

O POSSÍVEL EFEITO HEPATOPROTETOR DO PROPOFOL EM RATOS INALADOS POR HALOTANO*

CHRISTIAN TEIXEIRA NICOLETTI¹, MARIA INES LAVIGNIA RODRIGUES², LUIS JOSINO BRASIL³, CLAUDIO GALLEANO ZETTLER⁴, NORMA ANAIR POSSA MARRONI⁵

RESUMO

A proposta desse estudo foi investigar o possível efeito do anestésico propofol na formação de radicais livres e peroxidação lipídica em tecidos hepáticos de ratos com hepatotoxicidade induzida pelo halotano. Para esse estudo, foram divididos randomicamente 20 ratos wistar, machos, em 4 grupos iguais de 5 animais grupos: controle (**CO**); lipoperoxidação induzida pelo halotano (**H**); halotano com propofol (**H+P**) e somente propofol (**P**). Vinte e quatro horas após o final da administração das drogas, os ratos foram sacrificados, os fígados foram coletados e homogeneizados, e a fração sobrenadante dos fígados foi analisada com dosagens de catalase (CAT) e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Amostras de sangue foram coletadas para dosagem das enzimas transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP), o que revelou marcada injúria hepática. Exposição ao halotano e hipóxia resultou em significativa diminuição na atividade da enzima catalase e significativo aumento nas substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico. Os resultados revelaram aumento significativo das atividades séricas das enzimas transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP), o que revelou marcada injúria hepática. O propofol corrigiu as mudanças nas concentrações enzimáticas e preveniu o aumento no TBARS.⁶

Palavras-chave: propofol, halothano, antioxidantes, estresse oxidativo.

* Apoiado, em parte, por bolsas de estudo FAPERGS e CAPES

¹ Acadêmico do Curso de Medicina – Bolsista do PROICT/ULBRA

² Bióloga do Laboratório de Fisiologia Digestiva da UFRGS

³ Aluno de Pós-Graduação e anestesiolista da Irmandade

Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

⁴ Professor de Patologia Humana da ULBRA/ FFFCMPA

⁵ Professora – Orientadora do Curso Fisioterapia/ULBRA (nmarroni@terra.com.br)

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the possible effects of anesthetic propofol, on free radical formation and lipid peroxidation in liver tissues of rats with halothane-induced hepatotoxicity. For this study, 20 male wistar rats were divided into four randomized equal groups: control (group **CO**); halothane-induced lipid peroxidation (**H**); halothane with propofol (**H+P**) and only propofol (**P**). Twenty-four hours after the end of the administration of drugs, the rats were killed, and, the livers were harvested and the supernatant fractions of the livers were assayed for catalase (CAT) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Samples blood were collect for alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Halothane-hypoxic exposition resulted in a significantly decrease in the activities of the catalase (CAT) enzyme and significantly increase in the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The results are demonstrated significantly increase of serum activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Propofol corrected the enzymes changes concentration and prevented the increase in TBARS.

Key words: Propofol, Halothane, antioxidants, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A formação de radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ERO), em sistemas biológicos encontra-se bastante definida, sendo um radical livre conceituado como uma molécula que contém um número ímpar de elétrons e, dessa forma, considerada como contendo uma ligação aberta ou meia ligação aberta, decorrendo daí sua reatividade química (Boveris, 1998). Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. As ERO também podem ser formadas quando uma ligação covalente é quebrada, ou seja, quando cada um dos átomos fica com um elétron. Esse processo é denominado de fissão hemolítica (Halliwell & Gutteridge, 1989). Em animais, observou-se a geração dessas espécies em vários locais como: mitocôndria, lisossomas, peroxissomas, membrana plasmática, membrana nuclear, retículo endoplasmático e citosol.

(Meneghini, 1987; Southorn & Powis, 1988).

As doenças relacionadas a estresse oxidativo e conseqüente liberação de radicais livres estão entre as principais causas de mortalidade no mundo ocidental, incluindo doença cardíaca, diabetes, infecção por HIV, injúria de isquemia-reperusão, doença de Parkinson, artrite reumatóide, catarata, enfisema e outras. (Maxwell, 1995)

Estresse oxidativo é uma situação na qual existe aumento sustentado na concentração de ERO acima dos níveis fisiológicos, podendo resultar de uma situação em que haja diminuição dos níveis das defesas antioxidantes, elevada velocidade de produção de ERO ou até combinação de ambas as situações (McCord, 1985)

A peroxidação lipídica é definida sendo a deterioração oxidativa dos lipídios polinsaturados (Halliwell & Gutteridge, 1999). Os ácidos graxos polinsaturados contêm ao menos duas duplas li-

gações carbono-carbono, e as membranas plasmáticas e organelas celulares contêm grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados. A lipoperoxidação é um processo de reações em cadeia com iniciação, propagação e término. Um único evento de iniciação pode conduzir à formação de várias moléculas de peróxido. À medida que esse tipo de reação progride, proteínas transportadoras ou enzimas de membrana podem ser inativadas, ou a dupla camada lipídica pode tornar-se mais permeável, alterando dessa forma a homeostase dos íons (Meerson et al., 1982).

AS DEFESAS ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos lesivos potenciais de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva. Para controlar os excessos, a natureza dispõe de um sistema antioxidante endógeno complexo que impede ou minimiza o dano decorrente do excesso de O_2 ou de radicais livres.

Os antioxidantes endógenos podem ser divididos em dois grupos:

- os que atuam por processo enzimático, os conhecidos são a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona:

- os que atuam por processo não-enzimático que compreendem os antioxidantes lipossolúveis (tocoferóis, carotenóides, quinonas e bilirrubinas), hidrossolúveis (ácido ascórbico, ácido úrico e proteínas ligadas a metais) e os flavonóides. (Yu, 1994).

MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO HEPÁTICA POR HALOTANO

Vários estudos têm indicado que a hipóxia aumenta a ligação de metabólitos do halotano a componentes da fração microsomal hepática. No estudo realizado por Ross et al. (1979), foi demonstrado que ratos pré-tratados diariamente com fenobarbital 75 mg/Kg intraperitoneal, por quatro dias, tiveram seu sistema enzimático induzido e apresentaram extensiva lesão hepática com necrose após submissão à hipóxia (8% de O_2 e halotano 0,5 a 0,8%). Esse modelo de hepatotoxicidade induzida por halotano apresenta relevância clínica e tem sido corroborado por trabalhos como demonstra Mc Lain et al. (1979), que expuseram ratos, por 2 horas, a concentrações de O_2 de 14% e Halotano 1% resultando em necrose centro-lobular em 24 hs, com indução enzimática prévia (fenobarbital 1mg/mL na água de beber) por 10 dias antes do evento. Esses resultados suportam a hipótese de que o halotano é metabolizado até intermediários hepatotóxicos em um modelo dependente do citocromo p-450 redutivo ou não-dependente de O_2 . Richard et al.(1990) encontraram que o grau de hepatotoxicidade máxima determinada por alterações morfológicas e atividade de TGP correlaciona-se com a concentração de halotano e de citocromo P-450 hepático. A lesão máxima desenvolveu-se entre 12 a 24 hs após a exposição a 1% de halotano por 30 min. Esse trabalho demonstrou, que sob condições adequadas (hipóxia), o Halotano é uma verdadeira hepatotóxica e não produz lesão por reação de hipersensibilidade. Esses achados também sugerem que a biotransformação redutiva ou não

dependente de O_2 resulta em intermediários tóxicos que podem iniciar a injúria hepática induzida por halotano.

O PROPOFOL COMO ANTIOXIDANTE

O agente anestésico propofol (2,6 diisopropilfenol) contém um grupo fenólico $OH\cdot$



A estrutura química do propofol é semelhante a outros hipnóticos, mas lembra o antioxidante natural alfa-tocoferol, pois contém também o grupo fenólico $OH\cdot$. Esse composto depura radicais livres, diminui as ligações dissulfídicas protéicas e inibe a peroxidação (Caralei, 2001).

Caralei, (2001) demonstrou que concentrações clínicas de propofol diminuem o estresse oxidativo, atuando na captação e retenção de glutamato por astrócitos e que o tratamento com propofol pode normalizar os sistemas endógenos de transporte celular e atenuar o patológico aumento do glutamato extracelular nas sinapses e, assim, diminuir a necrose neuronal e citotóxica. Outros estudos experimentais têm demonstrado que a emulsão de propofol (utilizada em anestesia clínica) possui equivalente ou superior poder antioxidante que o propofol puro, possibilitando um efeito antioxidante durante a anestesia. (Karhman et al., 1997). Vários outros estudos comparando a injeção contínua em bolus repetidos ou mesmo em dose anestésica única de indução, demonstraram a capacidade do propofol em diminuir

e tem tido o seu poder antioxidante reconhecido. (Murphy et al., 1994; Eriksson et al., 1993; Aarts et al., 1994). As ações tissulares causadas pela atividade das espécies reativas de oxigênio resultam em lipoperoxidação. Os ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares são protegidos da peroxidação lipídica através de um sistema endógeno antioxidante que inclui o alfa tocoferol (vitamina E) que dificulta a peroxidação lipídica por um processo de doação de hidrogênios.



a lipoperoxidação nos modelos de indução por drogas e após torniquete i.e. isquemia-reperfusão. (Aldemir et al., 2001)

Manataki et al. (2001) demonstraram que a infusão contínua de propofol foi capaz de diminuir de forma significativa a formação de substâncias reativas de oxigênio em pacientes que foram submetidos à cirurgia videolaparoscópica, através da dosagem das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Está definida também a poderosa atividade antioxidante do propofol em concentrações clínicas relevantes, impedindo a lipoperoxidação em microssomas hepáticos e na mitocôndria (Eriksson et al., 1993).

Estas afirmações permitem-nos formular a hipótese de que o propofol em doses clínicas poderia influenciar de forma negativa a formação das ERO secundárias à injúria hepática induzida por halotano. O objetivo do presente estudo é determinar o efeito da administração do propofol no estresse oxidativo hepático induzido por halotano.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os experimentos com animais foram realizados de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Goldim & Raymundo, 1997). Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, provenientes do Biotério de Modelos Animais da Farmacologia da Funda-

ção Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, com peso médio entre 250 e 300 gramas. Os animais permaneceram em um ciclo de claro-escuro de 12 horas e com temperatura controlada por termostato. Tiveram água e alimentação *ad libitum*.

Delineamento do estudo

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

GRUPO	FENOBARBITAL	PROPOFOL	HALOTANO
CO	SIM	NÃO	NÃO
	SIM	NÃO	SIM
H + P	SIM	SIM	SIM
	SIM	NÃO	NÃO

Administração do halotano e propofol

Os grupos Halotano e Halotano+Propofol foram expostos ao halotano por duas horas a concentrações de oxigênio 14 % e halotano 1%, segundo o modelo de McLain et. al. (1979). Os animais foram inalados no interior de uma caixa inalatória com 47 X 34 X 18 cm (Jimenez et al., 1992). A concentração de oxigênio foi aferida através de um oxímetro. Os ratos foram monitorados por circuito interno, através de uma microcâmera instalada dentro da caixa inalatória. Uma hora após a inalação, os animais do grupo halotano+propofol receberam a dose subanestésica de propofol. Esses animais foram sacrificados 24 horas após a exposição ao

halotano, junto com os grupos controle e propofol, que receberam solução fisiológica 0,9% 6 ml/Kg e propofol 60mg/Kg, respectivamente.

Obtenção do Tecido Hepático

Para obtenção dos tecidos, os animais foram sacrificados através de laparotomia mediana, e amostras de tecido hepático foram colhidas para posterior avaliação de lipoperoxidação e aferição de enzimas antioxidantes. Os tecidos foram colocados em solução de tampão fosfato 20mM, pH 7,4 (KCl 140 mM) na proporção de 9ml por grama de tecido. Homogeneizaram-se os fígados em

homogeneizador ULTA TURRAX (IKAWERK), por 40 segundos, à temperatura de 0-2° centígrados. Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada (SORVALL RC 5B refrigerated Superspeed Centrifuge) por 10 minutos a 4000 rpm (Llesuy et al.,1985). Desprezou-se o precipitado de cada amostra, e o sobrenadante foi armazenado em ependorfs e congelado a -80° centígrados.

Para a avaliação da Lipoperoxidação foi utilizada a técnica de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Foi realizada conforme o modelo de Buege & Aust, (1978), utilizando 1,5 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 0,5 ml de homogeneizado de tecido hepático, 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 67% e água destilada. Essa mistura foi aquecida a 100° centígrados em banho-maria durante 15 minutos e resfriada em gelo. Após adição de 3 ml de álcool n-butílico e agitação por 40 segundos, esse material foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm e obteve-se um sobrenadante corado, resultante da reação de maloldialdeído e outros subprodutos liberados na lipoperoxidação. O sobrenadante foi colocado em cubeta de quartzo para leitura a 535 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nanomoles por miligramas de proteína (nmoles/mg prot).

A atividade da enzima Catalase foi realizada conforme o modelo de Boveris & Chance, (1979), que se baseia na medida da velocidade de consumo de peróxido de hidrogênio na amostra de tecido hepático. Utilizou-se, nes-

sa técnica, 955 μ l de tampão fosfato (50 nM, ph 7,4), e 10 μ l de homogeneizado de tecido hepático em cubeta de quartzo, onde foi adicionado 35 μ l de peróxido de hidrogênio (0,3 M). A velocidade da decomposição do H₂O₂ foi medida espectrofotometricamente a 240 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles por miligramas de proteína (nmol/mg de proteína).

A relação hepatossomática foi determinada através da proporção do peso final do animal, no dia do sacrifício, em relação ao peso do fígado. Os fígados dos animais dos grupos **H**, **H+P** e **P** foram comparados aos fígados dos animais **CO**.

A análise estatística foi feita por ANOVA, seguido de teste de TUKEY como pós-teste, sendo considerados significativos os resultados com p menores que 0,05. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

Avaliação de injúria bioquímica hepática TGO\TGp

A avaliação dos valores de transaminases, demonstra aumento significativo da injúria hepática no grupo **H**, quando comparado aos demais grupos com um $p < 0,05$. No grupo **H+P**, houve significativa redução da injúria hepática aos níveis do controle.

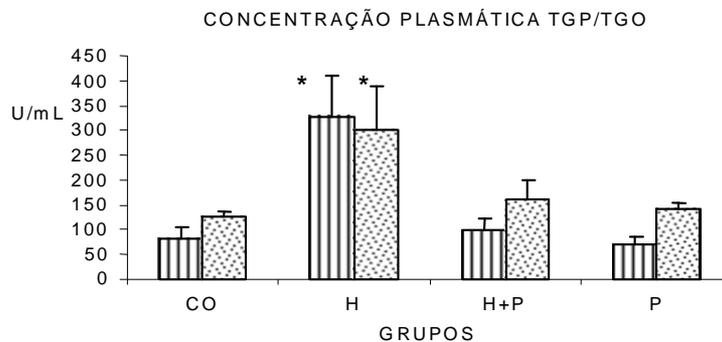


Figura 1 - Concentração plasmática de TGO e TGP (valores em médias e \pm EP * Diferenças significativas $p < 0,05$ em relação aos outros grupos)

Avaliação da Lipoperoxidação

A avaliação dos valores de TBARS, demonstra aumento significativo do estresse oxidativo

no grupo **H**, quando comparado aos demais grupos com um $p < 0,05$. No grupo **H+P**, houve significativa redução do estresse oxidativo aos níveis do controle.

LIPOPEROXIDAÇÃO

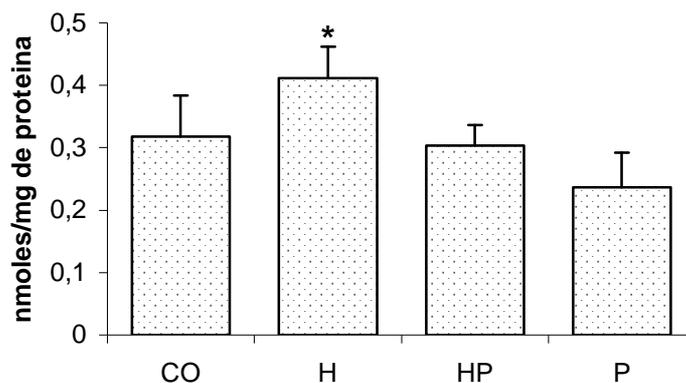


Figura 2 - Avaliação da lipoperoxidação avaliada por TBARS em fígados nos diferentes grupos. (Valores médios e \pm EP * Diferenças significativas $p < 0,05$ em relação aos outros grupos)

Atividade da Enzima Catalase

Na aferição da atividade da enzima catalase,

houve redução significativa na atividade dessa enzima no grupo **H**, quando comparado aos demais grupos com um $p < 0,05$.

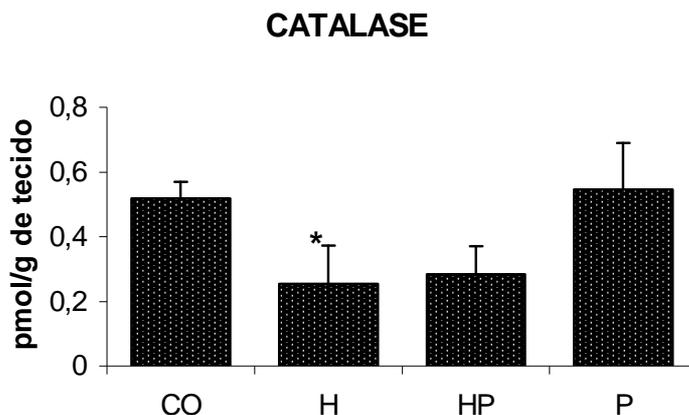


Figura 3 - Avaliação da atividade da enzima catalase em fígados nos diferentes grupos. Valores médios e \pm EP * Diferenças significativas $p < 0,05$ em relação aos outros grupos.

Relação hepatossomática

Os animais do grupo **H** mostraram tendência

à diminuição hepatossomática, quando comparados aos demais grupos. Não encontramos, porém diferenças significativas nos grupos.

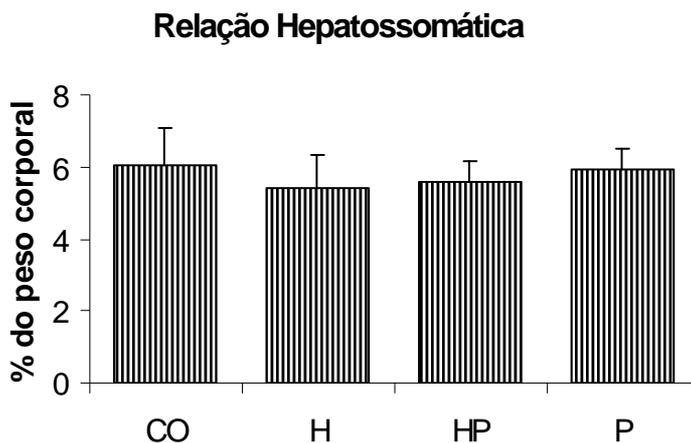


Figura 4 - Relação hepatossomática (% de peso corporal) nos diferentes grupos estudados. Valores percentuais e \pm EP * Diferenças não significativa $p > 0,05$ em relação aos outros grupos.

DISCUSSÃO

O modelo clássico de hepatotoxicidade induzida por halotano tem sido bastante estudado e causa lesão a partir da ligação de intermediários do metabolismo redutivo do halotano a porções periféricas das células hepáticas, desencadeando a iniciação da reação de lipoperoxidação com evidentes danos à estrutura celular e apoptose (McLain et al., 1979). O pré-tratamento dos animais com fenobarbital estimula a metabolização hepática (Ross et al., 1979; Sipes et al., 1976), aumentando a concentração desse intermediário reativo. Além disso, a administração inalatória do halotano em condições hipóxicas desvia o metabolismo do halotano para o lado redutivo e não-oxidativo, aumentando também por essa via o dano oxidativo hepático (Richard et al., 1990; Jee et al., 1980). Esse modelo tem sido realizado com sucesso em vários países e foi por nós reproduzido e revalidado no Brasil. A relevância desses achados para a compreensão da hepatotoxicidade em humanos é incerta. O metabolismo redutivo do halotano é menor, mas bem estabelecido como uma via importante para o halotano em humanos (Gourlay et al., 1981). Foi detectada evidência histológica de hepatotoxicidade em todos os animais com indução de lipoperoxidação hepática, com vasculite, edema e focos de necrose conforme o escore de Mc Lain et al., (1979) (dados não-apresentados). Esses achados foram corroborados pelo significativo grau de elevação das enzimas TGO e TGP que são marcadores bioquímicos de lesão hepática. Nota-se ainda significativo grau de lipoperoxidação hepática nos ratos que receberam halotano-hipóxia, com também significativo consumo da enzima catalase, achados que estão de acordo com a hipótese de que o aumento do estresse oxidativo leva a uma depleção do sis-

tema antioxidante endógeno, representado nesse estudo pela catalase. Esses resultados mostram que o propofol, em dose subanestésica, tem efeitos antioxidantes, como evidenciado pela inibição da peroxidação lipídica no tecido hepático e pelas mudanças nas enzimas TGP (Figura 1) e Catalase (Figura 3). A capacidade do propofol em reduzir a lipoperoxidação está bem documentada em tecidos animais, particularmente em microsomas cerebrais e sangue (Musacchio et al., 1991). Os efeitos antioxidantes do propofol são atribuídos à sua similaridade química com outros conhecidos antioxidantes como butihidroxitolueno e [alfa] tocoferol (Eriksson et al., 1992). Em nosso estudo, o propofol demonstrou-se capaz de restabelecer os estoques da enzima catalase, diminuiu a lipoperoxidação (TBARS) (Figura 2) e as enzimas TGO e TGP aos níveis equivalentes aos dos animais controle. Em resumo, foi demonstrada peroxidação lipídica causada especificamente pelo halotano em ratos Wistar, associada à lesão bioquímica e histológica. Além disso, ficou fortemente demonstrado que o antioxidante propofol foi capaz de proteger o fígado contra estresse oxidativo e lesão hepática induzida pelo halotano.

CONCLUSÕES

O modelo desenvolveu alterações significativas nas enzimas TGO/TGP. Foi encontrado maior lipoperoxidação no fígado dos animais com o uso de halotano e uma diminuição significativa com uso de propofol.

A enzima antioxidante catalase está diminuída nos animais do grupo halotano e aumentada nos animais com uso de propofol.

Estes dados sugerem uma proteção antioxidante do propofol neste modelo experimental de injúria hepática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTS, L. et al. The widely used anesthetic agent propofol can replace alpha-tocopherol as antioxidant. **FEBS Letters**, v.357(suppl 1), p. 83-85, 1995.

ALDEMIR et al. The effects of propofol or halothane on free radical production after tourniquet induced ischaemia-reperfusion injury during knee arthroplasty. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v.45, p.1221-1225, 2001.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v.134, p.707-716, 1973.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina**, Buenos Aires, v.58, p.350-356, 1998.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, v.52, p.302-309, 1978.

CARALEI et al. Anesthetic concentrations of propofol protect against oxidative stress in primary Astrocyte cultures. **Anesthesiology**, v.94, p.313-321, 2001.

ERIKSSON, O.; POLLESELLO, P.; SARIS, E. N. Inhibition of lipid peroxidation in isolated rat liver mitochondria by the general anesthetic propofol. **Biochemical Pharmacology**, v.44,

p.393-403, 1992.

GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. 2.ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

GOURLAY, G. K. et al. Genetic differences in reductive metabolism and hepatotoxicity of halothane in three rat strains. **Anesthesiology**, v.55, p.96-103, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2.ed. New York: Oxford University Press Inc., 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press Inc., 1999.

JEE, R. C. et al. Factors influencing halothane hepatotoxicity in the hypoxic rat model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.52, p.267-277, 1980.

JIMENEZ, W. et al. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.7, n.1, p.90-97, 1992.

KAHRAMAN, S.; DEMIRYUREK, A. T. Propofol is a peroxynitrite scavenger. **Anesthesia and Analgesia**, v.84, n.5, p.1127-1129, 1997.

LLESUY, S. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damaged induced by adrimycin and 4-epiadramycin in mice. **Tumori**, v.71, p.241-249, 1985.

MANATAKI, A. D. Lipid peroxidation and the use of emulsified propofol in laparoscopic surgery. **Surgical Endoscopy**, v.15, p.950-953, 2001.

MAXWELL, S. R. Prospect for the use of

- antioxidant therapies. **Journal of Drug Development**, v.49, p.345-361, 1995.
- MC CORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury **New England Journal of Medicine**, v.312, p.159-163, 1985.
- MCLAIN, G. E.; SIPES; BROWN, B. R. An animal model of halothane hepatotoxicity: Roles of enzyme induction and Hypoxia. **Anesthesiology**, v.51, p.321-326, 1979.
- MEERSON, F. Z. et al. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and antioxidant protection of the heart. **Basic Research in Cardiology**, v.77, p.465-485, 1982.
- MENEGHINI, R. A. Toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, v.5, p.57-62, 1987.
- MURPHY, P. G. et al. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). **British Journal of Anaesthesia**, v.68, p.613-618, 1992.
- MUSACCHIO, E. et al. Antioxidant action of propofol on liver microsomes, mitochondria and brain synaptosomes in the rat. **Pharmacology & Toxicology**, v.69, p.75-77, 1991.
- RICHARD, C. et al. Covalent binding of oxidative biotransformation intermediates is associated with halothane hepatotoxicity in Guinea Pigs. **Anesthesiology**, v.73, p.1208-1213, 1990.
- ROSS, W. T.; DAGGY, B. P.; CARDELL, R. R. Hepatic necrosis caused by halothane and hypoxia in Phenobarbital-treated rats. **Anesthesiology**, v.51, p.327-333, 1979.
- SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clinic Proceedings**, v.63, p.381-389, 1988.
- YU, P. B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, n.1, p.139-162, 1994.