



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

**PLANEJAMENTO DE NOVOS DERIVADOS DA  
EDARAVONA**

**BELÉM - PA  
2009**

**AURIEKSON NORONHA QUEIROZ**

**PLANEJAMENTO DE NOVOS DERIVADOS DA EDARAVONA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:**

**Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges**

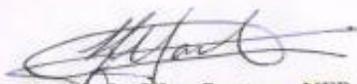
**BELÉM - PA  
2009**

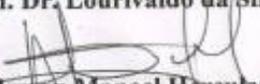


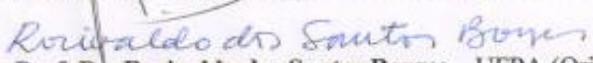
Universidade Federal do Pará  
 Instituto de Ciências da Saúde  
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA  
 DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO AURIEKSON NORONHA  
 QUEIROZ DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
 CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS NÍVEL DE MESTRADO.**

Aos trinta dias do mês de junho de dois mil e nove, às 8 horas, na Sala de aula do PPGCF/ICS/UFPA foi realizada a sessão pública de **Apresentação e Defesa de Dissertação de Mestrado** para concessão do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS** do aluno **AURIEKSON NORONHA QUEIROZ** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, orientado pelo Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges com o título do trabalho: **“Planejamento de novos compostos da Edaravona”**. Teve como Banca Examinadora o **Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges** da Universidade Federal do Pará (Orientador), o **Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva** da Universidade Federal do Pará e o **Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos** da Universidade Federal do Pará. Após a avaliação da apresentação e defesa da dissertação, a banca examinadora considerou o aluno **APROVADO** e recomenda ao Colegiado do Curso de Mestrado do PPGCF/ICS/UFPA a outorga do Título de **MESTRE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS** ao candidato. Para constar foram lavrados os termos da presente ATA, que lida e aprovada recebe a assinatura dos integrantes da Banca Examinadora.

  
**Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos – UFPA (Examinador)**

  
**Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – UFPA (Examinador)**

  
**Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges – UFPA (Orientador)**

Este trabalho dedico:

A meus pais Assendino Cardoso de Queiroz e Maria Marleide Noronha Queiroz;  
A minha irmã Aurileide Noronha Queiroz  
E minha esposa Joseane Rodrigues da Silva.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao orientador, professor Dr. Rosivaldo dos Santos Borges, pela orientação competente e pela amizade demonstrada em cada ensinamento e conselho durante esta caminhada.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFPA por suas preciosas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos meus pais, cujo amor e incentivo ajudaram na realização deste trabalho.

A minha esposa Joseane Rodrigues, por incentivar e compartilhar todos os momentos da minha vida e principalmente desse projeto com dedicação e amor.

Aos alunos de graduação (Ana Paula, Bruna e Yasmim) e de Pós-graduação (Sarah e Joseane) que integram o grupo de pesquisa do Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal por me ajudarem nesse trabalho através do apoio e divisão de tarefas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida.

E, a todos aqueles que contribuíram de modo direto ou indireto, a realização desta dissertação.

“O dom da sabedoria foi dado por Deus para usarmos de  
maneira contínua em prol da humanidade”

## RESUMO

Um estudo teórico detalhado da edaravona foi realizado usando o método TFD (Teoria do Funcional da Densidade) com o conjunto de base B3LYP/6-31G\*, com o objetivo de esclarecer o mecanismo seqüestrante de radical e a influência do tautomerismo da edaravona em condições ácidas, importantes para auxiliar na elucidação do mecanismo de seqüestro de radical pela edaravona no processo isquêmico. Em estudos teóricos anteriores, a tautomerização, o efeito do solvente e a abstração do elétron não foram considerados. Em nosso estudo, a estabilidade e reatividade foram determinadas através de parâmetros geométricos e energéticos. Os cálculos foram realizados em fase gasosa e o método PCM em fase aquosa e metanólica. As condições ácidas ou básicas foram consideradas pelas energias de dissociação e protonação, com conseqüente formação das formas aniônicas e catiônicas, respectivamente. As propriedades antioxidantes foram calculadas com base nos valores de HOMO, potencial de ionização (PI) e energia de dissociação da ligação (EDL). Os valores de HOMO e PI mostraram que o tautômero N-H é melhor antioxidante pela saída do elétron e os valores de EDL mostraram que o tautômero O-H é melhor antioxidante pela saída de hidrogênio. A protonação é mais favorecida termodinamicamente que a desprotonação. Além disso, a energia de protonação explica, teoricamente, a baixa diferença entre a protonação do N e O. O efeito do solvente diminuiu as barreiras de energias para a isomerização nos tautômeros O-H ou N-H. Adicionalmente, foram avaliados três derivados de pirazonas com suas capacidades antioxidantes comparadas com a edaravona, em um esforço para identificar o farmacóforo antioxidante. A capacidade antioxidante da antipirina, dipirona, fenilbutazona e edaravona foram determinadas pela inibição de dois radicais estáveis DPPH e ABTS. A edaravona e fenilbutazona foram as mais potentes para a inibição de radical DPPH e ABTS que a dipirona, enquanto que a antipirina não mostrou atividade em todas as concentrações analisadas. Simultaneamente, o método TFD previu o valor do potencial antioxidante *in silico* para explicar a relação de estrutura-atividade (REA). Além disso, foram calculados seus valores de HOMO, EDL X-H, e energia de estabilização ( $\Delta E_{iso}$ ). Todos os cálculos foram executados usando o programa Gaussian 03, Hyperchem 7.5, e ChemOffice 2005. Os resultados mostraram que o derivado com C-H na posição C-4 aumentou a abstração do elétron ou de hidrogênio. Finalmente, a estratégia geral empregada para planejar os novos derivados se baseou nos estudos de dezoito derivados da edaravona descritos na literatura. Os estudos de REA classificaram os compostos em três grupos, como mais ativo, ativo e menos ativo. Nove derivados foram planejados a partir do composto mais ativo selecionado pelo estudo teórico.

Palavras-chave: *edaravona*; *planejamento*; *TFD*; *antioxidante*; *DPPH*; *ABTS*.

## ABSTRACT

A detailed theoretical study of the edaravone was carried out by DFT method using B3LYP/6-31G\* basis set, with the objective to clarify the scavenging mechanism and influence of edaravone tautomerism under acid condition, which will be helpful to elucidate the radical-scavenging mechanisms in the ischemic process. Previous theoretical studies, tautomerization, solvent effects, and electron abstraction were not considered. In this work, the stability and reactivity were determined through geometric and energetic parameters realized in gas phase and PCM methods in water and methanol. The acid or basic conditions were considered by bond dissociation or protonation energies may undergo anion or cation products, respectively. The antioxidant properties were calculated through HOMO, ionization potential (IP), and bond dissociation energies (BDE). HOMO and IP values showed that N-H tautomer is better antioxidant by electron abstraction, while BDE values showed that O-H tautomer is better antioxidant by hydrogen abstraction. The protonation is thermodynamically more favored than deprotonation. Furthermore, the protonation energy explains, theoretically, the reduced difference between N and O protonation. The protonation is thermodynamically more favored than deprotonation. The solvent effect decreased energy barriers to isomerization in O-H or N-H tautomers. In addition, three pyrazolone derivatives were evaluated for their antioxidant activities compared to edaravone, in an effort to develop the evaluated and pharmacophore antioxidant identification. The antioxidant activity of antipyrine, dypirone, phenylbutazone and edaravone was determined measuring the inhibition of two stable free radical DPPH and ABTS. Edaravone and phenylbutazone exhibited more potent inhibition of DPPH and ABTS radical scavenging than dypirone, while antipyrine not shown activity in all concentrations analyzed. Simultaneously, the DFT method can provide an antioxidant potential value to explain the structure-activity relationship (SAR). Furthermore, their antioxidant activities and the ionization potential, HOMO, BDE X-H, and stabilization energies ( $\Delta E_{iso}$ ) of the compounds have been calculated using the density functional theory (DFT) method at the B3LYP level, employing the 6-31G(d) basis set, to explore the SAR. All calculations have been performed by using the Gaussian 03 program, Hyperchem 7.5, and ChemOffice 2005. The results showed that derivatives with C-H in 4-position increased electron or hydrogen abstraction. Finally, the general strategy employed to design the target compounds was based on the studies of eighteen derivatives of edaravone. The SAR studies supported the three groups, such as more active, active and less active. Nine compounds were designed with successful basis in the structure of more active.

Keywords: *edaravone; design; DFT; antioxidant; DPPH; ABTS.*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	88
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	9
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b> .....	11
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	13
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	13
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	14
<b>1. Introdução</b> .....	15
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	16
2.1 Pirazolonas .....	16
2.1.1 Atividade Biológica de Derivados de Pirazolonas .....	18
2.2 Edaravona (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona) .....	19
2.2.1 Estrutura Química e Atividade Biológica de Derivados da Edaravona .....	21
2.3 Estresse Oxidativo .....	25
2.3.1 Radicais Livres .....	25
2.3.2 Peroxidação Lipídica .....	25
2.3.3 Isquemia Cerebral .....	27
2.3.4 Mecanismos de produção de radicais livres após isquemia cerebral.....	29
2.3.5 Efeito de estratégias antioxidantes em dano cerebral pós-isquêmico .....	30
2.3.5.1 Inibição da produção de radical livre.....	31
2.3.5.2 Seqüestro de radicais livres.....	31
2.3.5.3 Aumento da degradação do radical livre .....	32
<b>3. Objetivos</b> .....	33
3.1. Geral.....	33
3.2. Específicos.....	33
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	34
4.1. Estudo Teórico dos Derivados da Edaravona.....	34
4.1.1 Energia dos Orbitais de Fronteira (HOMO e LUMO) .....	34
4.1.2 Logaritmo do Coeficiente de Partição (CLog P) .....	35
4.1.3 Energia de Hidratação (EH) .....	35
4.3 Estudo Teórico de Derivados da Edaravona no Seqüestro de Radicais Livres.....	36
4.3.1. Cálculo do Potencial de Ionização (PI) .....	37
4.3.2. Energia de Dissociação da Ligação ( $EDL_{XH}$ ).....	37

	10
4.3.3. Energia de Estabilização do Radical Formado ( $\Delta E_{iso}$ ). .....	37
4.4. Capacidade Antioxidante de Edaravona, Antipirina, Dipirona e Fenilbutazona.	38
4.5 Análise Estatística.....	39
4.6 Materiais, Equipamentos e vidrarias.....	39
5. Resultados e Discussão.....	39
5.1. Tautomerismo da Edaravona.....	39
5.2. Mecanismo de Ação Antioxidante da Edaravona.....	42
5.2.1. Abstração do Elétron.....	42
5.2.2. Abstração de Hidrogênio.....	43
5.3. Capacidade Antioxidante de Edaravona, Antipirina, Dipirona e Fenilbutazona.	44
5.3.1 Difenilpicril-hidrazil radical (DPPH) .....	44
5.3.2 ABTS (TEAC) .....	45
5.4 Relação Estrutura Química e Atividade Antioxidante de Derivados da Edaravona.....	46
<b>5.5. Estudo Teórico dos Derivados da Edaravona.....</b>	<b>51</b>
5.5.1 Propriedades de Solubilidade (CLogP e EH) .....	52
5.5.2 Propriedades Eletrônicas (HOMO, PI, $EDL_{XH}$ e $\Delta E_{iso}$ ) .....	53
5.6. Planejamento de Novos Derivados da Edaravona.....	57
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura de anéis heterocíclicos .....	15
Figura 2: Estrutura química da edaravona.....	16
Figura 3: Estruturas químicas da antipirina, isopropilantipirina, aminopirina, dipirona e fenilbutazona .....	17
Figura 4: Estruturas dos derivados da edaravona sintetizados por Nakagawa et al. (2006) .....	22
Figura 5: Estruturas dos derivados da edaravona sintetizados por Wang et. al. (2003) .....	24
Figura 6: Derivados utilizados nos estudos de modelagem molecular.....	36
Figura 7: Derivados das pirazolonas utilizados (Edaravona 1, Antipirina 2, Dipirona 5 e Fenilbutazona 6).....	44
Figura 8: Ressonância pela ionização dos sistemas carbonilimínico e dicarbonílico.....	48
Figura 9: Geometria molecular de derivados de pirazolonas .....	49
Figura 10: Estrutura dos orbitais moleculares de mais alta energia (HOMO) dos derivados de pirazolonas .....	50
Figura 11: Densidade de spin da forma semiquinona dos derivados de pirazolonas.....	51
Figura 12: Derivados com propriedades físico-químicas significativas selecionados nos estudos de modelagem molecular .....	53
Figura 13: Derivados da edaravona considerados menos ativos pelo estudo teórico.....	54
Figura 14: Derivados da edaravona considerados ativos pelo estudo teórico .....	57
Figura 15: Derivados da edaravona considerados mais ativos pelo estudo teórico.....	57
Figura 16: Novos derivados da edaravona planejados (P1 a P9).....	58

**LISTA DE ESQUEMAS**

Esquema 1: Mecanismo de seqüestro de radical livre pela edravona. (Adaptado de Wang et al., 2003).....	49
Esquema 2: Reações de peroxidação lipídica com espécies reativas.....	26
Esquema 3: Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de isquemia cerebral (BUZIN et al., 2006).....	28
Esquema 4: Mecanismos de produção de radicais livres após isquemia cerebral adaptado de MARGAILL et al., 2005.....	30
Esquema 5: Barreira de energia entre os tautômeros C-H e N-H ou O-H calculados pelo método PCM/TFD/B3LYP 6-31G(d).em Fase Gasosa, (Água) e [Metanol].....	40
Esquema 6: Formas tautômericas, formas anionicas e cationicas da edravona por catálise ácida e básica determinadas pelo método TFD/B3LYP 6-31G(d).....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas dos derivados da edaravona sintetizados por Nakagawa et al. (2006) com as respectivas IC <sub>50</sub> .....	22
Tabela 2: Propriedades eletrônicas dos tautômeros da edaravona determinadas pelo método TFD/B3LYP 6-31G(d).....	43
Tabela 3: Capacidade antioxidante, HOMO, PI e EDL <sub>XH</sub> de derivados pirazolônicos pelo método TFD.....	47
Tabela 4: Propriedades físico-químicas (CLogP e EH) para os derivados da edaravona utilizando os programas computacionais Hyperchem 7.5 (2002) e ChemOffice (2005).....	52
Tabela 5: Propriedades de reatividade e estabilidade química no seqüestro de radicais livres dos derivados da edaravona, usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de base 6-31G(d) pelo método TFD.....	55
Tabela 6: Propriedades físico-químicas e de atividade seqüestrante de radicais livres dos novos derivados propostos da edaravona, usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de base 6-31G* pelo método TFD.....	58

## LISTA DE GRÁFICOS

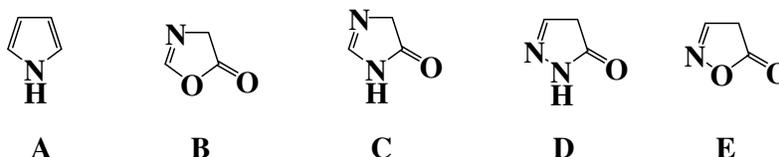
Gráfico 1: Avaliação da capacidade seqüestrante de derivados da pirazolona em diferentes concentrações em solução metanólica contra radical DPPH. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados são mostrados em valores percentuais de inibição, sendo edaravona (Eda), antipirina (Ant), dipirona (Dip) e fenilbutazona (Fen).....	45
Gráfico 2: Avaliação da capacidade seqüestrante de derivados da pirazolona em diferentes concentrações em solução metanólica contra radical ABTS. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados são mostrados em valores percentuais de inibição, sendo edaravona (Eda), antipirina (Ant), dipirona (Dip) e fenilbutazona (Fen).....	46

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>ERN</b>	Espécie Reativa de Nitrogênio
<b>NOS<sub>e</sub></b>	Óxido Nítrico Síntase Endotelial
<b>LDL</b>	Lipoproteína de Baixa Densidade
<b>CPNH</b>	Células Progenitoras de Neurônios Humanos
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator- $\alpha$ de Necrose Tumoral
<b>REA</b>	Relação Estrutura-Atividade
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória de 50%
<b>ABTS</b>	2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
<b>DPPH</b>	Difenilpicril-hidrazil radical
<b>TFD</b>	Teoria do Funcional da Densidade
<b>EDL</b>	Energia de Dissociação da Ligação
<b>PI</b>	Potenciais de Ionização
<b>ER<sup>•</sup></b>	Espécie Reativa
<b>ACM</b>	Artéria Cerebral Média
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>GPX</b>	Glutathione Peroxidase
<b>XO</b>	Xantina Oxidase
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>NAC</b>	<i>N</i> -acetilcisteína
<b>PM3</b>	Terceira Parametrização
<b>HOMO</b>	Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia
<b>LUMO</b>	Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia
<b>CLogP</b>	Logaritmo do Coeficiente de Partição octanol/água
<b>EH</b>	Energia de Hidratação
<b>PCM</b>	Meio Contínuo Polarizável

## 1. Introdução

O planejamento e aplicação de novos compostos heterocíclicos contendo nitrogênio são de extrema importância para a química farmacêutica e medicinal em relação aos demais heterocíclicos devido seus aspectos químicos e sua ampla atividade biológica. Nos últimos anos foram reportados diversos procedimentos para a síntese química de pirróis **A**, azalactonas **B**, imidazolonas **C**, pirazolonas **D** e isoxazolas **E** (Figura 1) (BECCALLI et al., 1988, 1996; PARK et al., 2005).



**Figura 1:** Estrutura de anéis heterocíclicos.

Dentre os heterocíclicos, o anel pirazolona **D** é uma estrutura que se destaca, sendo encontrada em numerosos compostos farmacêuticos ativos, devido à fácil obtenção sintética, a rica atividade biológica e alta estabilidade química. Por estas razões a estrutura da pirazolona atualmente vem despertando interesse pela comunidade científica e indústrias farmacêuticas para o planejamento e descoberta de novos medicamentos (PARK et al., 2005).

Em junho de 2001 foi lançado no mercado terapêutico japonês um medicamento pirazolonico denominado edaravona (3-metil-2-pirazolin-5-ona) com expressiva atividade antioxidante utilizado nos processos de isquemias, principalmente cerebrais e como neuroprotetores (MARGAILL et al., 2005), desde então constantes esforços tem sido direcionado para um melhor entendimento das características químicas e biológicas desse composto para a síntese de novos fármacos.

Baseado em ensaios clínicos em pacientes japoneses com processo isquêmico, a Mitsubishi-Tokyo Farmacêutica (Tokyo, Japão) obteve a aprovação da entidade regular do Japão para a utilização da edaravona (RADICUT Injeção 30 mg, Mitsubishi Pharma Corporation, Osaka, Japão) para o tratamento da isquemia aguda podendo ser administrada num período de até 72 h após o evento isquêmico (Grupo de Estudo Edaravona, 2003). Entretanto, as reações adversas que não foram previstas em ensaios clínicos foram relatadas depois de seu lançamento, e as “precauções” na inserção no mercado terapêutico foram revisados para cada reação adversa relatada. Em particular, as desordens renais que se tornaram mais freqüentes durante ou depois do tratamento com a edaravona ganharam uma maior atenção (ZIVIN e LAPCHAK, 2009).

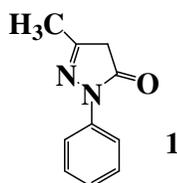
Embora a edaravona tenha benefício significativo em pacientes com quadro isquêmico, há um risco aumentado de toxicidade renal associado com sua administração (ZIVIN e LAPCHAK, 2009). Hishida (2007) relatou que aproximadamente 45% dos pacientes apresentaram toxicidade renal induzida pela edaravona e esses recuperaram a função renal depois que o tratamento foi cessado, e que a monitorização da função renal é recomendada quando os pacientes apresentam complicações como infecções e/ou desordens hepáticas.

Nesse contexto, nosso atual interesse baseia-se na aplicação de métodos teóricos para elucidação das propriedades físico-químicas e de reatividade da edaravona, as quais são importantes para atividade antioxidante no processo isquêmico, e com isso a realização de um estudo de relação estrutura química e atividade sequestrante de radical livre, da edaravona e de derivados pirazolônicos com estrutura semelhante e comercializados no Brasil, sendo esses levantamentos necessários e fundamentais para o planejamento racional de novos derivados da edaravona e de novos candidatos a fármacos com uma maior atividade antiisquêmica e neuroprotetora, podendo esse estudo servir de base para que futuramente sejam sintetizados e desenvolvidos no Brasil derivados mais ativos e menos tóxicos e que possam ser administrados em baixas doses e em diferentes formulações farmacêuticas para garantir um tratamento contínuo e de característica preventiva.

## 2. Revisão Bibliográfica

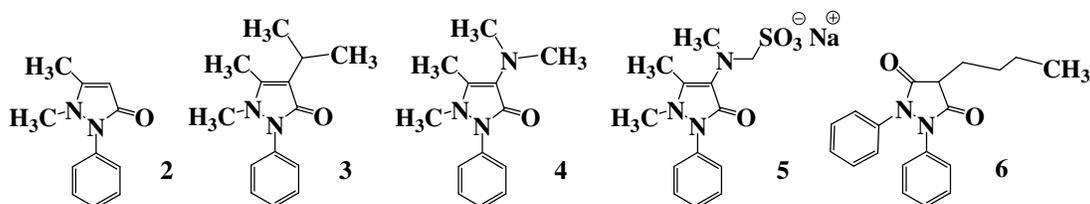
### 2.1 Pirazolonas

Os fármacos contendo anel pirazolona são de particular importância dentro da química farmacêutica por possuírem numerosas aplicações, tais como, analgésicos, antipiréticos, antiartríticos, uricosúricos, antiinflamatórios, antiflogísticos e antioxidantes (MOHAMMAD et al., 2008). A edaravona **1** em particular, (NAKAGAWA et al., 2006), atua como um sequestrante de radical livre interrompendo as reações em cadeia e as desintegrações peroxidativas da membrana associadas com a isquemia (KAWAI et al., 1997), razão pela qual a foi aprovada no Japão para o uso clínico na prevenção dos efeitos isquêmicos agudo (MARGAILL et al., 2005).



**Figura 2:** Estrutura química da edaravona.

O desenvolvimento de fármacos para uso como analgésicos e antiinflamatórios durante o século XIX concentrou-se nos derivados da pirazolona. Assim, dentre as várias substâncias dotadas de propriedades analgésicas, foi identificada na família das pirazolonas, a antipirina **2**, sintetizada na Alemanha em 1884. Anos mais tarde, em 1897 surgia a isopropilantipirina **3** e a aminopirina **4**. Em 1913, a Hoechst AG desenvolvia o primeiro composto injetável da família, a dipirona **5** denominada inicialmente de melubrina. Posteriormente, em 1921, era introduzida no mercado farmacêutica alemão a primeira pirazolona de uso clínico, que na realidade era um produto composto por 50% dipirona **5** e 50% aminopirina **3**. A indicação terapêutica foi como analgésico e antiespasmódico, apesar de ter sido testado até para o tratamento da tuberculose. E em 1949 foi introduzido no arsenal terapêutico a fenilbutazona **6**, utilizada como antiinflamatória, antipirética e analgésica. Inúmeros compostos desta classe exercem ação antiinflamatória, utilizados isoladamente ou em mistura entre si (HEDENMALM et al., 2002).



**Figura 3:** Estruturas químicas da antipirina, isopropilantipirina, aminopirina, dipirona e fenilbutazona.

No Brasil, a dipirona **5** (sal-sódico 1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolona-4-metilaminometanosulfônico) foi introduzida em 1922, pela Hoechst AG, com o nome de Novalgina®. No mesmo ano, coincidentemente, Schultz descrevia o primeiro caso de agranulocitose medicamentosa induzida por pirazolonas (JOSEPH, 1959). No entanto, a propriedade analgésica desta família é relevante, a qual é perfeitamente exemplificada pela dipirona **5** que constitui o analgésico antipirético mais utilizado no Brasil. É comercializada principalmente na forma sódica em diferentes formulações farmacêuticas, tais como: soluções orais, comprimidos, injetáveis e supositórios (PEREIRA et al., 2002).

O mecanismo farmacológico de ação das pirazolonas não é completamente compreendido, mas sabe-se que envolve a inibição da isoenzima cicloxigenase, com conseqüente inibição da síntese das prostaglandinas e tromboxanos em plaquetas (BENTUR et al., 2004).

Infelizmente, em diversos casos, o uso das pirazolonas, mais especificamente da dipirona e da aminopirina, foi seguido por uma diminuição severa no número de neutrófilos da circulação sanguínea (agranulocitose) (IBÁÑEZ et al., 2005). Por causa do risco de agranulocitose, as pirazolonas foram proibidas ou retiradas do mercado em vários países. Não obstante, estas drogas estão ainda disponíveis em alguns países como na Europa que inclui Alemanha, França, Espanha e Portugal (HEDENMALM et al., 2002) e no Brasil.

As Pirazolonas são ainda amplamente utilizadas em muitas partes do mundo, incluindo o Extremo Oriente, África e América do Sul (CHAN et al., 1996), alcançando um volume de venda anual em torno de kilotoneladas, principalmente a dipirona, propilfenazona (isopropilantipirina) e fenilbutazona (BENTUR et al., 2004).

### 2.1.1 Atividade Biológica de Derivados de Pirazolonas

O risco da agranulocitose associada ao uso de medicamentos derivados da pirazolona, em doses terapêuticas por curto período de tempo, foi considerado muito baixo. (IBÁÑEZ et al., 2005). Entretanto, pouca atenção foi dada à possível lise dos neutrófilos e o seqüestro de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas por estes compostos nos neutrófilos.

Tal efeito poderia ser benéfico, por exemplo, no aumento de números de neutrófilos, no entanto, poderia também ser altamente prejudicial se o número de neutrófilos circulantes estiver reduzido. Nesse sentido Costa et al. (2006), avaliaram a capacidade dos derivados de pirazolonas como antipirina **2**, isopropilantipirina **3**, aminopirina **4** e dipirona **5**, na inibição do metabolismo de neutrófilos humanos e sua atividade seqüestrante contra os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ), lipoperóxido ( $ROO^{\bullet}$ ) e ácido hipocloroso (HOCl) em neutrófilos.

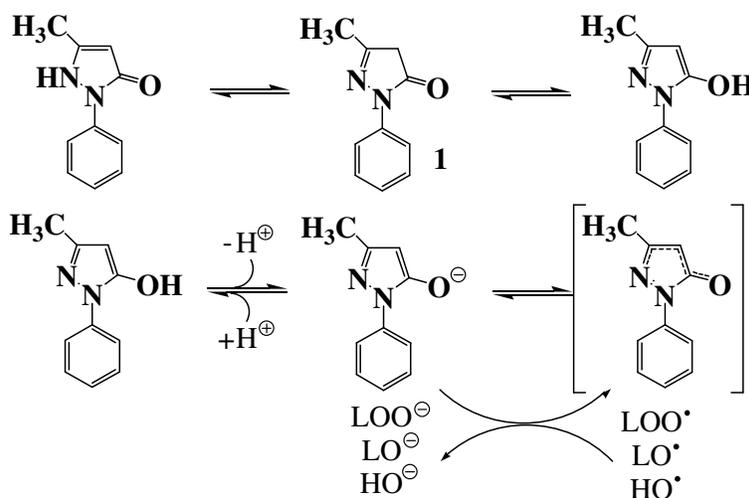
Os resultados obtidos por Costa et al. (2006), mostraram que a aminopirina e a dipirona impedem o metabolismo de neutrófilos induzidos pelo 2-miristato-3-acetato de forbol com elevada eficiência, enquanto a isopropilantipirina teve pouco efeito e a antipirina não teve nenhum efeito. A dipirona e a aminopirina foram sequestrantes altamente potentes do radical  $HO^{\bullet}$  e HOCl, enquanto a isopropilantipirina teve pouco efeito. No entanto, nenhuma destas pirazolonas estudadas se mostraram capazes de seqüestrar o  $O_2^{\bullet-}$  ou  $H_2O_2$ , enquanto que a dipirona se mostrou mais reativa contra o radical  $ROO^{\bullet}$ . Estes resultados não elucidaram o modo químico de atuação destes compostos na resposta inflamatória induzida em neutrófilos.

## 2.2 Edaravona (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas em muitas condições patológicas tais como isquemia (HALLIWELL et al., 1990; CHAPPLE et al., 1997); envelhecimento celular (ZGLINICKI et al., 2001) e progressão de arteriosclerose (DARLEY-USMAR et al., 1996). Recentemente, o composto derivado da pirazolona, edaravona (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona, igualmente conhecido como MCI-186, Radicut®) foi aprovado como um fármaco eficaz para as isquemias cerebrais (KAWAI et al., 1997; WATANABE et al., 1994) e miocárdicas (WU et al., 2002).

A edaravona, um seqüestrante de radical livre desenvolvido para o uso clínico como um novo agente antiisquêmico, possui a capacidade de inibir a reação radicalar através da inativação de uma variedade de espécies reativas tanto de oxigênio (ERO) quanto de nitrogênio (ERN) (TABRIZCHI et al., 2000). O efeito antiisquêmico da edaravona é devido sua propriedade antioxidante, capaz de diminuir a formação de radical hidróxil, inibição da atividade da lipoxigenase, e impedindo a peroxidação lipídica e a morte neuronal induzido por peróxidos e por ácidos hidroperoxi-eicosatetraenóico (HETEs) (YAMAMOTO et al., 1997).

A edaravona interage bioquimicamente com uma vasta escala de radicais livres, doando elétrons, principalmente na forma aniônica, ou hidrogênio. Sua forma de enolato pode interagir com ambos lipoperóxido ( $\text{LOO}^\bullet$ ), alcóxido ( $\text{LO}^\bullet$ ) e radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ), inativando-os e transformando-se em um produto químico estável (Esquema 1) (WATANABE et al., 1997).



**Esquema 1:** Mecanismo de seqüestro de radical livre pela edaravona. (Adaptado de Wang et al., 2003).

Yoshida et al. (2005) demonstraram pela primeira vez que a edaravona aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS). A NOS possui papel importante na manutenção e melhora da circulação sanguínea cerebral devido principalmente a síntese de NO (óxido nítrico), prevenindo lesões do tecido neuronal (IADECOLA et al., 1997; SAMDANI et al., 1997; ENDRES et al., 1998), contribuindo com isso, com uma melhor manutenção do endotélio e da circulação sanguínea vascular cerebral.

A radioterapia craniana é amplamente utilizada para tratar tumores cerebrais pré-malignos, metastáticos e cânceros da garganta. Infelizmente, crianças e adultos que recebem esse tipo de tratamento frequentemente experimentam um declínio cognitivo progressivo (ANDERSON et al., 2000; CROSSEN et al., 1994). Joseph (1992) e Poon et al., (2006) demonstraram que a deficiência cognitiva orgânica e apoptoses induzida por radioterapia nos neurônios do hipocampo é devido ao estresse oxidativo. Os radicais livres através da peroxidação lipídica induzem danos a biomoléculas, alterações na integridade da membrana e junto com as radiações contribuem à diminuição na transmissão neuronal, perda de neurônios e conseqüentemente diminuição na cognição.

Neste sentido, Ishii et al. (2007) investigaram se a edaravona poderia exercer efeitos protetores e anti-apoptóticos em células progenitoras de neurônios humanos (CPNH) irradiadas durante a radioterapia e se as CPNH protegidas mantinham a habilidade de se diferenciar. O resultado obtido mostrou que as CPNH foram mais sensíveis à radiação do que as células malignas, mas o número máximo de CPNH tratadas com edaravona que sobreviveram era equivalente ao número de células tumorais que sobreviveram em todos os grupos. Além disso, a edaravona restaurou a habilidade de auto-renovação e diferenciação das CPNH mesmo depois que foram sujeitas à irradiação. Estes resultados indicaram que a edaravona pode ser usada como uma pré-medicação para a radioterapia craniana (ISHII et al., 2007).

Outra importante situação na qual a edaravona foi avaliada é o Diabetes Tipo-1, uma doença auto-imune caracterizada pela infiltração mononuclear de células pancreáticas das ilhotas de Langerhans (insulítis) seguido pela destruição das células- $\beta$ . Os inibidores de isoformas não específicos da enzima óxido nítrico sintase (NOS) se mostraram eficazes na neutralização do diabetes induzida em modelos animais (ANDERSON et al., 2001).

Oberley (1988) sugeriu a hipótese de que o estresse oxidativo desempenha papel chave na patogênese do diabetes e Lenzen et al. (1996) mostraram que o pâncreas apresenta baixos níveis de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase e

cataláse. O óxido nítrico e as espécies reativas de oxigênio induzidos por citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-1 $\beta$ , fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  são considerados mediadores cruciais na morte das células- $\beta$  (LAKEY et al., 2001).

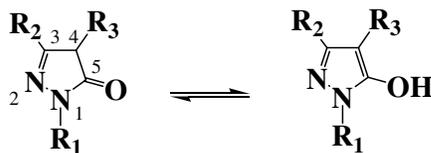
Fukudome et al. (2008) examinaram o efeito da edaravona no diabetes tipo-1 em um modelo múltiplo de baixas doses de estreptozotocina, demonstrando que a edaravona diminuiu a hiperglicemia e promoveu a redução na insulina pancreática no modelo estudado. O efeito da edaravona pôde ser devido a uma inibição do estresse oxidativo em células- $\beta$  da ilhota dos ratos tratados com estreptozotocina, protegendo as células pancreáticas da destruição inflamatória e imune induzidas pela estreptozotocina, sugerindo que a edaravona possa ser útil para neutralizar ou diminuir a progressão da diabetes tipo-1.

### 2.2.1 Estrutura Química e Atividade Biológica de Derivados da Edaravona

Nakagawa et al. (2006) estudaram a relação estrutura-atividade (REA) da edaravona e de seus novos derivados como meio de caracterizar o grupamento químico responsável pela sua atividade seqüestrante de radicais livres. Com esta finalidade, eles sintetizaram derivados da edaravona com vários substituintes com grupos elétron-retiradores, elétron-doadores e grupos com sistemas  $\pi$ -conjugados nas posições 1, 3, ou 4 do anel pirazolona (Tabela 1). Os valores da IC<sub>50</sub> foram determinados para sete dos dezenove derivados sintetizados e apresentaram diferentes potenciais de oxidação (**1**, **7-13**).

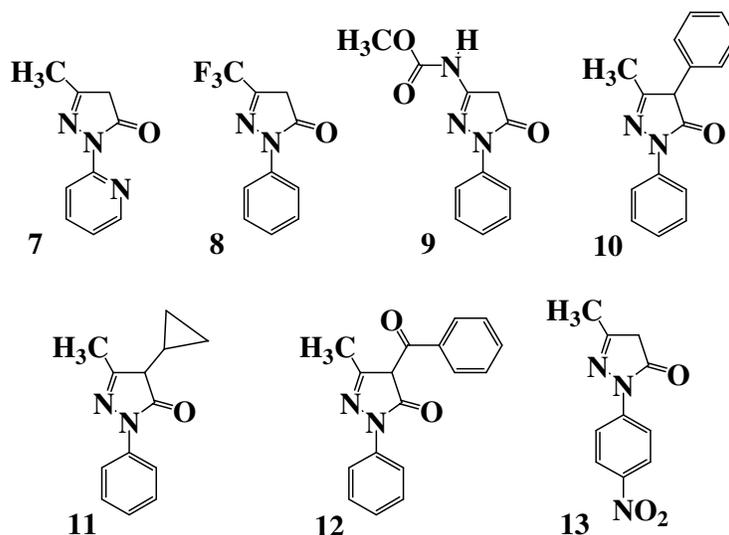
A relação entre o valor da IC<sub>50</sub> e o potencial de oxidação não foram simplesmente proporcionais. Derivados com grupos eletron-retiradores fortes, como composto **8** com o grupo trifluorometil e **12** com um grupo benzoil, tiveram potenciais de oxidação relativamente mais elevados, enquanto que os outros derivados mostraram uma variedade nos potenciais de oxidação devido às propriedades eletrônicas dos substituintes (Figura 4). É possível que os potenciais de oxidação fossem afetados não somente pela densidade de elétrons no anel da pirazolona, mas também pela estabilidade da espécie radicalar, principalmente através da capacidade dos orbitais- $\pi$  conjugados presentes nos substituintes deslocalizarem a carga radicalar. Em relação às posições dos substituintes, a substituição na posição 1 não afetou a redução do potencial de oxidação, ao contrario das substituições na posição 3 que pareceu ser mais eficaz (Tabela 1) (NAKAGAWA et al., 2006).

**Tabela 1:** Estruturas dos derivados da edaravona sintetizados por Nakagawa et al. (2006) com as respectivas IC<sub>50</sub>.



Comp	R1	R2	R3	IC <sub>50</sub> (mM)
1 (edaravona)	Fenil	CH <sub>3</sub>	H	0.25
7	2-Piridinil	CH <sub>3</sub>	H	0.018
8	Fenil	CF <sub>3</sub>	H	0.81
9	Fenil	FenilOCONH	H	0.38
10	Fenil	CH <sub>3</sub>	Fenil	0.79
11	Fenil	CH <sub>3</sub>	Ciclopropil	0.72
12	Fenil	CH <sub>3</sub>	FenilCO	0.61
13	4-NO <sub>2</sub> - Fenil	CH <sub>3</sub>	H	0.50

Fonte: Adaptado de Nakagawa et al., 2006.



**Figura 4:** Derivados da edaravona sintetizados por Nakagawa et al. (2006).

A edaravona ionizada (forma aniônica) é descrita como a forma ativa contra os radicais livres através do mecanismo de transferência de elétrons. Derivados da edaravona com os substituintes lipofílicos como grupo fenil, na posição 1 do anel pirazolona, elevaram a atividade inibitória da peroxidação lipídica, provavelmente devido às concentrações crescentes dos derivados na fase apolar (WATANABE et al.,1997). Enquanto que Nakagawa et al. (2006) sugeriram que os resultados são mais

expressivos em solução aquosa, uma vez que este meio aumenta a forma aniônica dos derivados parecendo com isso, ser uma condição importante para a eficiência no seqüestro de radicais.

Segundo Nakagawa et al. (2006), a densidade de elétrons no anel pirazolona é igualmente importante para a reatividade química frente à saída de um elétron. Portanto, os substituintes relativamente ricos em elétrons no anel da pirazolona podem diminuir o potencial de oxidação, porém diminui concomitantemente a concentração de sua forma aniônica pela protonação devido às cargas negativas parciais crescentes. Ao contrário, os substituintes deficientes em elétrons podem aumentar a quantidade da forma aniônica, mas aumentam o potencial de oxidação.

A edaravona tem grande potencial de proteger os tecidos contra vários tipos de toxicidade induzida por radicais livres e seu efeito farmacológico é decorrente de sua atividade sequestrante dessas espécies reativas. De fato, ela é eficiente contra os radicais hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ) e  $\text{DPPH}^\bullet$  (TABRIZCHI et al., 2000).

Entretanto, não é esperado que a edaravona seja eficaz contra o radical  $\text{DPPH}^\bullet$  devido ela não possuir em sua estrutura grupamentos como fenol, amino ou tiofenol que são conhecidos por serem ativos contra radicais  $\text{DPPH}^\bullet$  (WANG et al., 2003).

Conseqüentemente, Wang et al. (2003) utilizaram métodos teóricos para descrever a relação estrutura-atividade (REA), com o objetivo de esclarecer o mecanismo de seqüestro do radical  $\text{DPPH}^\bullet$  pela edaravona e por novos derivados (Figura 5). Ele utilizou o método TFD (Teoria do Funcional da Densidade) e selecionou parâmetros teóricos usando a base de cálculo B3LYP/6-31G(d), que é apropriada para caracterizar o mecanismo de seqüestro de radicais livres (QUEIROZ et al., 2009).

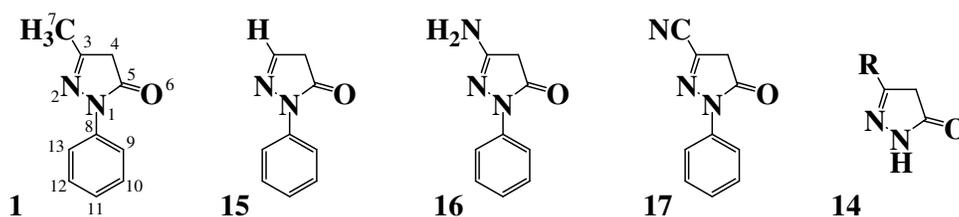
De maneira geral, existem dois mecanismos para que os antioxidantes seqüestrem  $\text{DPPH}^\bullet$ . O primeiro processo é através da abstração direta de um átomo de H (Equação 1), e o segundo processo é a formação de um cátion radical pela transferência de um elétron (Equação 2) (LITWINIENKO, 2003).



Onde, X representa O, N, S ou C. O primeiro caminho é determinado principalmente pela entalpia de dissociação da ligação X-H (EDL) de RXH e de DPPH. A reação somente irá ocorrer se a EDL dos compostos for mais baixo do que a energia do DPPH. Enquanto que o segundo caminho é determinado pelos potenciais de ionização (PI) de RXH e de  $\text{DPPH}^\bullet$ , e a condição prévia para ocorrer a reação é que o PI dos derivados deve ser mais baixo do que a do DPPH (LITWINIENKO, 2003).

O resultado do PI calculado do DPPH foi de 59,60 kcal/mol, enquanto que o PI para a edaravona foi de 164,72 kcal/mol, indicando que a reação de transferência de elétron entre edaravona e DPPH<sup>•</sup> não deve ocorrer do ponto de vista termodinâmico. Por outro lado, a EDL N-H para o DPPH é de 172,22 kcal/mol, muito mais alta do que a EDL C-H da edaravona (75,48 kcal/mol) (WANG et al., 2003). Portanto a reação que esta envolvida no processo de seqüestro de radical da edaravona, segundo o autor, é pela abstração do átomo de hidrogênio e não pela transferência de elétrons.

Adicionalmente, a EDL do C-H correspondente para a posição 4 é muito mais baixo do que para a posição 7. A posição C-H será o local de doação, devido o fato de que a posição 4 derivou os radicais mais estáveis do que os derivados da posição 7. Entretanto, é interessante mostrar que a distribuição da densidade de spin derivada na posição 4 origina os radicais concentrados nas posições N2, C4 e O6, correspondendo as três modalidades de ressonância da edaravona, e que a densidade de spin dos derivados na posição 7 do radical está localizada principalmente na posição C2 e C7, os quais são os dois isômeros de ressonância (WANG et al., 2003).



**Figura 5:** Estruturas dos derivados da edaravona sintetizados por Wang et. al. (2003).

Um dado interessante é que a EDL C-H para a posição 4 é relativo ao fenol, -7,33 kcal/mol, e mais elevados do que a EDL relativa ao  $\alpha$ -tocoferol, -10 kcal/mol (PRATT et al., 2001) contribuindo para a atividade mais elevada do  $\alpha$ -tocoferol ( $IC_{50} = 23,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) do que a edaravona como seqüestrador do radical livre DPPH<sup>•</sup> (TABRIZCHI et al., 2000). Portanto, o mecanismo de seqüestro de radical livre proposto por Wang et. al. (2003) foi investigado pela relação estrutura e atividade de quatro derivados da edaravona usando suas respectivas EDL C-H, onde foi avaliada a contribuição de cada substituinte na EDL C-H.

Os resultados de Wang et al. (2003) mostraram inesperadamente que a EDL C-H de **14** é comparável com a EDL C-H de **1** e a diferença da EDL entre **14** e **15** é de 0,5 kcal/mol, pois o anel benzeno reduziu a EDL C-H, devido a insignificante distribuição da densidade de spin desse anel. A baixa diferença entre a EDL C-H dos derivados **1**, **15**, **16** e **17** implica que a EDL C-H da edaravona é pouco influenciada pelas diferenças

nas propriedades eletrônicas dos substituintes na posição 3. Portanto o 2-pirazolin-5-ona (**14**) é o centro ativo para a edaravona (farmacóforo) como sequestrante de radical livre, e futuras modificações estruturais podem ser realizados no anel benzeno ou na posição 3 para melhorar a absorção e propriedades metabólicas da edaravona.

## **2.3 Estresse Oxidativo**

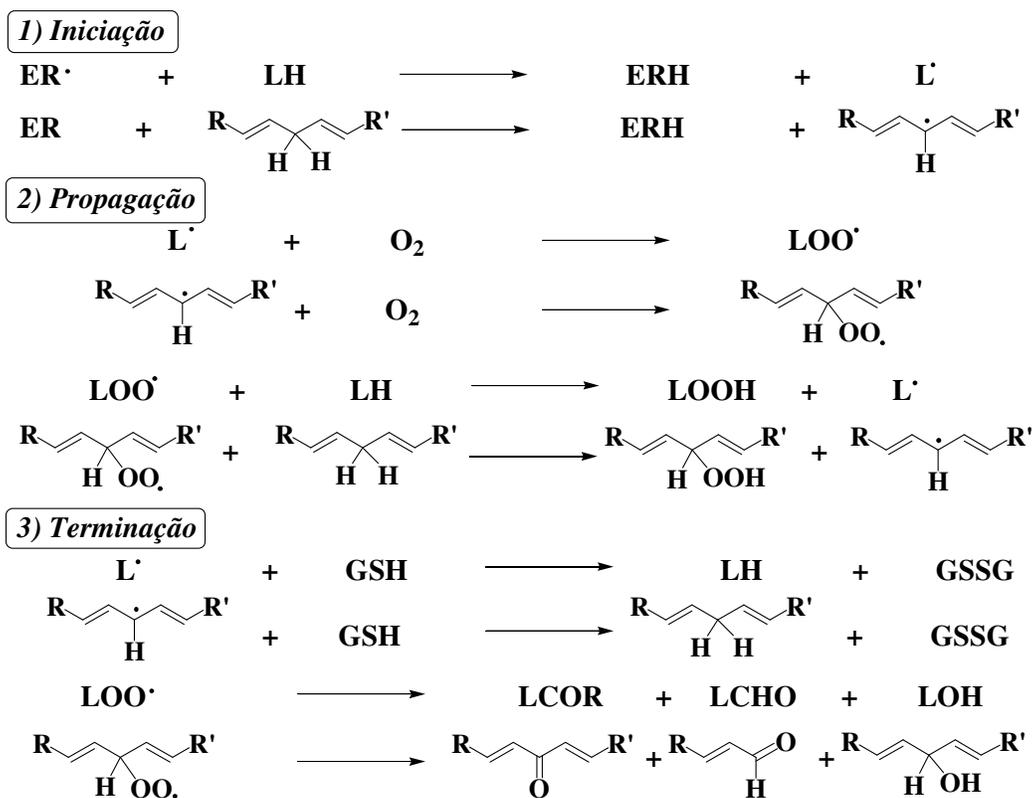
### **2.3.1 Radicais Livres**

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

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

### **2.3.2 Peroxidação Lipídica**

A peroxidação lipídica resulta na desorganização estrutural das membranas biológicas, resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando a destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de trocas metabólicas e finalmente, em condições irreversíveis, a morte celular, sendo responsável por diversas patologias, tais como aterosclerose, câncer, processos inflamatórios, enfermidades neurodegenerativas e o processo de envelhecimento (BENZIE, 1996; HALLIWELL, 1992; MASUTANI, 2000).



**Esquema 2:** Reações de peroxidação lipídica com espécies reativas.

Como toda reação radicalar, a peroxidação lipídica, pode ser dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação (Esquema 2). As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são os iniciadores do processo de peroxidação lipídica (BENZIE, 1996). O ataque da espécie reativa ( $\text{ER}^\bullet$ ) sobre o ácido graxo polinsaturado leva a abstração homolítica de um átomo de hidrogênio do grupo metileno, formando um radical de carbono ( $\text{L}^\bullet$ ) razoavelmente estável, devido o efeito de ressonância das ligações duplas dos alcenos ou por rearranjo sigmatrópico [1,5] de hidrogênio. Em meio aeróbio, este composto se combina com o oxigênio ( $\text{O}_2$ ) formando o radical peroxila ( $\text{LOO}^\bullet$ ), o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical ( $\text{L}^\bullet$ ), promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio forma o hidroperóxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ) (PORTER et al., 1995).

Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com a dupla ligação. Íons e metais de transição podem participar do processo, catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxila ( $\text{LO}^\bullet$ ), peroxila ( $\text{LOO}^\bullet$ ) e hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) a partir dos hidroperóxidos. A última fase ocorre, quando os radicais livres são aniquilados por reação com a glutatona, dismutação ou clivagem, formando ligações

covalentes com resíduos de aminoácidos ou rearranjos, formando grupos de aldeídos (RCHO), cetonas (RCOR) e álcool (ROH) (CHAN, 1987). Estas reações fazem parte de um sistema de defesa celular contra a oxidação por radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

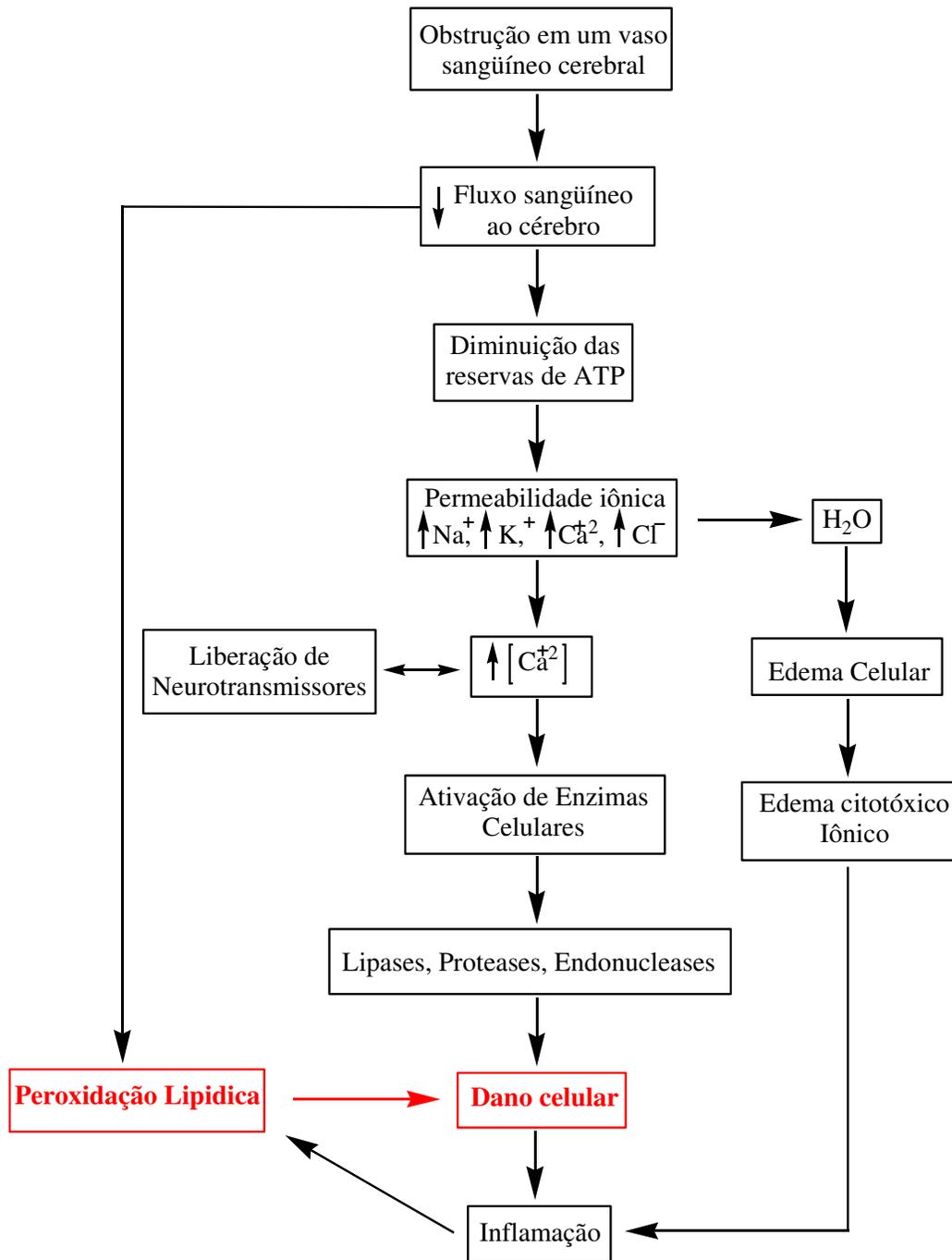
### **2.3.3 Isquemia Cerebral**

Isquemia é definida como sendo o fluxo arterial insuficiente para manter as funções normais teciduais, isto é, a diminuição de nutrientes (glicose, oxigênio, proteínas, vitaminas, enzimas, etc) para os tecidos e o retardo na retirada dos metabólitos. A isquemia pode ser total quando o fluxo arterial for insuficiente para manter a vida celular ou tecidual, ou parcial que mantém a viabilidade celular, porém com risco de evoluir para a morte celular, dependendo da nobreza do tecido e do tempo em isquemia. Já a hipóxia é somente a diminuição de oferta de oxigênio aos tecidos, mas também pode ser lesiva (D'ALECY et al., 1990).

As doenças cerebrovasculares têm grande impacto sobre a saúde da população, situando-se, conforme o ano e o Estado da Federação, entre a primeira e terceira principal causa de mortalidade no Brasil (300.000 mortes/ano). Estas doenças são compostas por grupo heterogêneo de transtornos vasculares de diferentes etiologias. Estima-se que cerca de 85% dos acidentes vasculares encefálicos são de origem isquêmica e 15% hemorrágicos. Dentre os hemorrágicos, cerca de 10% são hemorragias intraparenquimatosas e 5% hemorragias subaracnóideas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DOENÇAS CEREBROVASCULARES, 2008).

A isquemia cerebral caracteriza-se pela redução severa ou bloqueio completo do fluxo sanguíneo ao cérebro. O cérebro é altamente vulnerável à lesão isquêmica, por ser extremamente dependente do fluxo contínuo de sangue, para suprimento de oxigênio e glicose, devido a sua elevada taxa metabólica. Síndromes isquêmicas têm uma taxa de mortalidade de 30% e é a terceira maior causa de morte em países em desenvolvimento e industrializados (DIRNAGL et al., 1999).

Uma das conseqüências da isquemia cerebral é a neurodegeneração, que pode levar ao comprometimento das aptidões físicas e/ou mentais dos seres humanos.



**Esquema 3:** Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de isquemia cerebral (BUZIN et al., 2006).

Há vários mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de injúria cerebral isquêmica, tais como excitotoxicidade, produção de óxido nítrico, processo inflamatório, produção de radicais livres e morte celular programada (apoptose). No esquema 3, pode-se verificar como estão relacionados alguns destes mecanismos com o processo de morte celular (BUZIN et al., 2006).

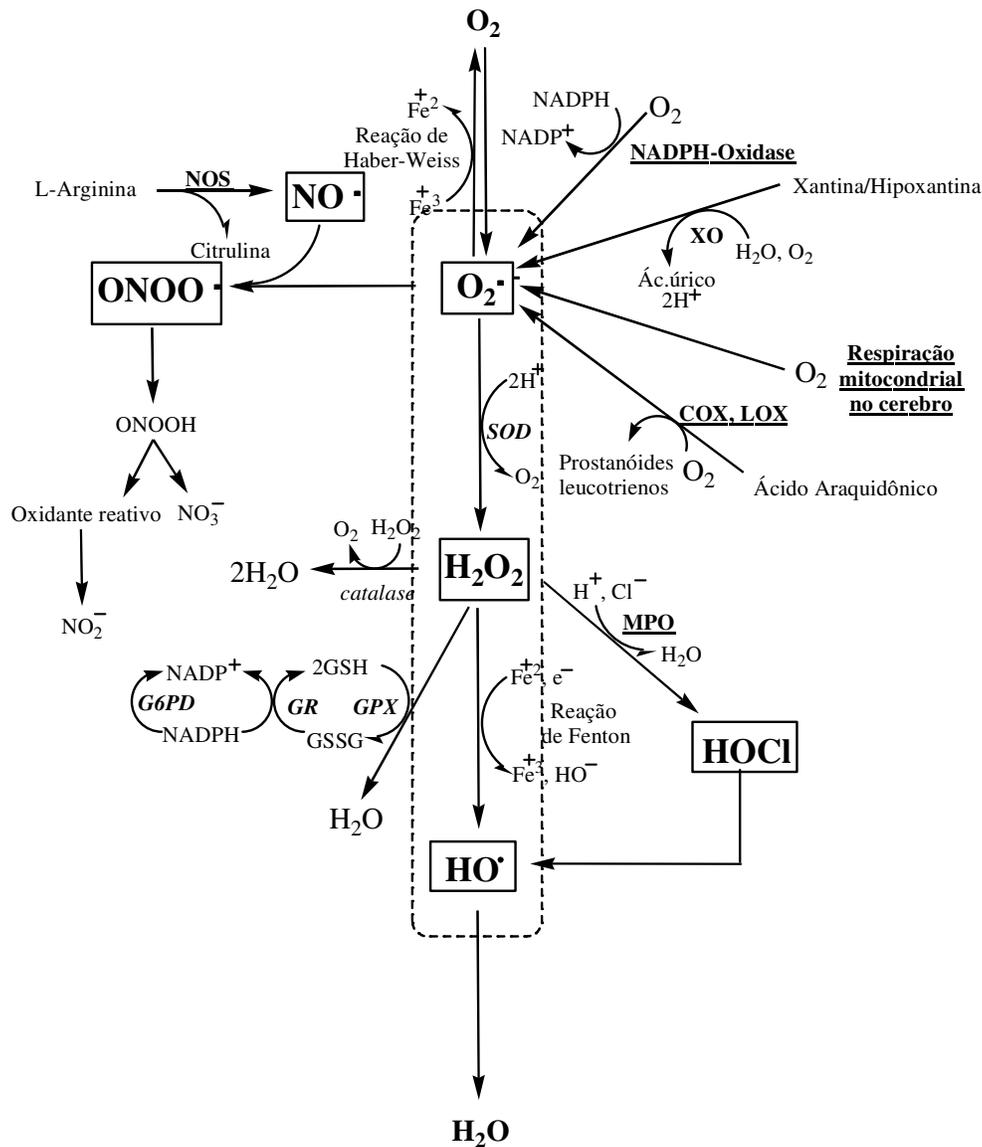
A causa mais comum de isquemia cerebral no ser humano é a oclusão da artéria silvian, igualmente chamada de artéria cerebral média (ACM). E modelos experimentais de isquemia cerebral focal consistem na oclusão permanente ou transitória da ACM (MARGAILL et al., 2005).

Segundo Dringen, (2000) o cérebro quando comparado a outros órgãos, parece ser particularmente mais vulnerável ao estresse oxidativo devido aos seguintes aspectos: (1) as células do cérebro humano utilizam 20% do oxigênio consumido pelo corpo, mas constitui somente 2% do peso corpóreo total, indicando que o cérebro gera muito mais radicais livres do que os outros tecidos, (2) várias regiões do cérebro contem concentrações elevadas de ferro, que podem catalisar a geração de radicais livres, (3) o cérebro é rico em lipídios com ácidos graxos insaturados, alvos para a peroxidação lipídica.

#### **2.3.4 Mecanismos de produção de radicais livres após isquemia cerebral**

No tecido cerebral normal, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio (água oxigenada), radical hidróxil, e ânion peroxinitrito são balanceadas por defesas antioxidantes que atuam através de: sistemas enzimáticos endógenos (superóxido dismutase ou SOD, glutathione peroxidase ou GPX, catalase) e por sistemas não enzimáticos (por exemplo, glutathione, ácido úrico, vitaminas C e E).

Assim, a SOD representa a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, catalisando a reação da dismutação do anion superóxido à água oxigenada, visto que GPX e a catalase protegem as células dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio catalisando sua decomposição em água sem produção de radical livre. Entretanto, após a isquemia e em particular a reperfusão cerebral, a produção de radical livre é aumentada drasticamente e suprime os sistemas antioxidantes endógenos, conduzindo a um desequilíbrio do sistema. Esta produção elevada de radical livre pode ser gerada por várias rotas bioquímicas como pode ser observado no esquema 4, onde o que esta representado na forma sublinhada mostra as enzimas e vias que são próoxidantes (contribuem para a formação de radicais livres), em **negrito** e nas caixas as principais espécies reativas formadas e em *itálico* as enzimas antioxidantes presentes no meio biológico (LIPTON, 1999).



**Esquema 4:** Mecanismos de produção de radicais livres após isquemia cerebral adaptado de MARGAILL et al., 2005.

### 2.3.5 Efeito de estratégias antioxidantes em dano cerebral pós-isquêmico

Os radicais livres constituem um alvo terapêutico importante na isquemia, onde várias estratégias antioxidantes foram desenvolvidas em modelos de isquemia cerebral focal. Estas estratégias consistem em inibir a produção de radical livre, em sequestrar os radicais livres, ou em aumentar sua degradação. O uso de ratos geneticamente modificados contribuiu igualmente para uma melhor compreensão do papel do estresse oxidativo e de estudos farmacológicos usando estratégias antioxidantes na isquemia cerebral (MARGAILL et al., 2005).

### 2.3.5.1 Inibição da produção de radical livre

Entre as moléculas que impedem a formação de radicais livres, estão os inibidores de XO, tais como o alopurinol ou o oxipurinol, os quais reduziram o tamanho do infarto e do edema na isquemia cerebral (LINDSAY et al., 1991). Os inibidores de COX 2, NS-398 e a nimesulida, apresentaram também efeito neuroprotetor demonstrado após a isquemia transitória e permanente sugerindo que a inibição de COX 2 possa representar uma estratégia terapêutica interessante no tratamento da isquemia (CANDELARIO-JALIL et al., 2004).

### 2.3.5.2 Seqüestro de radicais livres

Em conjunto com esses inibidores, o uso de antioxidantes é a estratégia mais usada e consiste no seqüestro de radicais livres. Estes compostos incluem tiolatos, tais como o ácido lipóico e a precursora da glutathione, *N*-acetilcisteína (NAC), que é capaz de reduzir o volume da lesão pós-isquêmica. O ácido lipóico exerce seu efeito antioxidante pelo seqüestro de radicais hidróxil, superóxido, e óxido nítrico. Os quelatos de metais de transição e outros antioxidantes, tais como a vitamina E e C, elevam os níveis intracelulares de glutathione. A NAC está relacionada ao seqüestro eficaz de espécies reativas de oxigênio, tais como radical hidróxil, peróxido de hidrogênio e radicais peroxil, e aumentar a taxa de síntese endógena de glutathione (CLARK et al., 2001).

Para citar como exemplo, Carroll et al. (1998) mostraram uma redução de 49 ou de 29% do tamanho da lesão, quando a NAC é administrada previamente ou após a reperfusão, sugerindo que o estresse oxidativo que ocorre durante a reperfusão exerce efeito deletério mais importante do que durante a isquemia. Um estudo recente demonstrou que a administração da NAC protege o cérebro da lesão do radical livre com uma janela terapêutica de até 6 horas de eficácia após a reperfusão, e esta neuroproteção é associada com os níveis elevados de glutathione (KHAN et al., 2004).

O ácido úrico é um dos antioxidantes mais importantes no plasma e é um sequestrante muito poderoso de peroxinitrito. Assim, Yu et al. (1998) mostraram uma redução de 70-80% no tamanho do infarto, quando o ácido úrico foi administrado em dose única 24 h antes da oclusão ou 1 h depois da reperfusão, sugerindo um papel importante para anions peroxinitrito no dano cerebral pós-isquêmico (YU et al., 1998).

Takamatsu et al. (1998) sugeriram que o período mais crítico de formação de radical hidróxil para dano cerebral isquêmico pode ocorrer a poucas horas após a isquemia (reperfusão). Outros compostos, como os hidroxistilbenos, compostos

polifenólicos naturais, são igualmente conhecidos por suas propriedades sequestrante de radical livre. O resveratrol (3,5,4'-trihidroxistilbeno), um dos componentes principais do vinho vermelho, principal representante desta classe, atua impedindo a peroxidação lipídica. E dados de dois estudos demonstraram que este composto poderia reduzir o tamanho do infarto cerebral (SINHÁ et al., 2002).

O efeito neuroprotetor da edaravona foi avaliado em diversos modelos de isquemia cerebral e dois estudos relataram que um tratamento com este composto reduziu o aumento dos níveis do anion superóxido e do radical hidróxil induzidos após a isquemia (SHICHINOHE et al., 2004).

### **2.3.5.3 Aumento da degradação do radical livre**

A terceira estratégia farmacológica antioxidante consiste em destacar a degradação do radical livre. Por 15 anos, o efeito neuroprotetor da SOD e da catalase foi relatado após a isquemia sob diferentes formas. Recentemente, estudos compararam a neuroproteção de moléculas sintéticas com atividade catalítica comparável a destas enzimas. Baker et al. (1998) consideraram que a substância EUK-134, um quelato de cloro-manganês, possui atividade semelhante à SOD e a catalase.

O ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3 (2H)-ona) mimetiza o efeito de GPX, uma das enzimas principais responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos no cérebro, e ao lado desta atividade, pode igualmente inibir a peroxidação lipídica com a inibição da lipoxigenase, e da NADPH oxidase (SCHEWE et al., 1995).

Com base nos estudos relatados, o foco deste trabalho é o estudo da reatividade e propriedades da edaravona frente aos radicais livres e o estudo de seu mecanismo de ação, para então promover o planejamento de novos compostos antioxidantes que possuem uma maior atividade, com o intuito de planejar e desenvolver compostos com eficácia elevada em baixas doses e toxicidade reduzida, que ao mesmo tempo possam penetrar a barreira hematoencefálica (BH) com maior facilidade, a qual é certamente a principal barreira que separa o microambiente cerebral do sangue, ou seja, novos derivados da edaravona que possuam principalmente melhores características farmacocinéticas e uma maior facilidade na doação de elétrons e/ou hidrogênio frente aos radicais livres gerados durante o processo isquêmico.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Geral

Planejar novos derivados da edaravona com atividade antioxidante.

#### 3.2. Específicos

- Realizar um estudo teórico do tautomerismo da edaravona.
- Estudar o mecanismo de ação antioxidante da edaravona.
- Diferenciar a capacidade antioxidante entre 3-metil-2-pirazolin-5-ona (edaravona), 2,3-dimetil-3-pirazolin-5-ona (antipirina), ácido 1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolona-4-metilaminometanosulfônico (dipirona) e 1,2-difenil-pirazolin-3,5-diona (fenilbutazona).
- Realizar um estudo da relação entre estrutura química e atividade antioxidante da edaravona e seus derivados.
- Propor novos derivados da edaravona com maior capacidade antioxidante.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Estudo Teórico dos Derivados da Edaravona

Inicialmente foram realizados cálculos teóricos de derivados da edaravona descritos na literatura (NAKAGAWA et al., 2006) e nos derivados propostos, para determinação da estrutura geométrica e obtenção de parâmetros moleculares. O método semi-empírico PM3 (Terceira Parametrização) (STEWART, 1989) foi empregado para otimização da geometria e obtenção de parâmetros teóricos. Todos os cálculos foram realizados nos computadores do Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

As propriedades físico-químicas foram calculadas com a finalidade de determinar na estrutura química possíveis sítios ou formas de reação com os radicais livres e os fatores que podem afetar as propriedades de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) dos derivados, entre as quais o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), o orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO), o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (CLogP) e a energia de hidratação (EH) (CHANG e SWAAN, 2006). Estes cálculos foram realizados utilizando os programas computacionais Hyperchem 7.5 (2002) e ChemOffice (2005) em plataformas *Windows XP Professional* e processadores pentium IV.

Os cálculos de teoria do funcional de densidade (TFD) foram empregados também nas determinações da geometria e propriedades físico-químicas (PARR et al., 1989), usando o conjunto de base 6-31 G\* (HENRE, 1986). Somente as conformações mais estáveis para as moléculas estudadas foram utilizadas. Os descritores de reatividade calculados foram: potencial de ionização (PI), energia de dissociação da ligação XH ( $EDL_{XH}$ ) onde X pode ser C, N, O ou S, energia de estabilização do radical ( $\Delta E_{iso}$ ) e densidades de spin. Nesta etapa, os cálculos foram realizados utilizando os programas computacionais Gaussview e Gaussian 2003 (FRISCH et al., 2004).

#### 4.1.1 Energia dos Orbitais de Fronteira (HOMO e LUMO)

O HOMO é o orbital molecular ocupado de maior energia e está diretamente relacionado com a capacidade de doar elétrons, podendo ser utilizado para caracterizar o composto como nucleofílico. A maior ou menor nucleofilicidade estão relacionadas com o menor ou maior valor em módulo, respectivamente. Enquanto que o LUMO é o orbital molecular desocupado de mais baixa energia, sendo diretamente relacionado com a capacidade de receber elétrons, indicando a possibilidade de reagir como um eletrófilo. A maior ou menor eletrofilicidade estão relacionadas com o maior ou menor

valor em módulo, respectivamente. Os Valores de HOMO e LUMO são expressos em elétron-volt (eV) (KOROLKOVAS, 1978).

Estes parâmetros estão relacionados com as regiões ricas ou deficientes em elétrons presentes na estrutura química de um derivado, que podem reagir com radicais livres contendo elétron desemparelhado. É um importante parâmetro que contribui para uma maior compreensão da reatividade química de um candidato com atividade antioxidante (KUBINYI, 2002).

#### **4.1.2 Logaritmo do Coeficiente de Partição (CLog P)**

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

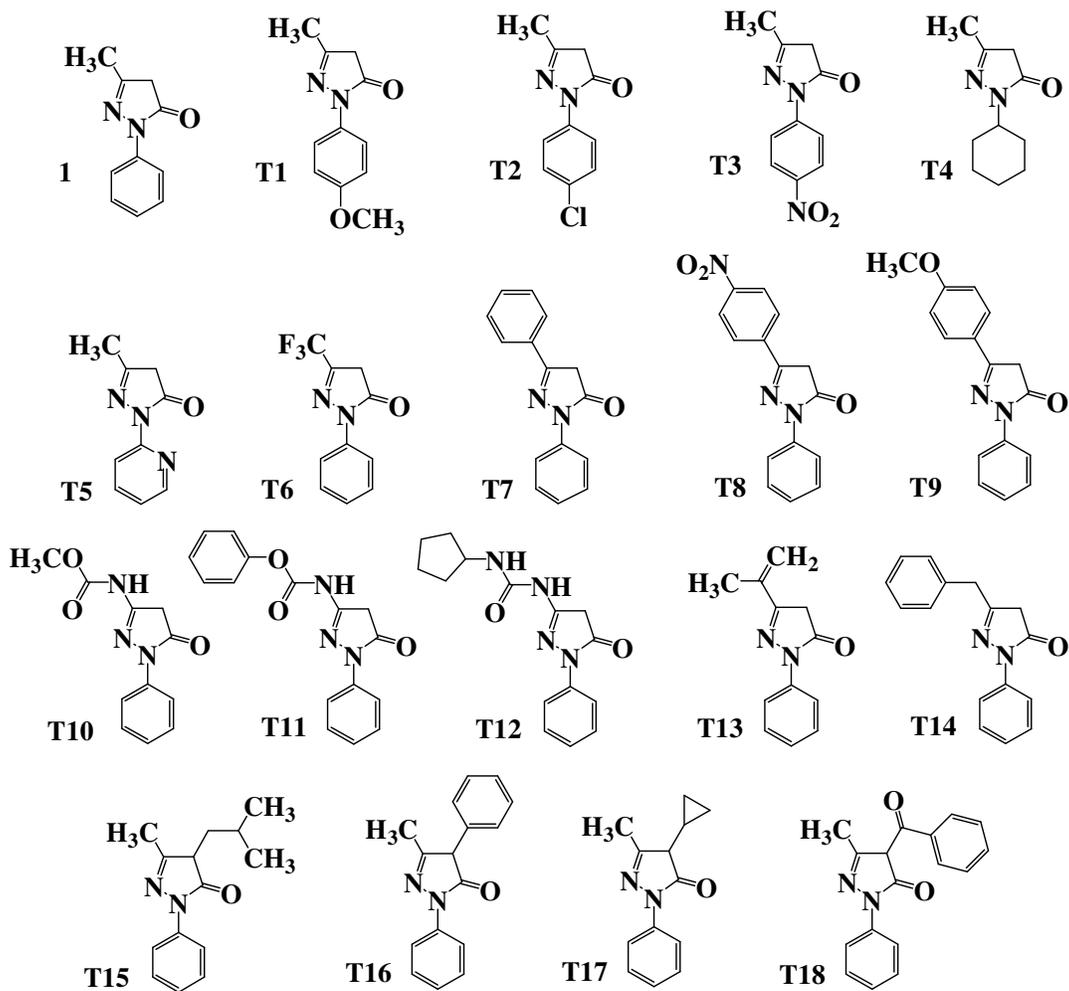
#### **4.1.3 Energia de Hidratação (EH)**

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

### **4.2. Conjunto de Compostos Estudados**

As moléculas em estudo foram selecionadas de estudos anteriores (NAKAGAWA et al., 2006) denominadas de moléculas “T” (conjunto de treinamento)

e receberam a numeração de T1 até T18, onde a molécula de número 1 é representada pela edaravona (Figura 6). A partir dos estudos teóricos nesses compostos foram selecionadas as propriedades com maior relevância para a proposição de derivados com maior facilidade de obtenção sintética na fase de planejamento de compostos mais potentes.



**Figura 6:** Derivados utilizados nos estudos de modelagem molecular.

#### 4.3 Estudo Teórico de Derivados da Edaravona no Seqüestro de Radicais Livres

Os métodos teóricos foram aplicados com sucesso na predição da capacidade antioxidante e determinação de sua estrutura farmacofórica no LQFM (QUEIROZ et al., 2009), pelo método TFD, usando o funcional híbrido B3LYP (BECKE et al., 1993; LEE et al., 1998) e o conjunto de base 6-31G(d) (HEHRE, 1986). Os derivados da edaravona (*EPirXH*) e seus tautômeros (onde X esta representado por C, N e O), funcionaram

como doadores de elétrons (Eq. 3) ou hidrogênio (Eq. 4), cujos resultados foram correlacionados com os diferentes mecanismos de seqüestro de radicais livres.



Os métodos teóricos utilizados para predição da capacidade antioxidante *in silico* estão relacionados diretamente com a reatividade e estabilidade química da edaravona e seus derivados frente aos radicais livres principalmente o radical hidroxil, ou seja, o potencial de ionização (PI) o qual esta envolvido na doação de elétrons pela molécula, energia de dissociação da ligação XH ( $EDL_{XH}$ ) envolvido na doação de hidrogênio e a energia de estabilização do radical formado ( $\Delta E_{iso}$ ) envolvido com a habilidade do composto em estabilizar o radical semiquinona formado, onde os resultados foram sempre comparados com os valores correspondentes a molécula da edaravona.

Para estes cálculos são necessários métodos teóricos mais precisos como o TFD que demandam maior tempo computacional utilizando as bases B3LYP e UB3LYP, resultados alcançados com sucesso segundo metodologias já empregadas por Querioz et al., 2009, Diniz et al. (2004) e Alves et al. (2006). Nesta etapa, os cálculos foram realizados utilizando os programas computacionais Gaussview e Gaussian 2003 (FRISCH et al., 2004).

#### 4.3.1. Cálculo do Potencial de Ionização (PI)

O potencial de ionização foi calculado a partir das energias de retirada de um elétron. O cálculo do potencial de ionização foi realizado pela diferença entre a energia da molécula neutra e o respectivo cátion radical (Equação 5).

$$PI = [EPirXH^{\bullet+}] - [EPirXH] \quad (\text{Eq 5})$$

#### 4.3.2. Energia de Dissociação da Ligação ( $EDL_{XH}$ )

A energia de dissociação da ligação XH ( $EDL_{XH}$ ) foi calculada pela diferença entre a molécula neutra e sua respectiva semiquinona mais o radical hidrogênio (Equação 6),

$$EDL_{XH} = [EPirX^{\bullet} + EH^{\bullet}] - [EPirXH] \quad (\text{Eq 6})$$

#### 4.3.3. Energia de Estabilização do Radical Formado ( $\Delta E_{iso}$ ).

A energia de estabilização do radical formado foi calculada pela diferença entre a edaravona (Eda) e seus derivados (Pir) nas formas semiquinona e neutra (Equação 7).

$$\Delta E_{iso} = [EEda^{\bullet} + EPirH] + [EEdaH + EPir^{\bullet}] \quad (\text{Eq 7})$$

Todos os cálculos foram executados em fase gasosa com a proposta de obter as propriedades intrínsecas dos tautômeros e dos derivados estudados e propostos. O efeito do solvente foi calculado para o estudo do tautomerismo da edaravona, em presença de água ou metanol usando o método teórico de cálculo PCM (Meio Contínuo Polarizável) (COSSI et al., 1998) através do programa Gaussian 03W.

Os estudos são complementados pela análise de distribuição de spin, devido à finalidade de localizar as posições e os grupos responsáveis pela maior ou menor estabilidade do radical livre formado e/ou contribuição para a estabilização do elétron desemparelhado (DINIZ et al., 2004). Estes estudos, juntamente com o cálculo de barreira de energia, foram significativos para expressar a reatividade química dos derivados e através de modelos experimentais de reação com radical hidroxil para os estudos de atividade seqüestrante deram maior suporte na elucidação do provável mecanismo de ação da edaravona, os quais foram importantes para o planejamento de novos derivados mais ativos.

#### **4.4. Capacidade Antioxidante da Edaravona 1, Antipirina 2, Dipirona 5 e Fenilbutazona 6.**

##### **4.4.1 Difenilpicril-hidrazil radical (DPPH)**

Para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* dos compostos derivados da edaravona com propriedades moleculares de doadores de hidrogênio (principal) e/ou elétrons frente ao radical DPPH, foram misturados 200µL de cada diluição do derivado (solução metanólica), partindo de uma concentração de 20mg/mL, com 1800µL de solução metanólica de DPPH a 0,04mM. A mudança na absorvância foi medida em 517 nm após 5 minutos os testes foram realizados em triplicata, de acordo com Blois (1958).

##### **4.4.2 ABTS (TEAC)**

Este método proposto é adaptado de Re et al., (1999). O método baseia-se na geração do radical pré-formado monocation de 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) através da oxidação de ABTS com persulfato de potássio e pela redução desse radical na presença dos derivados com poder antioxidante doadores de elétrons. A técnica envolve a produção direta do cromóforo ABTS<sup>•+</sup> azul/verde reagindo a solução estoque de ABTS (7mM) com persulfato de potássio (2,45nM). A solução deve permanecer a temperatura ambiente protegida da luz por 12-16 horas antes do uso. O radical nesta forma é estável por mais dois dias quando armazenado nessas condições. A

absorção padrão em comprimento de onda é de 734 nm, com o intervalo de absorbância de 0,770-0,800, concentração de radical ideal para a análise (RE et al., 1999). A solução de ABTS<sup>•+</sup> e dos derivados da edaravona foi diluída em metanol, onde foram usados 1800µL de ABTS<sup>•+</sup> com 200µL de cada diluição dos derivados (concentração de partida de 20mg/mL), realizando a leitura no intervalo de 1 minuto durante 5 minutos, todos realizados em triplicata.

#### 4.5. Análise Estatística

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da média e analisados pela análise de variância (ANOVA) com o teste a posteriori *T-Student*. Os valores são apresentados em gráficos através de valores percentuais de inibição. Os valores da IC<sub>50</sub> foram calculados usando-se pelo menos três dosagens dos compostos, através da regressão linear usando o software apropriado Statistica® e BioEstat® 5.0. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significativas foi de  $p < 0,05$ .

#### 4.6. Materiais, Equipamentos e Vidrarias

Espectrofotômetro Spectrum UV-Vis; Balança analítica – Bioprecisa; Becker de 50 mL e 250 mL; Erlenmeyer de 125 mL, 250 mL e 500 mL; placa de Petri; provetas de 5 mL, 20 mL e 100 mL; micropipetas – Labmate- de 100 µL a 1000 µL; bastão de vidro; 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) e edaravona foram obtidos pela Sigma-Aldrich, antipirina – Merck Co, dipirona e fenilbutazona foram obtidas da Boehringer-Ingelheim; 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS<sup>•</sup>) – Fluka-; persulfato de potássio - Sigma-Aldrich-; metanol e etanol- Nuclear.

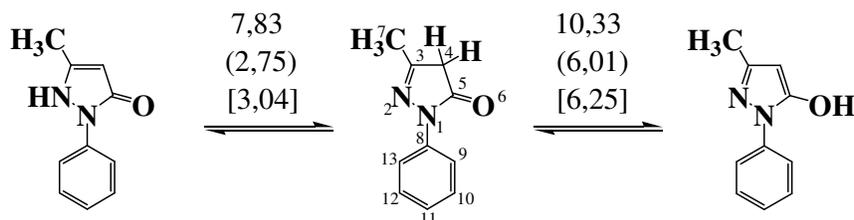
### 5. Resultados e Discussão

#### 5.1. Tautomerismo da Edaravona

Em 2003 Wang e Zhang demonstraram através do método DFT que o mecanismo de sequestro do radical DPPH (DPPH<sup>•</sup>) pela edaravona é devido à abstração do átomo de hidrogênio presente na posição C<sub>4</sub> e não da posição C<sub>7</sub>, devido a energia de dissociação da ligação C<sub>7</sub>-H ser muito mais alta que a ligação C<sub>4</sub>-H sendo esta última a mais favorável. A formação dos tautômeros não foi levada em consideração, através dos cálculos das energias de dissociação das ligações enamina N-H (EDL<sub>NH</sub>) e hidroxila O-H (EDL<sub>OH</sub>) por considerarem essas formas tautoméricas instáveis.

Entretanto os autores em seus estudos teóricos não consideraram também a influência da polaridade do meio, ou seja, o efeito do solvente e a energia de protonação da edaravona, presente no processo isquêmico, os quais são fatores importantes para a formação e estabilização dos possíveis tautômeros, o que pode contribuir para um melhor entendimento do mecanismo antioxidante da edaravona.

Em nossos resultados os valores de  $EDL_{NH}$  e  $EDL_{OH}$  correspondentes para as posições 2 e 6, respectivamente, foram relacionados com o valor de  $EDL_{CH}$  correspondente para a posição 4, como descrito na tabela 2. Os cálculos inicialmente realizados fase gasosa, mostrou que a barreira relativa de energia entre os tautômeros C-H e N-H ou O-H foram de 7,83 e 10,33 kcal/mol respectivamente (Esquema 5), estando de acordo com Wang e Zhang 2003, ou seja, os tautômeros N-H e O-H são mais dificilmente formados.

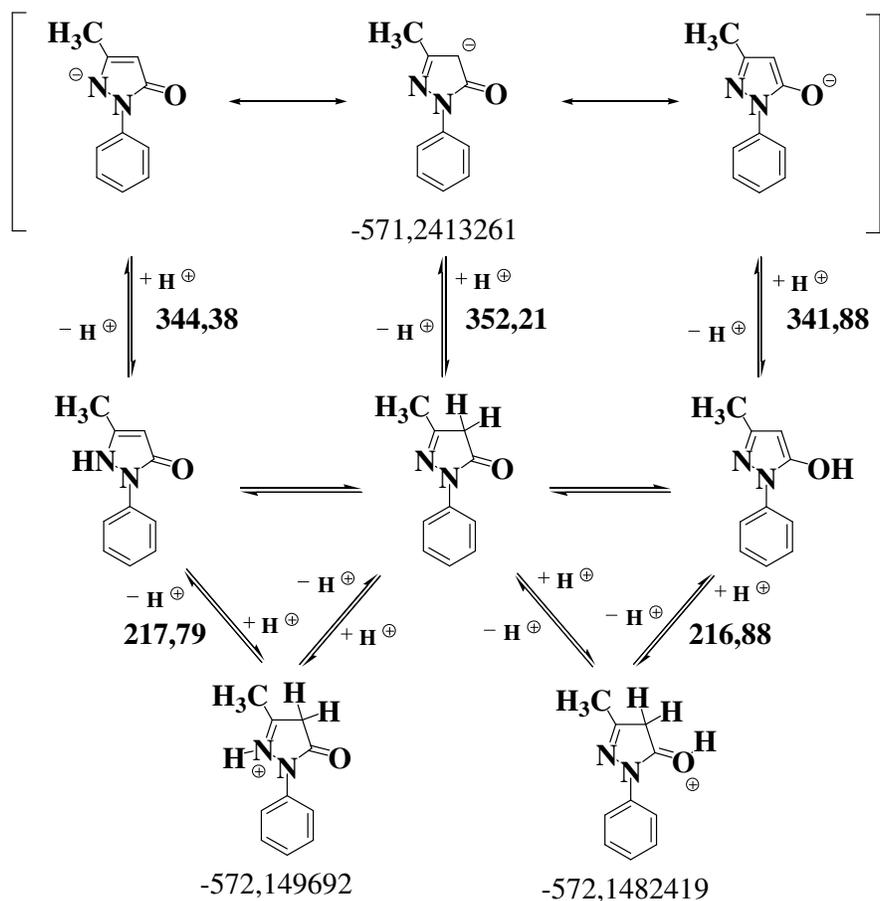


**Esquema 5.** Barreira de energia entre os tautômeros C-H e N-H ou O-H calculados pelo método PCM/TFD/B3LYP 6-31G(d) em Fase Gasosa, (Água) e [Metanol].

No entanto, com a utilização do método PCM, que leva em consideração o efeito do solvente, ocorreu uma diminuição na barreira de energia para a formação dos tautômeros N-H e O-H. Os valores obtidos em meio aquoso foram 2,75 e 6,01 kcal/mol, enquanto que em metanol foram 3,04 e 6,25 kcal/mol, respectivamente. Portanto, o efeito do solvente diminuiu a barreira de energia para a tautomerização da edaravona.

Além do efeito do solvente, as condições ácidas ou básicas favorecem a tautomerização de moléculas. A tautomerização da edaravona está envolvida na atividade sequestrante de radical livre durante a isquemia (OHARA et al., 2006). A forma anionica da edaravona é reportada por ser a forma ativa de seqüestro de radicais livres pelo mecanismo de transferência de elétrons (WATANABE et al., 1997). Nakagawa et al. 2006 demonstrou que a eficiência da atividade antioxidante foi devida um aumento de sua forma anionica como forma ativa. Entretanto, a isquemia resulta em uma marcada redução do pH tecidual pela geração de ácido láctico aumentando a concentração de prótons do meio (YANGZHONG e MCNAMARA, 2004).

A energia de protonação calculada foi de 216,88 e 217,79 kcal/mol para a protonação do átomo de O e N, respectivamente. No entanto, a energia de desprotonação para gerar as respectivas formas anionicas foi de 341,88 e 352,21 kcal/mol. Consequentemente a protonação é mais favorecida termodinamicamente. Estes valores são mostrados no esquema 6.



**Esquema 6.** Formas tautoméricas, formas anionicas e cationicas da edaravona por catálise ácida e básica determinadas pelo método TFD/B3LYP 6-31G(d).

Entretanto, como mostrado no esquema 6, não há diferença significativa entre as energias de protonação da edaravona para a protonação no átomo de N ou O (< 1 kcal/mol). Esses grupos são elétrons doadores e podem facilitar a protonação do anel pirazolona, reduzindo a barreira de energia para formação dos tautômeros. A formação dos tautômeros deve ocorrer melhor em meios polares e próticos como o meio aquoso (principal meio presente nas reações biológicas) facilitando com isso a protonação da edaravona.

Conseqüentemente é possível que na isquemia o tautômero mais ativo seja o N-H devido possuir uma menor energia para doar o átomo de hidrogênio e sua formação serem favorecida pela condição do meio polar e protonado presente no processo isquêmico. Esses resultados são importantes para o planejamento de novos derivados da edaravona e para o estudo da estrutura e atividade do grupo pirazolona.

## **5.2. Mecanismo de Ação Antioxidante da Edaravona**

O efeito farmacológico da edaravona é decorrente de sua atividade sequestrante de radicais livres, devido sua eficiência no seqüestro do radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ) e DPPH radical ( $\text{DPPH}^\bullet$ ) (TABRIZCHI et al., 2000). Entretanto o verdadeiro mecanismo de seqüestro de radicais livres não está totalmente elucidado devido haver contradições entre os autores, ou seja, uns consideram a forma aniônica da edaravona (enolato) pelo mecanismo de doação de um elétron (WATANABE et al., 1997) como a forma ativa de seqüestro de radicais livres, e outros relataram que a atividade antioxidante da edaravona está relacionada com a doação de átomos de hidrogênio pelo C4 (C-H) do anel pirazolona (WANG e ZHANG, 2003). Conseqüentemente os autores em seus estudos não levaram em consideração alguns fatores importantes, tais como, o tautomerismo da edaravona e as influências químicas presentes no meio biológico que podem determinar o mecanismo antioxidante da edaravona, já mostrados anteriormente.

Os nossos resultados buscam elucidar qual o processo é mais favorecido no mecanismo antioxidante da edaravona (doação de hidrogênio e/ou elétron) e de que forma os tautômeros e as condições físico-químicas do meio biológico determinadas teoricamente (efeito do solvente e pH) podem influenciar em seu mecanismo e em sua atividade.

### **5.2.1. Abstração do Elétron**

A atividade antioxidante dos tautômeros C-H, N-H, e O-H da edaravona foram teoricamente determinados usando os valores da energia de HOMO. A energia de HOMO é um importante parâmetro eletrônico da estrutura molecular. As moléculas que possuem baixos valores de energia de HOMO têm fraca habilidade em doar elétrons. Ao contrário, altos valores de energia de HOMO implicam que a molécula é um bom doador de elétrons (ANTONCZAK, 2008). A disposição de HOMO nas moléculas pode indicar seus sítios ativos de seqüestro de radicais livres, qualitativamente devido a reação de abstração-H ocorrer após a transferência de elétron. Os valores de HOMO são mostrados na tabela 2.

Os tautômeros mostraram valores de HOMO em fase gasosa de -5,73 eV para o C-H, -5,80 eV para o O-H e -5,64 eV para o N-H. Consequentemente, os resultados dos cálculos mostram que o tautômero N-H é mais nucleofílico que o tautômero C-H e O-H, ou seja, apresenta uma melhor capacidade doadora de elétrons.

**Tabela 2.** Propriedades eletrônicas dos tautômeros da edaravona determinadas pelo método TFD/B3LYP 6-31G(d).

<b>Propriedades</b>	<b>HOMO</b>	<b>LUMO</b>	<b>PI</b>	<b>EDL<sub>X-H</sub></b>
<b>Tautômeros</b>	<b>(eV)</b>	<b>(eV)</b>	<b>(kcal/mol)</b>	<b>(kcal/mol)</b>
C-H	-5,73	-0,87	173,04	82,14
O-H	-5,80	-0,22	174,52	71,81
N-H	-5,64	-0,84	171,81	74,31

Em 2009, Queiroz et al. demonstraram uma boa tendência na relação entre os valores de HOMO e o potencial de ionização (PI). Portanto resultados similares são esperados para o PI. De fato, como se podem observar na tabela 2, os valores de PI na fase gasosa para os tautômeros foram de 173,04 kcal/mol para C-H, 174,52 kcal/mol para O-H e 171,81 kcal/mol para N-H. Estes resultados estão coerentes com os valores de LUMO. Os resultados indicaram que no tautômero O-H houve um aumento nos valores de HOMO e PI, enquanto que no tautômero N-H ocorreu uma diminuição nos valores de HOMO e PI. Todos os cálculos mostraram que o tautômero N-H é mais nucleofílico que o tautômero C-H, e que em meio polar ocorre uma diminuição dos valores de PI e nesse meio os tautômeros N-H e O-H apresentaram melhores valores de HOMO do que o tautômero C-H. Consequentemente a doação de elétrons pode ser mais favorecida em solventes polares, tais como metanol e água, devido à transferência de elétron ser estabilizada pela transferência de carga entre o cátion radical formado e o solvente polar. Não obstante, as baixas diferenças de energia que existe entre os diferentes tautômeros, menores que 2 kcal/mol, fazem com que o segundo mecanismo de doação de átomo de hidrogênio seja investigado.

### 5.2.2. Abstração de Hidrogênio

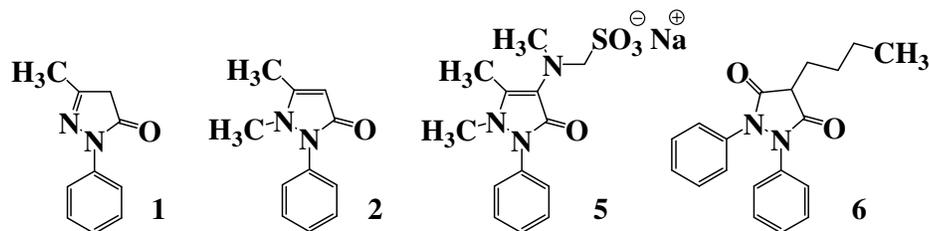
A energia de dissociação da ligação (EDL) para os tautômeros da edaravona foram calculados. A abstração de hidrogênio é o principal mecanismo antioxidante estudado (QUEIROZ et al., 2009; REIS et al., 2007, ALVES et al., 2006 e DINIZ et al., 2004). Portanto moléculas com menores valores de EDL serão as mais ativas.

Como se pode observar na tabela 2, os valores de  $EDL_{XH}$  para os tautômeros em fase gasosa foram de 82,14 kcal/mol para C-H, 71,81 kcal/mol para O-H e 74,31 kcal/mol para o tautômero N-H. Ao contrário da doação de elétrons, o tautômero O-H apresenta uma maior tendência para doação de hidrogênio. Os resultados mostram que o tautômero O-H apresenta um valor de EDL menor em aproximadamente 10 kcal/mol em relação a C-H, enquanto que tautômero N-H apresenta um valor de EDL menor em aproximadamente 8 kcal/mol em relação a C-H, demonstrando a maior barreira de energia para a saída de hidrogênio em relação a saída de elétron dos tautômeros. A doação de hidrogênio pelo tautômero C-H é dificultada por causa do carbono  $sp^3$  presente no grupo pirazolona. Portanto a  $EDL_{OH}$  é favorecida, enquanto que a  $EDL_{NH}$  é menos favorecida devido o impedimento estérico dos grupos metil e fenil. Os resultados mostram que a atividade antioxidante pode ser determinada principalmente pela estabilidade do radical semiquinona, gerado após a abstração de hidrogênio. A densidade de spin determinada está de acordo com a literatura (WANG e ZHANG, 2003).

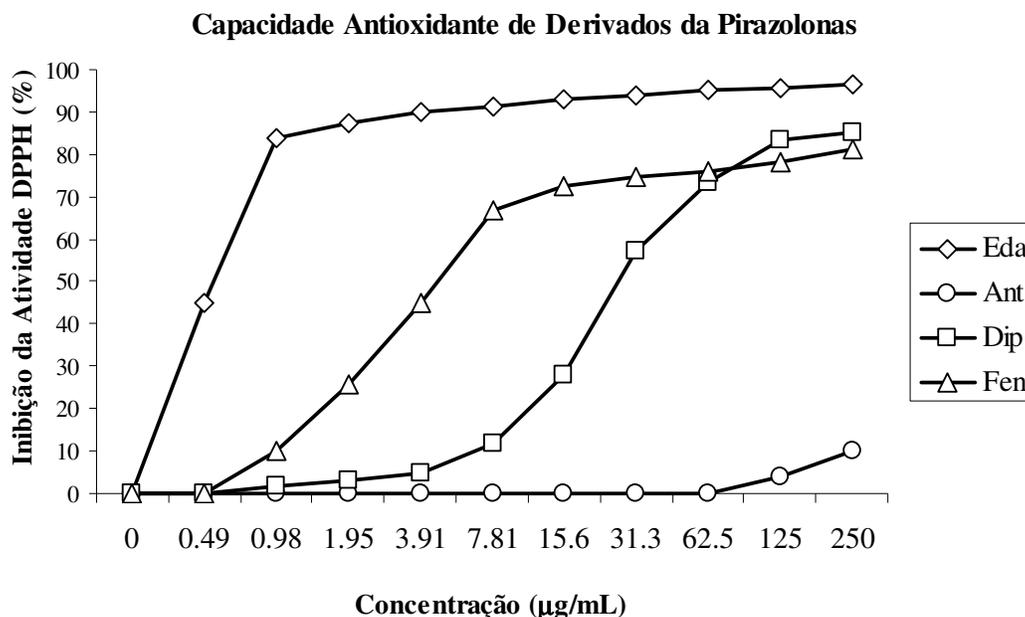
### 5.3. Capacidade Antioxidante de Edaravona, Antipirina, Dipirona e Fenilbutazona

#### 5.3.1 Difenilpicril-hidrazil radical (DPPH)

Neste estudo foram utilizados quatro derivados das pirazolonas em diferentes concentrações mostrados na figura 7. Os compostos 1 e 6 (Edaravona e Fenilbutazona) foram usados para verificar a influência do carbonos  $sp^3$  da posição 4, pois após a abstração do hidrogênio desta posição, a carga radicalar pode entrar no sistema aromático conferindo planaridade, além da formação dos tautômeros O-H e N-H e consequentemente a capacidade doadora de hidrogênio. Enquanto que, o composto 2 e 5 (Antipirina e Dipirona) possuem na posição 4 carbono  $sp^2$  e grupos doadores de elétrons por indução (metil) e por ressonância (amina) respectivamente, verificando com isso a capacidade doadora de elétrons.



**Figura 7:** Derivados das pirazolonas utilizados para capacidade antioxidante (Edaravona **1**, Antipirina **2**, Dipirona **5** e Fenilbutazona **6**).

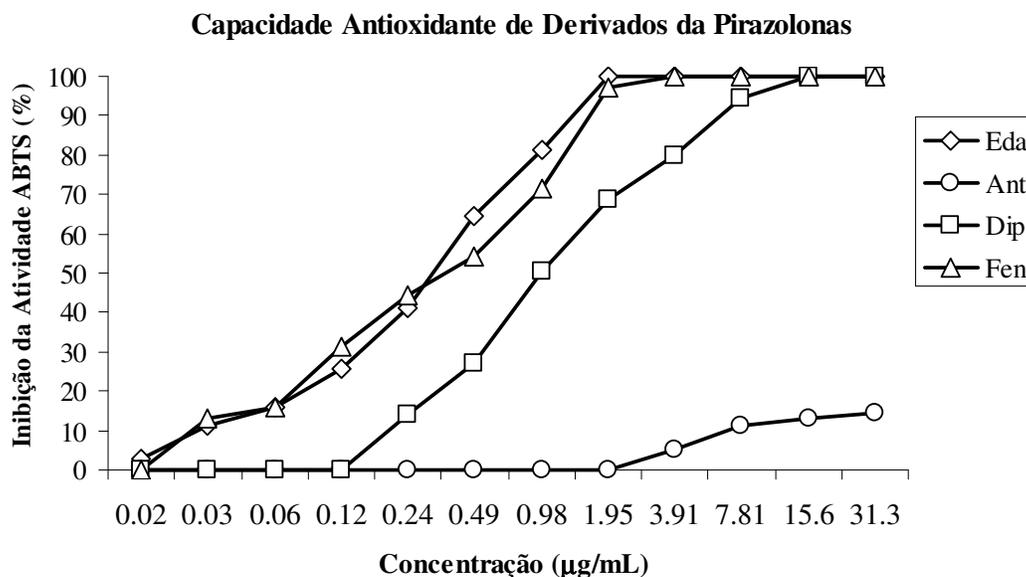


**Gráfico 1:** Avaliação da capacidade sequestrante de derivados da pirazolona em diferentes concentrações em solução metanólica contra radical DPPH. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados são mostrados em valores percentuais de inibição, sendo edaravona (Eda), antipirina (Ant), dipirona (Dip) e fenilbutazona (Fen).

Os resultados da capacidade antioxidante dos derivados da pirazolona através da inibição percentual do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, descritos no gráfico 1, mostram diferenças na reatividade molecular. A  $IC_{50}$  calculada para a edaravona foi de  $0,5\mu\text{g/mL}$  apresentando uma capacidade de inibição dez vezes superior a fenilbutazona ( $IC_{50} = 5,3\mu\text{g/mL}$ ) e quase setenta vezes superior a dipirona ( $IC_{50} = 36,1\mu\text{g/mL}$ ) neste modelo de avaliação, enquanto que a antipirina demonstrou baixa capacidade de inibição com uma  $IC_{50}$  maior que  $250\mu\text{g/mL}$ . Os valores de  $p$  foram menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 ABTS (TEAC)

Neste estudo, os derivados da pirazolona mostrados na figura 7 foram usados para verificar, diferentemente do sequestro do radical DPPH, a capacidade doadora de elétrons pelas moléculas. Os resultados da capacidade antioxidante dos derivados da pirazolona, através da inibição percentual do radical livre 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico), mostraram que a edaravona apresentou uma  $IC_{50}$  de  $0,35\mu\text{g/mL}$  sendo a mais ativa nesse modelo.



**Gráfico 2:** Avaliação da capacidade sequestrante de derivados da pirazolona em diferentes concentrações em solução metanólica contra radical ABTS. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados são mostrados em valores percentuais de inibição, sendo edaravona (Eda), antipirina (Ant), dipirona (Dip) e fenilbutazona (Fen).

Surpreendentemente, a fenilbutazona teve uma  $IC_{50} = 0,40\mu\text{g/mL}$  com uma diferença de apenas  $0,05\mu\text{g/mL}$  em relação à edaravona, podendo ser explicada possivelmente por estar na forma aniônica (fenilbutazona) tendo uma maior facilidade na doação de elétrons. A dipirona apresentou um aumento considerável em relação ao modelo de inibição de DPPH (doação de hidrogênio), ou seja, sua  $IC_{50}$  no modelo de inibição de ABTS (doação de elétrons), foi de  $0,96\mu\text{g/mL}$ . Estes valores estão descritos no gráfico 2. A antipirina demonstrou baixa capacidade de inibição com uma  $IC_{50}$  maior que  $100\mu\text{g/mL}$ . Os valores de  $p$  foram menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4. Relação Estrutura Química e Atividade Antioxidante de Derivados da Edaravona

A relação estrutura química e atividade antioxidante dos quatro derivados da pirazolona, contendo na posição 4 carbonos  $sp^3$  e capacidade doadora de hidrogênio (edaravona **Eda** e fenilbutazona **Fen**) e os compostos 2 e 5 (antipirina **Ant** e dipirona **Dip**) contendo na posição 4 carbono  $sp^2$  e grupos doadores de elétrons por indução (metil) e por ressonância (amina) respectivamente, e capacidade doadora de elétron, avaliados através do modelo de inibição do radical DPPH e ABTS foram comparados com seus valores de HOMO, potencial de ionização e  $EDL_{XH}$  calculados pelo método TFD usando o funcional B3LYP e UB3LYP, com a base 6-31G\*, tendo esta

metodologia sido empregada com sucesso no trabalho de Borges, 2007, conforme apresentados na tabela 3.

**Tabela 3:** Capacidade antioxidante, HOMO, PI e EDL<sub>XH</sub> de derivados pirazolonicos pelo método TFD.

Derivados	IC <sub>50</sub> DPPH (µg/mL)	IC <sub>50</sub> ABTS (µg/mL)	HOMO (eV)	PI (kcal/mol)	EDL <sub>XH</sub> (kcal/mol)
Eda	0,50	0,35	-0,15	43,85	82,14
Ant	> 250	> 100	-5,62	170,49	–
Dip	36,1	0,96	-1,67	76,89	–
Fen	5,30	0,40	-1,28	61,89	87,72

Os resultados dos estudos de relação estrutura e atividade de derivados da pirazolona indicam que os compostos que demonstraram menor capacidade antioxidante apresentaram maiores valores em módulo de -5,62 (**Ant**) a -1,67 eV (**Dip**) para o HOMO. Os estudos teóricos têm mostrado uma relação entre os valores de HOMO e PI (QUEIROZ et al., 2009; ALVES et al., 2006 e DINIZ et al., 2004). De fato os valores do potencial de ionização foram de 170,49 (**Ant**) a 76,89 kcal/mol (**Dip**).

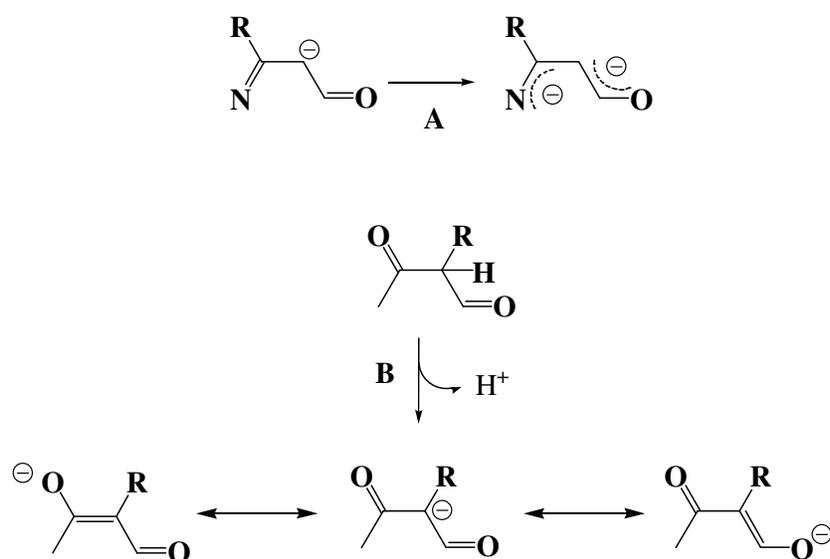
Estes valores mais elevados mostram a influência do carbono sp<sup>2</sup>, que contribui com a ressonância de elétrons no anel pirazolona e um deslocamento de elétrons para o anel fenil da posição 1 e para o grupo sulfonato, ou seja, diminui a nuvem eletrônica no anel pirazolona. Enquanto os compostos que demonstraram maior capacidade antioxidante, mostrando a importância do carbono sp<sup>3</sup>, que propicia a formação dos tautômeros ativos, melhorando com isso tanto a capacidade doadora de elétrons, quanto de hidrogênio.

Os valores de PI da **Eda** e **Fen** foram considerados pela doação de elétrons da molécula na forma ionizada, segundo a equação 8.

$$PI = [EPirX^*] - [EPirX^-] \text{ (Eq 8)}$$

Pelos resultados alcançados de correlação entre IC<sub>50</sub> e propriedades teóricas para a edaravona e fenilbutazona é possível que estas moléculas estejam em suas formas aniônicas. Consequentemente, o cálculo do PI com a molécula na forma ionizada foi realizado em virtude da falta de correlação do PI calculado pela molécula neutra. Adicionalmente, a ionização do composto permitiu a ressonância entre o carbono C4 com a carbonila, facilitando sua transformação em carbono sp<sup>2</sup>.

As moléculas edaravona (**Eda**) e fenilbutazona (**Fen**) apresentaram valores de -0,15 (**Eda**) a -1,28 eV (**Fen**) para o HOMO, 43,85 (**Eda**) a 61,89 kcal/mol (**Fen**) para o PI e 82,14 (**Eda**) a 87,72 kcal/mol (**Fen**) para a EDL<sub>XH</sub>, mostrando que a edaravona apresenta uma capacidade doadora de elétrons superior em 18,04 kcal/mol e uma capacidade doadora de hidrogênios superior em 5,58 kcal/mol em relação a fenilbutazona. Estes valores explicam a capacidade antioxidante superior da edaravona no modelo de DPPH e no modelo de ABTS, mostrando que o sistema carboniliminico (A) e dicarbonílico (B) presentes na edaravona e fenilbutazona (Figura 8), respectivamente, exercem maior influência sobre a capacidade doadora de elétrons e menor influência na capacidade doadora de hidrogênio (próton seguido do elétron). Os resultados mostram também, a maior influência do sistema carboniliminico (A) sobre o grupo fenil-pirazol, e uma concentração de carga sobre o sistema dicarbonílico (B), o que pode ser comprovado pela análise dos coeficientes dos orbitais de HOMO.

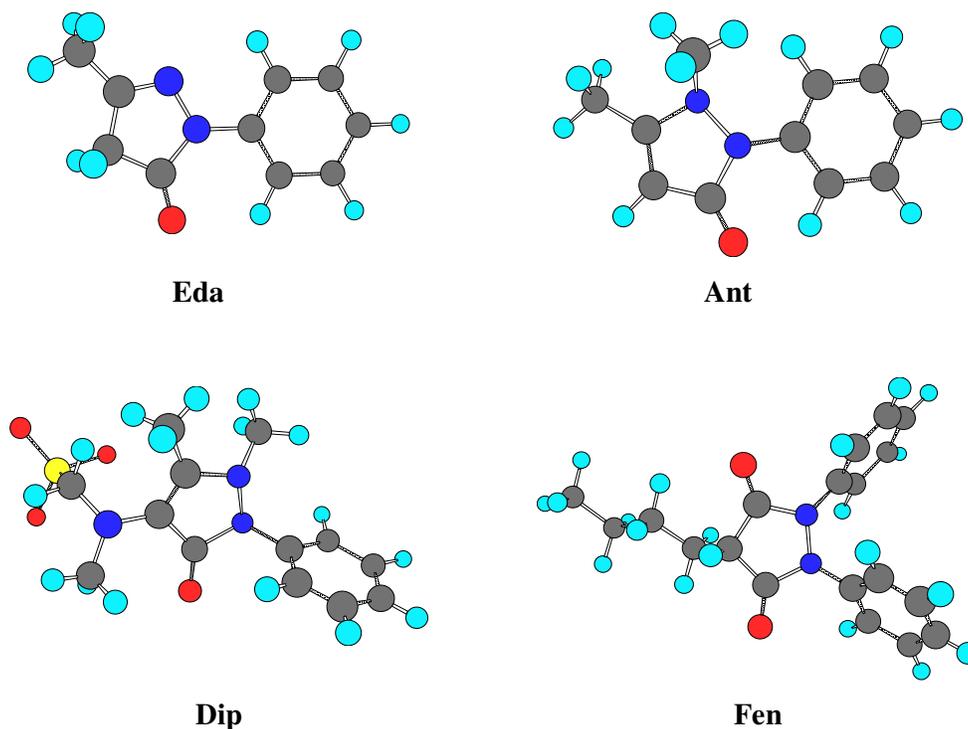


**Figura 8:** Ressonância pela ionização dos sistemas carboniliminico e dicarbonílico.

Finalmente, estes resultados mostram também que a capacidade antioxidante dos compostos pirazolonicos não é determinada apenas pelo orbital molecular ocupado de mais alta energia, pelo potencial de ionização ou pela energia de dissociação da ligação XH, mas pela combinação de todas as propriedades.

As geometrias moleculares dos derivados da edaravona (**Eda**), antipirina (**Ant**), dipirona (**Dip**) e fenilbutazona (**Fen**) são mostradas na figura 9. Os compostos apresentam uma geometria não planar entre os anéis pirazolona e fenila. Os grupos N-metil, C-metil e N-fenil apresentam impedimento estérico, fazendo com que ocorra uma

deformação no anel pirazolona. Portanto, a falta de coplanaridade pode dificultar o efeito de ressonância na **Ant** e **Dip**.



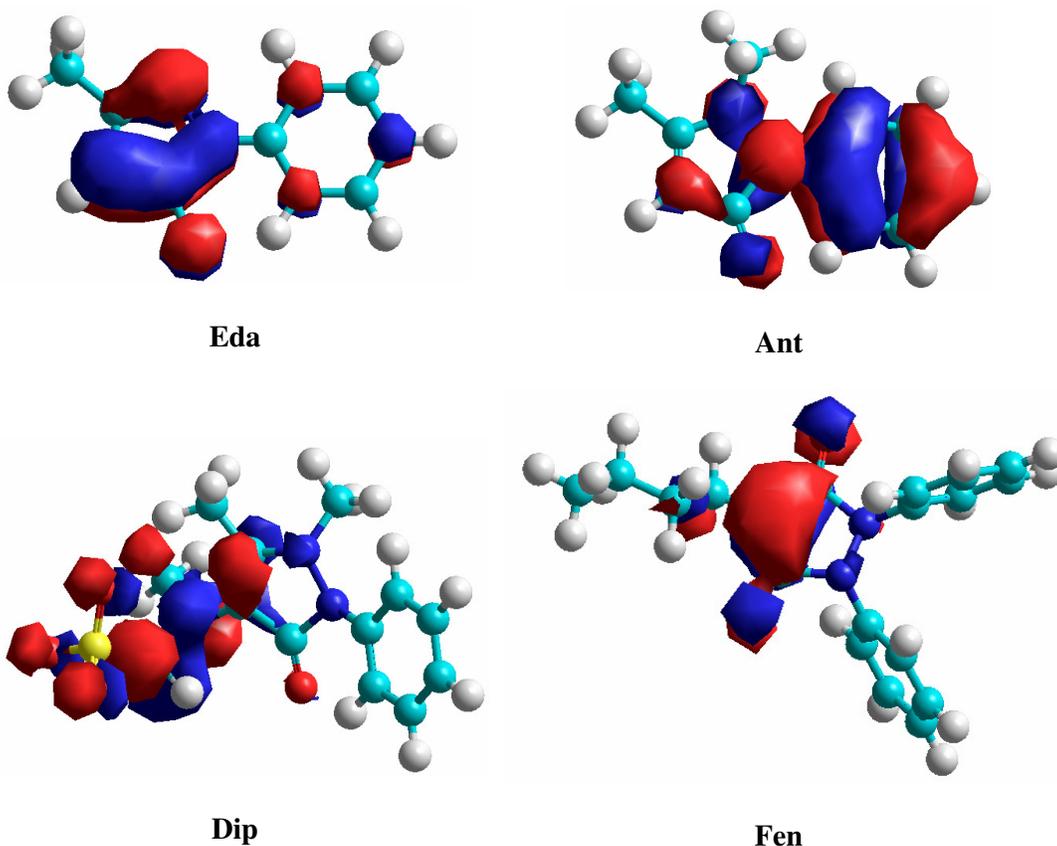
**Figura 9:** Geometria molecular de derivados de pirazolonas.

A análise gráfica dos coeficientes dos orbitais moleculares de HOMO (Figura 10) demonstra as regiões ricas em elétrons (elétron-doadoras). A análise do orbital molecular de mais alta energia mostra os grupamentos que estão contribuindo para a formação deste orbital, portanto, se a molécula interagir com seu sítio receptor como doador de elétron deverá ser por esta região. Ao mesmo tempo, se a molécula doar um elétron, os grupos que contribuem por efeito indutivo ou efeito de ressonância para a formação do HOMO, deverão participar na estabilização do elétron desemparelhado.

Uma vez que a capacidade antioxidante ocorre com a participação de grupos ricos em elétrons, os resultados de HOMO para os derivados pirazolonicos são extremamente importantes. A análise de HOMO mostrou que:

- Maior distribuição no grupo fenil e sulfonato reduzem a capacidade antioxidante (**Ant** e **Dip**);
- Ausência de contribuição no grupo fenil e carbono C3 reduzem a capacidade antioxidante (**Ant** e **Dip**);
- Maior distribuição no grupo pirazol aumenta a capacidade antioxidante (**Eda** e **Fen**);

- Maior localização no grupo dicarbonílico reduz a capacidade antioxidante (**Fen**);
- Uma participação do grupo fenil aumenta a capacidade antioxidante (**Eda**).

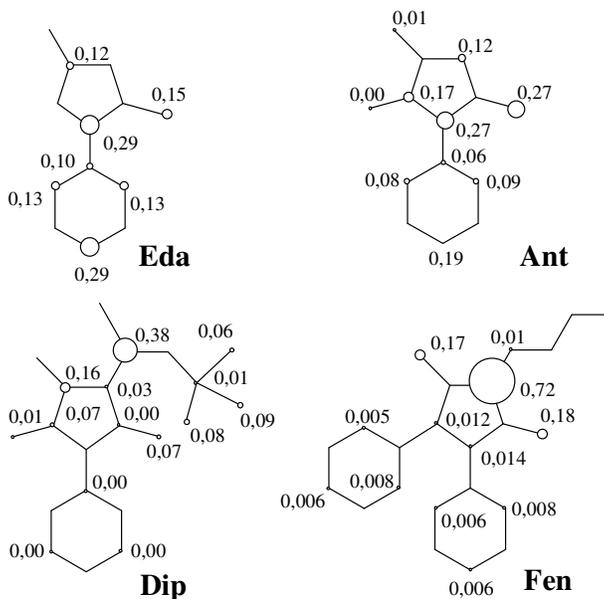


**Figura 10:** Estrutura dos orbitais moleculares de mais alta energia (HOMO) dos derivados de pirazolonas.

Os resultados de distribuição de spin mostraram que as estruturas de ressonância do radical livre semiquinona obtido pela abstração do hidrogênio (Figura 11) observados nos derivados pirazolonicos estão relacionados com os mais baixos valores de EDL<sub>XH</sub>. Os cálculos da densidade de spin para a abstração inicial do hidrogênio para a edaravona (**Eda**) e fenilbutazona (**Fen**) mostraram maior contribuição do grupo carbonilimínico (0,15-0,12) e grupo dicarbonílico (0,18-0,72-0,17) respectivamente, e uma contribuição da posição 1 (0,29) deslocando a carga para o anel fenila (0,13-0,29) na molécula da **Eda**, havendo com isso a participação importante desse anel para a estabilização do radical formado. Esses compostos são excelentes antioxidantes.

Entretanto na molécula da **Ant** ocorreu uma diminuição na contribuição de ressonância no anel fenil (0,08-0,09-0,19) e ausência da participação do carbono na posição 3, não apresentando capacidade sequestrante nem capacidade deslocalizadora do radical livre. As contribuições na molécula da **Dip** para o elétron desemparelhado

mostrou a participação principalmente do nitrogênio aminico (0,38), do sulfonato (0,06-0,08-0,09) e do carbono C3 do anel pirazol, mostrando a importância de grupos életron doadores por ressonância na posição 4 do anel pirazolona.



**Figura 11:** Densidade de spin da forma semiquinona dos derivados de pirazolonas.

### 5.5. Estudo Teórico dos Derivados da Edaravona

Os estudos de modelagem molecular foram realizados cálculos teóricos usando os métodos semi-empírico PM3 e TFD de dezoito candidatos derivados da edaravona descritos nos estudos de Nakagawa et al., 2006.

Na primeira parte foi estuda as propriedades de solubilidade com a finalidade de descrever os aspectos farmacocinéticos dos candidatos. Enquanto que na segunda parte do trabalho, as propriedades eletrônicas foram relacionadas com a capacidade antioxidante, principalmente, como descrito no estudo anterior, através da saída de hidrogênio. Os compostos selecionados são mostrados na figura 6.

O estudo da relação entre estrutura química e capacidade antioxidante selecionou as propriedades físico-químicas mais importantes, tais como o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (CLog P) e energia de hidratação (EH) os quais estão relacionados com a solubilidade das moléculas. Enquanto que as propriedades eletrônicas como orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), potencial de ionização (PI), energia de dissociação da ligação XH ( $EDL_{XH}$ ) e energia de estabilização do radical semiquinona ( $\Delta E_{iso}$ ) foram relacionados com as características de reatividade e estabilidade frente aos radicais livres.

### 5.5.1 Propriedades de Solubilidade (CLogP e EH)

Os resultados obtidos das propriedades físico-químicas para os derivados relacionados com a farmacocinética, basearam-se nos valores de CLogP (Coeficiente de partição octanol/água) e energia de hidratação (EH) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Propriedades físico-químicas (CLogP e EH) para os derivados da edaravona utilizando os programas computacionais Hyperchem 7.5 (2002) e ChemOffice (2005).

Compostos	CLogP	EH (kcal/mol)
<b>1</b>	1,66	-3,12
<b>T1</b>	1,58	-3,76
<b>T2</b>	1,66	-2,77
<b>T3</b>	<b>-0,02</b>	<b>-10,07</b>
<b>T4</b>	1,37	-3,89
<b>T5</b>	<b>0,16</b>	<b>-8,91</b>
<b>T6</b>	2,18	-3,67
<b>T7</b>	3,16	-1,98
<b>T8</b>	1,22	-4,03
<b>T9</b>	2,44	-2,70
<b>T10</b>	1,63	-7,05
<b>T11</b>	2,82	-5,04
<b>T12</b>	2,93	-3,63
<b>T13</b>	2,30	-3,57
<b>T14</b>	3,23	-2,99
<b>T15</b>	3,63	-1,25
<b>T16</b>	<b>3,68</b>	<b>-1,02</b>
<b>T17</b>	2,53	-3,72
<b>T18</b>	3,50	-1,64

Os valores de CLogP para os derivados variaram de -0,02 (**T3**) a 3,68 (**T16**), onde a edaravona apresentou-se com o valor de 1,66. Este parâmetro é importante, pois prediz a solubilidade dos derivados em lipídios, ou seja, quanto maiores os valores de CLogP mais lipossolúvel será a molécula e quanto mais próximos de zero e/ou valores negativos mais hidrossolúvel será a molécula. Devido o principal local de ação ser no

sistema nervoso central, o qual é um microambiente altamente lipossolúvel, os derivados com maiores valores de CLogP do que a edaravona seriam compostos mais ativos.

Os derivados com os menores valores foram o **T3** (-0,02) devido apresentar em sua estrutura o grupo nitro (NO<sub>2</sub>) e o derivado **T5** (0,16) o qual possui o anel piridina (Figura 12). A presença desses grupamentos não demonstraram serem relevantes para as propriedades físico-químicas, pois diminuíram os valores de CLogP pela capacidade de formar pontes de hidrogênio com o solvente aquoso, ou seja, diminuíram a lipossolubidade. Entretanto, o derivado com o maior valor de CLogP foi o **T16** (3,68), superior duas vezes ao valor da edaravona (1,66), devido apresentar o grupamento fenil, o que dificulta a formação de pontes de hidrogênios porém facilita as interações hidrofóbicas e de van der Waals com os lipídios.

**Figura 12:** Derivados com propriedades físico-químicas significativas selecionados nos estudos de modelagem molecular.

Os resultados da energia de hidratação (EH) expressam a energia em kcal liberada pela molécula em contato com o meio aquoso, ou seja, quanto menor o valor negativo maior quantidade de energia liberada (reação exotérmica), significando um maior índice de solvatação pela água. Os valores de energia de hidratação estão coerentes com os valores de CLogP, onde as moléculas mais hidrossolúveis **T3** e **T5** apresentaram os valores de EH de -10,07 e -8,91 kcal/mol, respectivamente. Enquanto que os derivados com maiores valores de CLogP, principalmente o **T16** tiveram os menores valores de EH (-1,02 kcal/mol), ou seja, pouca energia liberada em meio aquoso, dando características de lipossolubidade a esse derivado. Conseqüentemente, o derivado **T16** apresentará uma maior difusão e concentração nos neurônios, por ter tido melhores valores de CLogP e EH do que a edaravona, 3,68 e -1,02 kcal/mol, 1,66 e -3,12, respectivamente.

### 5.5.2 Propriedades Eletrônicas (HOMO, PI, EDL<sub>XH</sub> e ΔE<sub>iso</sub>)

O estudo de modelagem molecular das propriedades eletrônicas foi realizado para os dezoito compostos descritos por Nakagawa et al., 2006 e estão descritos na tabela 5. Os cálculos teóricos foram realizados no vácuo, sem efeito de solvente ou temperatura. O estudo de relação estrutura e atividade quantitativa (QSAR) foram dificultados, devidos aos métodos utilizados por Nakagawa et al., 2006 serem destrutivos, onde as reações entre o radical hidroxil com os derivados ocorreram com

irradiação de luz ultravioleta e ultrasson, o que deve alterar o estado quântico dos compostos, modificando a reatividade química.

Os derivados considerados menos ativos no estudo *in silico* para atividade sequestrante (Figura 13) foram assim classificados através dos valores de  $\Delta E_{iso}$ , pois apresentaram valores positivos (Tabela 5) significando baixa capacidade em estabilizar o radical formado, de fato os valores variaram de 0,31 (**T2**) a 1,79 kcal/mol (**T13**). Os valores em módulo do HOMO, PI e  $EDL_{XH}$ , em média para estes derivados (Tabela 5), não demonstraram serem bons antioxidantes quando comparados com os valores da edaravona.

**Figura 13:** Derivados da edaravona considerados menos ativos pelo estudo teórico.

O estudo de relação estrutura e atividade dos derivados menos ativos mostrou que a introdução de grupamentos eletrôn-retiradores (Cl,  $NO_2$  e piridinil) no anel fenila da posição 1 (**T2**, **T3** e **T5** respectivamente), diminuiu a atividade *in silico* devido seus efeitos retiradores e com isso a diminuição da participação na distribuição de elétrons pelo anel fenil, demonstrado anteriormente ser importante para a capacidade antioxidante. Enquanto que alterações na posição 3 do anel pirazolona com grupos eletrôn-retiradores e com sistemas de ressonância de elétrons  $\pi$  nessa posição (**T12**, **T13** e **T14**) diminuem a atividade por diminuírem a nuvem eletrônica no anel pirazolona. Esses derivados não deverão ter atividade anti-isquêmica.

**Tabela 5:** Propriedades de reatividade e estabilidade química no seqüestro de radicais livres dos derivados da edaravona, usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de base 6-31G(d) pelo método TFD.

Compostos	HOMO (eV)	LUMO (eV)	PI (kcal/mol)	$EDL_{XH}$ (kcal/mol)	$\Delta E_{iso}$ (kcal/mol)
<b>1</b>	-5,73	-0,87	173,04	82,14	0
<b>T1</b>	<b>-5,27</b>	-0,79	<b>161,06</b>	81,33	-0,81
<b>T2</b>	-5,86	-1,05	174,27	82,44	0,31
<b>T3</b>	-6,44	-2,22	187,55	83,34	1,20
<b>T4</b>	-6,00	-0,57	187,55	80,69	-1,45
<b>T5</b>	-5,61	-0,91	172,45	82,20	0,74
<b>T6</b>	-6,21	-1,69	184,74	81,07	-1,07
<b>T7</b>	-5,64	-1,63	165,73	82,06	-0,08

<b>T8</b>	-6,06	-2,88	174,82	81,85	-0,29
<b>T9</b>	<b>-5,44</b>	-1,41	<b>158,98</b>	82,10	-0,03
<b>T10</b>	-5,53	-0,88	166,65	81,90	-0,24
<b>T11</b>	-5,59	-1,01	165,80	81,82	-0,31
<b>T12</b>	<b>-5,41</b>	-0,62	<b>162,49</b>	82,56	0,42
<b>T13</b>	-5,72	-0,92	170,16	82,61	1,79
<b>T14</b>	-5,71	-1,56	169,60	83,93	0,47
<b>T15</b>	-5,69	-0,80	170,41	75,99	-6,14
<b>T16</b>	<b>-5,71</b>	-0,88	<b>169,89</b>	<b>73,32</b>	<b>-8,82</b>
<b>T17</b>	-5,72	-0,82	171,57	74,49	-7,65
<b>T18</b>	-5,82	-1,89	172,69	78,10	-4,04

Os derivados considerados ativos (Figura 14) apresentaram valores de  $\Delta E_{iso}$  (Tabela 5), satisfatórios para estabilizarem o radical formado, com valores que variaram de -0,03 (**T9**) a -1,45 kcal/mol (**T4**), a média dos valores de  $EDL_{XH}$  foi de 81,05 kcal/mol inferiores à edaravona (82,14 kcal/mol) demonstrando boa capacidade doadora de hidrogênio e boa capacidade doadora de elétrons, já que, os valores de PI foram menores ficando em média 170,50 kcal/mol, quando comparados com a edaravona (173,04 kcal/mol).

Estruturalmente, os derivados que apresentaram grupos doadores por indução e retiradores por ressonância ( $OCH_3$ ) no anel fenil (**T1**) ou somente doadores por indução para o anel pirazolona (ciclohexil) não alteraram a atividade. E alterações na posição 3 não demonstraram serem relevantes para a atividade, já que, a introdução de grupos eletrôn-retiradores no anel fenil desta posição (**T8** e **T9**) não diminuiu ou aumentou a atividade *in silico*. Esses derivados poderão ter boa atividade anti-isquêmica.

**Figura 14:** Derivados da edaravona considerados ativos pelo estudo teórico.

Os derivados mais ativos (Figura 15) selecionados no estudo teórico para a atividade sequestrante de radical *in silico* foram os derivados **T15**, **T16**, **T17**, **T18**. Os valores de  $\Delta E_{iso}$  foram os mais negativos (Tabela 5) indicando elevada capacidade em estabilizar o radical formado com valores que variaram de -4,04 (**T18**) a -8,62 kcal/mol (**T16**), os valores de  $EDL_{XH}$  para estes derivados foram os mais significativos de todos

os compostos (73,32 a 78,10 kcal/mol) e menores do que a edaravona, ou seja, podem possuir uma elevada habilidade em doar hidrogênio.

**Figura 15:** Derivados da edaravona considerados mais ativos pelo estudo teórico.

Entre esses quatro derivados o composto **T16** apresentou os melhores valores de HOMO, PI, EDL<sub>XH</sub> e  $\Delta E_{iso}$ , sendo com isso considerado o composto mais ativo do estudo *in silico* para os derivados da edaravona.

Os derivados mais ativos possuem como característica estrutural importante a modificação na posição 4, cujas modificações aumentaram a atividade considerável desses compostos, seja pela introdução de grupos doadores por indução, tais como, grupos alquílicos (isobutil e ciclopropil) observados nos derivados **T15** e **T17** respectivamente, ou principalmente grupos com sistemas de ressonância de elétrons  $\pi$  observado no composto mais ativo **T16**. Esses derivados poderão ter excelente atividade anti-isquêmica.

### 5.6. Planejamento de Novos Derivados da Edaravona

A molécula **T16**, mostrada na figura 16, foi selecionada pelo método de modelagem molecular por ter apresentado melhores parâmetros moleculares quando comparado com a edaravona, ou seja, seus valores do HOMO, PI, EDL<sub>XH</sub> e  $\Delta E_{iso}$ , suas propriedades físico-químicas como a solubilidade, bem como a simplicidade molecular e facilidade sintética, foram os parâmetros para o planejamento de nove derivados, denominados de P (Derivados Propostos) com propriedades termodinâmicas e eletrônicas superiores a edaravona.

**Figura 16:** Novos derivados da edaravona planejados (**P1** a **P9**).

Suas propriedades físico-químicas e capacidade teórica de seqüestro de radicais livres estão descritas na tabela 6. Outras moléculas tiveram suas propriedades calculadas, mas não foram selecionadas pelo critério sintético. Os melhores derivados serão sintetizados posteriormente e avaliados biologicamente quanto à atividade anti-isquêmica em culturas de neurônio.

**Tabela 6:** Propriedades físico-químicas e de atividade seqüestrante de radicais livres dos novos derivados propostos da edaravona, usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de base 6-31G\* pelo método TFD.

Compostos	HOMO (eV)	LUMO (eV)	CLogP	EH (kcal/mol)	PI (kcal/mol)	EDL <sub>XH</sub> (kcal/mol)	$\Delta$ Eiso (kcal/mol)
<b>1</b>	-5,72	-0,86	1,66	-3,12	173,04	82,14	0
<b>T16</b>	-5,71	-0,88	3,68	-1,02	169,89	73,32	-8,82
<b>P1</b>	<b>-5,68</b>	-0,84	<b>4,18</b>	-2,72	<b>168,40</b>	<b>72,86</b>	<b>-9,27</b>
<b>P2</b>	<b>-5,23</b>	-0,68	<b>3,85</b>	-1,29	<b>154,20</b>	<b>69,84</b>	<b>-12,30</b>
<b>P3</b>	<b>-5,64</b>	-0,81	<b>3,60</b>	-5,57	<b>165,14</b>	<b>71,67</b>	<b>-10,50</b>
<b>P4</b>	-5,78	-0,98	3,83	-3,56	171,30	72,73	-9,41
<b>P5</b>	<b>-5,69</b>	-0,87	<b>4,24</b>	-3,95	<b>162,96</b>	<b>71,71</b>	<b>-10,40</b>
<b>P6</b>	-5,82	-1,04	4,40	-3,42	171,99	72,80	-9,34
<b>P7</b>	-6,00	-2,59	2,46	-8,76	176,71	73,00	-9,15
<b>P8</b>	<b>-5,54</b>	-0,73	<b>1,92</b>	-8,09	<b>160,73</b>	<b>70,40</b>	<b>-11,70</b>
<b>P9</b>	<b>-5,69</b>	-0,86	<b>2,71</b>	-6,14	<b>162,48</b>	<b>72,38</b>	<b>-9,76</b>

O planejamento dos derivados a partir do composto **T16** baseou-se na introdução de grupos doadores de elétrons por indução e por ressonância (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, SCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>) e grupos retiradores de elétrons (NO<sub>2</sub>, F e Cl), na posição *para* do anel fenil presente na posição 4 do anel pirazolona. Os resultados teóricos obtidos para as propriedades físico-químicas de solubilidade (CLogP e EH) mostraram que os derivados propostos poderão apresentar uma maior solubilidade em lipídios, o qual é importante para a atividade nos neurônios, de fato os valores de CLogP e EH variaram de 1,92 (**P8**) a 4,40 (**P6**) e -1,29 (**P2**) a -8,76 kcal/mol (**P8**), respectivamente.

As propriedades eletrônicas relevantes para a atividade sequestrante de radical *in silico* mostraram resultados satisfatórios para os parâmetros moleculares mais importantes (HOMO, PI, EDL<sub>XH</sub> e  $\Delta$ Eiso). Os derivados propostos com grupos eletrorretiradores apresentaram valores de HOMO inferiores ao da edaravona, devido suas propriedades eletrônicas (**P4**, **P6** e **P7**), de fato seus valores foram de -5,78, -5,82 e -6,00 eV respectivamente, com potencial de ionização superiores ou de semelhante valor (171,30, 171,99 e 176,71 kcal/mol) demonstrando baixa capacidade na doação de elétrons frente aos radicais livres. Esses compostos não são uma boa estratégia para a síntese de novos derivados da edaravona com atividade anti-isquêmica.

Entretanto, os derivados planejados com grupos eletror-doadores na posição *para* do anel fenil na posição 4 do anel pirazolona (**P1**, **P2**, **P3**, **P5**, **P8**, **P9**)

demonstraram pelos valores teóricos serem as moléculas mais ativas do que a molécula de partida (**T16**) e a edaravona, devido suas contribuições eletrônicas direcionadas ao anel pirazolona. Os coeficientes de HOMO variaram de -5,23 a -5,69 eV onde a relação decrescente para a nucleofilicidade dos derivados foi **P2 > P8 > P3 > P1 > P9 > P5**. Os valores do potencial de ionização foram bastante significativos, variando de 154,20 a 168,40 kcal/mol, onde a ordem decrescente para a capacidade doadora de elétrons foi de **P2 > P8 > P9 > P3 > P5 > P1**.

Os resultados para a capacidade doadora de hidrogênio ( $EDL_{XH}$ ) apresentaram relação direta com a capacidade de estabilizar o radical semiquinona formado ( $\Delta E_{iso}$ ), de fato os valores variaram de 70,40 a 72,86 kcal/mol e -9,27 a -12,30 kcal/mol, respectivamente. A ordem decrescente de atividade através desses parâmetros moleculares para esses derivados foi que **P2 > P8 > P3 > P5 > P9 > P1**. Esses derivados são uma excelente estratégia para a síntese de novos derivados da edaravona com atividade anti-isquêmica.

Os derivados **P2** e **P8** foram os derivados planejados mais ativos no estudo *in silico* apresentando valores excelentes de todos os parâmetros físico-químicos, de reatividade e estabilidade frente a radicais livres no processo isquêmico, quando comparados com todos os compostos pirazolônicos analisados nesse estudo, ou seja, o composto **P2** e **P8** possuem uma capacidade doadora de elétrons superior a 18,84 e 12,31 kcal/mol respectivamente, e capacidade doadora de hidrogênios superior a 12,30 e 11,74 kcal/mol respectivamente, quando comparados com a edaravona.

## 6. Conclusão

De acordo com os objetivos propostos e os resultados alcançados podemos concluir que:

- O estudo teórico do tautomerismo comprovou que o tautômero O-H é o mais ativo para doação de hidrogênio.
- A doação de elétrons pela molécula da edaravona é mais favorecida em meio aquoso e o tautômero N-H é o mais nucleofílico.
- A edaravona, fenilbutazona e dipirona foram as moléculas mais ativas nos modelos de seqüestro de radicais livres. A antipirina não demonstrou atividade frente aos radicais livres.
- O seqüestro do radical DPPH foi diretamente relacionado com mecanismo de doação de hidrogênio ( $EDL_{XH}$ ) e o seqüestro do radical ABTS foi diretamente relacionada com a nucleofilicidade (HOMO) e doação de elétrons (PI). O que confirma a utilização desses parâmetros teóricos para predição da capacidade antioxidante desses derivados pirazolonicos.
- A presença de carbono  $sp^3$  na posição 4 do anel pirazolona, sistemas de ressonância de elétrons na posição 4, sistemas carboniliminico e contribuição de elétrons do anel fenila são essenciais para capacidade antioxidante dos derivados da pirazolona.
- O composto T16 foi o mais ativo no estudo teórico dos dezoito derivados da edaravona selecionados.
- Nove derivados da edaravona foram planejados, sendo que cinco estão sendo descritos pela primeira vez.
- Dos compostos planejados seis apresentaram capacidade sequestrante, teórica de radical, superior ao da molécula da edaravona.



## 7. Referências Bibliográficas

ALVES, C. N.; BORGES, R. S.; SILVA, A. B. F. Density functional theory study of metabolic derivatives of the oxidation of paracetamol. **Int. Quant. Chem.** 106 (2006) 2617-2623.

ANDERSON, V.A.; GODBER, T. E.; SMIBERT, S.; WEISKOP, H. Cognitive and academic outcome following cranial irradiation and chemotherapy in children: a longitudinal study, **Br. J. Cancer.** 82 (2000) 255–262.

ANDERSSON, A. K.; FLODSTRÖM, M.; SANDLER, S. Cytokine-induced inhibition of insulin release from mouse pancreatic  $\beta$ -cells deficient in inducible nitric oxide synthase. **Bioch. Bioph. Res. Com.** 281 (2001) 396–403.

BABER, A.D.; HARRIS, S.R.; Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Amer. Pharmacol.** 34 (1994) 26-35.

BAKER, K.; MARCUS, C. B.; HUFFMAN, K.; KRUK, H.; MALFROY, B.; DOCTROW, S. R. Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 284 (1998) 215–221.

BECCALLI, E. M. MARCHESINI, A. Diels-Alder Reactions of (Z)-Ethyl 3-[(1-ethoxycarbonyloxy-2-methoxy)ethenyl]-2-(ethoxycarbonyloxy)indole-1-carboxylate. Synthesis of the Carbazole Alkaloid Carbazomycin B. **Tetrahedron.** 52 (1996) 3029-3036.

BECCALLI, E. M.; BENINCORI, T.; MARCHESINI, A. 1,3-Oxazin-6-ones from 5(2H)-isoxazolones. **Synthesis**, (1988) 630.

BECKE, A.D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories **J. Chem. Phys.** 98 (1993)1372-1377.

BECCALLI, E. M.; CLERICI, F.; GELMI, M. L. (4H)-Oxazolones. Part XIII. A New Synthesis of 4-Ylidene-S(4H)-oxazolones by the Stille Reaction. **Tetrahedron.** 55 (1999) 781-786

BENTUR, Y.; COHEN, O. Dipyron overdose. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.** 42 (2004) 261– 265.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.** 47 (1996) 233-261.

BENZIL, D. L.; FINKELSTEIN, S. D.; EPSTEIN, M. H.; FINCH, P.W. **Cancer Res.** 52 (1992) 2951.

BETZ, A. L.; RANDALL, J.; MARTZ, D. Xanthine oxidase is not a major source of free radicals in focal cerebral ischemia. **Am. J. Physiol.** 260 (1991) 563– 568.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature.** 181 (1958) 1199-1200,

BORGES, R. S. Planejamento, Síntese e Avaliação Antioxidante de Inibidores Fenólicos da PGES Derivados da Associação p-Aminofenol e Salicilatos. **Tese Doutorado.** 2007.

BUZIN, L.; CIMAROSTI, H.; JACQUES-SILVA, M. C.; SALBEGO, C. Antiinflamatórios não-esteróides e isquemia cerebral. Nova estratégia para neuroproteção. **Infarma.** 18 (2006) 5/6.

CARROLL, J. E.; HOWARD, E. F.; HESS, D. C.; WAKADE, C. G.; CHEN, Q.; CHENG, C. Nuclear factor- $\kappa$ B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N- acetylcysteine treatment. **Mol. Brain Res.** 56 (1998)186–91.

CATIVIELA, C.; SERRANO, J. L.; ZURBANO, M. M. molecular structure of 4-*p*-hydroxyphenyl-3,5-dimethylpyrazole monohydrate **J. Org. Chem.** 60 (1995) 3074.

CHAN, T. Y. K.; CHAN, A. W. K. Aminopyrine-induced blood dyscrasias– Still a problem in many parts of the world. **Pharmacop. Drug Saf.** 5 (1996) 215–219.

CHEMOFFICE, Manual. **CambridgeSoft Corporation.** (2005)

CHEN, W.; SONG, J.; GUO, P.; CAO, W.; BIAN, J. Exploring a possible way to synthesiza novel better antioxidants based n vitamin E: a DFT study. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 16 (2006) 5874-5877.

CLARK, W. M.; RINKER, L. G.; LESSOS, N. S.; LOWERY, S. L.; CIPOLLA, M. J. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. **Stroke** 32 (2001)1000–1004.

COSTA, D.; MARQUES, A. P.; REIS, R. L.; LIMA, L. F. C. Fernandes, E. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. **Free. Rad. Bio. Med.** 40 (2006) 632 – 640

CROSSEN, J. R.; GARWOOD, D.; GLATSTEIN, E.; NEUWELT, E. A. Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: a review of radiation-induced encephalopathy, **J. Clin. Oncol.** 12 (1994) 627–642.

D’ALECY L. G.; ZELENOCK G. B. Pathophysiology of ischemia and hypoxia. In: Zelenock GB, D’Alecyc LG, Shlafer M, Fantone III JC, Stanley JC. Clinical ischemic syndromes: mechanisms and consequences of tissue injury. St Louis, **The CV Mosby company.** (1990)147-158.

DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G.; BECHARA, E.J.H.; CATALANI, L.H. Singlete molecular oxygen: Generation, reactivity, identification and biological effects. **Cienc. Cult.** 47 (1995) 297-311.

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

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. **TINS (Trends Neurosci).** 22 (1999) 391-397.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog. Neurobiol.** 62 (2000) 649– 671.

EDARAVONE STUDY GROUP. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. **Cerebrovasc. Dis.** 15 (2003) 222–229.

EISENBERG, D.; MCLACHLAN, A.D. Solvation energy in protein folding and binding. **Nature.** 319 (1986) 199–203.

ENDRES, M.; LAUFS, U.; HUANG, Z. Stroke protection by 3- hydroxy-3methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci USA.** 95 (1998) 8880–95.

FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; CHEESEMAN, J.R.; MONTGOMERY JR., J.A.; VREVEN, T.; KUDIN, K.N.; BURANT, J.C.; MILLAM, J.M.; IYENGAR, S.S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G.A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J.E.; HRATCHIAN, H.P.; CROSS, J.B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R.E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A.J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J.W.; AYALA, P.Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G.A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J.J.; ZAKRZEWSKI, V.G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A.D.; STRAIN, M.C.; FARKAS, O.; MALICK, D.K.; RABUCK, A.D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J.B.; ORTIZ, J.V.; CUI, Q.; BABOUL, A.G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B.B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R.L.; FOX, D.J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M.A.; PENG, C.Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P.M.W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M.W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J.A. **Gaussian 03**, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, (2004).

GALATI, G.; O'BRIEN, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Rad. Biol. Med.** 37- 3 (2004) 287–303.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.** 59 (1992) 1609-1623.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. 3 ed. **New York: Oxford University**, (1999) 936

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.** 1 (1990) 186.

HEDENMALM, K.; SPIGSET, O. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyron (metamizol). **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 58 (2002) 265–274.

HSIEH, R.J.; KINSELLA, J.E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Adv. Food Nutr: Res.** 33 (1989) 233-241.

HYPERCHEM, release 7.5 professional, Hypercube, Inc. Gainesville, Florida, USA.

IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **TINS (Trends Neurosci)** 20 (1997)132–9.

IBÁÑEZ, L.; VIDAL, X.; BALLARÍN, E.; LAPORTE, J. R. Agranulocytosis associated with dipyron (metamizol). **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 60 (2005) 821–829.

ISHII, J.; NATSUME, A.; WAKABAYASHI, T.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, H.; KIM, S. U.; YOSHIDA, J. The free-radical scavenger edaravone restores the differentiation of human neural precursor cells after radiation-induced oxidative stress. **Neurosci. Lett.** 423 (2007) 225–230

JANUSZ, M. J.; HOOKFIN, E. B.; HEITMEYER, S. A.; WOESSNER, J. F.; FREEMONT, A. J.; HOYLAND, J. A.; BROWN, K. K.; HSIEH, L. C.; ALMSTEAD, N. G.; DE, B.; NATCHUS, M. G.;PIKUL, S.; TAIWO, Y. O. **Osteoarthr. Cartilage** 9 (2001) 751.

JOSEPH, J. A. The putative role of free radicals in the loss of neuronal functioning in senescence, *Integr. Physiol. Behav. Sci.* 27 (1992) 216–227.

JOSEPH, M. Painel Internacional de Avaliação da Segurança da Dipirona, 1959. Disponível em: <<http://www.henrifarma.com.br/re1260.htm>>. Acesso em: 25 dezembro 2004.

KAWAI, H. H.; NAKAI, M.; SUGA, S. Y.; WATANABE, T.; SAITO K. I. Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281 (1997) 921.

KENDALL, J. D.; DUFFIN, G. F. **US Patent 2,704,762** (1955); (b) Reynolds, G. A. **US Patent 2**, 688 (1954) 548.

KHAN, M.; SEKHON, B.; JATANA, M.; GIRI, S.; GILG, A. G.; SEKHON, C.; SINGH, I.; SINGH, A. K. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J. Neurosci. Res.* 76 (2004) 519–527.

KIM, G. W.; KONDO, T.; NOSHITA, N.; CHAN, P. H. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 33 (2002) 809–815.

KOROLKOVAS, A. **Fundamentos da Farmacologia Molecular**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara S. A. (1982) 783.

KUBINYI, H. Nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character: the bilinear model. *Farmaco.* 34 (1979) 248-276.

LAKEY, J. R.; SUAREZ-PINZON, W. L.; STRYNADKA, K.; KORBUTT, G. S.; RAJOTTE, R. V.; MABLEY, J. G.; SZABÓ, C.; RABINOVITCH, A. Peroxynitrite is a mediator of cytokine-induced destruction of human pancreatic islet  $\beta$  cells. *Lab. Invest* 81 (2001) 1683–1692.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Rad. Biol. Med.** 20 (1996) 463–466.

LI, J.H. Cardiovasc. **Drug Rev.** 15 (1997) 2201. LI, J. H. **Drug Rev.** 15 (1997) 220.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol. Rev.** 79 (1999) 1431– 1568.

LITWINIENKO, G.; INGOLD, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 3. Novel kinetics in sequential proton loss electron transfer chemistry. **J. Org. Chem.** 68 (2003) 3433.

M. COSSI, V. BARONE. Analytical second derivatives of the free energy in solution by polarizable continuum models. **J. Chem. Phys.** 109 (1998) 6246

MARGAILL, I.; PLOTKINE, M.; LEROUET, D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. **Free. Rad. Biol. Med** 39 (2005) 429 – 443

MASUTANI, H. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. **Int. J. Hematol.** 71 (2000) 25-32.

MATSUO, Y.; KIHARA, T.; IKEDA, M.; NINOMIYA, M.; ONODERA, H.; KOGURE, K. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 15 (1995) 941–947.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P.A. What determines the strength of noncovalent association of ligands to proteins in aqueous solution? **Proc Natl Acad Sci USA.** 90 (1993) 8402-8406.

MOHAMMAD, M. M.; MASHAL, J.; ABAEE, M. S. Convenient ultrasound mediated synthesis of substituted pyrazolones under solvent-free conditions. **Ultras. Sonochem.** 15 (2008) 828–832.

NAKAGAWA, H.; OHYAMA, R.; KIMATA, A.; SUZUKI, T.; MIYATA, N. Hydroxyl radical scavenging by edaravone derivatives: Efficient scavenging by 3-methyl-1-(pyridin-2-yl)-5-pyrazolone with an intramolecular base. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 16 (2006) 5939–5942

NOGAWA, S.; ZHANG, F.; ROSS, M. E.; IADECOLA, C. Cyclooxygenase gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. **J. Neurosci.** 17 (1997) 2746–2755.

OBERLEY, L.W. Free radicals and diabetes. **Free Rad. Biol. Med.** 5 (1988) 113–124.

PAUL A. LAPCHAK JUSTIN A. ZIVIN. The lipophilic multifunctional antioxidant edaravone (radicut) improves behavior following embolic strokes in rabbits: A combination therapy study with tissue plasminogen activator. **Exp. Neurol.** 215 (2009) 95–100.

PARK, H.; LEE, K.; PARK, S.; AHN, B.; LEE, J.; CHO, H. Identification of antitumor activity of pyrazole oxime ethers. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 15 (2005) 3307–3312.

PARMENTIER-BATTEUR, S.; BOHME, G. A.; LEROUET, D.; ZHOU-DING, L.; BERAY, V.; MARGAILL, I.; PLOTKINE, M. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 21 (2001) 15–21.

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

PEREIRA, A.V.; PENCKOWSKI, L.; VOSGERAU, M.; SASSA, M. F.; FILHO, O. L. Determinação Espectrofotométrica de Dipirona em produtos farmacêuticos por injeção em fluxo pela geração de íons triiodeto. **Quím Nov.** 25 (2002) 553-557.

PLATH, P.; ROHR, W.; WUERZER, B.; **Ger. Offen. DE 79-2920933**, 19790523 (1980).

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

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

RIES, C. A.; SAHUD, M. A. Agranulocytosis caused by Chinese herbal medicines. Dangers of medications containing aminopyrine and phenylbutazone. **J. Am. Med. Assoc.** 231(1975) 352– 355.

SABAA, M.W.; ORABY, F. H.; ABDEL-NABY, A. S.; MOHAMED, R. R.; **Polym. Degrad. Stab.** 91 (2006) 911.

SAMDANI, A. F.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. **Stroke** 28 (1997)1283–8.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen - an anti-inflammatory antioxidant. **Gen. Pharmacol.** 26 (1995)1153– 1169.

SHICHINOHE, H.; KURODA, S.; YASUDA, H.; ISHIKAWA, T.; IWAI, M.; HORIUCHI, M.; IWASAKI, Y. Neuroprotective effects of the free radical scavenger Edaravone (MCI-186) in mice permanent focal brain ischemia. **Brain Res.** 1029 (2004) 200–206.

SINHA, K.; CHAUDHARY, G.; GUPTA, Y. K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **Life Sci.** 71 (2002) 655– 665.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DOENÇAS CEREBROVASCULARES. Consenso brasileiro do tratamento da fase aguda do acidente vascular cerebral. **Arq Neuropsiquiatr.** 92 (2008) 972-980.

SUGIURA, S.; OHNO, S.; OHTANI, O.; IZUMI, K.; KITAMIKADO, T.; ASAI, H.; KATO, K.; HORI, M.; FUJIMURA, H. Syntheses and antiinflammatory and hypnotic

activity of 5-alkoxy-3-(N-substituted carbamoyl)-1-phenylpyrazoles. 4 **J. Med. Chem.** 20 (1977) 80.

TABRIZCHI, R. Edaravone, Mitsubishi-Tokyo. **Curr Opin Investig Drugs** 1 (2000) 347–54.

TAKAMATSU, H.; KONDO, K.; IKEDA, Y.; UMEMURA, K. Hydroxyl radical generation after the third hour following ischemia contributes to brain damage. **Eur. J. Pharmacol.** 352 (1998)165–169.

UEMURA, Y.; MILLER, J. M.; MATSON, W. R.; BEAL, M. F. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. **Stroke** 22 (1991) 1548–1553.

UMLAND, S. P.; WAN, Y.; SHORTALL, J.; SHAH, H.; JAKWAY, J.; GARLISI, C. G.; TIAN, F.; EGAN, R. W.; BILLAH, M. M. **J. Leukocyte Biol.** 67 (2000) 441.

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

VON ZGLINICKI, T.; BURKLE, A.; KIRKWOOD, T. B. Stress, DNA and ageing: an integrative approach. **Exp. Gerontol.** 36 (2001) 1049.

WANG, F.; ZHANG, H.Y. A Theoretical Investigation on DPPH Radical-Scavenging Mechanism of Edaravone. **Bioorg Med.Chem. Lett.** 13 (2003) 3789–3792

WATANABE, K.; WATANABE, K.; HAYASE, T. Radical scavenging mechanism of MCI-186. **Jpn. Pharmacol. Ther.** 25 (1997) 1699

WU, T. W.; ZENG, L. H.; WU, J.; FUNG, K. P. Myocardial protection of MCI-186 in rabbit ischemia-reperfusion. **Life Sci.** 71 (2002) 2249.

YAMAMOTO, T.; YUKIS WATANABE, T.; MITSUKA, M.; SAITO, K.; KOGURE, K. Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. **Brain Res.** 762 (1997) 240–2.

YOSHIDA, H.; SASAKI, K.; NAMIKI, Y.; SATO, N.; TADA, N. Edaravone, a novel radical scavenger, inhibits oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) and reverses oxidized LDL-mediated reduction in the expression of endothelial nitric oxide synthase. **Atherosclerosis** 179 (2005) 97–102

YU, Z. F.; BRUCE-KELLER, A. J.; GOODMAN, Y.; MATTSON, M. P. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. **J. Neurosci. Res.** 53 (1998) 613– 625.