Endo G		Endonuclease G
Et ₂ NH		Dietilamina
Et ₃ N		Trietilamina
FAD		Flavina adenina dinucleotídeo
FCE		Fluido cérebro espinal
FMN		Flavina mononucleotídeo
GSH		Glutationa
GTH		Enzima glutationa transferase
HMG-CoA		3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A
Hz		Hertz
IL		Interleucina
JNK		Proteína quinase c-Jun N-terminal
LEF		Leflunomida
LPS		Lipopolissacarídeo
MAPLK		Proteína quinase ativada por mitógeno
MLK		Proteína quinase de linhagem mista
MO		Micro-ondas

MOM		metóximetiléter
MPT		Transição de permeabilidade mitocondrial
MTBE		Éter metil <i>terc</i> -butílico
NAC		<i>N</i> -acetilcisteína
NADP		Fosfato dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NADPH		
NAPQI		<i>N</i> -acetil- <i>p</i> -benzoquinona imina
P		Promoiety
PAPS		3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato
$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4 - \text{Pd}^0$		Paládio Tetrakis(trifenilfosfina)
PFC		Propriedades farmacocinéticas
PFD		Propriedades farmacodinâmicas
PGE_2		Prostaglandina E 2
PGH_2		Prostaglandina H 2
ppm		Parte por milhão

RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RNS	Espécie reativa de nitrogênio
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Enzima superóxido dismutase
SULT	Enzima sulfotransferase
TEA	trietanolamina
TFA	Ácido trifluoracético
THF	Tetraidrofurano
TEBAC	Cloreto de benzil trietil amônio
TNF α	Fator de necrose tumoral α
UDP	Uridina difosfato
UGT	Enzima UDP-glucuronosil transferase
UV/Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
J	Constante de acoplamento
$\tan\delta$	Fator de perda

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Pró-fármacos.....	2
1.1.1 Tipos de pró-fármacos.....	6
1.1.2 Planejamento de pró-fármacos.....	9
1.2 Síntese orgânica: uma abordagem envolvendo o acetaminofeno.....	15
1.2.1 Síntese dos pró-fármacos de acetaminofeno.....	18
1.3 Importância e uso do paracetamol e do propacetamol.....	23
1.3.1 Mecanismos de ação do paracetamol e do propacetamol.....	25
1.3.2 Metabolismo e toxicidade do paracetamol e do propacetamol.....	27
2. OBJETIVOS	37
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	39
3.1 Síntese do propacetamol.....	39
3.1.1 Síntese do cloridrato de propacetamol assistida por micro-ondas.....	54
3.2 Avaliação antipirética do propacetamol: determinação da temperatura retal por telemetria.....	57
3.3 Estudo do metabolismo: formação e identificação de metabólitos do propacetamol.....	61
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

6. PARTE EXPERIMENTAL	82
6.1 Materiais e métodos.....	82
6.1.1 Solventes e reagentes.....	82
6.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	82
6.1.3 Espectrometria de massas de baixa resolução.....	83
6.1.4 Espectrometria de massas de alta resolução.....	83
6.1.5 Cromatografia gasosa.....	84
6.2 Procedimentos experimentais.....	84
6.2.1 Síntese do 2-cloroacetato de metila (55).....	84
6.2.2 Síntese do 2-iodoacetato de metila (106).....	84
6.2.3 Síntese do dietilglicinato de metila (56).....	85
6.2.4 Síntese do 4-acetamidofenil-2-cloroacetato (54).....	85
6.2.5 Síntese do 4-acetamidofenil-2-iodoacetato (127).....	86
6.2.6 Síntese do cloridrato de propacetamol (23).....	87
6.2.7 Síntese do acetato de 4-acetamidofenila (123).....	88
6.2.8 Síntese 2-cloroacetato de 4-nitrofenila (54 a).....	88
6.2.9 Método geral para reação microssomal.....	89
ANEXOS	92

Introdução

1. Introdução

1.1 Pró-fármacos

A habilidade de um fármaco administrado obter a resposta farmacológica desejada e reverter as condições clínicas manifestadas pela enfermidade em análise é o objetivo da terapia medicamentosa, já que para a observação do efeito é necessário que a substância ativa esteja disponível no sítio ativo, ocorrência que é dependente da concentração plasmática do fármaco, ou seja, um sistema de liberação de fármacos deve garantir níveis sanguíneos terapêuticos adequados para as condições patológicas apresentadas (FASINU et al., 2011).

Dessa forma, a biodisponibilidade de moléculas é um parâmetro fundamental para avaliar a capacidade da substância ativa de atravessar barreiras biológicas, uma vez que, em determinados compostos, a biodisponibilidade pode ser baixa, devido à polaridade de grupos funcionais, os quais podem ser responsáveis por uma menor absorção ou má distribuição do fármaco, destruição precoce da molécula pelo metabolismo de primeira passagem ou outro tipo de degradação que diminua o tempo de meia-vida biológica. A fim de superar tais desvantagens e devido ao uso restrito e limitado de determinados princípios ativos, algumas estratégias no preparo de formulações farmacêuticas são utilizadas como alternativa, tais como a microencapsulação, a liberação sustentada ou as preparações enterossolúveis. Entretanto, geralmente, formulações galênicas não são suficientes para corrigir insuficiências farmacocinéticas, logo, é necessário o uso de modificações químicas da molécula ativa, cujo objetivo é converter uma molécula de interesse em um fármaco clinicamente aceitável. Dessa forma, a utilização de pró-fármacos é uma estratégia eficientemente empregada na resolução de questões farmacocinéticas ou farmacodinâmicas (WERMUTH, 2008).

O uso da estratégia de pró-fármacos como uma abordagem química e biológica para superar as diversas barreiras do organismo na liberação de fármacos tem sido alvo de diversas pesquisas e publicações, sendo que um levantamento no número de publicações contendo no título a palavra *prodrug* em intervalos de cinco anos na base de dados *Web of Science* mostra o crescente número de trabalhos empregando esta estratégia de modificação molecular (Gráfico 1).

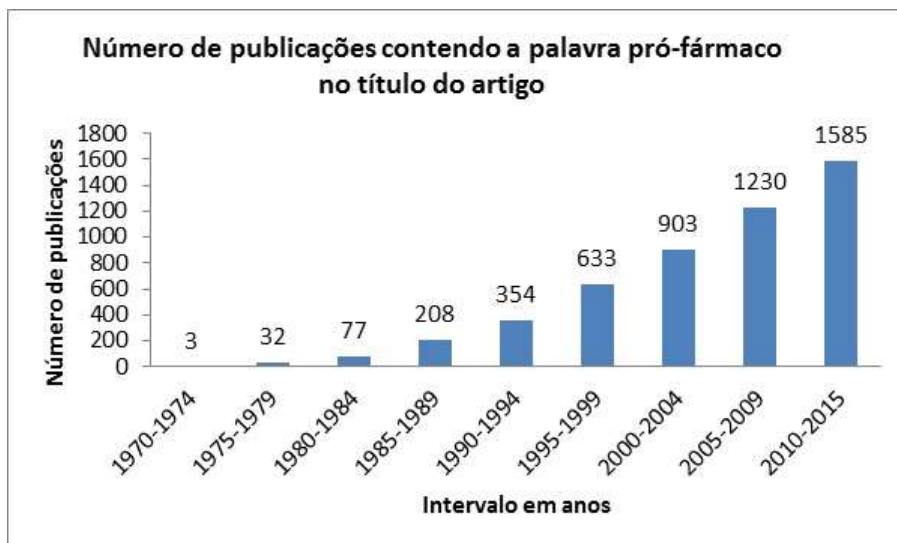


Gráfico 1 Número de publicações envolvendo pró-fármaco em intervalos de cinco anos – *Web of Science*/pesquisa pela palavra *prodrug*

O termo pró-fármaco foi registrado pela primeira vez por Adrien Albert (1958) em seu trabalho cujo título é “Chemical Aspects of Selective Toxicity”, onde esse é definido como substâncias químicas com pouca ou nenhuma atividade biológica, as quais sofrerão biotransformação para gerar o metabólito ativo. Esta definição é ampla e inclui pró-fármacos acidentais históricos, como ácido acetil salicílico (**a**) e ácido salicílico (**b**), metabólitos ativos, como imipramina (**c**) e desmetilimipramina (**d**), e compostos planejados para melhorar o perfil farmacocinético de uma molécula ativa (WERMUTH, 2008). Outra definição foi dada por Bundgaard, em seu livro texto publicado em 1991, o qual afirmava que pró-fármacos são formados por uma parte ativa e outra metade inativa, a fim de superar as barreiras biológicas que impedem o uso ótimo do princípio ativo (Figura 1). Entretanto, tal definição se aplica apenas aos pró-fármacos do tipo carreador, sem considerar os demais tipos.

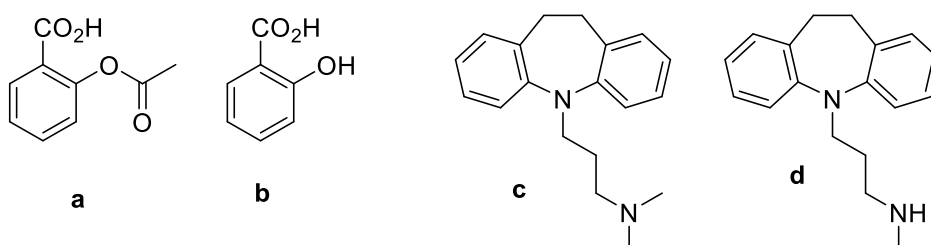


Figura 1. Pró-fármacos acidentais

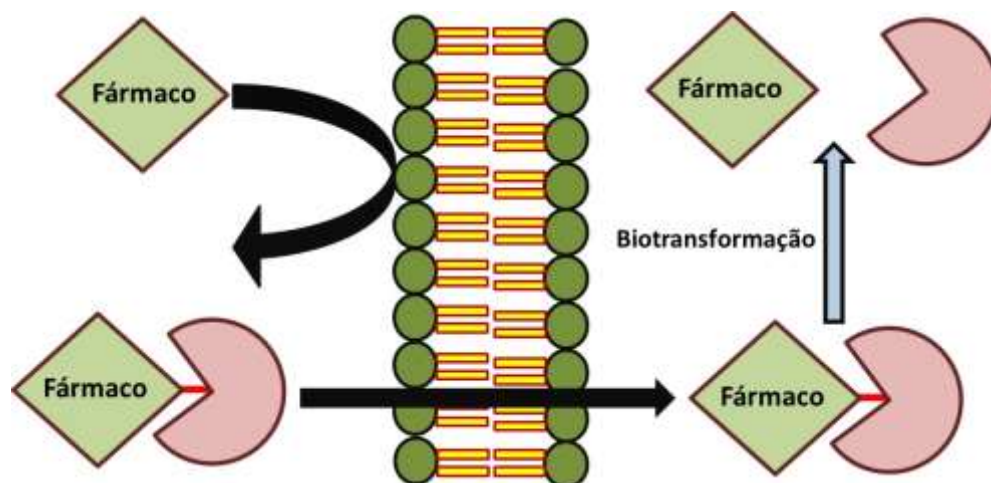


Figura 2. Representação do modo de ação de pró-fármacos em superar barreiras biológicas

Posteriormente, Harper (1959) propôs a latenciação de fármacos, termo que o autor define como a modificação química de um composto biologicamente ativo para formar um novo composto, o qual liberará o princípio ativo após a metabolização enzimática *in vivo*, sendo as alterações químicas realizadas responsáveis pela mudança nas propriedades físico-químicas do fármaco, as quais afetam a absorção, a distribuição e o metabolismo enzimático. Porém, apenas na década de 70, com a melhor compreensão dos mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), o processo de latenciação de fármacos consolidou-se. No decorrer do tempo, outros termos foram empregados como sinônimos de pró-fármaco, como por exemplo, fármaco latente e derivados biorreversíveis, mas posteriormente, o termo pró-fármaco foi padronizado e definido como derivado químico e farmacologicamente inativo da molécula matriz, que requer biotransformação para liberar o fármaco ativo (CHUNG et al., 2005).

Contudo, pró-fármacos não devem ser confundidos com fármacos intrinsecamente ativos, que no organismo ainda são capazes de serem biotransformados em uma ou mais substâncias ativas, as quais contribuem para a resposta clínica observada, visto que a magnitude do efeito depende da atividade farmacológica e de fatores farmacocinéticos como compartimentalização e perfil de distribuição. Um exemplo clássico desse fato refere-se à codeína, a qual é *O*-desmetilada a morfina, e o diazepam que também por *O*-desmetilação é biotransformado em nordiazepam (TESTA, 2004).

Porém, em muitos casos o termo pró-fármaco é frequentemente confundido com o termo “soft drug”. Este último é definido como análogos isostéricos e isoeletrônicos ativos de compostos líderes que são inativados por um modo previsível e controlável depois de executar

sua função terapêutica. *Soft drugs* são planejados para serem rapidamente metabolizados em moléculas inativas e simplificar o perfil de transformação-distribuição-atividade do fármaco. Dessa forma, *soft drugs* são novos agentes terapêuticos obtidos pela modificação molecular de modo mais desejável da molécula líder, sem alterar o grupo farmacofórico, de modo que esta modificação permita uma rápida inativação ou desintoxicação após o fármaco exercer seu efeito biológico. Geralmente, este tipo de fármaco é administrado próximo ao local de ação, contudo, caso haja distribuição para locais distantes do sítio ativo, a molécula será rapidamente inativada pelo metabolismo, uma vez que sua estrutura foi planejada e desenhada para impedir a atividade farmacológica indesejada ou a toxicidade. Dentre as vantagens do uso de *soft drugs* se destacam: a melhoria do índice terapêutico pela minimização de efeitos colaterais sistêmicos e pela eliminação de intermediários tóxicos reativos; impedimento da toxicidade não localizada ou duradoura pelo fornecimento de uma rota fácil e acessível de degradação metabólica; simplificação do perfil de distribuição/atividade por evitar a formação de intermediários ativos; e, finalmente, a eliminação da interação de fármacos por evitar vias metabólicas competitivas (BODOR; BUCHWALD, 2000).

Como exemplo da aplicação da estratégia de *soft drugs*, temos o fármaco anti-inflamatório etabonato de loteprednol (**2**), um glicocorticoide planejado baseado na estrutura de um metabólito inativo da prednisolona **3**. A prednisolona (**1**) causa alergias e cataratas em pacientes que fizeram uso deste medicamento por muito tempo, sendo este efeito adverso associado ao grupo α -hidróxicarbonil da posição 17β do sistema esteroide da prednisolona. Bodor e colaboradores (1994) planejaram a *soft drug* **2** de modo que os grupos inseridos na posição 17β sejam metabolizados por esterases não-específicas ao metabólito inativo **3**, o qual, além de não se ligar ao receptor de glicocorticoide, é eliminado prontamente pelo organismo (Figura 2).

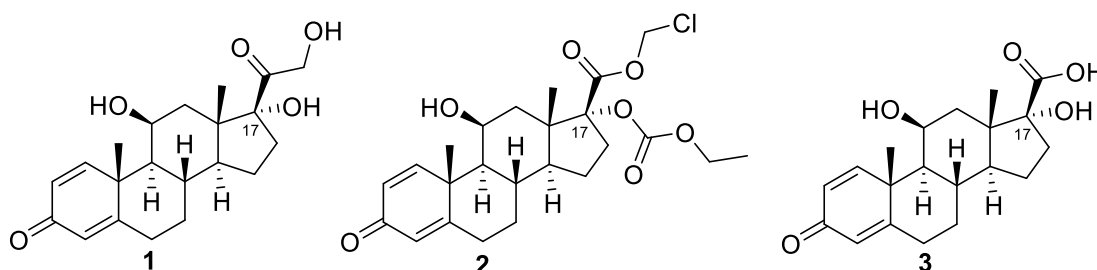


Figura 3. Aplicação de soft drugs no anti-inflamatório etabonato de loteprednol

Atualmente, o desenvolvimento de pró-fármacos é uma estratégia bem estabelecida para a melhoria das propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de compostos

farmacologicamente potentes. Nas últimas décadas, cerca de 5 a 7% dos fármacos aprovados ao redor do mundo foram considerados pró-fármacos, sendo que entre 2001 e 2002, aproximadamente 15% dos fármacos aprovados foram pró-fármacos (RAUTIO et al., 2008).

Contudo, durante o planejamento de um pró-fármaco, devem ser considerados alguns pontos críticos como: a existência de grupos funcionais na molécula matriz capazes de sofrer derivatização; a existência de mecanismos ou sistemas no organismo capazes de ativa-lo; a facilidade de sintetizar e purificar sua molécula; sua estabilidade química; a regeneração, *in vivo*, da molécula matriz em quantidades ideais; e a toxicidade do transportador no caso de pró-fármacos carreadores (CHUNG; FERREIRA, 1999).

Dessa maneira, é desejável que o pró-fármaco apresente algumas características fundamentais como: inatividade ou menor atividade do que o fármaco matriz; produção por rotas sintéticas menos complexas que a do fármaco original; cisão da ligação entre o fármaco matriz e o transportador, *in vivo*, por via química ou enzimática, no caso de pró-fármacos carreadores; ausência de toxicidade do transportador; cinética de biotransformação e inativação adequada para assegurar concentrações eficazes do fármaco no sítio ativo (CHUNG et al., 2005).

1.1.1 Tipos de Pró-fármacos

Os pró-fármacos podem ser subdivididos em classes ou grupos, quanto a critérios químicos ou relacionados à pesquisa. Contudo, o número de classes sofreu algumas alterações ao longo dos anos.

Em 1984, Wermuth subdividiu os pró-fármacos em quatro classes: **pró-fármacos clássicos**, os quais seguem a definição clássica de latenciação, sendo por si só compostos inativos que devem sofrer hidrólise química ou enzimática para liberar a porção ativa; **bioprecursores**, os quais são fármacos latentes que não apresentam um transportador propriamente dito, mas são moléculas inativas que sofrem biotransformação *in vivo*, pelos sistemas de oxidação e redução do organismo para gerarem o metabólito ativo; **mistos**, são os pró-fármacos com características de bioprecursor e pró-fármaco clássico, ou seja, moléculas biologicamente inativas que precisam sofrer diversas reações para se converterem no fármaco ativo, visando ao aumento da concentração do fármaco no sítio de ação específico; e **pró-fármacos dirigidos**, os quais se caracterizam por apresentarem um fármaco acoplado a um transportador específico para determinado receptor ou enzima existente no sítio ativo, podendo

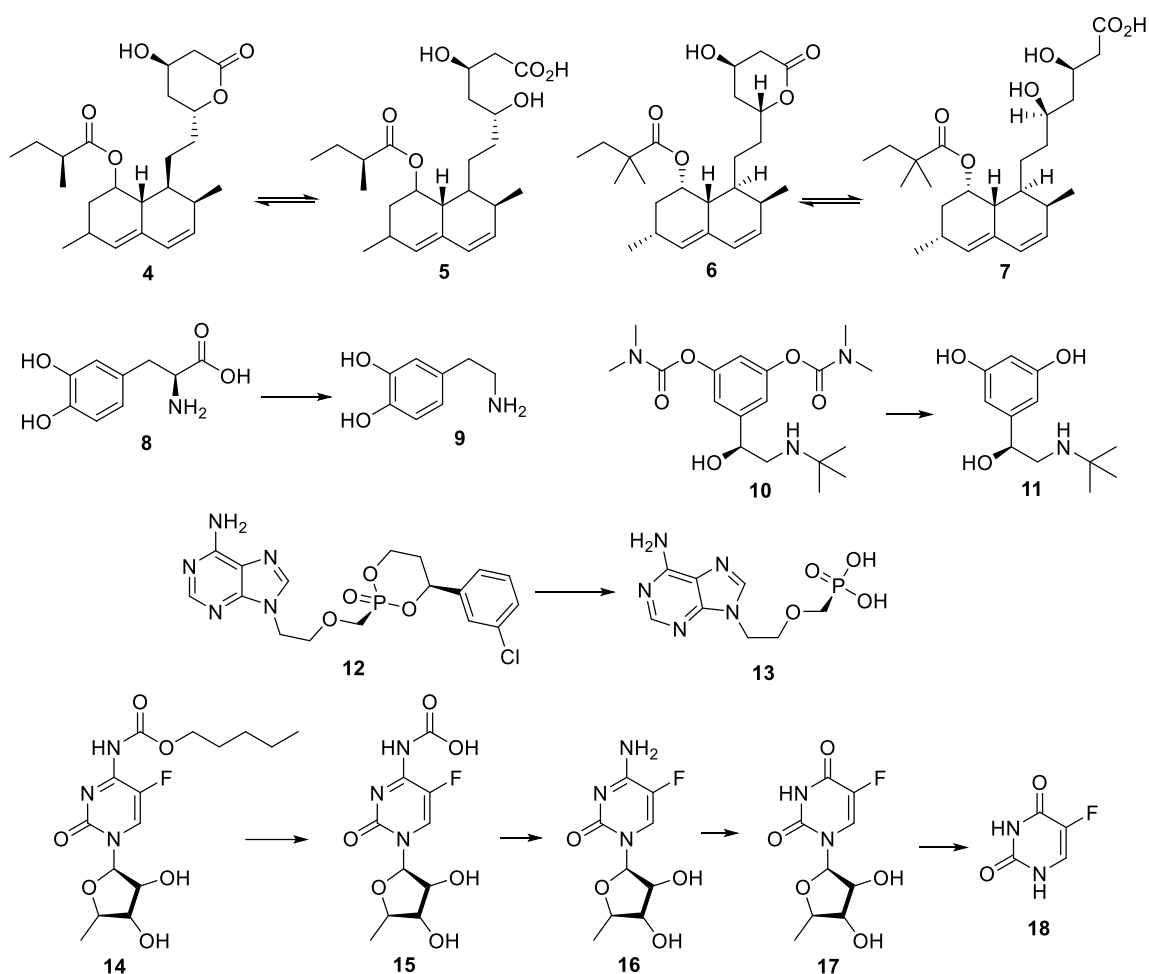
o carreador ser um polímero ou uma macromolécula específica como um anticorpo (CHUNG et al., 2005).

Testa e colaboradores, em 2004, descrevem em sua publicação que os pró-fármacos podem ser classificados de acordo com dois critérios principais: **classe química**, o qual engloba pró-fármacos ligados a carreadores, bioprecursores, sistemas de liberação química sítio específica, pró-fármacos macromoleculares e aqueles conjugados a anticorpos; e **mecanismo de ativação**, o qual se baseia no tipo de metabolismo que a molécula irá sofrer, como enzimático ou não enzimático, ativação por oxidação, redução ou hidrólise, reações catabólicas ou anabólicas (ETTMYER et al., 2004).

Posteriormente, químicos medicinais classificaram os pró-fármacos, segundo argumentos químicos, em quatro classes principais: **pró-fármacos ligados a carreadores**, que difere da definição anterior pelo fato de a ativação poder ocorrer por hidrólise, oxidação ou redução; **pró-fármacos macromoleculares**, cujo carreador é uma macromolécula, como por exemplo, o polietilenoglicol; **pró-fármaco conjugado a um anticorpo**, cujo carreador é um anticorpo; e **bioprecursor** (TESTA, 2004). Contudo, em 2008, Wermuth, em seu livro “A prática da química medicinal”, classifica os pró-fármacos em duas classes principais: **pró-fármacos carreadores**, os quais resultam de uma ligação temporária, a qual é clivada por hidrólise no momento correto, entre a molécula ativa com a metade transportadora, a qual é frequentemente de natureza lipofílica; **bioprecursores**, os quais resultam de uma modificação molecular do princípio ativo, gerando um novo composto, o qual é substrato para o metabolismo enzimático, responsável por biotransformar o pró-fármaco na molécula ativa.

Alguns exemplos de pró-fármacos bioprecursores são: a **lovastatina (4)**, um inibidor da enzima HMG-Coa (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A redutase) utilizado no tratamento de hipercolesterolemias, que é biotransformado em seu composto ativo por meio da abertura do anel lactônico (CHUNG et al., 2005); a **sinvastatina (6)**, outro fármaco inibidor da HMG-CoA, também sofre metabolização semelhante à lovastatina (MAURO, 1993; SHITARA; SUGIYAMA, 2006); a **levodopa (8)**, utilizada no tratamento da doença de Parkinson, que é biotransformada em dopamina por descarboxilação, catalisada pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (NUTT; WOODWARD, 1986); o **bambuterol (10)**, utilizado para o tratamento da asma, sofre reações de hidrólise e oxidação para liberar a terbutalina, a qual é a molécula ativa (PERSSON; PAHLM; GNOSSPELIUS, 1995; SVENSSON; TUNEK, 1988); o **pradefovir (12)**, antiviral para o tratamento da Hepatite B crônica, é oxidado pelo citocromo

P-450, a adefovir (ERION et al., 2004); e a **capecitabina (14)**, utilizada como antineoplásico, requer múltiplas etapas de ativação enzimática, que se inicia pela hidrólise da ligação éster do grupo carbamato pelas carboxilesterases hepáticas 1 e 2 (CES1 e CES2), seguido por uma descarboxilação, gerando o metabólito **16**, que sofre a ação da citidina desaminase para formar o metabólito **17**, o qual é substrato para a enzima timidina fosforilase que libera o composto ativo, o 5'-fluoruracil (**18**) (Esquema 1) (MIWA et al., 1998; VENTURINI, 2002).



Esquema 1

Por outro lado, alguns exemplos de pró-fármacos carreadores são: o **valaciclovir (19)**, pró-fármaco do antiviral aciclovir (GUO et al., 1999); o **irinotecano (20)**, pró-fármaco do antineoplásico camptotecina (ROTHENBERG, 2001); a **pivampicilina (21)**, pró-fármaco do antibiótico β-lactâmico ampicilina (EHRNEBO; NILSSON; BORÉUS, 1979); a **fosfenitoína (22)**, o pró-fármaco do anticonvulsivante fenitoína (BROWNE; KUGLER; ELTON, 1996;

VARIA et al., 1984); e o **propacetamol (23)**, pró-fármaco do antipirético paracetamol (Figura 3).

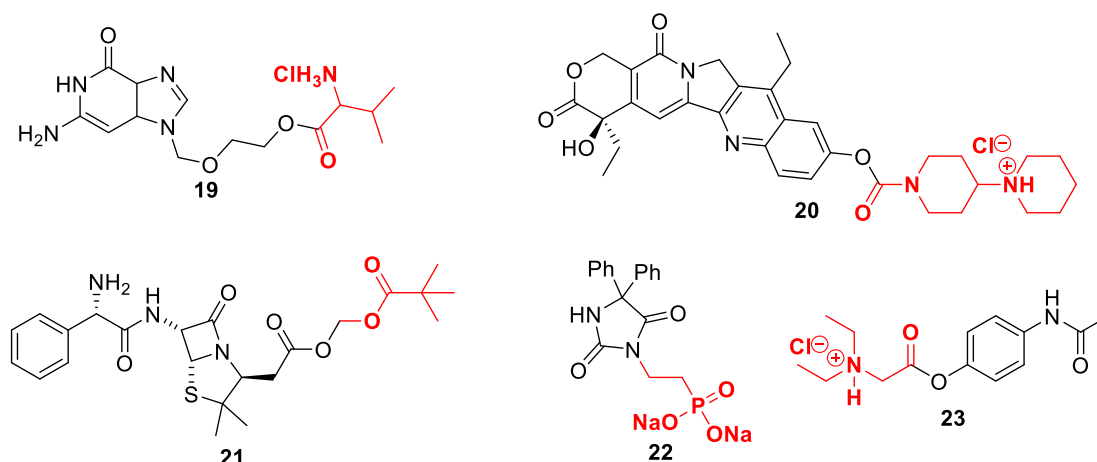


Figura 4. Exemplos de pró-fármacos carreadores

1.1.2 Planejamento de Pró-fármacos

A estratégia de pró-fármacos pode ser adotada frente a diferentes situações. Contudo, um uso racional seria o emprego apenas quando uma substância inovadora e muito promissora apresenta restrições farmacocinéticas ou farmacodinâmicas, ou seja, em um projeto para identificar compostos com potencialidade para líder, por exemplo, temos inicialmente um espaço hipotético contendo um número de moléculas com diversidade estrutural (DE). Podemos distinguir dois outros espaços, ou conjuntos, os quais se diferenciam em duas características essenciais: propriedades farmacodinâmicas (PFD) e propriedades farmacocinéticas (PFC) (Figura 4).

Assim, em uma situação considerada ideal, se os dois subconjuntos se sobrepõem gerando uma área de intersecção, haverá moléculas que apresentam características estruturais que combinam ambas as propriedades. Por outro lado, se as moléculas apresentarem aspectos estruturais que sejam incompatíveis de aliar às propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas numa única estrutura, uma estratégia envolvendo o uso de pró-fármacos se faz necessária a fim de se adicionar uma *promoiety* (P) no composto que viabilize o uso do fármaco (ETTMAYER et al., 2004).

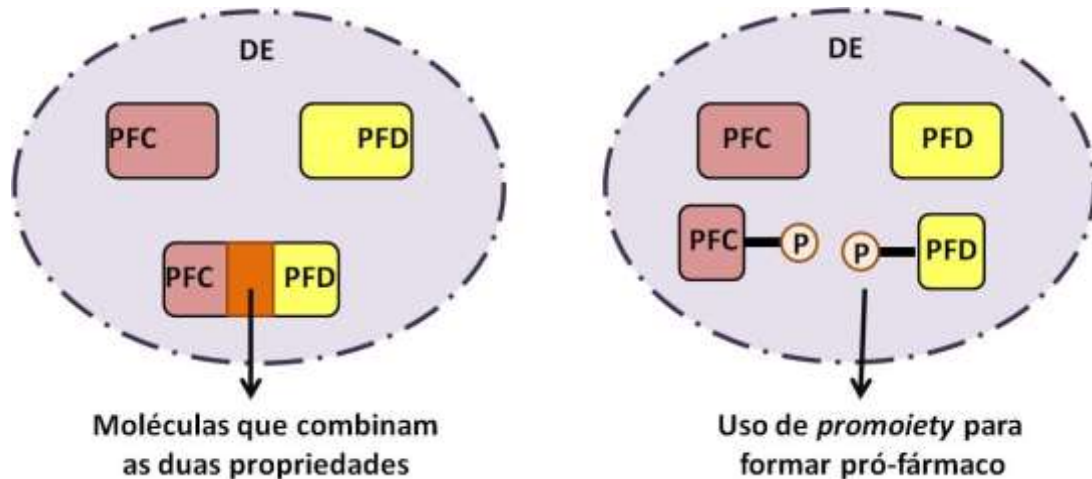


Figura 5. Uso racional da estratégia de pró-fármacos. Adaptado de ETTMAYER (2004)

Nesse contexto, a aplicação desta estratégia de modificação molecular se destaca com o objetivo de solucionar problemas de caráter **farmacêutico**, como baixa solubilidade, estabilidade química insuficiente ou propriedades organolépticas desfavoráveis, como sabor amargo; **farmacocinético**, como baixa biodisponibilidade oral, em virtude de baixa absorção gastrointestinal ou metabolismo pré-sistêmico, baixa absorção parenteral, tempo de ação curto e ausência de seletividade onde há a necessidade de prolongar o tempo de ação e de liberação órgão/tecido seletiva do ativo; e **farmacodinâmico**, como baixo índice terapêutico e geração *in situ* de agente citotóxico (TESTA, 2004).

Dessa forma, o desenho e o planejamento de uma estrutura de pró-fármaco adequada, realizado anteriormente aos estágios de desenvolvimento pré-clínico, deve considerar que o novo composto pode alterar a distribuição tecidual, a eficácia e a toxicidade do fármaco matriz (do inglês *parent drug*) devido à presença da parte estrutural adicionada, chamada *promoiety* (grupo funcional que modifica a estrutura do agente farmacologicamente ativo para melhorar as propriedades físico-químicas, biofarmacêuticas e farmacocinéticas). Um *promoiety* ideal deve ser seguro, atóxico, excretado prontamente do organismo sem causar qualquer tipo de lesão e apresentar uma ligação química lábil com o fármaco. Logo, deve ser levado em consideração durante o desenvolvimento, quais grupos funcionais do fármaco de origem são adequados para a derivatização em pró-fármaco. A tabela 1 correlaciona as funções presentes no fármaco com os possíveis pró-fármacos passíveis de serem formados (RAUTIO et al., 2008).

Tabela 1. Correlação entre grupo funcional e tipo de pró-fármaco formado

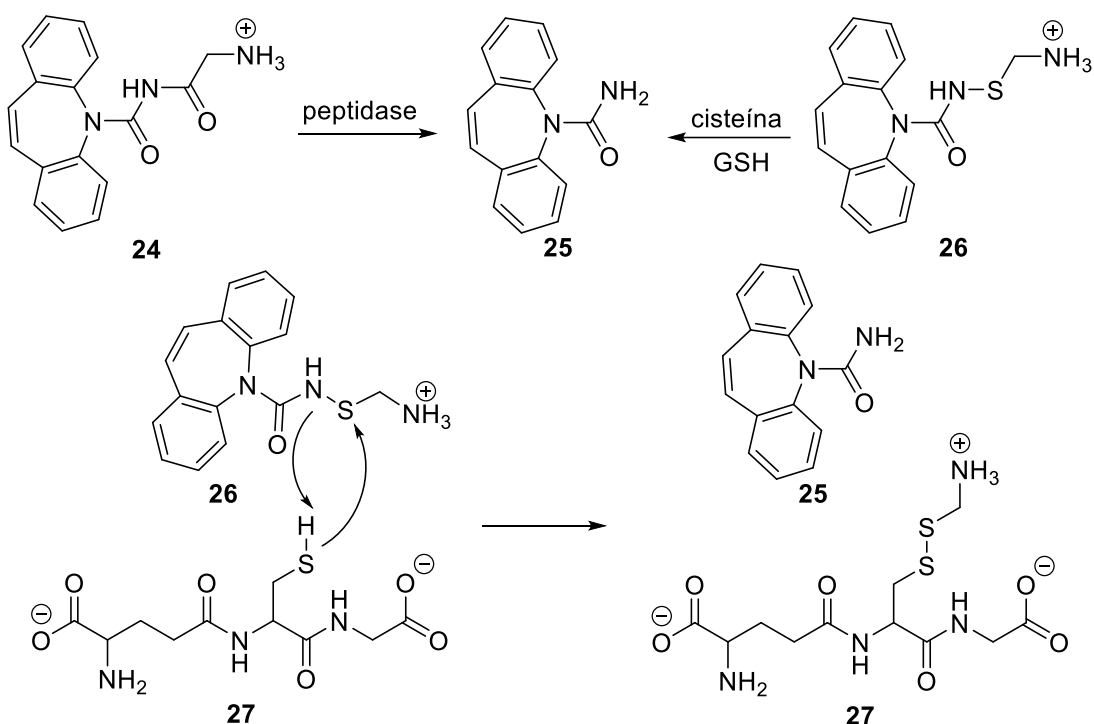
Grupo funcional presente no fármaco	Tipos de Pró-fármaco
-COOH	Carbonatos, ésteres, amidas e carbamatos
-OH	Carbonatos, ésteres, éteres e fosfatos
-SH	Tioésteres e tioéteres
-PO(OH) ₂	Fosfatos e ésteres
-NHR, -NHH	Amidas, carbamatos, bases de N-Mannich, oximas, iminas e enaminas
-C=O	Iminas, cetais, oxazolidinas, ésteres enólicos e tiazolidinas

Os pró-fármacos do tipo éster são os mais comuns e correspondem a 49% do total disponível comercialmente, eles são responsáveis por aumentar a lipofilicidade e a permeabilidade a membranas biológicas de fármacos hidrossolúveis mascarando grupos funcionais carregados como carboxilatos e fosfatos (BEAUMONT et al., 2003; ETTMAYER et al., 2004; TAYLOR, 1996).

Uma vez no organismo, a ligação éster é hidrolisada cataliticamente por enzimas do tipo esterases, as quais incluem acetilcolinesterases, butirilcolinesterases, paraoxanases, arilesterases e carboxilesterases, sendo esta última a mais envolvida nos processos de bioconversão. Estas esterases são classificadas como do tipo B, com denominação EC (Enzyme Commission) número 3.1.1.1 pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) (LIEDERER; BORCHARDT, 2006).

Nas formulações para a administração através das vias parenterais, a estratégia de pró-fármacos geralmente pretende prolongar a liberação do fármaco por meio da adição de um grupo polar, geralmente ionizável, cuja finalidade é aumentar a hidrossolubilidade, como por exemplo, no caso da *N*-glicil carmazepina **24**, pró-fármaco da carbamazepina **25** (Esquema 2). Hemeney, avaliou que a estrutura do pró-fármaco era semelhante a uma ligação peptídica, a qual poderia ser hidrolisada rapidamente por peptidases, o que foi verificado após a

administração intravenosa do composto em ratos. O mesmo composto, quando administrado pela via oral, apresentou biodisponibilidade maior em comparação com o fármaco de origem. Contudo, devido à instabilidade química, um derivado *N*-cisteamina foi sintetizado. Este novo pró-fármaco mostrou-se mais estável quimicamente e *in vivo* foi capaz de liberar rapidamente a carbamazepina em presença de cisteína e glutatona (HEMENWAY et al., 2007).



Esquema 2

Pró-fármacos contendo aminoácidos como *promoietyes* são vantajosos por proporcionar às moléculas derivatizadas boa hidrossolubilidade e uma liberação rápida e quantitativa do ativo através da ação das esterases, além do fato de o carreador não ser tóxico ao organismo. Há diversos exemplos na literatura, dentre os quais podemos citar os pró-fármacos do dapsona (Figura 5). Pochopin e colaboradores sintetizaram diversos pró-fármacos de dapsona variando o aminoácido, os quais apresentaram maior hidrossolubilidade comparado ao fármaco de origem, o qual é uma amina aromática de baixa solubilidade. O pró-fármaco de lisina **29** foi o que conferiu maior solubilidade devido ao grupo amino ionizável na cadeia lateral (POCHOPIN; CHARMAN; STELLA, 1995).

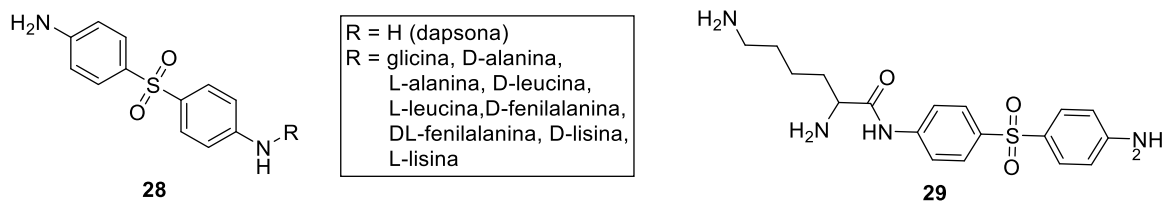


Figura 6. Pró-fármaco do dapsona

Ésteres de aminoácidos também são promoietyes empregados em alguns fármacos para aumentar a solubilidade de fármacos de baixa hidrossolubilidade como: metronidazol, alopurinol e aciclovir. O metronidazol **30** é um fármaco utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias anaeróbicas. Embora sua via de administração usual seja a oral, em alguns casos onde é necessária uma ação mais rápida, infusões intravenosas são utilizadas. Contudo, em função da baixa solubilidade, infusões de 100 a 200 mL (solução aquosa 0,5% p/v) são administradas a cada oito horas para suprir a dose terapêutica requerida. A fim de que o medicamento pudesse ser administrado na dose adequada em uma simples injeção, Bundgaard e colaboradores utilizaram a estratégia de pró-fármaco para solucionar a solubilidade do metronidazol em formulações de uso parenteral. O grupo de pesquisa sintetizou uma série de ésteres de aminoácido para avaliar a potencialidade dos pró-fármacos hidrossolúveis. Com base em seus resultados, o éster de *N,N*-dimetilglicinato **31**, na forma de sal cloreto, foi escolhido como pró-fármaco mais adequado, pois o composto apresentou baixo tempo de meia vida no plasma humano, o que indica que o metronidazol é liberado rapidamente no meio biológico e também por critérios como estabilidade e toxicidade (Figura 6) (BUNDGAARD; LARSEN; THORBEEK, 1984). Os mesmos autores, numa publicação posterior realizaram os ensaios de biodisponibilidade e comprovaram a eficiência do pró-fármaco que apresentou cinética de primeira ordem e tempo de meia vida de 3 a 7 minutos, utilizando cães como modelo animal (BUNDGAARD; LARSEN; ARNOLD, 1984).

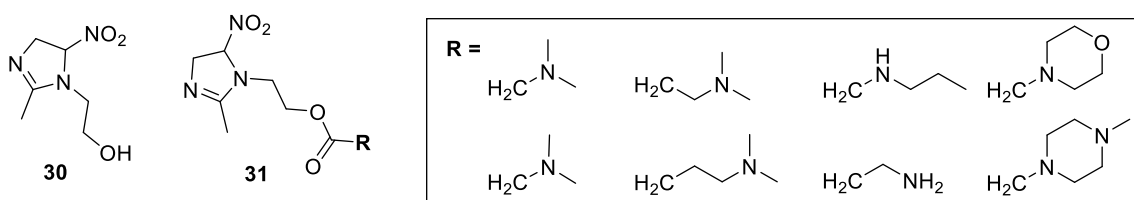


Figura 7. Pró-fármaco do metronidazol

Uma estratégia similar foi empregada para o alopurinol **32**, um fármaco utilizado para prevenir ou tratar a hiperuricosúria. Administrado geralmente por via oral, o alopurinol tem seu

uso restrito em pacientes em quimioterapia contra o câncer, já que esses pacientes sofrem constantemente náusea e vômito. Em função da baixa solubilidade em água para soluções de administração parenteral (0,5 mg/mL à 20°C) e da baixa absorção em preparações de uso retal (menor que 5%), Bundgaard e colaboradores (1985; 1985; 1985, 1990) desenvolveram pró-fármacos com alta hidrossolubilidade e lipofilicidade em pH fisiológico, capazes de liberar rapidamente e quantitativamente o fármaco de origem (Figura 7). Os derivados *N*-aciloximetil **33**, contendo um grupo amino na parte acil, na forma de sal, apresentaram perfis adequados de hidrossolubilidade e lipofilicidade, graças ao referido grupo amino que contribui para um aumento nos valores de log P (medida da lipofilicidade da molécula em sistema bifásico água/octanol) e para hidrólise dos pró-fármacos, com rápida liberação do alopurinol demonstrado por meio dos valores de meia-vida determinados (Tabela 2).



Figura 8. Pró-fármaco do alopurinol

Tabela 2. Comparação do tempo de meia-vida e log P do alopurinol e seu pró-fármaco

Composto	$t_{1/2}$ plasma(min)	log P
Alopurinol	-	-0,55
1-(<i>N,N</i> -dimetilglicioximetil)alopurinol,HCl	7	-0,49
1-(<i>N,N</i> -dietilglicioximetil)alopurinol,HCl	10	0,20

Um terceiro exemplo do emprego de pró-fármacos de ésteres de aminoácidos foi para o aciclovir **34**, um antirretroviral usado para o tratamento de infecções causadas pelo vírus da herpes. Os pró-fármacos sintetizados **35** apresentaram hidrossolubilidade e lipofilicidade melhores em relação ao fármaco original, além de apresentar uma melhor estabilidade química que permite a preparação de soluções prontas para o uso, já que a presença de um grupo benzil impede a hidrólise intramolecular da ligação éster pelo grupo amino vizinho (Figura 8) (BUNDGAARD; JENSEN; FALCH, 1991).

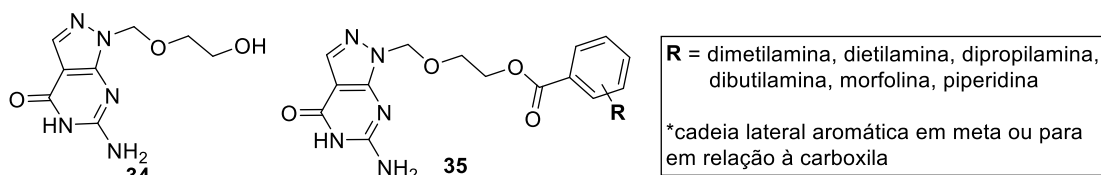


Figura 9. Pró-fármaco do aciclovir

Portanto, ésteres de aminoácidos, os quais podem conter um grupo benzil como espaçador entre a carboxila e o grupo amino ionizável, mostraram-se, através dos exemplos descritos, pró-fármacos potencialmente úteis proporcionando hidrossolubilidade, lipofilicidade e propriedades físico-químicas apropriadas para fármacos contendo grupos hidroxila ou grupos N-H ácidos, características desejáveis para a preparação de formulações administradas por via parenteral, dérmica e transdérmica. Os ésteres são altamente solúveis em meio aquoso em pH de 1 a 6, combinam adequada estabilidade e velocidade de liberação do ativo, além de serem facilmente sintetizados e purificados (BUNDGAARD; FALCH; JENSEN, 1989). Este tipo de pró-fármaco será explorado mais adiante neste trabalho, que teve como alvo de pesquisa o propacetamol, pró-fármaco carreador do paracetamol do tipo éster de aminoácido.

1.2 Síntese Orgânica: uma abordagem envolvendo o acetaminofeno

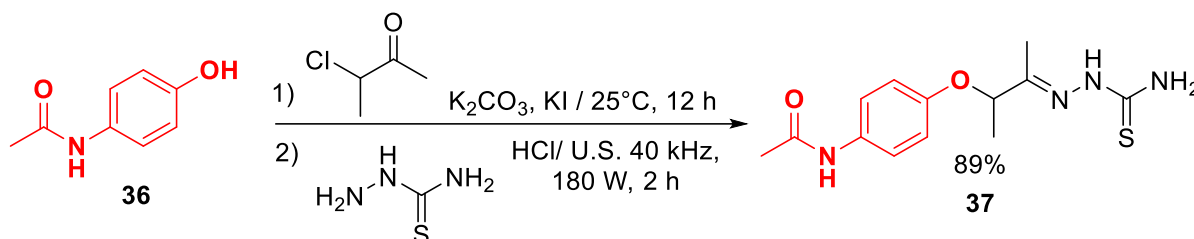
A química orgânica tem seu marco inicial com a síntese da uréia realizada por Frederich Wöhler em 1828, que além de derrubar a teoria da força vital introduziu a química orgânica sintética. Outro marco histórico importante é a síntese do corante mauveína por William H. Perkin, em 1856, o qual, na realidade, pretendia sintetizar a quinina a partir de um derivado de anilina. A “frustrada” síntese, porém, permitiu a abertura das portas para o desenvolvimento racional e científico da Química Medicinal, a qual passou a ter laços cada vez mais estreitos com a Química Orgânica, o que propiciou a síntese de diversos fármacos e de compostos estruturalmente complexos com potencial atividade biológica (CORREIA; FERREIRA, 2002).

A síntese orgânica ocupa posição central no coração da química, como demonstrado por E. J. Corey, em sua carta, quando o mesmo foi agraciado com o Prêmio Nobel, em 1991¹. Corey, em sua obra “Disconnection Approaches”, ainda descreve que o químico sintético é mais que um estrategista com lógica, é um explorador influenciado na arte de especular, criar e imaginar, o que lhe confere um toque de artista (CORREIA; FERREIRA, 2002).

¹ Disponível em http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1990/corey-lecture.pdf

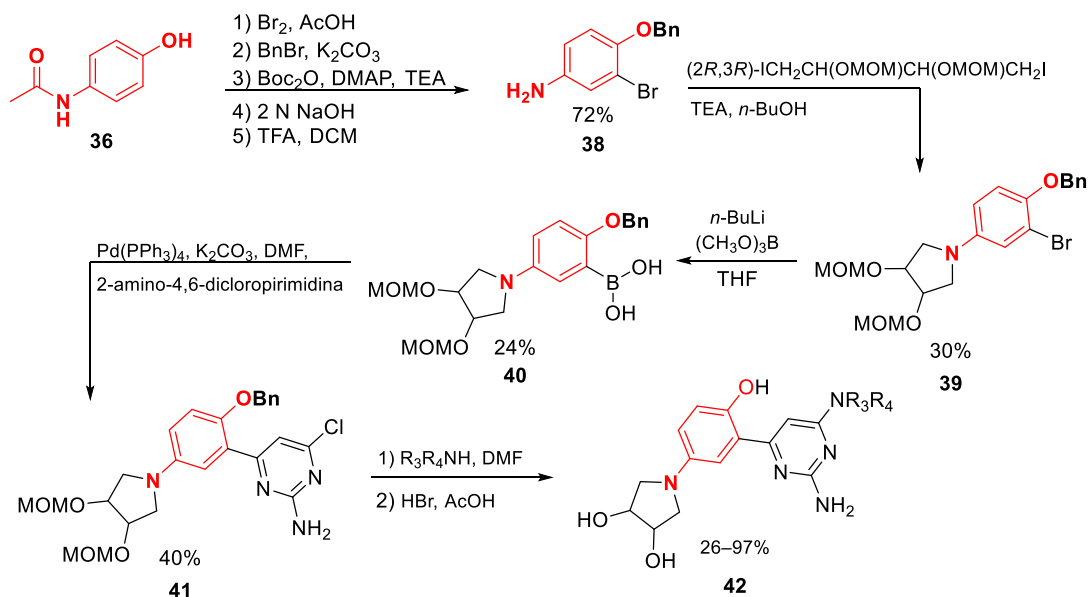
Logo, a síntese orgânica é uma ferramenta valiosa para a obtenção de novas moléculas dotadas de potencial ação biológica, já que aproximadamente 85% dos fármacos disponíveis para terapêutica são de origem sintética (BARREIRO; FRAGA, 2008). Neste contexto, o acetaminofeno tem sido empregado como reagente em diversos trabalhos na literatura para a síntese de diferentes compostos, sendo alguns exemplos relatados neste trabalho.

Moreira e colaboradores (2014) sintetizaram tiosemicarbazonas potentes e seletivas anti-*Trypanosoma cruzi*, as quais induzem a morte do parasita. Um dos substratos utilizados na rota sintética foi o paracetamol (**36**), a partir do qual foi obtido o composto **37** (Esquema 3) que apresentou citotoxicidade à forma tripomastigota do parasita, similar a do nifurtimox e cerca de duas vezes mais potente que o benzonidazol, que foram os fármacos de referência para este estudo.



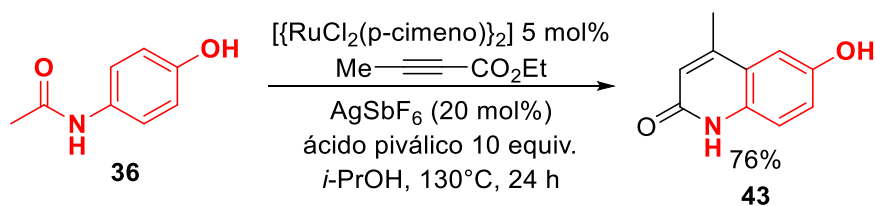
Esquema 3

Lee e colaboradores (2011) sintetizaram uma nova classe de compostos antineoplásicos potentes, derivados de 2-(2-aminopirimidin-4-il)fenol, os quais são inibidores de CDK1 e CDK2, enzimas do tipo quinase dependentes de ciclinas que atuam no ciclo de divisão celular. A inibição desses alvos impede a proliferação das células cancerígenas. Os autores desenvolveram uma rota sintética utilizando o acetaminofeno como material de partida para gerar compostos do tipo **42** (Esquema 4).



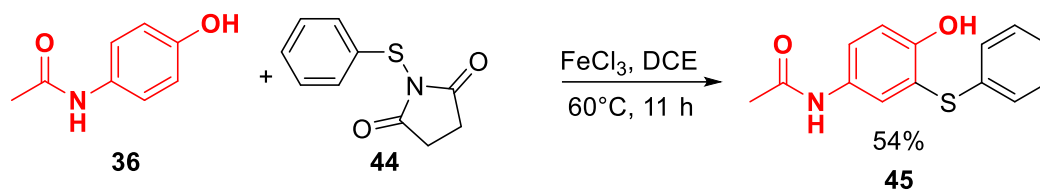
Esquema 4

Manikandan e Jegannmohan (2014) propuseram uma eficiente rota para a síntese de 2-quinolinonas, a qual é uma ciclização de anilidas substituídas ou não com propionatos ou acrilatos substituídos, catalisada por rutênio. Uma das anilidas utilizadas foi o acetaminofeno, o qual gerou um derivado de 2-quinolinona **43** com 76% de rendimento (Esquema 5). As quinolinonas estão relacionadas a atividades como: antibiótico, antiviral, antineoplásico e contra a hipersensibilidade.



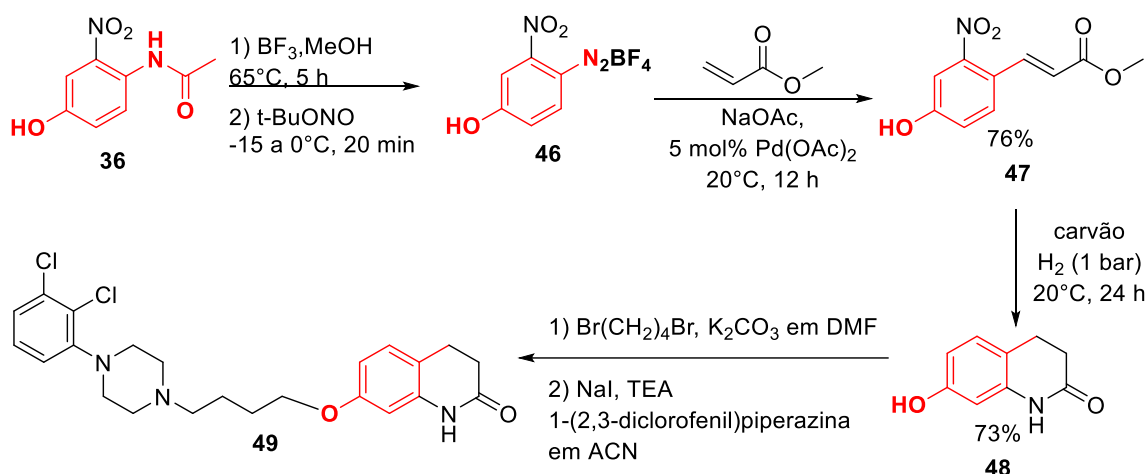
Esquema 5

Tian e colaboradores (2014) propuseram a síntese de aril sulfetos, os quais são importantes blocos de construção em síntese orgânica para a síntese de compostos usados no tratamento da inflamação, Alzheimer, Parkinson, SIDA e câncer. Esse trabalho aborda a ativação C-H, alvo de muitos pesquisadores nos últimos anos, por meio da ariliação de fenóis substituídos catalisada por ferro ou boro, sendo um dos materiais de partida utilizados, o paracetamol, que ao reagir com 1-(feniltio)pirrolidina-2,5-diona gerou o derivado **45** em 54% de rendimento (Esquema 6).



Esquema 6

Schmidt e colaboradores (2010) realizaram um estudo metodológico da reação de Mizoroki-Heck, utilizando paracetamol e diferentes anilidas numa sequência reacional que inclui desacetilação-diazotação-precipitação, a fim de produzir um sal de tetrafluorborato de diazônio **46**, o qual foi acoplado ao acrilato de metila empregando diferentes catalisadores de paládio. Os autores aplicaram a metodologia desenvolvida na síntese do aripiprazol **49** (Esquema 7), um fármaco antipsicótico para o tratamento da esquizofrenia e transtorno bipolar.



Esquema 7

Diversos exemplos de aplicação sintética do paracetamol estão disponíveis na literatura, contudo, abordaremos a seguir a síntese de seus pró-fármacos com atividade antipirética e analgésica.

1.2.1 Síntese dos Pró-fármacos de Acetaminofeno

O primeiro trabalho sobre pró-fármaco de acetaminofeno foi publicado em 1973. Repta e Hack (1973) sintetizaram o composto 2-(*p*-acetaminofenoxi)tetrahidropirano **49** como pró-fármaco (Figura 9) para ser utilizado em formulações do tipo comprimido mastigável. Embora a molécula sintetizada apresentasse as características desejadas, a baixa solubilidade em meio

aquoso inviabilizou seu uso, uma vez que a velocidade de dissolução determina a velocidade de liberação do princípio ativo.

Hussain e colaboradores (1978) sintetizaram o 1-(*p*-acetaminofenoxi)-1-etoxietano **50**, como pró-fármaco de paracetamol do tipo éter (Figura 9), e o avaliaram quanto à velocidade de hidrólise e a biodisponibilidade. O composto sintetizado, embora menos solúvel que o fármaco de origem, apresentou estabilidade química em pH neutro e em meio ácido hidrolisou rapidamente liberando o princípio ativo. Nos testes de biodisponibilidade realizados em cães, o pró-fármaco administrado em dose equivalente ao acetaminofeno alcançou concentração plasmática comparável a este último.

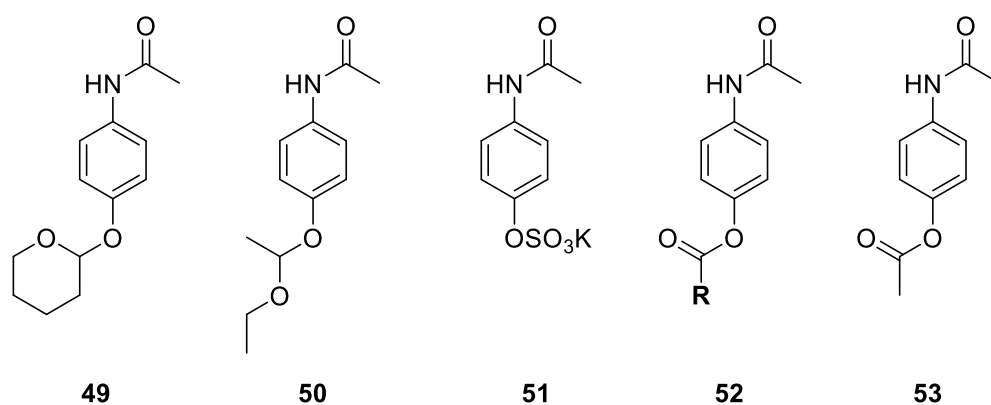


Figura 10. Pró-fármacos de acetaminofeno

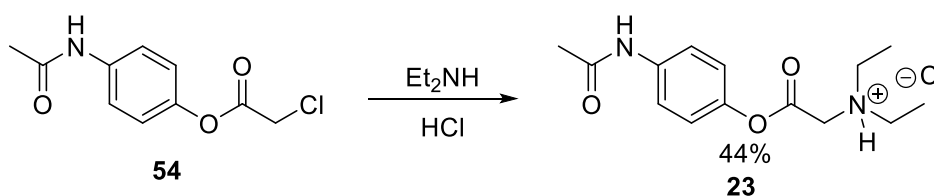
A estratégia de pró-fármaco do tipo éster sulfato foi descrita por Williams e colaboradores (1983) os quais sintetizaram o acetaminofeno sulfato de potássio **51**, um metabólito natural do paracetamol (Figura 9). A molécula proposta pelos autores se mostrou estável em soluções neutras, porém, o tempo de meia-vida de 24 horas para a hidrólise em meio ácido à temperatura de 37°C inviabilizou seu uso como pró-fármaco, devido à incapacidade de ésteres de sulfato hidrolisarem rapidamente para a liberação do acetaminofeno.

Seki e colaboradores (1988) avaliaram a velocidade de hidrólise catalisada enzimaticamente de diversos ésteres do ácido *p*-acetilaminobenzóico (APAB) e de derivados acetilados de acetaminofeno (APAP) **52** (Figura 9), sendo estes últimos já analisados em estudos prévios pelos mesmos autores. Alguns dos ésteres avaliados frente a diferentes fontes de esterases foram: ésteres carbonato de APAP, propionato (APAP-propionato), etilcarbonato (APAP-EC), 4-(acetilamino)fenoximetil etil carbonato (APAPM-EC), hexanoato (APAP-hexanoato) e outros. Os resultados desse estudo sugeriram que pró-fármacos do tipo éster

podem ser planejados para hidrolisar em sítios selecionados ao longo do caminho percorrido pelo composto no organismo, desde a absorção até a corrente sanguínea.

Bhalla e Lalla (1990) sintetizaram o *N*-[4-(acetiloxi)fenil]acetamida **53**, como pró-fármaco do tipo éster (Figura 9) para ser utilizado em comprimidos mastigáveis. Os autores realizaram a caracterização do composto, bem como a investigação da dose em estudos de pré-formulação, e concluíram que o mesmo apresentou propriedades adequadas, as quais poderiam ser exploradas comercialmente.

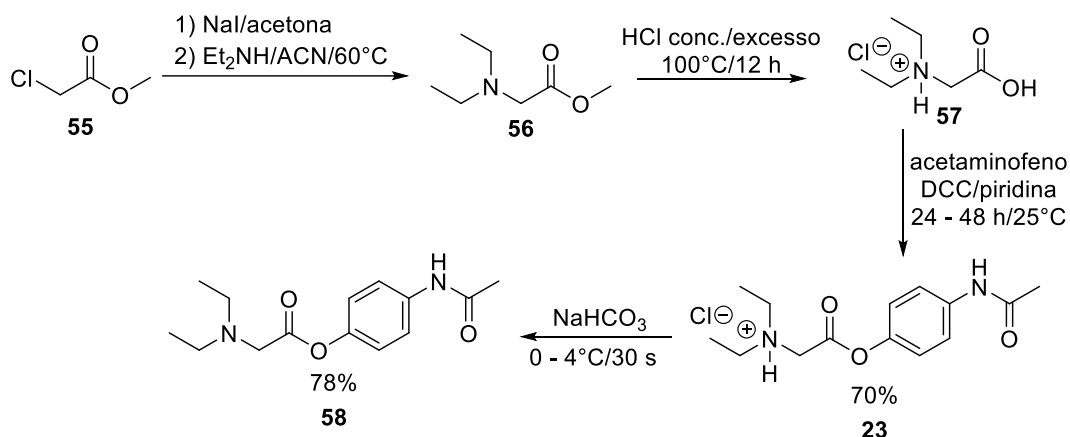
Contudo, o pró-fármaco mais estudado tem sido o propacetamol **23**, cujo primeiro trabalho envolvendo a avaliação de seu efeito analgésico comparada a um placebo data de 1985 (DELACROIX; KENESI; STOPPA, 1985) e a avaliação antipirética em crianças queimadas foi publicado em 1989 (MARICHY et al., 1989). O propacetamol foi sintetizado e comercializado sob o nome fantasia de Pro-Dafalgan[®], em 1983, pelo Laboratório francês UPSA, que em 1994 foi integrado ao grupo Bristol-Myers Squibb.² A patente mais antiga encontrada na base de dados Scifinder é de 1977, a qual tem como inventor Jean Claude Cognacq da Hexachimie S.A., França. Nesse documento pioneiro, o inventor relata o preparo do propacetamol a partir da reação entre o cloroacetato de *p*-acetamidofenol **54** e a dietilamina (Esquema 8) (COGNACQ, 1977).



Esquema 8

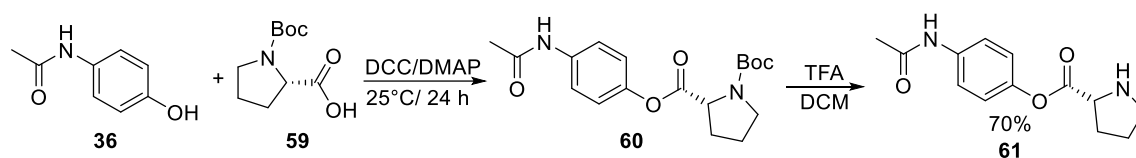
Devarajan-Ketha e Sloan (2011) em seu trabalho sobre pró-fármacos do tipo *N,N'*-dialquilaminoalquilcarbonil propuseram uma rota sintética para o propacetamol, a qual faz uso de dicitlo-hexilcarbodiimida (DCC) como reagente de acoplamento entre a dietilglicina **56** e o acetaminofeno (Esquema 9). Outros métodos de preparação deste pró-fármaco, similares ao patenteado por Cognacq, também foram propostos na forma de patentes, dentre elas se destacam as de origem chinesa (WU, 2009; ZHANG et al., 2012).

² Disponível em <http://www.bmsfrance.fr/nous-connaitre/BMS-histoire/Pages/Home.aspx>



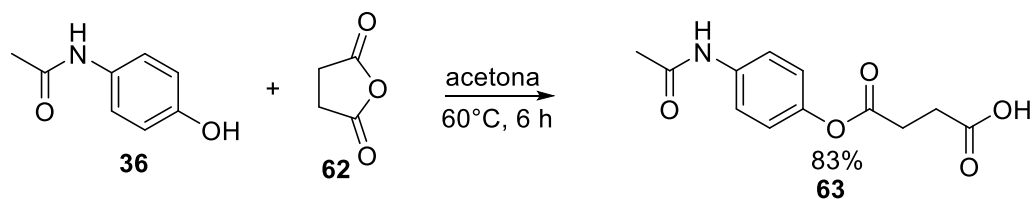
Esquema 9

Além do propacetamol, foi desenvolvido outro pró-fármaco do tipo éster de aminoácido por Wu e colaboradores (2010), que utilizaram a prolina protegida com Boc (terc-butiloxicarbonil) como material de partida. A esterificação foi realizada com DCC e dimetilaminopiridina (DMAP) e o produto **60** foi obtido em 70% de rendimento (Esquema 10). O grupo protetor foi removido com ácido trifluoroacético (TFA) em diclometano (DCM) para gerar o pró-fármaco **61**.



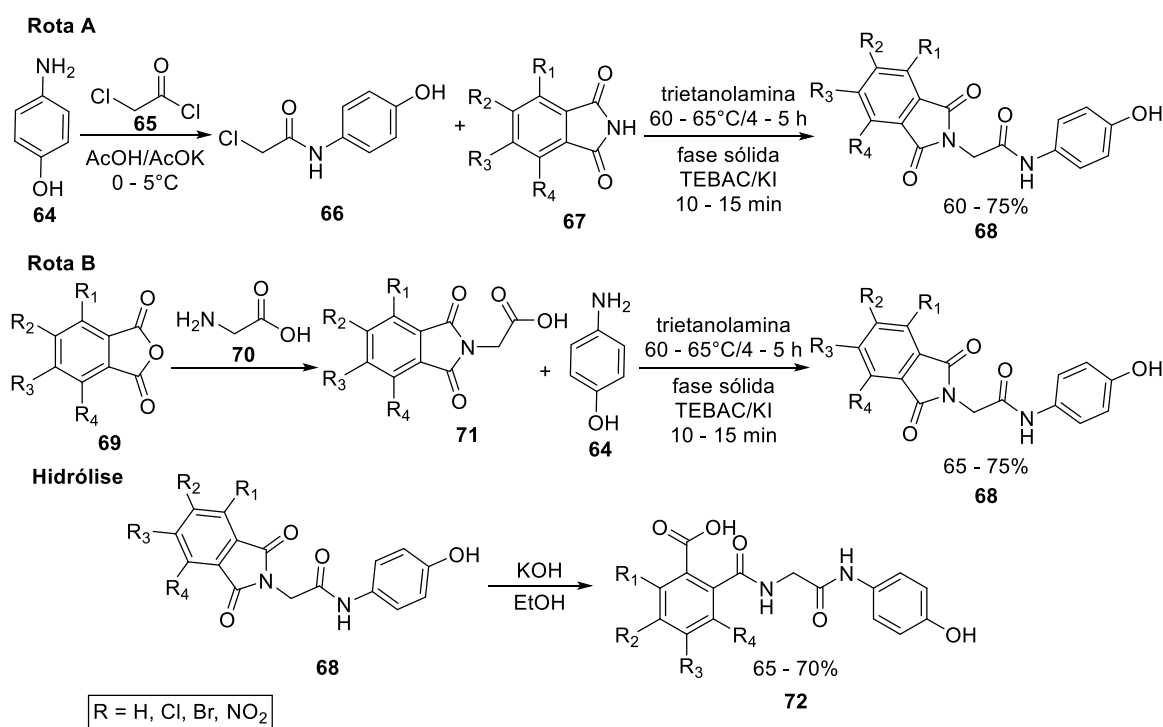
Esquema 10

Recentemente, Fu e colaboradores (2012) sintetizaram o acetaminofeno hemisuccinato **63**, como candidato a pró-fármaco, por meio da esterificação do paracetamol com anidrido succínico **62**, utilizando DMAP como catalisador e acetona como solvente, por 6 horas, a 60°C , com rendimento de 83% (Esquema 11).



Esquema 11

Uma estratégia de modificação do grupo acetamida da molécula de acetaminofeno foi proposta por Reddy e colaboradores (2014). Nesse estudo, os autores sintetizaram derivados de ftalimida **68** por duas rotas sintéticas diferentes, sendo uma (Rota A) a partir do *p*-aminofenol **64** numa esterificação com cloreto de cloroacetila **65**, em acetato de potássio e ácido acético à baixa temperatura, para gerar o *N*-(4-hidróxifenil)-2-cloroacetamida **66**, o qual reagiu com diferentes ftalimidias substituídas **67** em trietanolamina ou em reação de fase sólida na presença de cloreto de trietilbenzilamônio (TEBAC) e iodeto de potássio (KI). A outra rota (Rota B) partiu da reação entre diferentes anidridos ftálicos **69** com substituintes no anel benzênico e a glicina **70**, a fim de gerar um intermediário **71** que ao reagir com *p*-aminofenol, numa esterificação com DCC ou em trietanolamina, ou em fase sólida, gerou os mesmos pró-fármacos. Os derivados de ftalimida **68** foram hidrolisados com hidróxido de potássio (KOH) alcoólico para produzir outra série de derivados de acetaminofeno **72** com uma extremidade ácido carboxílico livre (Esquema 12).



Esquema 12

Portanto, as sínteses dos pró-fármacos descritas são algumas das estratégias de modificações moleculares para o acetaminofeno, uma vez que são ferramentas essenciais para a melhoria dos parâmetros biofarmacêuticos no preparo de formulações e formas farmacêuticas adequadas, bem como do perfil farmacocinético, cujo objetivo é a adequação das propriedades

físico químicas, no intuito de que o ativo esteja disponível na corrente sanguínea em concentrações adequadas para que alcance o sítio ativo, onde se manifestará o efeito biológico.

1.3 Importância e uso do paracetamol e do propacetamol

Durante anos, dor e febre têm sido sintomas alvos de inúmeras pesquisas que culminaram no desenvolvimento de fármacos utilizados na terapia analgésica e antipirética. Tais substâncias têm uma estimativa de uso clínico por volta de 100 milhões de prescrições por ano, estando entre as mais utilizadas no mundo, em virtude de diversos fatores como o aumento da expectativa de vida da população mundial, a rotina estressante do dia-a-dia, infecção por diferentes moléstias, incômodos do pós-operatório e outros. Um dos representantes desta classe farmacológica é o acetoaminofeno ou paracetamol (TAGLIATI, 2003).

O paracetamol (**36**) é membro da família dos compostos derivados da acetanilida (**73**) (Figura 10). A acetanilida teve suas propriedades antipiréticas descobertas acidentalmente por Cahn e Hepp em 1886, contudo seu uso foi descartado devido a sua toxicidade. A partir daí foram desenvolvidos diversos trabalhos em busca de derivados químicos, sendo a fenacetina (**74**) o composto com os melhores resultados encontrados e seu uso terapêutico em misturas analgésicas foi iniciado em 1887. A exemplo de seu antecessor, a fenacetina também teve sua retirada do mercado em 1980 em virtude da ocorrência de nefropatias decorrentes do uso abusivo. Já o acetoaminofeno (**58**) foi utilizado pela primeira vez em 1893 por van Mering, mas sua popularidade só foi alcançada em 1949 após ter sido reconhecido como metabólito ativo da fenacetina e da acetanilida (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2006).

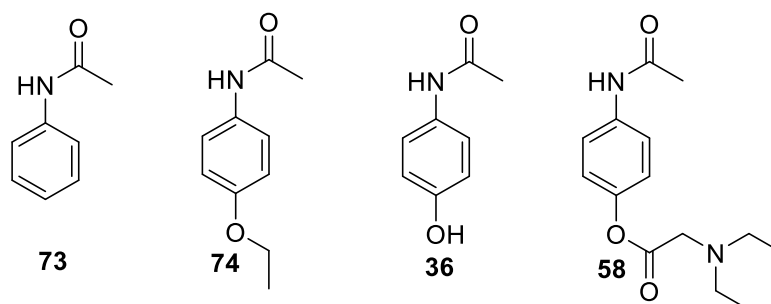


Figura 11. Derivados da acetanilida

O paracetamol não apresenta efeito sobre a isoforma constitutiva da ciclooxigenase-1 (COX-1), nem sobre a agregação plaquetária, tampouco sobre a função renal (CATTABRIGA et al., 2007), o que o tornou apropriado para o tratamento da dor no período perioperatório (KANG et al., 2015; REMY; MARRET; BONNET, 2005) em associação com uma terapia de

opióides, chamada de regime analgésico multimodal para controle da dor pós-operatória, pela American Society of Anesthesiologists (AMERICAN SOCIETY OF ANESTHESIOLOGISTS TASK FORCE ON ACUTE PAIN MANAGEMENT, 2004); para o tratamento da febre em crianças (DUHAMEL et al., 2007); em pacientes oncológicos com mucosites (WALSON et al., 2006a) e nos demais casos em que este sintoma esteja envolvido.

O controle da febre e da dor pós-cirúrgica é adequado para promover alívio ao paciente que geralmente se encontra debilitado, com dificuldade para ingerir medicamentos, ou com problemas de absorção entérica (HERSCH; RAVEH; IZBICKI, 2008). A partir deste quadro, fez-se necessária a utilização de uma via injetável para o acetoaminofeno, o que foi alcançado recentemente com o desenvolvimento de uma formulação intravenosa para uso nos Estados Unidos (PYATI; GAN, 2007). Após sua aprovação em 2001, esse medicamento tem sido indicado para o tratamento da dor aguda e da febre em cerca de 80 países, além dos Estados Unidos, sendo mais de 437 milhões de doses administradas na Europa (JAHR; LEE, 2010).

Tradicionalmente, a analgesia do período perioperatório é realizada por meio da administração de analgésicos opióides como morfina e seus derivados, por exemplo, os quais se relacionam a uma variedade de graves efeitos colaterais como depressão respiratória, sonolência, sedação, náusea pós-operatória, vômitos, prurido, retenção urinária e constipação, fatores que atrasam a alta hospitalar (WHITE, 2002). Além disso, esses fármacos potentes, em altas doses e infusões contínuas, acabam por aumentar a dor pós-operatória devido a sua rápida eliminação e ao desenvolvimento de tolerância aguda (GUIGNARD et al., 2000), o que gera a necessidade de regimes analgésicos perioperatórios que sejam eficazes, seguros, com efeitos colaterais reduzidos e de fácil manuseio para os profissionais atuantes nos centros cirúrgicos (WHITE, 2005).

Por essa razão, anesthesiologistas e cirurgiões optam cada vez mais por técnicas analgésicas “balanceadas” ou multimodais de controle da dor perioperatória, as quais se baseiam no uso de doses menores de opióides em associação com analgésicos não-opioides, entre eles, anestésicos, cetamina, acetoaminofeno e anti-inflamatórios não esteroidais como adjuvantes, a fim de minimizar os efeitos indesejados das metodologias tradicionais (ERIKSSON; TENHUNEN; KORTTILA, 1996; MICHALOLIAKOU; CHUNG; SHARMA, 1996; PAVLIN et al., 2003).

Dos analgésicos não-opioides, o acetoaminofeno é o mais seguro e o de melhor custo efetivo quando administrado em doses analgésicas (WHITE, 2005), além de ser um dos

antipiréticos mais utilizados em adultos e crianças (JONES, 2011). Contudo, esse fármaco é pouco solúvel em água e instável em solução, o que dificulta seu uso em preparações intravenosas. A partir disto, foi desenvolvido um pró-fármaco do acetaminofeno, o propacetamol, o qual é disponibilizado na forma de um pó a ser dissolvido em solução salina ou de glucose imediatamente antes da infusão (MOLLER et al., 2005). Estudos observaram que o propacetamol reduziu em média 2,05°C a temperatura corpórea máxima em pacientes pediátricos com febre devido à infecção (DUHAMEL et al., 2007) e em aproximadamente de 22 a 46% o consumo de morfina no controle da dor pós-operatória em pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas maiores (DELBOS; BOCCARD, 1995; HERNANDEZ-PALAZÓN et al., 2001), o que tem contribuído para seu uso rotineiro como adjuvante a analgésicos opioides na Europa (MOLLER et al., 2005).

1.3.1 Mecanismos de ação do paracetamol e do propacetamol

Por se tratar de um pró-fármaco, o propacetamol é desprovido de atividade biológica, já que necessita de uma transformação metabólica a fim de se transformar no seu metabólito ativo, o paracetamol, que é o composto capaz de gerar uma resposta farmacológica.

O paracetamol é um inibidor da biossíntese de prostaglandina. Lucas e colaboradores propuseram que ao contrário dos demais AINEs, o paracetamol não interage com o sítio ativo da enzima, mas age na subunidade peroxidase alterando o estado de oxidação da enzima da forma ativa Fe(IV) para a forma inativa Fe(III), provavelmente através da doação de elétrons (Figura 11). Dessa forma não haverá síntese de PGH₂ a qual é substrato para a biossíntese da prostaglandina envolvida na febre e na dor, a PGE₂ (Esquema 13). Em ambientes ricos em peróxidos, como numa inflamação, por exemplo, não temos inibição da biossíntese de PGE₂, o que vai de acordo com a atividade do paracetamol, o qual apresenta atividade antipirética e analgésica, porém desprovido de atividade anti-inflamatória (LUCAS et al., 2005).

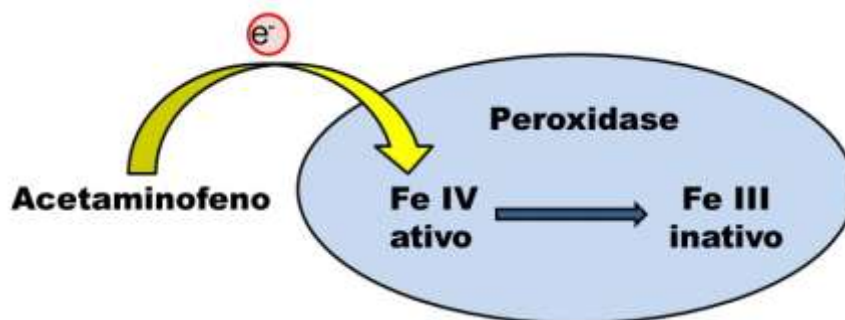
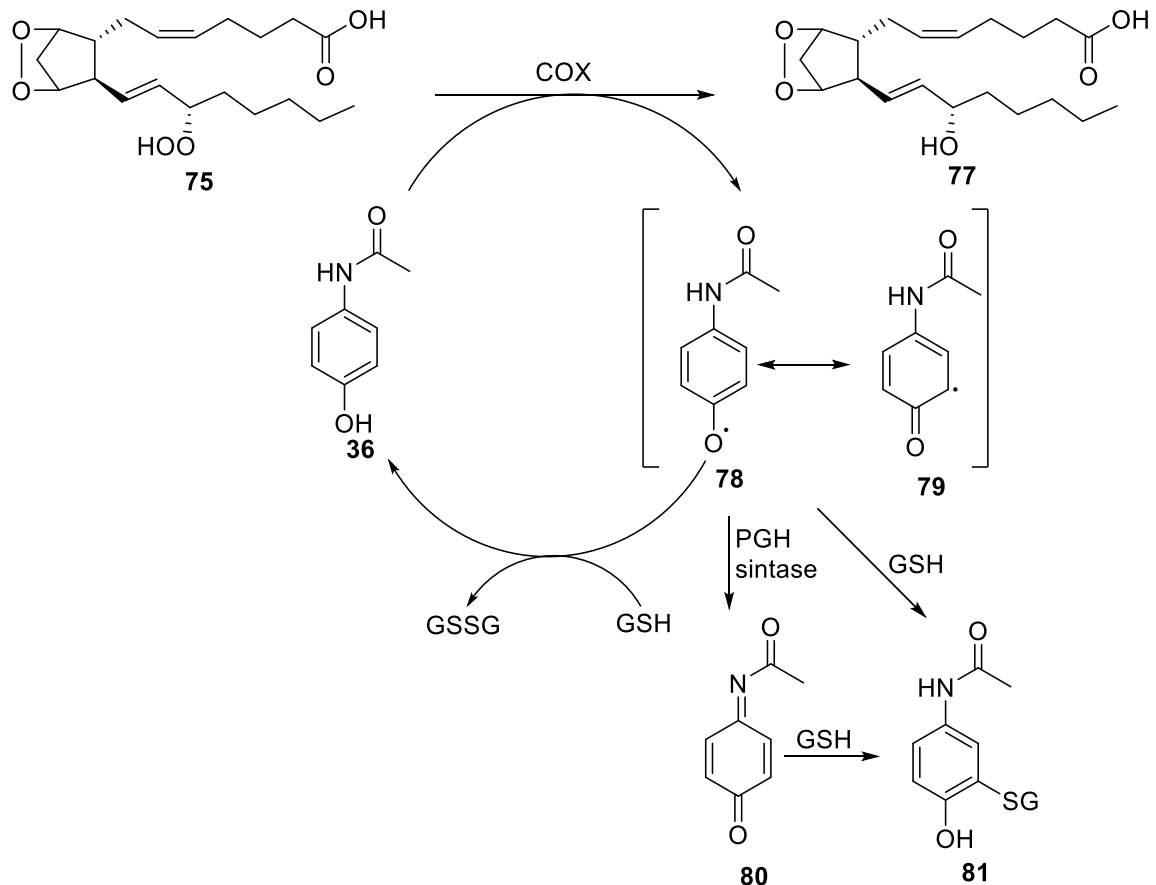


Figura 12. Inibição da peroxidase pelo acetaminofeno



(Adaptado de SILVERMAN (2004), p.443)

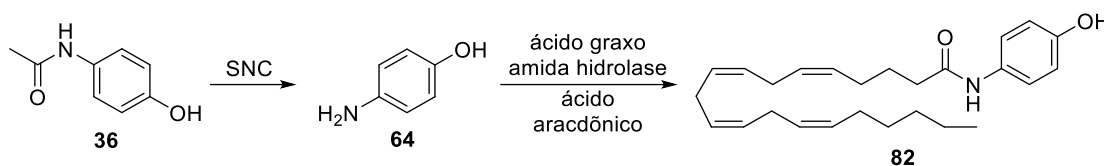
Esquema 13

Quando há um estímulo inflamatório, como o lipolissacarídeo (LPS), temos a produção de diferentes citocinas, dentre elas a IL-1 e o TNF α , os quais são mediadores químicos responsáveis pela indução de proteínas de adesão na superfície do endotélio, as quais promovem a migração celular de linfócitos que vão fazer parte do arsenal do organismo para combater a inflamação. As citocinas também irão atuar na área pré-óptica do hipotálamo anterior aumentando a biossíntese de PGE₂, que via AMPc, estimula os neurônios sensíveis ao calor e inibe os neurônios sensíveis ao frio, gerando aumento da produção de calor e diminuição da perda de calor, o que resulta no aumento da temperatura corpórea, que chamamos febre (BOULANT, 2000, 2006; LAZARUS et al., 2007; NAKAMURA et al., 2005; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

Por outro lado, também frente ao mesmo estímulo inflamatório, temos a liberação de outros mediadores como IL-1, IL-8, TNF α , BK e Substância P, os quais estimulam a biossíntese local de PGE₂, que via receptores EP₃ diminuem o limiar do potencial de ação dos receptores

nociceptivos, que são as terminações nervosas livres das fibras A δ e C, responsáveis pela condução dos estímulos de dor para o SNC (NATURA et al., 2013)

Em doses analgésicas, o paracetamol é desacetilado pela enzima ácido graxo amida hidrolase presente em altos níveis no cérebro, gerando um metabólito **82** por meio da conjugação entre *p*-aminofenol e ácido araquidônico (Esquema 14), o qual é o responsável pela ação analgésica por ativar indiretamente receptores canabinóides CB₁ e diretamente canais de cátions TRPV1 presentes na dor (BERTOLINI et al., 2006).



Esquema 14

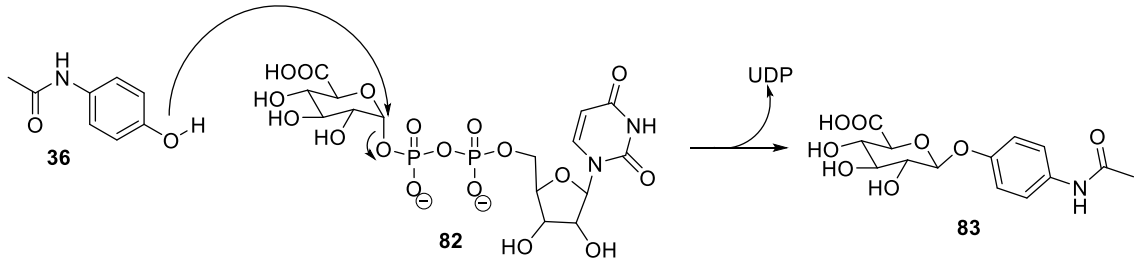
1.3.2 Metabolismo e toxicidade do paracetamol e do propacetamol

O propacetamol é completamente hidrolisado a paracetamol pelas esterases plasmáticas dentro de sete minutos depois da aplicação intravenosa. Medidas da concentração de acetaminofeno no plasma e no fluido cérebro-espinal (FCE) demonstraram que o efeito farmacológico máximo antipirético e analgésico ocorre de uma a duas horas depois do pico da concentração no plasma, porém, no período de quatro a doze horas depois da administração, a sua concentração no FCE é superior à plasmática, o que proporciona a perpetuação do efeito neste período. Tais evidências são compatíveis com a ação central do fármaco (BANNWARTH et al., 1992).

Após a promoção do efeito farmacológico, os fármacos são biotransformados com a finalidade de gerar metabólitos solúveis em água, a fim de serem mais facilmente eliminados pela via urinária. O acetaminofeno é metabolizado via conjugação (reações de fase II do metabolismo) com: ácido glicurônico (60%), ácido sulfúrico (35%) e cisteína (3%) (JAMES, 2003; STEVENTON; MITCHELL; WARING, 1996; SUN et al., 2008).

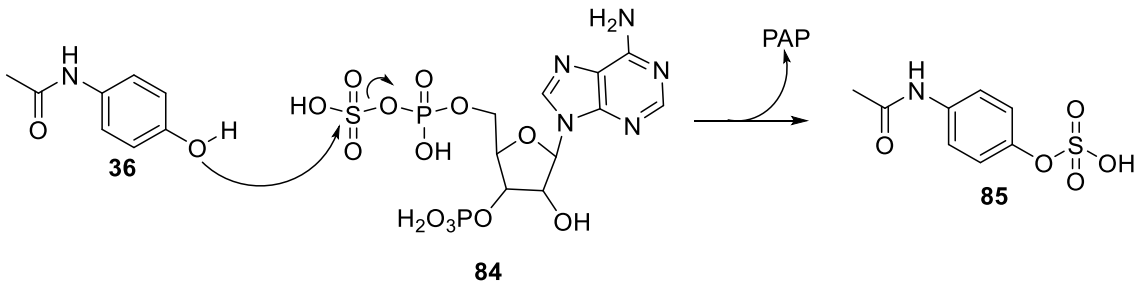
As principais vias de metabolização do paracetamol nas reações de fase II do metabolismo ocorrem no fígado, por meio da formação de metabólitos glicuronidados ou sulfatados, os quais são excretados pela via urinária por serem mais hidrossolúveis que o fármaco de origem. A glucuronidação é a transferência de um grupo glucuronosil do ácido uridina 5'-difosfoglicurônico (ácido UDP-glucurônico) para a molécula alvo, catalisada pela

enzima UDP-glucuronosil transferase (UGT). O metabólito glucuronidado **83** (Esquema 15) corresponde de 70 a 50% do fármaco administrado em doses terapêuticas (MCGILL; JAESCHKE, 2013; NAVARRO et al., 2011; XU et al., 2012).



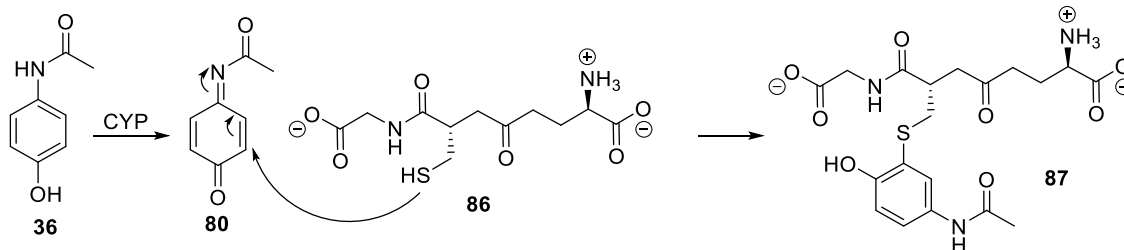
Esquema 15

A sulfatação é responsável pela biotransformação de cerca de 25 a 30% da dose de acetaminofeno administrado. Esta reação catalisada pela enzima sulfotransferase (SULT) consiste na transferência de um grupo sulfato do 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) para o fármaco aceptor gerando o metabólito **85** (Esquema 16). O PAPS é biossintetizado a partir de sulfatos oriundos da dieta (HARDWICK et al., 2013; LI et al., 2008; MCGILL; JAESCHKE, 2013).



Esquema 16

Por outro lado, de 5 a 15% de paracetamol de uma dose terapêutica sofre metabolização por enzimas do complexo citocromo P450 (POTTER et al., 1973; TESTA; KRÄMER, 2007) originando o metabólito reativo *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina (NAPQI) **80** (DAHLIN et al., 1984), o qual se liga ao grupo tiol do resíduo de cisteína do tripeptídeo glutationa **86** (GSH) (Esquema 17). O metabólito conjugado com glutationa **87** (APAP-GSH) é inicialmente excretado pela bile, posteriormente, ele sofre degradação em outros órgãos, como no rim (FISCHER; GREEN; HARMAN, 1985; NEWTON et al., 1986), originando produtos de degradação que são eliminados na urina (WONG et al., 1981).



Esquema 17

A formação do metabólito NAPQI é catalisada por enzimas do complexo citocromo P450 (CYP), as quais são classificadas como oxigenases de função mista. Essa família de enzimas recebeu esse nome após experimentos envolvendo isótopos de oxigênio marcados (¹⁸O₂) na hidroxilação de acetanilida pela fração microsossomal do fígado contendo proteínas com grupo heme, os quais após serem reduzidos e expostos ao monóxido de carbono apresentavam absorção forte em 450 nm no espectro visível. As enzimas P450, a exemplo das hemoproteínas, consistem de uma apoproteína, a qual é variável para cada tipo de isozima e, portanto, determinante para a especificidade ao substrato e produto, ligada a um grupo prostético do tipo heme, chamado de ferro protoporfirina IX (Figura 12), o qual é comum a todas as enzimas do CYP. O grupo heme possui um cátion de ferro central coordenado a quatro átomos de nitrogênio pirrólicos e ligado em posição axial a dois ligantes não porfirínicos, um grupo tiolato de um resíduo de cisteína e outro ligante que pode ser um grupo hidroxila de um aminoácido adjacente ou uma molécula de água. Durante a atividade catalítica, neste local se ligará o oxigênio molecular (O₂), que será reduzido e clivado, liberando dois átomos de oxigênio, sendo um em uma molécula de água e o outro é transferido para o substrato. Na célula, o citocromo se encontra associado à outra enzima, a NADPH-citocromo P450 redutase, uma flavoenzima que contém uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e uma de flavina mononucleotídeo (FMN) (SILVERMAN, 2004; TESTA; KRÄMER, 2007).

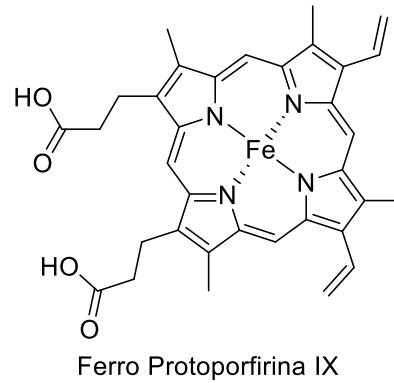
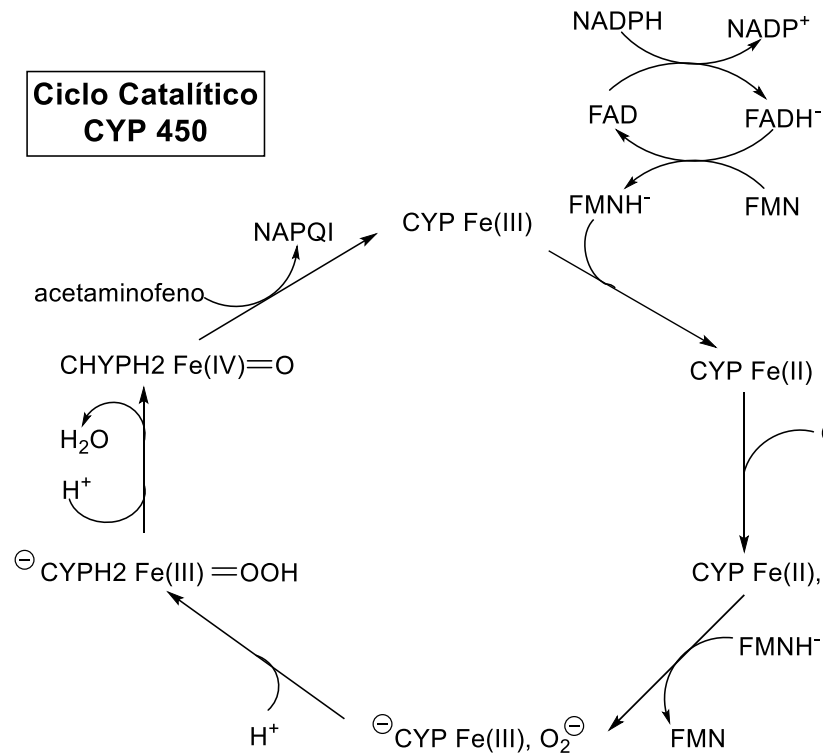
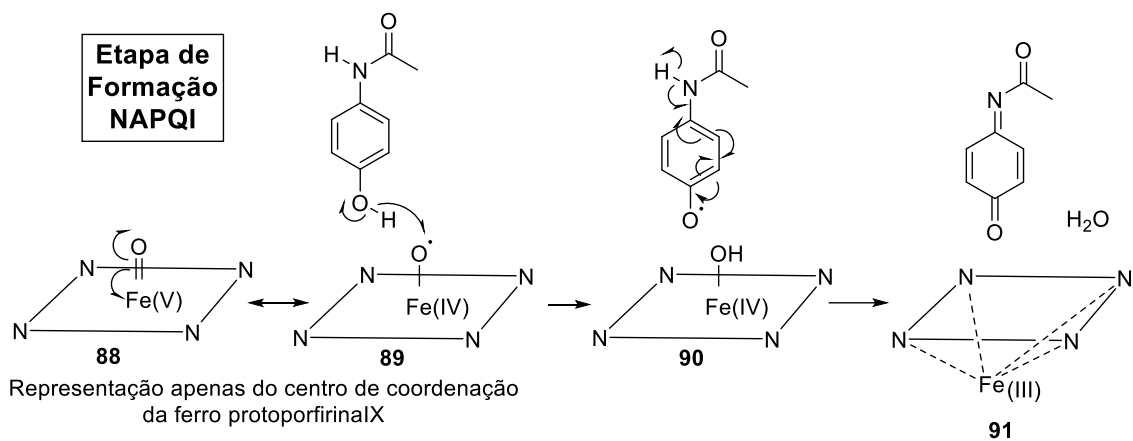


Figura 13. Estrutura da Ferro Protoporfirina IX

A principal isozima envolvida na oxidação do paracetamol é a CYP2E1 (MCGILL; JAESCHKE, 2013). O CYP P450 catalisa a oxidação de amidofenóis a correspondente quinona imina. O mecanismo da formação de NAPQI é do tipo dois elétrons. Inicialmente, há abstração de um átomo de hidrogênio do grupo hidroxila originando o composto **90**, de acordo com cálculos quânticos, acompanhado da redução do ferro da porfirina do estado V (composto **88**) para o IV (composto **89**). Posteriormente, há a transferência de mais um elétron e um próton, o que leva à redução do ferro de IV para III (composto **91**) (Esquemas 18 e 19) (BUSSY; BOUJTITA, 2014; GUENGERICH, 2001; HRYCAY; BANDIERA, 2012; SILVERMAN, 2004; TESTA; KRÄMER, 2007).



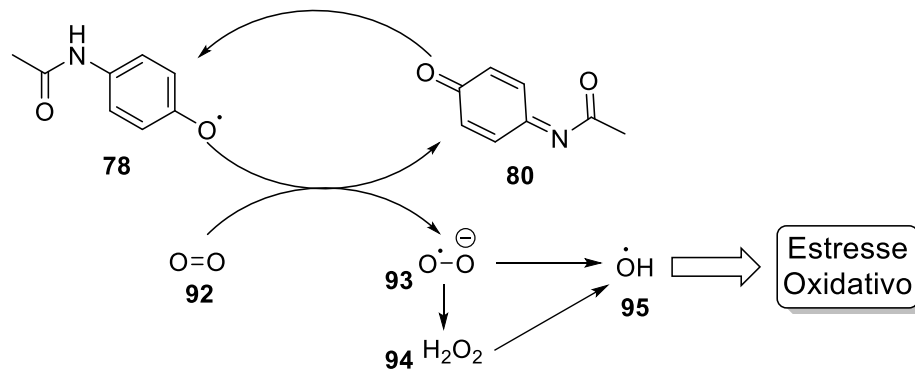
Esquema 18



Esquema 19

A glutatiação é uma reação de fase II, logo ela só ocorre após a oxidação do paracetamol a NAPQI, o qual é um eletrófilo mole susceptível ao ataque nucleofílico de grupamentos do tipo sulfidril. A conjugação com glutatona é espontânea e catalisada enzimaticamente pela glutatona-S-transferase (GST) (COLES et al., 1988), como um mecanismo de desintoxicação do organismo (ALLAMEH; ALIKHANI, 2002).

Em altas doses de paracetamol há a formação de um excesso de NAPQI, o qual depleta as reservas de glutathiona hepática. Após a depleção de glutathiona, aproximadamente 70% da GSH do fígado (MCGILL; JAESCHKE, 2013; MITCHELL et al., 1973), o metabólito altamente reativo se liga covalentemente a proteínas, principalmente pelos resíduos de cisteína (STREETER et al., 1984) e lisina (LU et al., 2011) causando hepatotoxicidade. Estudos mostram que o metabólito tóxico se liga preferencialmente a proteínas mitocondriais hepáticas (TIRMENSTEIN; NELSON, 1989) como: glutathiona peroxidase, proteína Housekeeping, aldeído desidrogenase, subunidade alfa da ATP sintase, homólogo da 2,4-dienoil-CoA redutase e glutathiona S-transferase (QIU; BENET; BURLINGAME, 2001). Os adutos formados causam a diminuição da respiração mitocondrial (MEYERS et al., 1988) e o estresse oxidativo (Esquema 20, adaptado pág 687 de WERMUTH (2008)) (JAESCHKE, 1990).



(Adaptado de WERMUTH (2008), p. 687)

Esquema 20

As mitocôndrias são alvos críticos na toxicidade de fármacos, os quais geram metabólitos reativos capazes de promover estresse oxidativo mitocondrial e formação de peroxinitritos, que por sua vez promovem alterações estruturais de proteínas e DNA mitocondriais e a abertura de poros de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (MPT). A MPT é um fenômeno caracterizado pelo inchamento da organela, pela permeabilidade de solutos de massa até 1500 Da e pela ruptura da membrana externa; e estimulado por alta concentração de íons cálcio e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KON et al., 2004). A formação dos poros MPT resulta em colapso do potencial da membrana mitocondrial e interrupção da síntese de adenosina trifosfato (ATP), o que leva à redução da respiração mitocondrial. Além disso, há a liberação de proteínas do espaço intermembranas como o fator indutor de apoptose (AIF) e endonuclease G (EndoG), as quais se deslocam para o interior do núcleo celular e promovem a fragmentação do DNA, o que leva à morte celular

por necrose (Figura 13). Por outro lado, ainda há a liberação de citocromo c e outros fatores pró-apoptóticos, os quais promovem a ativação de proteínas do tipo caspase, as quais induzem a morte celular por apoptose (JAESCHKE; MCGILL; RAMACHANDRAN, 2012).

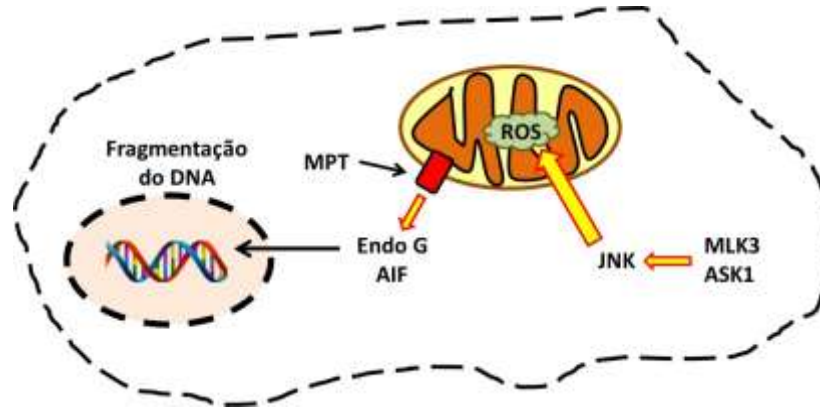


Figura 14. Mecanismo da necrose do hepatócito

Durante o estresse oxidativo mitocondrial induzido pelo acetaminofeno há a produção de superóxidos, espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente oriundos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, e também de peroxinitrito, espécies reativas de nitrogênio (RNS), formados a partir da reação entre superóxidos e óxido nítrico (REID et al., 2005). Os superóxidos podem ser convertidos a peróxido de hidrogênio pela enzima manganês superóxido dismutase (SOD2) (AGARWAL et al., 2011). Dessa forma, tanto o peróxido de hidrogênio quanto o estresse oxidativo mitocondrial levam à ativação das seguintes proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPLK): quinase de linhagem mista 3 (MLK3) e quinase reguladora do sinal de apoptose 1 (ASK1), as quais ativam a proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK). A JNK após ser fosforilada é translocada para o interior da mitocôndria, onde amplifica o estresse oxidativo, o qual por sua vez leva à abertura dos poros MPT desencadeando em morte celular, como relatado anteriormente (JAESCHKE; MCGILL; RAMACHANDRAN, 2012).

Em casos de overdose de paracetamol, o uso de *N*-acetilcisteína (NAC) como fármaco de primeira escolha é comum, visto que ela é um precursor da glutathiona. Dessa forma a NAC aumenta os níveis de glutathiona e diminui a toxicidade, agindo como um antioxidante para antagonizar o estresse oxidativo induzido pelo metabólito tóxico do acetaminofeno. Estudos recentes mostram que a leflunomida (LEF) também poderia ser utilizada em casos de intoxicação por acetaminofeno. A LEF inibe a fosforilação da JNK, previne a formação de peroxinitritos e evita a abertura de poros MPT nos hepatócitos, impedindo a necrose (TAN; NEW; CHAN, 2008).

Estudos metabólicos na urina de camundongos tratados com dieta contendo acetaminofeno (APAP) revelaram a presença de metabólitos do tipo APAP-sulfato-APAP e APAP-S-S-APAP em adição aos tradicionais metabólitos de fase I e II (SUN et al., 2008). Recentemente, alguns trabalhos mostraram que a peroxidase horseradish, enzima que catalisa a oxidação, via mecanismo um elétron, de substratos orgânicos dependente de peróxido de hidrogênio (HRYCAY; BANDIERA, 2012), também catalisa a formação de polímeros de paracetamol e conjugados com glutatona em solução de tampão fosfato de potássio. Tsikas e colaboradores identificaram uma série de metabólitos incluindo di, tri e tetra-APAP, mono e di-nitro-APAP e éster nítrico de di-APAP, por métodos cromatográficos associados à espectrometria de massas (Figura 14). Os autores destacam que a formação destes metabólitos possivelmente ocorre por um mecanismo radicalar envolvendo radicais de nitrogênio, $\bullet\text{NO}$ e $\bullet\text{NO}_2$, visto que nitritos podem induzir oxidações em soluções tamponadas de acetaminofeno/nitrito imersas em nitrogênio líquido (TRETTIN; JORDAN; TSIKAS, 2014).

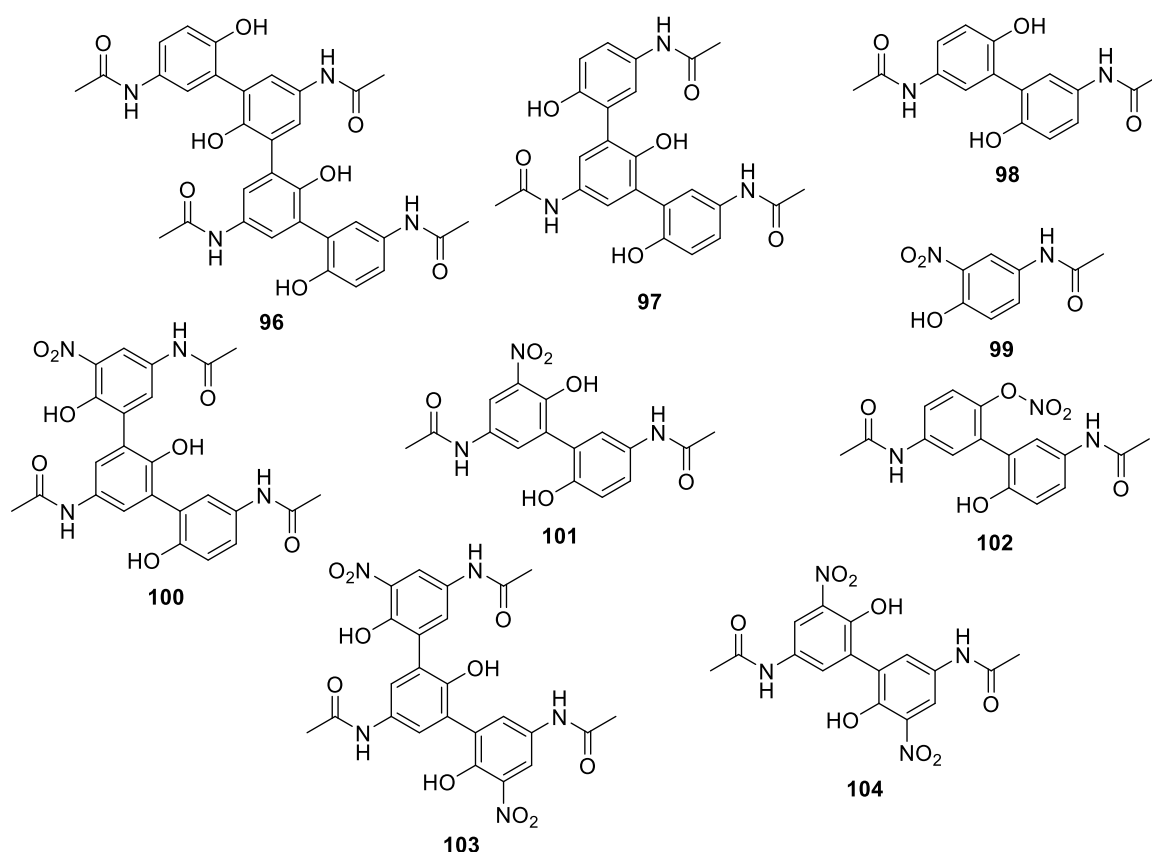


Figura 25. Metabólitos incomuns do acetaminofeno

Além disso, em estudos pilotos utilizando dois modelos animais, sendo um deles camundongos que receberam paracetamol administrado intraperitonealmente e o outro, seres

humanos saudáveis que ingeriram comprimidos de 500 mg do fármaco, Tsikas e colaboradores (2011) identificaram por meio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, na urina e no sangue, os metabólitos 3-nitro-paracetamol **99** e di-paracetamol **98**, os quais tiveram sua razão molar em relação ao paracetamol determinadas. Esse modelo experimental, baseado em trabalhos prévios utilizando tirosina e 3-nitro-tirosina como biomarcadores, tem o objetivo de medir o estresse oxidativo utilizando os metabólitos como biomarcadores, uma vez que acetaminofeno reage com espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Tal modelo tem aplicação em estudos clínicos para determinar reações adversas de fármacos em doenças arteriais coronarianas, as quais podem fazer uso de doses maiores que 500 mg de paracetamol, o que pode ser inadequado em função dos resultados obtidos nos estudos de metabolismo (TRETTIN et al., 2014).

Portanto, embora o paracetamol seja uma molécula estruturalmente simples e um importante fármaco antipirético e analgésico de amplo uso na clínica, os trabalhos publicados na literatura revelam que a química e a bioquímica envolvida em seus mecanismos é muito mais complexa do que aparenta ser.

Objetivos

2. Objetivos

Em virtude da pequena quantidade de trabalhos na literatura sobre o propacetamol envolvendo modelos animais, bem como o interesse de grupos de farmacologia em avaliar sua ação nas diferentes cascatas de reações envolvidas na resposta febril frente a diferentes estímulos inflamatórios, e da difícil aquisição do pró-fármaco comercializado apenas na forma de amostra, este trabalho teve como objetivo: a síntese do pró-fármaco propacetamol a partir de rotas sintéticas disponíveis na literatura, com adaptações necessárias para melhorar o rendimento, a fim de que se possa gerar a molécula alvo em quantidade necessária para a avaliação da atividade antipirética do composto frente ao estímulo inflamatório lipopolissacarídeo e para a formação de metabólitos por meio de reações microssomais, com posterior identificação dos mesmos através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Considerações Finais e Conclusão

4. Considerações Finais e Conclusão

A partir dos objetivos propostos e das análises dos resultados obtidos foi possível tecer algumas conclusões e as considerações finais sobre o trabalho desenvolvido.

O trabalho de pesquisa desenvolvido durante o curso de Mestrado foi focado no primeiro objetivo, a síntese do pró-fármaco propacetamol, devido à importância de se estabelecer o protocolo mais adequado para a obtenção do composto em quantidade e pureza necessárias aos demais estudos: avaliação antipirética e metabolismo *in vitro*, complementares à caracterização da molécula sintetizada.

Dessa forma, as estratégias utilizadas nos protocolos experimentais, os quais visam à síntese do propacetamol, apresentaram resultados satisfatórios, pois foi possível obter o cloridrato de propacetamol em quantidade e grau de pureza desejáveis para os estudos farmacológicos. Embora algumas dificuldades tenham sido enfrentadas no início do trabalho, as rotas investigadas são promissoras, uma vez que a molécula de interesse foi obtida em poucas etapas reacionais e com purificações que dispensam o uso de sílica e grandes quantidades de solventes, fatores importantes para a produção em escala industrial.

O maior destaque da parte sintética deve-se ao uso de micro-ondas na etapa chave da rota proposta, já que a partir da condição reacional desenvolvida foi possível obter a molécula alvo com rendimento superior aos descritos na literatura. O emprego desta tecnologia se mostrou vantajoso comparado aos métodos clássicos, pois, além de otimizar os parâmetros reacionais, tempo e temperatura, possibilita uma economia de reagentes e solvente, o que pode ser comprovado pelas condições testadas, já que o rendimento do produto variou de moderado a excelente.

A partir do estabelecimento das condições reacionais da síntese do cloridrato de propacetamol, foi realizada a avaliação da atividade antipirética do pró-fármaco, a qual permitiu confirmar a eficácia da molécula sintetizada em laboratório, visto que a dose de 600 mg/Kg inibiu a febre estimulada por LPS. Os resultados também constatam que a dosagem efetiva de propacetamol equivale a 300 mg/Kg de paracetamol, a qual está de acordo com os trabalhos descritos na literatura.

Além disso, na etapa final deste trabalho, realizou-se um estudo sobre a formação dos metabólitos do propacetamol utilizando microsomas de ratos, visando à aplicação da espectroscopia de massas na identificação dos referidos metabólitos. O emprego desta técnica permitiu identificar que o principal metabólito do propacetamol é o próprio princípio ativo, o

que confere êxito ao pró-fármaco sintetizado do ponto de vista da liberação do paracetamol *in vivo*.

Portanto, os resultados dos estudos de metabolismo devem ser considerados como prévios, uma vez que outros protocolos ainda devem ser investigados para a identificação da formação do metabólito tóxico do paracetamol, bem como a cinética de formação do mesmo. Do ponto de vista toxicológico, a formação de paracetamol *in vitro* a partir de propacetamol abre a perspectiva da avaliação da velocidade de formação do NAPQI *in vivo* frente à hepatotoxicidade, através de cortes histológicos de fígados de animais tratados com o pró-fármaco.

Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

- AGARWAL, R. et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice occurs with inhibition of activity and nitration of mitochondrial manganese superoxide dismutase. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 337, n. 1, p. 110–116, 2011.
- ALBERT, A. Chemical aspects of selective toxicity. **Nature**, v. 182, n. 4633, p. 421–422, 1958.
- ALLAMEH, A.; ALIKHANI, N. Acetaminophen–glutathione conjugate formation in a coupled cytochrome P-450-glutathione S-transferase assay system mediated by subcellular preparations from adult and weanling rat tissues. **Toxicology in Vitro**, v. 16, n. 6, p. 637–641, dez. 2002.
- BANNWARTH, B. et al. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of paracetamol after a single intravenous dose of propacetamol. **British journal of clinical pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 79–81, 1992.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal As Bases Moleculares da Ação de Fármacos**. 2°. ed. São Paulo: Artmed, 2008.
- BAUMANN, L. K. et al. Iron porphyrin catalyzed N-H insertion reactions with ethyl diazoacetate. **Organometallics**, v. 26, n. 16, p. 3995–4002, 2007.
- BEAUMONT, K. et al. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. **Current drug metabolism**, v. 4, n. 6, p. 461–485, 2003.
- BERTOLINI, A. et al. Paracetamol: New vistas of an old drug. **CNS Drug Reviews**, v. 12, n. 3-4, p. 250–275, 2006.
- BHALLA, D. V.; LALLA, J. K. Chewable Tablets of Acetaminophen-Prodrug Approach. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 1, p. 115–135, jan. 1990.
- BODOR, N. Designing safer ophthalmic drugs by soft drug approaches. **Journal of ocular pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 3–15, 1994.
- BODOR, N.; BUCHWALD, P. Soft drug design: General principles and recent applications. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, n. 1, p. 58–101, 2000.
- BOULANT, J. A. Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in Thermoregulation and Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. Supplement 5, p. S157–S161, 1 out. 2000.
- BOULANT, J. A. Neuronal basis of Hammel’s model for set-point thermoregulation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 100, n. 4, p. 1347–1354, 2006.
- BROWNE, T. R.; KUGLER, A. R.; ELDON, M. A. Pharmacology and pharmacokinetics of fosphenytoin. **Neurology**, v. 46, n. Issue 6, Supplement 1, p. S3–S7, 1 jun. 1996.

BUNDGAARD, H. Allopurinol prodrugs. I. Synthesis, stability and physicochemical properties of various N1-acyl allopurinol derivatives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 23, n. 2, p. 223–237, 1985.

BUNDGAARD, H. et al. Allopurinol prodrugs. IV. Improved rectal and parenteral delivery of allopurinol using the prodrug approach as evaluated in rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 27, n. 1, p. 71–80, 1985.

BUNDGAARD, H. et al. Allopurinol prodrugs. V. Water-soluble N-substituted (aminomethyl)benzoyloxymethyl allopurinol derivatives for parenteral or rectal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 64, n. 1, p. 75–87, out. 1990.

BUNDGAARD, H.; FALCH, E. Allopurinol prodrugs. III. Water-soluble N-acyloxymethyl allopurinol derivatives for rectal or parenteral use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 25, n. 1, p. 27–39, jun. 1985.

BUNDGAARD, H.; FALCH, E.; JENSEN, E. A novel solution-stable, water-soluble prodrug type for drugs containing a hydroxyl or an NH-acidic group. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2503–2507, dez. 1989.

BUNDGAARD, H.; JENSEN, E.; FALCH, E. Water-soluble, solution-stable, and biolabile N-substituted (aminomethyl)benzoate ester prodrugs of acyclovir. **Pharmaceutical research**, v. 8, n. 9, p. 1087–1093, 1991.

BUNDGAARD, H.; LARSEN, C.; ARNOLD, E. Prodrugs as drug delivery systems XXVII. Chemical stability and bioavailability of a water-soluble prodrug of metronidazole for parenteral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 18, n. 1-2, p. 79–87, jan. 1984.

BUNDGAARD, H.; LARSEN, C.; THORBEEK, P. Prodrugs as drug delivery systems XXVI. Preparation and enzymatic hydrolysis of various water-soluble amino acid esters of metronidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 18, n. 1-2, p. 67–77, jan. 1984.

BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Analgesic-antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. In: BRUNTON, L. L. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. New York: 2006, 2006. p. 517–550.

BUSSY, U.; BOUJTITA, M. Advances in the Electrochemical Simulation of Oxidation Reactions Mediated by Cytochrome P450. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 10, p. 1652–1668, 20 out. 2014.

CATTABRIGA, I. et al. Intravenous paracetamol as adjunctive treatment for postoperative pain after cardiac surgery: a double blind randomized controlled trial. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 32, n. 3, p. 527–531, 2007.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 75–84, fev. 1999.

CHUNG, M.-C. et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 155–180, jun. 2005.

COGNACQ, J. C. p-Acetamidophenol derivative. v. *Hexachimie*, p. FR2348701, 1977.

COLES, B. et al. The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: a stopped-flow kinetic study. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 264, n. 1, p. 253–260, 1988.

CORREIA, C. R. D.; COSTA, P. R. R.; FERREIRA, V. F. Vinte e cinco anos de reações, estratégias e metodologias em química orgânica. **Química Nova**, v. 25, p. 74–81, 2002.

DAHLIN, D. C. et al. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 5, p. 1327–1331, 1984.

DATHU REDDY, Y.; VENKATA RAMANA REDDY, C.; DUBEY, P. K. Green approach for drug design and discovery of paracetamol analogues as potential analgesic and antipyretic agents. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 7, n. 1, p. 24–31, 2014.

DELACROIX, P.; KENESI, C.; STOPPA, R. Evaluation of the analgesic potency of propacetamol versus placebo in postoperative pain. **Semaine Des Hopitaux**, v. 61, n. 39, p. 2739–2742, 1985.

DELBOS, A.; BOCCARD, E. The morphine-sparing effect of propacetamol in orthopedic postoperative pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 10, n. 4, p. 279–286, 1995.

DEVARAJAN-KETHA, H.; SLOAN, K. B. N,N'-Dialkylaminoalkylcarbonyl (DAAC) prodrugs and aminoalkylcarbonyl (AAC) prodrugs of 4-hydroxyacetanilide and naltrexone with improved skin permeation properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 13, p. 4078–4082, jul. 2011.

DUHAMEL, J. F. et al. Antipyretic efficacy and safety of a single intravenous administration of 15 mg/kg paracetamol versus 30 mg/kg propacetamol in children with acute fever due to infection. **International journal of clinical pharmacology and therapeutics**, v. 45, n. 4, p. 221–229, 2007.

EHRNEBO, M.; NILSSON, S. O.; BORÉUS, L. O. Pharmacokinetics of ampicillin and its prodrugs bacampicillin and pivampicillin in man. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 7, n. 5, p. 429–451, 1979.

ERIKSSON, H.; TENHUNEN, A.; KORTTILA, K. Balanced analgesia improves recovery and outcome after outpatient tubal ligation. **Acta anaesthesiologica Scandinavica**, v. 40, n. 2, p. 151–155, 1996.

ERION, M. D. et al. Design, synthesis, and characterization of a series of cytochrome P 450 3A-activated prodrugs (HepDirect Prodrugs) useful for targeting phosph(on)ate-based drugs to the liver. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 16, p. 5154–5163, abr. 2004.

ETTMAYER, P. et al. Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 2393–2404, 2004.

FABRICIO, A. S. C. et al. The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 288, n. 3, p. R671–R677, 2005.

FAN, X.; SONG, Y. L.; LONG, Y. Q. An efficient and practical synthesis of the HIV protease inhibitor atazanavir via a highly diastereoselective reduction approach. **Organic Process Research and Development**, v. 12, p. 69–75, 2008.

FASINU, P. et al. Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 32, n. 4, p. 185–209, maio 2011.

FISCHER, L. J.; GREEN, M. D.; HARMAN, A. W. Studies on the fate of the glutathione and cysteine conjugates of acetaminophen in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 13, n. 2, p. 121–126, 1985.

FRAENKEL, G. et al. Arylallylic lithium compounds, internally versus externally coordinated: Comparison of their structures and dynamic behavior via X-ray crystallography and NMR. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 12, p. 4140–4145, 2008.

FU, H. et al. Method fo synthesis of mono-p-(acetylamino)phenol succinate. v. Sichuan Ag, p. CN102731337, 2012.

GUENGERICH, F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical research in toxicology**, v. 14, n. 6, p. 611–650, 2001.

GUIGNARD, B. et al. Acute Opioid Tolerance. **Anesthesiology**, v. 93, n. 2, p. 409–417, 2000.

GUO, A. et al. Interactions of a nonpeptidic drug, valacyclovir, with the human intestinal peptide transporter (hPEPT1) expressed in a mammalian cell line. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 289, n. 1, p. 448–454, 1999.

HARDWICK, R. N. et al. Altered UDP-Glucuronosyltransferase and Sulfotransferase Expression and Function during Progressive Stages of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41, n. 3, p. 554–561, 1 mar. 2013.

HARPER, N. J. Drug latention. **Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry**, v. 1, n. 6, p. 467–500, 1959.

HEMENWAY, J. N. et al. Preparation, characterization and in vivo conversion of new water-soluble sulfenamide prodrugs of carbamazepine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 23, p. 6629–6632, dez. 2007.

HERNANDEZ-PALAZÓN, J. et al. Intravenous Administration of Propacetamol Reduces Morphine Consumption After Spinal Fusion Surgery. **Anesthesia and Analgesia**, v. 92, n. 6, p. 1473–1476, jun. 2001.

HERSCH, M.; RAVEH, D.; IZBICKI, G. Effect of intravenous propacetamol on blood pressure in febrile critically ill patients. **Pharmacotherapy**, v. 28, n. 10, p. 1205–1210, 2008.

HRYCAY, E. G.; BANDIERA, S. M. The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 522, n. 2, p. 71–89, 2012.

HUSSAIN, A.; KULKARNI, P.; PERRIER, D. Prodrug approaches to enhancement of physicochemical properties of drugs IX: Acetaminophen prodrug. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 4, p. 545–546, abr. 1978.

JAESCHKE, H. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 255, n. 3, p. 935–941, 1990.

JAESCHKE, H.; MCGILL, M. R.; RAMACHANDRAN, A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. **Drug Metabolism Reviews**, v. 44, n. 1, p. 88–106, 2012.

JAHR, J. S.; LEE, V. K. Intravenous acetaminophen. **Anesthesiology Clinics**, v. 28, n. 4, p. 619–645, 2010.

JAMES, L. P. ACETAMINOPHEN-INDUCED HEPATOTOXICITY. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 12, p. 1499–1506, 1 dez. 2003.

JONES, V. M. Acetaminophen Injection: A Review of Clinical Information. **Journal of Pain and Palliative Care Pharmacotherapy**, v. 25, n. 4, p. 340–349, 2011.

KANG, J.-E. et al. Comparison of the efficacy and safety of different doses of propacetamol for postoperative pain control after breast surgery. **Pain Management Nursing**, v. 16, n. 3, p. 367–371, 2015.

KAPPE, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, p. 6250–6284, 2004.

KON, K. et al. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 40, n. 5, p. 1170–1179, 2004.

LAZARUS, M. et al. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1131–1133, set. 2007.

LEE, J.; KIM, K. H.; JEONG, S. Discovery of a novel class of 2-aminopyrimidines as CDK1 and CDK2 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 14, p. 4203–4205, 2011.

LI, Y. et al. Structure, Function and Polymorphism of Human Cytosolic Sulfotransferases. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 2, p. 99–105, 1 fev. 2008.

LIEDERER, B. M.; BORCHARDT, R. T. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, p. 1177–1195, jun. 2006.

LU, Z. et al. SIRT3-dependent deacetylation exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. **EMBO reports**, v. 12, n. 8, p. 840–846, 2011.

LUCAS, R. et al. Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclo-oxygenase. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 6, p. 635–637, 2005.

MA, L. et al. Rapid Screening of Glutathione-Trapped Reactive Metabolites by Linear Ion Trap Mass Spectrometry with Isotope Pattern-Dependent Scanning and Postacquisition Data Mining. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 7, p. 1477–1483, jul. 2008.

MAGALHAES MOREIRA, D. R. et al. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 467–478, 2014.

MANIKANDAN, R.; JEGANMOHAN, M. Ruthenium-catalyzed cyclization of anilides with substituted propiolates or acrylates: An efficient route to 2-quinolinones. **Organic Letters**, v. 16, n. 13, p. 3568–3571, 2014.

MARICHY, J. et al. The antipyretic efficacy of propacetamol in severely burned children. **Cahiers d'anesthesiologie**, v. 37, n. 7, p. 521–523, 1989.

MARQUES, L. M. M. et al. In vitro metabolism of the alkaloid pipartine by rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 95, p. 113–120, 2014.

MAURO, V. F. Clinical pharmacokinetics and practical applications of simvastatin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 24, n. 3, p. 195–202, mar. 1993.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 9, p. 2174–2187, 2013.

MEYERS, L. L. et al. Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 93, n. 3, p. 378–387, maio 1988.

MICHALOLIAKOU, C.; CHUNG, F.; SHARMA, S. Preoperative multimodal analgesia facilitates recovery after ambulatory laparoscopic cholecystectomy. **Anesthesia and analgesia**, v. 82, n. 1, p. 44–51, 1996.

MITCHELL, J. R. et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 211–217, 1973.

MIWA, M. et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5 fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. **European Journal of Cancer**, v. 34, n. 8, p. 1274–1281, 1998.

MOLLER, P. L. et al. Intravenous acetaminophen (paracetamol): Comparable analgesic efficacy, but better local safety than its prodrug, propacetamol, for postoperative pain after third molar surgery. **Anesthesia and Analgesia**, v. 101, n. 1, p. 90–96, 2005.

NAKAMURA, Y. et al. Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 3137–3146, 2005.

NATURA, G. et al. Neuronal prostaglandin E2 receptor subtype EP3 mediates antinociception during inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 33, p. 13648–13653, 13 ago. 2013.

NAVARRO, S. L. et al. UGT1A6 and UGT2B15 Polymorphisms and Acetaminophen Conjugation in Response to a Randomized, Controlled Diet of Select Fruits and Vegetables. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 9, p. 1650–1657, 1 set. 2011.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 17, n. 7, p. 522–524, jul. 1978.

NEWTON, J. F. et al. Metabolism and excretion of a glutathione conjugate of acetaminophen in the isolated perfused rat kidney. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 237, n. 2, p. 519–524, 1986.

NUTT, J. G.; WOODWARD, W. R. Levodopa pharmacokinetics and pharmacodynamics in fluctuating parkinsonian patients. **Neurology**, v. 36, n. 6, p. 739–739, 1 jun. 1986.

PAVLIN, D. J. et al. Preincisional treatment to prevent pain after ambulatory hernia surgery. **Anesthesia and analgesia**, v. 97, n. 6, p. 1627–1632, 2003.

PÉREZ, J. et al. Synthesis of new copper(I) complexes with tris(2-pyridyl) ligands. Applications to carbene and nitrene transfer reactions. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 1, n. 2, p. 375–382, 2009.

PERSSON, G.; PAHLM, O.; GNOSPELIUS, Y. Oral bambuterol versus terbutaline in patients with asthma. **Current Therapeutic Research**, v. 56, n. 5, p. 457–465, maio 1995.

POCHOPIN, N. L.; CHARMAN, W. N.; STELLA, V. J. Amino acid derivatives of dapsone as water-soluble prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 121, n. 2, p. 157–167, 1995.

POTTER, W. Z. et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. 3. Cytochrome P-450-mediated covalent binding in vitro. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 203–210, 1973.

PYATI, S.; GAN, T. J. Perioperative Pain Management. **CNS Drugs**, v. 21, n. 3, p. 185–211, 2007.

QIU, Y.; BENET, L. Z.; BURLINGAME, A. L. Identification of Hepatic Protein Targets of the Reactive Metabolites of the Non-hepatotoxic Regioisomer of Acetaminophen, 3'-Hydroxyacetanilide, in the Mouse in Vivo Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. In: **The Journal of biological chemistry**. [s.l.: s.n.]. v. 273p. 663–673.

RAUTIO, J. et al. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 3, p. 255–270, fev. 2008.

REID, A. B. et al. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 312, n. 2, p. 509–516, 2005.

REMY, C.; MARRET, E.; BONNET, F. Effects of acetaminophen on morphine side-effects and consumption after major surgery: Meta-analysis of randomized controlled trials. **British Journal of Anaesthesia**, v. 94, n. 4, p. 505–513, 2005.

REPTA, A. J.; HACK, J. Acetaminophen prodrug: 2-(p-acetaminophenoxy)tetrahydropyran. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 11, p. 1892–1894, nov. 1973.

ROTHENBERG, M. L. Irinotecan (CPT-11): recent developments and future directions--colorectal cancer and beyond. **The oncologist**, v. 6, n. 1, p. 66–80, 2001.

SCHMIDT, B. et al. Mizoroki-heck reactions with 4-phenoldiazonium salts. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 352, n. 14-15, p. 2463–2473, 2010.

SEKI, H.; KAWAGUCHI, T.; HIGUCHI, T. Specificity of esterases and structure of prodrug esters: Reactivity of various acylated acetaminophen compounds and acetylaminobenzoated compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 10, p. 855–860, out. 1988.

SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 71–105, out. 2006.

SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 2^o. ed. New York: Elsevier Academic Press, 2004.

STEVENTON, G. B.; MITCHELL, S. C.; WARING, R. H. Human metabolism of paracetamol (acetaminophen) at different dose levels. **Drug metabolism and drug interactions**, v. 13, n. 2, p. 111–117, 1996.

STREETER, A. J. et al. The covalent binding of acetaminophen to protein. Evidence for cysteine residues as major sites of arylation in vitro. **Chemico-biological interactions**, v. 48, n. 3, p. 349–366, 1984.

SUN, J. et al. Metabonomics evaluation of urine from rats given acute and chronic doses of acetaminophen using NMR and UPLC/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 328–340, ago. 2008.

SVENSSON, L.-Å; TUNEK, A. The design and bioactivation of presystemically stable prodrugs. **Drug Metabolism Reviews**, v. 19, n. 2, p. 165–194, jan. 1988.

TAGLIATI, C. A. Analgésicos e Anti-reumáticos. In: OGA, S. (Ed.). . **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: 2003, 2003. p. 381–395.

TAN, S. C.; NEW, L. S.; CHAN, E. C. Y. Prevention of acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity by leflunomide via inhibition of APAP biotransformation to N-acetyl-p-benzoquinone imine. **Toxicology Letters**, v. 180, n. 3, p. 174–181, 2008.

TAYLOR, E. C.; DAVIES, H. M. L.; HINKLE, J. S. Synthesis and reactions of some 1,2-disubstituted 1,2-diazetid-3-ones: an intramolecular aldol approach to bicyclic systems. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1530–1536, 1986.

TAYLOR, M. D. Improved passive oral drug delivery via prodrugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 19, n. 2, p. 131–148, maio 1996.

TESTA, B. Prodrug research: Futile or fertile? **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 11, p. 2097–2106, 2004.

TESTA, B.; KRÄMER, S. D. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. **Chemistry & biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 257–405, 2007.

TIAN, H. et al. Iron or boron-catalyzed C-H arylation of substituted phenols at room temperature. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 50, n. 64, p. 8875–8877, 2014.

TIRMENSTEIN, M. A.; NELSON, S. D. Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 17, p. 9814–9819, 1989.

TRETTIN, A. et al. LC-MS/MS and GC-MS/MS measurement of plasma and urine di-paracetamol and 3-nitro-paracetamol: Proof-of-concept studies on a novel human model of oxidative stress based on oral paracetamol administration. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 959, p. 71–81, 2014.

TRETTIN, A.; JORDAN, J.; TSIKAS, D. LC-MS/MS analysis of uncommon paracetamol metabolites derived through in vitro polymerization and nitration reactions in liquid nitrogen. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 966, p. 171–178, 2014.

TSIKAS, D.; ZOERNER, A. A.; JORDAN, J. Oxidized and nitrated oleic acid in biological systems: Analysis by GC-MS/MS and LC-MS/MS, and biological significance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 11, p. 694–705, nov. 2011.

VAN DER STEEN, F. H. et al. Synthesis of organozinc enolates of N,N-disubstituted glycine esters. Crystal structure of [Et(t-Bu)Me]₄. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 390, n. 2, p. c21–c26, 1990.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 38, p. 97–120, 1998.

VARIA, S. A. et al. Phenytoin prodrugs III: water-soluble prodrugs for oral and/or parenteral use. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 73, n. 8, p. 1068–1073, 1984.

VENTURINI, M. Rational development of capecitabine. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 3–9, fev. 2002.

WALSON, P. D. et al. Antipyretic efficacy and tolerability of a single intravenous dose of the acetaminophen prodrug propacetamol in children: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical Therapeutics**, v. 28, n. 5, p. 762–769, 2006a.

WALSON, P. D. et al. Antipyretic efficacy and tolerability of a single intravenous dose of the acetaminophen prodrug propacetamol in children: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical Therapeutics**, v. 28, n. 5, p. 762–769, maio 2006b.

WERMUTH, C. G. No Title. In: WERMUTH, C. G. (Ed.). . **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3. ed. Oxford: [s.n.]. p. 721–746.

WHITE, P. F. The role of non-opioid analgesic techniques in the management of pain after ambulatory surgery. **Anesthesia and analgesia**, v. 94, n. 3, p. 577–585, 2002.

WHITE, P. F. The changing role of non-opioid analgesic techniques in the management of postoperative pain. **Anesthesia and analgesia**, v. 101, n. 5 Suppl, p. S5–S22, 2005.

WIBERG, K. B.; PRATT, W. E.; BAILEY, W. F. Nature of substituent effects in nuclear magnetic resonance spectroscopy. 1. Factor analysis of carbon-13 chemical shifts in aliphatic halides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 45, n. 24, p. 4936–4947, nov. 1980.

WILLIAMS, D. B. et al. Evaluation of the prodrug potential of the sulfate esters of acetaminophen and 3-hydroxymethyl-phenytoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 113–120, mar. 1983.

WONG, L. T. et al. Pathways of disposition of acetaminophen conjugates in the mouse. **Toxicology Letters**, v. 9, n. 2, p. 145–11, 1981.

WU, X. A process for preparing propacetamol hydrochloride. v. Anhui Yuek, p. CN1013533314, 2009.

WU, Z. et al. Development of acetaminophen proline prodrug. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 13, p. 3851–3854, 2010.

XU, J. et al. UDP-Glucuronosyltransferase Expression in Mouse Liver Is Increased in Obesity- and Fasting-Induced Steatosis. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, n. 2, p. 259–266, 1 fev. 2012.

YASUDA, M. et al. Radical coupling of iodocarbonyl compounds with butenylindium generated by Transmetalation between cyclopropylmethylstannane and indium halides. **Organometallics**, v. 28, n. 1, p. 132–139, 2009.

ZHANG, Z. et al. Method for preparing propacetamol hydrochloride. v. Bengdu Fen, p. CN102786431, 2012.