UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Avaliação antioxidante de 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis
e tiazóis utilizando o método ORAC (Capacidade de
Absorção de Radicais Oxigênio)**

Filipe André Nascimento Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S586a Silva, Filipe André Nascimento
Avaliação antioxidante de 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e
tiazóis utilizando o método ORAC (capacidade de absorção de
radicais oxigênio) / Filipe André Nascimento Silva. -- São Paulo,
2010.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Pereira, Cláudio Martin Pereira de

1. Química : Toxicologia 2. Estresse oxidativo : Toxicologia 3.
Pirazol 4. Tiazol I. T. II. Pereira, Cláudio Martin Pereira
de, orientador.

615.9 CDD

Filipe André Nascimento Silva

**Avaliação antioxidante de 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis
e tiazóis utilizando o método ORAC (Capacidade de
Absorção de Radicais Oxigênio)**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2010.

Dedicatória

À minha mãe, Ilca Guedes do Nascimento Silva. É praticamente impossível descrever com palavras o amor, a admiração e a gratidão que sinto por você, que sempre esteve comigo em todos os momentos da minha longa caminhada. Mesmo estando tão distante, se fez tão presente, não me deixando, em nenhum momento, sentir a sua falta, desistir ou desanimar. Sempre me ensinado a levantar e seguir em frente. Eu jamais poderia sonhar ou imaginar essa conquista sem você.

Mãe, esse título também é seu: te amo incondicionalmente!

A meu pai, Bráulio André Dantas da Silva, que sempre esteve presente em todos os momentos difíceis, me dando conselhos, palavras amigas, me ajudando no que foi possível e, principalmente, me dando esperança nos momentos mais difíceis. Pai, sem você eu não teria conseguido. Te amo muito!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, por estar sempre presente em minha vida, me iluminado e guiado em todos os momentos. Sem Ele eu não sou nada.

À minha avó Terezinha, que sempre esteve perto, dando todo amor e esperança em todos os meus momentos distantes. Te amo, vó!

À minha avó Eutália e minha tia Graça, pelo apoio e incentivo sempre dados durante minha caminhada. Sempre acreditando no meu sucesso. Te amo vó, obrigado tia!

À minha noiva Elizangela que faz com que meus dias sejam mais felizes. Conviver com uma pessoa tão especial me torna melhor a cada dia. Obrigado por sempre me dar força, apoio, esperança e, além disso, me dar amor em todos os momentos. Eu te amo!

Aos meus tios Ilma e Lúcio Angnes, que sempre me deram apoio e força desde o primeiro dia em que cheguei aqui em São Paulo, vocês foram muito importantes nessa conquista. Muito Obrigado!

A Nereu e Pedrinho, que foram meus irmãos de todas as horas, estando sempre presentes nos momentos difíceis e nos momentos de alegrias. Nunca irei esquecer nossos churrascos, farras, saídas e tudo que crescemos e aproveitamos. Vocês também foram muito importantes nessa etapa de minha vida. Obrigado, amigos!

Ao meu irmão Paulo e à minha cunhada (irmã) Cláudia, por apoiarem, darem força e estarem sempre comigo nas horas em que eu precisei, principalmente aqui em São Paulo. Muito obrigado!

À minha irmã Isabelle, que mesmo de longe, sempre torceu, acreditou e me deu apoio e confiança para a realização do meu sonho. Obrigado!

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira, pela oportunidade, confiança e dedicação. Por estar sempre disponível a ajudar e dar bons conselhos. Pela determinação e esforço em proporcionar tudo que foi necessário para a realização deste trabalho. Pelas lições de humildade, força de vontade e de sempre levantar a cabeça, mesmo nos momentos mais difíceis. E, finalmente, pelas vitórias conquistadas. O meu muito obrigado professor e AMIGO!

À Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros, pela colaboração, por ter cedido gentilmente seu laboratório para realização do trabalho, pelo apoio, amizade, carinho, pelos conselhos científicos e não científicos dados. Deixo aqui o meu muito obrigado por tudo, sem você este trabalho teria sido muito mais difícil. Muito obrigado, professora!

Ao Prof. Dr. Frank Herbert Quina, pela colaboração, apoio, conselhos científicos e por ter cedido seu laboratório, possibilitando a realização dos ensaios de fluorescência; também ao seu aluno Sergio, pela ajuda durante minha permanência lá.

Ao Prof. Dr. Maurício Yonamine, pelo apoio, conselhos, amizade e por ter cedido gentilmente seu laboratório para realização do trabalho.

À Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau, pelas conversas, conselhos, amizade, carinho. O meu sempre obrigado!

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto pelo apoio, confiança e por ceder seu laboratório para realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Geonir Siqueira, da UFPel, pelo apoio, pelos conselhos científicos e por todo tempo dedicado a ajudar na composição deste trabalho.

Às Profas. Dras. Aletheia Gatto e Francieli Stefanello, pelas colaborações, conselhos científicos e apoios na composição do trabalho.

Aos Professores Ricardo Leite, Valdenice Cunha, Fábio Bezerra, Jairo Sotero, Fátima Pedrosa, Graça Almeida e Adriana Rezende, que sempre me estimularam o gosto pela pesquisa e acreditaram em minha conquista. A vocês o meu muito obrigado por tudo.

Aos colegas e amigos de laboratório de patologia: Diogo, Camila, Rebeca, Manuela, Laura, Renato e Karla, pela colaboração, atenção, amizade e pelos bons momentos enquanto trabalhei lá.

À Fabiana Missau, Marly, Beatriz Bismara, Thiago Oliveira, Raphael Caio, Vanessa Gressler e Rafael Menk, pela amizade e pelos bons momentos entre um café e outro no departamento.

Aos funcionários Roseli, Ângelo, Dalva, Luzia, Helena, Nanci, Ana Dantas, Sueli Providelo e Edna Lima, pela colaboração, dedicação, apoio e amizade sempre.

Aos amigos Elaine e Jorge pelos conselhos e ajuda dada sempre, sem medir esforços. Obrigado apenas por serem meus amigos!

À Leila Bonadio, da Biblioteca do Conjunto das Químicas, pela gentil revisão da lista de referências bibliográficas.

Ao Jockey Clube de São Paulo, em nome da Coordenadora do DCPA, Dra. Mirtes Eliete Velletri, que tornou possível o término dos meus experimentos e atividades acadêmicas restantes, me concedendo licença do trabalho. Aqui, deixo o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1 Pirazóis e isoxazóis com atividade biológica.....	06
2.2 Radicais livres.....	13
2.2.1 Oxigênio	16
2.2.2 Radical superóxido.....	16
2.2.3 Peróxido de hidrogênio.....	17
2.2.4 Radical hidroxila.....	18
2.3 Estresse oxidativo.....	20
2.4 Antioxidantes	24
2.5 Antioxidantes sintéticos.....	29
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Equipamentos e acessórios	33
4.2 Soluções e reagentes.....	35
4.3 Compostos utilizados.....	37
4.4 Metodologia ORAC.....	40
4.5 Determinação do ensaio piloto.....	41
4.6 Medição da fluorescência de compostos	44

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos derivados sintéticos: 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis.....	48
5.2 Determinação da solubilidade dos derivados sintéticos: 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis para o método ORAC.....	49
5.3 Determinação do ensaio piloto para avaliação antioxidante do 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis via método ORAC.....	50
5.4 Perfil antioxidante dos compostos testados.....	51
5.5 Verificação de fluorescência dos compostos com atividade antioxidante, pirazóis e tiazóis.....	56
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICES	69

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estrutura química da prometazina.....	04
Figura 2. Estrutura do α -tocoferol.....	04
Figura 3. Estrutura base do pirazol.....	06
Figura 4. Estrutura do pirazol e substituições em metil e fenil pirazol.....	06
Figura 5. Antipirina, analgésico e antipirético.....	07
Figura 6. Difenamizole, ação analgésica, antiinflamatória e antipirética.....	08
Figura 7. Betazol, um bioisótero da histamina.....	08
Figura 8. Difenzoquat possui atividade herbicida.....	09
Figura 9. Dimetilan possui atividade inseticida.....	09
Figura 10. Estrutura do fipronil.....	09
Figura 11. Estrutura do celecoxib.....	10
Figura 12. Estrutura do rimonabant.....	11
Figura 13. Isoxazóis com atividade farmacológica.....	12
Figura 14. Pirazol com atividade biológica.....	12
Figura 15. Alguns compostos flavonoides com potencial biológico.....	29
Figura 16. Compostos sintéticos com atividade antioxidante.....	30
Figura 17. Compostos sintéticos com atividade antioxidante.....	31
Figura 18. Quadro de compostos testados 1: 3,5,-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis.....	38
Figura 19. Continuação de quadro de compostos testados 2: 3,5,-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis.....	39
Figura 20. Esquema da distribuição em placa de 96 poços usada na análise ORAC.....	43
Figura 21. Determinação da atividade antioxidante do P08 expressa como a área sob a curva (AUC).....	44
Figura 22. Espectro de absorção do composto P08	45
Figura 23. Espectro de emissão do composto T02.....	46
Figura 24. Gráficos da atividade antioxidante relativa dos compostos quantificados nas análises de ORAC.....	52
Figura 25. Gráfico dos resultados das análises de ORAC.....	53

Figura 26.	Gráfico dos desvios padrão das amostras com atividade antioxidante.....	55
Figura 27.	Fluoresceína com a adição de acetona uma e duas vezes...	57
Figura 28.	Fluoresceína e compostos com adição de até duas vezes a concentração.....	58
Figura 29.	Espectro de emissão dos compostos com atividade antioxidante.....	59
Figura 30.	Espectro de excitação da fluoresceína	60
Figura 31.	Espectro de emissão da fluoresceína	60

LISTA DE EQUAÇÕES

	Pág.
Equação 1. Reação entre duas moléculas de hidrogênio diatômico...	02
Equação 2. Reação de formação do peroxinitrito.....	02
Equação 3. Reação de formação de radical livre.....	02
Equação 4. Reação de radical agindo como agente redutor.....	03
Equação 5. Reação de redução do cobre pelo dióxido de carbono.....	03
Equação 6. Reação de formação de cátion radicalar.....	03
Equação 7. Entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio (em 4 etapas de 1 elétron).....	15
Equação 8. Reação de dismutação do radical superóxido.....	18
Equação 9. Reação de Haber-Weiss.....	19
Equação 10. Reação de Fenton.....	19
Equação 11. Reação da cisão homolítica.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/mL	Micrograma/Mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromol
µM/mL	Micromol/ Mililitro
µmol/g	Micromol/Grama
µs	Micro/Segundo
¹O₂	Oxigênio Singlete
AAPH	(2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride)
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
ATP	Adenosina tri-fosfato
AUC	Área sob a curva
CAT	Catalase
CB1	Receptor canabinoide 1
COX	Cicloxygenase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ER	Espécies reativas
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FL	Fluoresceína
G	Grama
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
H₂O Mq	Água Miliq
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HO[•]	Radical hidroxila
HPLC	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

LPO	Llipoperoxidação
mg/mL	Miligrama/Microlitro
mL	Microlitro
mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio
Nm	Nanomolar
nm	Nanometro
NO[•]	Óxido Nítrico
O₂	Oxigênio Molecular
O₂^{•-}	Ânion Radical Superóxido
OH⁻	Ânion Hidroxila
OH[•]	Radical Hidroxila
ONOO⁻	Ânion Peroxinitrito
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity assay
pH	Potencial Hidrogeniônico
PR	Prometazina
RFU	Relative Fluorescence Unit
RL	Radicais Livres
RS	Radicais derivados de tióis
SOD	Superóxido Dismutase
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta do Visível

SILVA, F. A. N. **Avaliação antioxidante de 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis utilizando o método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio).** Dissertação de Mestrado, 2010 [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RESUMO

Os radicais livres são espécies químicas que reagem rapidamente com diversos compostos e alvos celulares, por possuírem tempo de meia vida muito curto e serem espécies altamente instáveis. A formação destes compostos constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais as quais ocorrem pela perda ou adição de um único elétron a um composto não radicalar. Estas reações podem ocorrer em processos bioquímicos do sistema imune ou químicos, causando prejuízo às células através da destruição de componentes, como proteínas, lipídios, açúcares e nucleotídeos. Sabe-se que existem compostos que são efetivos contra tais espécies, prevenindo os danos provocados pelo estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi estudar compostos heterocíclicos que possuam nitrogênio em sua estrutura (azóis), que figuram na literatura como moléculas exemplares de compostos de aplicação farmacológica de amplo espectro. Dentre estes compostos foram analisados os derivados de pirazóis (26 compostos), tiazóis (7 compostos) e 1 isoxazol (3,5-dimetilisoxazol). Estes 34 compostos foram avaliados pela metodologia ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio) a fim de determinar e/ou de avaliar seu potencial antioxidante. A escolha do método ORAC se deu pelo fato das moléculas estudadas apresentarem características hidrofílicas e lipofílicas, além de ser um método validado pela literatura, disponível e de ampla aplicação. O método ORAC avalia a capacidade antioxidante da amostra, medindo sua habilidade de proteger a fluoresceína (FL) da oxidação pelo AAPH no meio reacional. O AAPH é um gerador de radicais livres que a 37°C retira hidrogênio do meio, promovendo a redução da fluorescência da fluoresceína em λ medido pelo tempo. Seis compostos apresentaram atividade antioxidante de boa à moderada: 3,5-dimetil-1H-pirazol (2.382 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); 3-fenil-5-(4-fluorfenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol (6.354 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); 3-fenil-5-(2-metoxifenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol (8.739 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); 5-(2,4-diclorofenil)-3-fenil-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol (6.022,226 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); 2-[5-(4-metoxifenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol (3.135 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); e finalmente 2-[5-(3-nitrofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol (2.700 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$). Os experimentos com o método ORAC para os azóis estudados apresentaram reprodutibilidade na execução experimental e demonstraram ser uma alternativa viável para estudos de moléculas sintéticas de potencial antioxidante.

Palavras-chave: ORAC, Antioxidantes, Antioxidantes Sintéticos, Pirazóis, Tiazóis.

SILVA, F. A. N. **Evaluation of antioxidant 3,5-dimethyl isoxazol pyrazoles and thiazoles using the ORAC method (Absorption Capacity Oxygen Radical)**. Master's Thesis, 2010 [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

ABSTRACT

Free radicals are chemical species that react rapidly with various compounds and target cells, as they have a very short half life and are highly unstable. The formation of these compounds consists of a continuous, physiological action, which includes essential biological functions and occurs through the loss or addition of a single electron to a non-radical compound. These reactions may occur in biochemical processes of the immune system, or by chemical reactions, causing damage to the cells through the destruction of components such as proteins, lipids, sugars and nucleotides. It is known that compounds exist which are effective against these species, preventing damage caused by oxidative stress. The object of this work was to study heterocyclic compounds that have nitrogen in their structure (azoles), which appear in the literature as exemplary molecules of compounds with a wide spectrum of pharmacological applications. Of these compounds, derivatives of pyrazoles (26 compounds), thiazoles (7 compounds) and 1 isoxazole (3,5-dimethylisoxazole) were analyzed. These 34 compounds were evaluated by the ORAC (Oxygen Radicals Absorption Capacity) in order to determine and/or evaluate its antioxidant potential. The choice of ORAC method is based on the fact that the molecules studied have hydrophilic and lipophilic characteristics, as well as a method validated by the literature, which is available and widely used. The ORAC method evaluates the antioxidant capacity of the sample, measuring its ability to protect the fluorescence (FL) of the oxidation by the AAPH in the reaction medium. AAPH is a generator of free radicals which, at 37°C, removes hydrogen from the medium, promoting the reduction of fluorescence from fluorescein in λ measured by time. Six compounds present good to moderate antioxidant activity: 3,5-dimethyl-1H-pyrazole (2.382 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); 3-phenyl-5-(4-fluorophenyl)-1-thiocarbamoyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole (6.354 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); 3-phenyl-5-(2-methoxyphenyl)-1-thiocarbamoyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole (8.739 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); 5-(2,4-diclorophenyl)-3-phenyl-1-thiocarbamoyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole (6.022,226 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); 2-[5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-il]-4-phenylthiazole (3.135 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$); and finally, 2-[5-(3-nitrophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-il]-4-phenylthiazole (2.700 $\mu\text{mol eq.Trolox/g}$). Experiments with the ORAC method for the azoles studied present reproducibility in the experimental execution, and have proven to be a viable alternative for studies of synthetic molecules with antioxidant potential.

Keywords: ORAC, Antioxidants, Synthetic Antioxidants, Pyrazoles, Thiazoles.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As substâncias antioxidantes possuem vasto campo de aplicações, abrangendo diferentes áreas das ciências e da tecnologia. Na indústria de alimentos, as substâncias antioxidantes são empregadas para se evitar processos de oxidação de gorduras insaturadas; na área da tecnologia química, aditivos antioxidantes são aplicados em diversas frentes de produção, na fabricação de plásticos para controlar processos de polimerização, bem como na área de combustíveis e lubrificantes, como compostos que podem conferir estabilidade para esses produtos. Nesse sentido, são encontrados vários fármacos com propriedades antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Para entendimento inicial sobre o tema antioxidantes, é importante termos uma ideia clara das espécies reativas radicalares. Em sistemas biológicos, as espécies reativas (ER) mais estudadas são as espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN), os radicais derivados de tióis (RS), as espécies reativas do halogênio cloro, as espécies reativas de carbono e alguns derivados de elementos metálicos, como Fe, Cu, Mn e Cr. As ER, além de incluírem radicais ($O_2^{\cdot-}$, $^{\cdot}OH$, $NO^{\cdot}$), também incluem intermediários neutros ou carregados (H_2O_2 e $ONOO^-$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Dentro deste tema, descreveremos algumas reações realizadas pelos radicais no organismo humano. Uma das reações se dá quando dois radicais livres compartilham seu elétron desemparelhado, formando uma ligação covalente, como representado na Equação 1, na qual estão descritas duas moléculas do radical hidrogênio atômico, formando uma molécula de hidrogênio diatômico (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Equação 1. Reação entre duas moléculas de hidrogênio diatômico

Um exemplo biológico relevante é a rápida reação do óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) com radical superóxido na formação do produto não-radicalar, peroxinitrito (Equação 2) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Equação 2. Reação de formação do peroxinitrito

No entanto, a maioria das moléculas biológicas não é radical. Quando um radical livre reage com uma espécie não-radicalar, uma nova reação pode ocorrer. Na primeira reação, o radical $\text{X}^\bullet$ pode adicionar-se à outra molécula. O aduto formado deve ter um elétron desemparelhado (Equação 3) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Equação 3. Reação de formação de radical livre

Um radical pode ser um agente redutor ($\text{X}^\bullet$), doando um único elétron para a espécie não-radicalar (Y). Nesse sentido, a equação resulta em uma espécie com um elétron desemparelhado ($\text{Y}^{\bullet-}$) e outra espécie catiônica, com carência de elétrons (X^+) (Equação 4) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Equação 4. Reação de radical agindo como agente redutor

Seguindo o mesmo raciocínio, um exemplo desse tipo de reação é mostrado na Equação 5, na qual o radical dióxido de carbono ($\text{CO}_2^{\bullet-}$) reduz Cu^{+} a Cu, derivando também uma molécula de CO_2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Equação 5. Reação de redução do cobre pelo dióxido de carbono

Um radical pode ser um agente oxidante quando recebe um único elétron de uma espécie não-radicalar. A espécie não-radicalar (PR) doa um elétron, resultando no composto cátion radical ($\text{PR}^{\bullet+}$), conforme é demonstrado na Equação 6. O radical hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$) oxida a prometazina (PR), levando à formação de um cátion radicalar ($\text{PR}^{\bullet+}$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Equação 6. Reação de formação de cátion radicalar

Figura 1. Estrutura química da prometazina

As substâncias antioxidantes podem ter origens em várias fontes, naturais ou sintéticas, com diferentes segmentos de representação. Seleccionamos, como exemplo, algumas classes de substâncias antioxidantes:

- **Enzimas:** alguns exemplos relevantes são superóxido dismutase, peroxidase e catalase;
- **Minerais:** alguns minerais são bem conhecidos por sua capacidade antioxidante, como os derivados de selênio e zinco;
- **Alimentos:** sementes de uva, abacate, manga, jaca e tamarindo constituem fonte de polifenóis. Além disso, algumas cascas de frutas também compartilham dessa propriedade (OLIVEIRA *et al.*, 2009);
- **Vitaminas:** pode-se destacar o α -tocoferol, também conhecido como vitamina E. Sua estrutura é propícia para inibição de radicais livres (Figura 2);

Figura 2. Estrutura do α -tocoferol

- **Produtos naturais:** sementes, extratos vegetais (exemplo: gengibre e alecrim) e óleos essenciais (exemplo: família *Ocimum*) são algumas fontes naturais de substâncias antioxidantes. Tocoferol, carotenoides e flavonoides são exemplos (OLIVEIRA *et al.*, 2009);
- **Antioxidantes sintéticos:** estão inseridos os compostos aromáticos hidroxilados, compostos não aromáticos e variada gama de compostos heterocíclicos, como flavonas, cumarinas, pirimidinas, pirazolonas, chalconas, entre outros (PACKER & CADENAS, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pirazóis e isoxazóis com atividade biológica

Historicamente, os pirazóis figuram na literatura como moléculas exemplares de compostos de aplicação farmacológica. De acordo com a temática de aplicação dos pirazóis, esses se apresentam com vários exemplares de moléculas bioativas atuando em diversos segmentos da farmacologia (Figura 3) (EICHER & HAUPTMANN, 1995).

Figura 3. Estrutura base do pirazol

Os pirazóis compõem uma classe de compostos heterocíclicos de 5 membros, com 2 nitrogênios ocupando posições adjacentes, posição-1 e -2, respectivamente. O nitrogênio também pode apresentar substituição (exemplo: metil pirazol e fenil pirazol) (Figura 4) (EICHER & HAUPTMANN, 1995).

Figura 4. Estrutura do pirazol e substituições em metil e fenil pirazol

Foram selecionados alguns pirazóis de importância histórica e seus seguimentos recentes dentro do contexto de apresentação de novos fármacos. Para comprovar a importância desses compostos e o interesse no estudo de seus derivados, mostramos alguns exemplos que permitem a visualização das aplicações dos pirazóis e seus derivados.

Pirazóis de ocorrência natural são raros. No entanto, vários trabalhos têm reportado estudos de pirazóis sintéticos biologicamente ativos, de importância na química medicinal. Em 1884, Ludwig Knorr descobriu a antipirina, um composto antipirético derivado da pirazolona (Figura 5) que compunha um fármaco que, além de reduzir a febre, também constituía efeito analgésico. Desde então, vários trabalhos são derivados dessa estrutura, a fim de otimizar a bioatividade deste fármaco (ELGUERO, 2002; BRUNE, 1997; SCHOFIELD *et al.*, 1976).

Figura 5. Antipirina, analgésico e antipirético

Outro exemplo que podemos citar é o difenamizol, um pirazol com as atividades analgésica, antiinflamatória e antipirética (Figura 6) (SCHOFIELD *et al.*, 1976; EICHER & HAUPTMANN, 1995)

Figura 6. Difenamizol, ação analgésica, antiinflamatória e antipirética

Outro pirazol importante e de estrutura simples é o betazol, que é bioisómero da histamina (Figura 7) (SCHOFIELD *et al.*, 1976; EICHER & HAUPTMANN, 1995).

Figura 7. Betazol, um bioisómero da histamina

Um pirazol na forma de sal e de reconhecida atividade herbicida é o difenzoquat (Figura 8), que foi amplamente empregado na Europa. O dimetilan apresenta atividade inseticida (Figura 9) (EICHER & HAUPTMANN, 1995).

Figura 8. Difenzoquat possui atividade herbicida

Figura 9. Dimetilan possui atividade inseticida

No contexto atual, em relação aos derivados de pirazóis, muitos exemplos dessa classe de molécula assumiram a posição de protótipos importantes no campo das ciências farmacêuticas. Moléculas como o fármaco veterinário Fipronil® figuram como inseticida e carrapaticida dos mais destacados e rentáveis dentro desse segmento da indústria (Figura 10) (CHOPRA, 2009).

Figura 10. Estrutura do fipronil

Dentro da química farmacológica, podemos destacar o Celecoxib[®], que pertence ao grupo dos antiinflamatórios não esteroides usados no tratamento da osteoartrite, artrite reumatoide e outras situações de dor (Figura 11). Os antiinflamatórios atuam inibindo as enzimas cicloxigenase (COX) envolvidas na formação de prostaglandinas, importantes mediadores do processo inflamatório. A COX apresenta duas isoformas, a COX-1, que desempenha papel citoprotetor, atuando diretamente na proteção gastrintestinal, e a COX-2, que é induzida no momento da lesão, causando inflamação, dor e febre.

Figura 11. Estrutura do celecoxib

Os antiinflamatórios tradicionais inibem as duas isoformas do COX, apresentando importantes efeitos adversos nos tecidos. O Celecoxib[®] não exerce influência sobre a COX-1, portanto, tem menor possibilidade de efeitos adversos no trato gastrintestinal, nos rins e nas plaquetas. É indicado para tratamento de osteoartrite e artrite reumatoide. O Celecoxib[®] é um inibidor

altamente seletivo da COX-2 (BHANDARI *et al.*, 2009; ABDELLATIF *et al.*, 2009; BOSCHI *et al.*, 2009).

Rimonabant® é um fármaco recentemente descoberto, utilizado para redução de consumo de alimentos e do peso corporal. Ele atua bloqueando substâncias conhecidas como endocanabinoides, que provocam uma espécie de autoestimulação em nossas ações e também no apetite. O Rimonabant® é um antagonista do receptor canabinoide CB1. Esse fármaco tem levado a indústria farmacêutica ao estudo de compostos com essas características na busca de novos fármacos dessa classe, pois ainda há necessidade de evolução no campo dos fármacos antiobesidade (Figura 12) (LANGE & KRUSE, 2008; SELTZMAN, 2009; SEO *et al.*, 2010; KOOLMAN *et al.*, 2010).

Figura 12. Estrutura do rimonabant

Nesse mesmo sentido, os isoxazóis constituem uma classe de compostos heterocíclicos com várias aplicações, em especial na química-farmacêutica são encontradas exemplares de ação, antibiótica, antiinflamatória e antirreumática (Figura13) (EICHER & HAUPTMANN, 1995).

Figura 13. Isoxazóis com atividade farmacológica

Dentro do amplo tema existente de pirazóis com atividade biológica (Figura 14), e de acordo com o extenso histórico destes compostos, é evidenciado que os derivados de pirazóis possuam potencial atividade farmacológica e biológica.

Recentemente, Wang e colaboradores (2008) prepararam uma série de pirazóis polifuncionalizados que serviram como reagentes para construção de complexos metálicos de Zn, Cu e Ni, que foram avaliados para atividade antioxidante (Figura14).

Figura 14. Pirazol com atividade biológica

2.2 Radicais livres

A presença de radicais livres em materiais biológicos foi descoberta há mais de 50 anos (DRÖGE, 2002). Denham Harman (1956) sugeriu a hipótese de que os radicais livres produzidos durante a respiração aeróbia poderiam causar dano oxidativo cumulativo, resultando em câncer, processos degenerativos e envelhecimento (BECKMAN & AMES, 1998; DRÖGE, 2002; HARMAN, 2003; AUGUSTO, 2006).

No início dos anos 1960, acreditava-se que os radicais livres tinham curta duração, não tinham controle e não desempenhavam qualquer papel nos processos referentes à vida (DAVIES & PRYOR, 2005). Tudo isso foi alterado quando McCord e Fridovich (1968) relataram as propriedades da enzima superóxido dismutase (SOD). De acordo com os conceitos até então estudados, os radicais livres se mostraram vitais no funcionamento de organismos aeróbios, levando os estudos até então realizados destas espécies a uma segunda era, sugerindo que as espécies radicalares são fundamentais na biologia (BECKMAN & AMES, 1998; DRÖGE 2002; DAVIES & PRYOR, 2005; AUGUSTO, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; HARMAN, 2009). Em 1969, a teoria ganhou credibilidade com a descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD), que forneceu a primeira evidência convincente de geração em vivo do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e da elucidação posterior da elaboração de defesas antioxidantes (BECKMAN & AMES, 1998; AUGUSTO, 2006; HARMAN 2009).

Após a descoberta da SOD, vieram muitas outras, relatando que as reações radicais estão envolvidas em muitas vias de desintoxicação e nas reações destas toxinas com seus alvos biológicos (DAVIES & PRYOR, 2005), comprovando que os radicais livres participam em vários processos fisiopatológicos, como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, etc. (DAVIES & PRYOR, 2005; VALKO *et al.*, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; LIMA, 2008).

Os radicais livres são espécies muito instáveis e reativas, pois possuem enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivadas. O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) é frequentemente usado para incluir também espécies reagentes que não são radicais livres, mas algumas moléculas derivadas de O₂ (oxigênio) capazes de gerar radical livre, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (DAVIES & PRYOR, 2005; CHOE & MIN, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). A formação destes compostos radicalares é uma ação contínua e fisiológica, de funções biológicas essenciais do organismo e se dá por reações de oxidorredução, nas quais estes provocam as reações ou são produtos da mesma, podendo ceder um elétron, oxidando-se, ou recebendo um elétron, reduzindo-se (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; LIMA, 2008). Essas reações ocorrem no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e moléculas de DNA) está relacionado com seu local de formação (LIMA, 2008). Entretanto, estas espécies reativas também estão relacionadas a processos fisiológicos no organismo, como, por exemplo, resposta imune e sinalização celular (HALLIWELL, 2001; GASPARRI, 2005; VALKO *et al.*, 2006). Normalmente, a

formação destes compostos ocorre no interior da célula, mais intensamente na mitocôndria.

Em condições fisiológicas no metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre uma redução tetravalente, aceitando 4 elétrons e formando H_2O (Equação 7). Neste processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\bullet$).

Equação 7. Entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio (em 4 etapas de 1 elétron)

Em particular, as espécies reativas de oxigênio (ERO) são parte do metabolismo fisiológico e celular humano e estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças reumáticas, cardiovasculares, infecções respiratórias e diabetes mellitus tipo 2 (ULRICH-MERZENICH *et al.*, 2009). Apesar de possuir importante função biológica, em processos bioquímicos e do sistema imune, estas moléculas são suficientemente reativas para causar prejuízo às células através da destruição de componentes, como proteínas, lipídios, açúcares e nucleotídeos. Em circunstâncias normais, o organismo é capaz de se defender contra danos causados pelas ERO, através do sistema antioxidante de defesa, que usa pequenas moléculas e enzimas antioxidantes, ajudando a manter o equilíbrio entre a formação e a eliminação das ERO. Dessa forma, em condições normais, as ERO são mantidas em níveis constantes no corpo (KANG *et al.*, 2008; TALAS *et al.*, 2008).

2.2.1 Oxigênio

O oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Uma delas, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), geralmente formado pela excitação do oxigênio triplete na presença de sensibilizador e luz (SANTOS, 2006; CHOE & MIN, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007), por fagócitos por indução luminosa, por reações catalisadas por peroxidases, etc. O oxigênio singlete possui meia vida em tecidos menor que $0,5\mu\text{s}$ e difere do oxigênio por não apresentar restrição na transferência de elétrons, o que o torna altamente reativo, causando danos às proteínas devido à oxidação de grupos essenciais de aminoácidos, principalmente de triptofano, metionina, histidina e resíduos de cisteína (GASPARRI, 2005; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

2.2.2 Radical superóxido

Ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é formado enzimaticamente e quimicamente a partir do oxigênio triplete, que é o oxigênio em seu estado fundamental (CHOE & MIN, 2006; VALKO *et al.*, 2006; HALLIWELL, 2008). Essa forma de oxigênio é considerada a mais estável e abundante, sendo comum no ar que respiramos (GASPARRI, 2005; CHOE & MIN, 2006).

O radical superóxido tem em sua configuração eletrônica apenas um elétron livre (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007), formado no organismo principalmente pela cadeia de transporte de elétrons ou através da ação de células fagocitárias (neutrófilos, monócitos e macrófagos) responsáveis pela defesa bactericida (DIAZ *et al.*, 1998). Na cadeia de transporte de elétrons, essa produção do radical superóxido ocorre dentro da célula (especificamente na mitocôndria). O processo da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é a principal fonte de ATP nas células de mamíferos, sendo, assim, um processo essencial para vida (VALKO *et al.*, 2006).

2.2.3 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre por definição, porém é um intermediário reativo. Considerado um agente oxidante fraco, pode oxidar grupos tióis e alguns aminoácidos, além de poder inativar diversas enzimas. Apesar de não ser muito reativo, o H_2O_2 pode migrar pela célula e atingir alvos distantes do local de sua formação. É uma espécie reativa de oxigênio importante por sua capacidade de gerar radical hidroxila ($HO^\bullet$) em presença de metais como ferro (GASPARRI, 2005; SANTOS, 2006). Qualquer sistema gerador de radical superóxido produz peróxido de hidrogênio, pela reação de dismutação, a não ser que o radical superóxido seja interceptado por outras substâncias (OGA & ZANINI, 2008). O peróxido de hidrogênio é a forma protonada do íon peróxido (CHOE & MIN, 2006); a sua produção ocorre

principalmente na mitocôndria, durante o processo de redução do oxigênio ou pela dismutação do radical superóxido (OGA & ZANINI, 2008).

Equação 8. Reação de dismutação do radical superóxido

O peróxido de hidrogênio é formado na reação de dismutação do superóxido e por fagócitos, além de ser também subproduto da assimilação oxidativa de muitas fontes de carbono e nitrogênio, por peroxissomos e glioxissomos (FORMAN e THOMAS, 1986). Algumas bactérias e micoplasmas também liberam peróxido de hidrogênio, podendo lesar células do hospedeiro, visto que o H_2O_2 pode atravessar membranas biológicas (OGA & ZANINI, 2008).

2.2.4 Radical hidroxila

O radical hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$) é um dos intermediários mais reativos de oxigênio; tem meia vida extremamente curta e reage rápida e inespecificamente com os alvos celulares mais próximos, podendo lesar DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (VALKO *et al.*, 2006; GASPARRI, 2005; OGA & ZANINI, 2008). Esse radical possui maior capacidade de lesar as células que os demais ERO, pois o organismo não possui um sistema enzimático de defesa

contra o radical hidroxila (GASPARRI, 2005; SANTOS, 2006; HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007).

O radical hidroxila pode ser gerado pela reação de íons metálicos com o peróxido de hidrogênio, pela reação do radical superóxido com o peróxido de hidrogênio (reação de Haber-Weis) ou via cisão homolítica da molécula do radical peróxido de hidrogênio induzida por radiações ionizantes (CHOE & MIN, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OGA & ZANINI, 2008).

Por existir um alto teor de água nas células, e pelo fato da exposição destas às radiações ionizantes, como raios x e raios gama, ocorre a formação do radical hidroxila pelo processo de radiólise da água. O radical superóxido em reação com o peróxido de hidrogênio resulta na formação do radical hidroxila através da reação de Haber-Weiss, demonstrada na Equação 9 (OGA & ZANINI, 2008):

Equação 9. Reação de Haber-Weiss

No entanto, em sistemas biológicos (meio aquoso) essa reação ocorre com velocidade extremamente baixa, o que indica que a produção de radicais hidroxila, *in vivo*, deve ser catalisada diretamente por metais de transição, como ferro ou cobre (reação de Fenton, Equação 10) (GASPARRI, 2005; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OGA & ZANINI, 2008).

A formação do radical $\text{OH}^{\bullet}$ a partir do peróxido de hidrogênio pode ser catalisada pela presença de íons de metais de transição, como mostrado na

reação de Fenton (Equação 10) (GASPARRI 2005; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OGA & ZANINI, 2008).

Equação 10. Reação de Fenton

A presença de íons de metais de transição atua como um fator que gera a formação de radicais livres. À medida que mudam do estado de valência, esses íons podem ganhar ou perder um elétron. Os metais de transição encontrados no organismo em maior abundância são o ferro e o cobre (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OGA & ZANINI, 2008).

A cisão homolítica pode ocorrer em um processo da simples exposição da pele ao sol. Em laboratório, *in vitro*, a geração de $\text{OH}^\bullet$ através do H_2O_2 pode ser efetuada através de um baixo comprimento de onda de uma fonte ionizante de radiação UV (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Processo demonstrado pela Equação 11.

Equação 11. Reação da cisão homolítica

2.3 Estresse oxidativo

A oxidação é o processo de perda de elétrons e a redução é o ganho de elétrons. Por isso, as substâncias que recebem elétrons se reduzem e as que doam elétrons se oxidam (ATKINS & JONES, 2006). Dentro desse contexto,

temos, em organismos aeróbios normais, a formação das espécies reativas de oxigênio. A formação destes compostos radicalares, que são átomos ou moléculas, se dá por reações de oxidorredução, tornando-as altamente reativas por conter número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (DAVIES & PRYOR, 2005; VALKO *et al.*, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; LIMA, 2008).

A produção das ER constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais (LIMA, 2008). Deste modo, sua produção é equilibrada pelo organismo através de um sistema de defesa denominado de antioxidante, que mantém um equilíbrio, que não é perfeito, pois como estes processos fazem parte do metabolismo humano os antioxidantes apenas controlam a formação das ER ao invés de erradicá-las (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Quando o organismo não consegue equilibrar a produção e a eliminação das ERO tem-se o estresse oxidativo, que se define como desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante em favor do pró, provocando danos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Esse desequilíbrio provoca, dentre outras reações, a oxidação dos lipídios, que são alvos principais das espécies reativas de oxigênio. A formação destes substratos oxidáveis, que são os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), que contêm duas ou mais ligações duplas carbono-carbono e estão presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, quando mediados por radicais livres (RL), são o principal alvo das espécies reativas de oxigênio. Um processo em cadeia é desencadeado pela ação dos (RL) sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, conhecido como peroxidação lipídica

ou lipoperoxidação (LPO), processo definido como a deterioração oxidativa dos AGPI (LIMA & ABDALLA, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A peroxidação lipídica pode ser avaliada e utilizada como um indicador do estresse oxidativo celular e se dá em três etapas que são bastante estudadas e conhecidas pelo caráter sequencial: iniciação, propagação e terminação, gerando principalmente $L\bullet$, $LO\bullet$ e $LOO\bullet$, que leva à destruição da estrutura das membranas celulares, à falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (LIMA & ABDALLA, 2001). A velocidade deste processo é limitada pelas fases de iniciação e propagação.

A etapa de iniciação se dá quando AGPI (LH) sofre ataque de uma espécie reativa (radical hidroxila, complexos ferro-oxigênio, etc.), retirando um átomo de hidrogênio e oxidando o AGPI (LH) ao radical livre $L\bullet$. (LIMA & ABDALLA, 2001; AUGUSTO, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

INICIAÇÃO: $LH \rightarrow L\bullet$

A propagação se dá quando o radical alquila reage com o oxigênio, formando o radical peroxila $LOO\bullet$, podendo este abstrair um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono (hidroperóxido lipídico, $LOOH$) e outro $L\bullet$ que reage com oxigênio, e assim por diante. Promovendo a etapa de propagação (LIMA & ABDALLA, 2001; AUGUSTO, 2006).

Íons de metais de transição, como Fe e Cu, podem participar do processo na formação de radicais lipídicos alcóxila, peróxila e hidroxila a partir dos hidroperóxidos, servindo de catalisadores, conforme demonstrado nas reações de propagação abaixo (LIMA & ABDALLA, 2001):

A última etapa da reação da peroxidação lipídica se dá com a fase de terminação, que é a destruição dos radicais formados, originando produtos não radicalares (LIMA & ABDALLA, 2001; AUGUSTO, 2006).

Dentro desse contexto, sabe-se que o estresse oxidativo pode contribuir amplamente para o desenvolvimento de várias doenças relacionadas com a

idade e talvez até mesmo para o processo do envelhecimento (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

2.4 Antioxidantes

O termo antioxidante é bastante utilizado nos dias atuais, porém possui interpretação multiconceitual, pois, dependendo da área de utilização ou do tipo de substância, algumas podem ter ação antioxidante ou não. Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, pode reduzir significativamente ou prevenir a oxidação deste substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OGA & ZANINI, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O termo substrato oxidável inclui grande número de substâncias encontradas na natureza e nos tecidos vivos: proteínas, carboidratos, DNA e lipídios. Esta definição mostra a importância do dano, do alvo e da fonte de radicais livres quando se estuda a atividade antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009) pois a formação de radicais livres ocorre continuamente por processos normais do metabolismo humano.

Para conter a formação contínua das espécies radicalares, existe um sistema no organismo que controla o balanço entre a formação e a eliminação destes compostos, atuando diretamente na redução dos danos causados (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004; TALAS *et al.*, 2008).

O sistema antioxidante mantém o equilíbrio orgânico, pois há formação contínua das espécies reativas através do metabolismo humano (ex:

sinalização celular), que controlam os níveis destas espécies reativas, em vez de erradicá-las (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Dentro deste contexto, dividimos o sistema antioxidante em dois: o sistema de defesa primário (enzimático) e o sistema de defesa secundário (não enzimático). O sistema de defesa primário é a primeira linha de defesa, formada por substâncias que impedem a geração de espécies reativas ou sequestram-nas, impedindo a sua interação com alvos celulares e bloqueando a etapa de iniciação da cadeia radicalar (OGA & ZANINI, 2008). Dentre estas substâncias cabe destacar as substâncias enzimáticas mais estudadas: superóxido dismutase, catalase e as glutatonas (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A enzima superóxido dismutase (SOD) foi descoberta em 1969 por McCord e Fridovich, representando grande avanço na área da pesquisa da toxicidade do oxigênio. Em mamíferos, a enzima SOD é descrita em duas isoformas, a Cu e Zn-SOD, presente no citosol, na mitocôndria e no espaço extracelular, e a Mn-SOD, encontrada na matriz mitocondrial (BANERJEE, 2008; TORRES, 2009). A superóxido dismutase catalisa a conversão do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). O peróxido de hidrogênio formado é um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, mas, na presença de metais de transição (íons ferro ou cobre), gera $OH^\bullet$, pela reação de Fenton (McCORD & FRIDOVICH, 1969; VASCONCELOS *et al.*, 2007; OGA & ZANINI, 2008; TORRES, 2009).

A catalase (CAT) é uma hemoproteína localizada nos peroxissomos do fígado e dos rins e em microperoxissomos de outras células. Esta enzima tem especificidade para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), promovendo sua decomposição a O_2 e H_2O , não atuando sobre peróxidos orgânicos. Por estar compartimentalizada nos peroxissomos, e ter menos afinidade ao peróxido de hidrogênio em relação à glutathiona peroxidase (GPx), a CAT é mais importante em condições de altas concentrações de peróxido de hidrogênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007; LIMA, 2008; OGA & ZANINI, 2008; TORRES, 2009).

A glutathiona peroxidase (GPx) está localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2), pela glutathiona reduzida (GSH), para formar glutathiona oxidada (GSSG) e água ou alcoóis (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OGA & ZANINI, 2008; LIMA, 2008; TORRES, 2009).

A glutathiona redutase (GR) catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) em duas moléculas na forma tiol da glutathiona (GSH). Esse processo utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADP) em sua forma

reduzida (NADPH), transformando-a em sua forma oxidada (NADP⁺). As células utilizam a GSH na redução do peróxido de hidrogênio e de outros substratos oxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; TORRES, 2009; WELKER, 2009).

O sistema de defesa secundário (não enzimático) é formado por muitas substâncias que podem ser endógenas ou exógenas; cabe destacar a glutathione (GSH), principal composto antioxidante intracelular, o ascorbato e os tocoferóis. A GSH atua bloqueando a etapa de propagação da cadeia radicalar e sequestrando radicais intermediários (como peroxil ou alcoxil) (SANTOS, 2006; OGA & ZANINI, 2008). Em particular, a glutathione (GSH) possui baixo peso molecular, sendo um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico. A glutathione é um sequestrador de radical hidroxila e de oxigênio singlete que exerce funções celulares essenciais, dentre estas destaca-se a sua função como cofator da família de enzimas glutathione peroxidases (GPx), a qual tem papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto de glutathione (GSSG). A GSH é o único tiol não proteico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de espécies reativas de oxigênio. A GSH também atua na regeneração da vitamina E, constituindo uma ação semelhante a do ascorbato, reduzindo o radical tocoferil a tocoferol (forma mais comum da vitamina E). A glutathione pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante, pois está presente na

maioria das células, tecidos (exemplo: sangue, pulmão e sistema nervoso central). Sendo o antioxidante mais abundante no meio intracelular, protegendo-o contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OGA & ZANINI, 2008; TORRES, 2009; WELKER, 2009).

Um ácido de relevante importância para o ser humano é o ácido ascórbico (vitamina C). O ácido ascórbico não é sintetizado pelo organismo humano, sendo necessário obtê-lo através da dieta (frutos e vegetais). Pelo fato de possuir baixo peso molecular, a vitamina C é capaz de neutralizar rapidamente as espécies reativas de oxigênio por transferência de elétrons, inibindo a lipoperoxidação. Como a sua ação antioxidante ocorre principalmente por doação de um elétron, ela é considerada um agente redutor. A vitamina C elimina os radicais livres do plasma, do citosol e de outros compartimentos aquosos. Além do papel antioxidante, a vitamina C atua como principal doador de elétrons para o radical da vitamina E, α -tocoferil, promovendo a regeneração do α -tocoferol (GASPARRI, 2005; SANTOS, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OGA & ZANINI, 2008; WELKER, 2009).

O tocoferol (vitamina E), pelo fato de ser lipossolúvel, se acumula no interior das biomembranas, protegendo-as contra a lipoperoxidação (ZANINI & OGA, 2008; GASPARRI, 2005). O α -tocoferol suprime e reage com o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), sequestrando os radicais superóxido e hidroxila, podendo, assim, bloquear o início da peroxidação lipídica. No entanto, a sua principal ação nas membranas biológicas consiste em interromper a fase de propagação da lipoperoxidação, doando um átomo de hidrogênio para os radicais peroxil e

alcoxil derivados da oxidação dos ácidos graxos e interrompendo a cadeia radicalar da peroxidação lipídica (OGA & ZANINI, 2008). As fontes dietéticas de vitamina E incluem germe de trigo, óleo vegetal, amêndoas, avelãs, grãos, vegetais verdes folhosos, entre outras (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

2.5 Antioxidantes sintéticos

As substâncias de origem natural compreendem um alvo de pesquisa bastante explorado e são fontes de matéria-prima para pesquisa de novos fármacos e nutrientes. No entanto, a maioria das substâncias naturais, quando isoladas, oferece alguns limites para a indústria farmacêutica, uma vez que é praticamente impossível se obter grandes quantidades de produtos naturais puros. Outra desvantagem nos processos de isolamento de produtos naturais é o emprego de solventes orgânicos de forma excessiva, essenciais no processo de extração das substâncias orgânicas ativas. Dentro da grande gama de classes de compostos disponíveis e da biodiversidade, daremos destaque aos derivados flavonoides, que são compostos reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e podem ser encontrados em vários alimentos e plantas.

Tanto a indústria como a pesquisa têm demonstrado grande interesse nos compostos flavonoides devido ao potencial biológico. Catequina, quercetina, nepetina e silibina compreendem alguns exemplos de flavonoides de origem natural (Figura 15) e que já são produzidos por processos sintéticos.

Figura 15. Alguns compostos flavonoides com potencial biológico

A possibilidade de disponibilidade de compostos sintéticos perfaz uma gama de variações interessantes, uma vez que se torna possível a reprodução de compostos naturais bioativos ou mesmo o estudo da atividade biológica de compostos análogos com atividade reconhecida. Dentro desse contexto, foram selecionados alguns compostos orgânicos de origem sintética e com atividade antioxidante. Em relação ao tema de compostos antioxidantes sintéticos, um grupo de compostos químicos não fenólicos é empregado como inibidor dos processos de peroxidação lipídica. Em particular, o composto norfenazona (MCI-186, 3-metil-1-fenil-pirazolinona-1) foi um dos mais estudados (PACKER & CADENAS, 1997).

Na Figura 16, estão demonstrados alguns compostos sintéticos com atividade antioxidante.

Figura 16. Compostos sintéticos com atividade antioxidante

No sentido de ampliar a visualização para alguns compostos com representatividade na química farmacológica, foram selecionados alguns fármacos empregados no tratamento de disfunções cardíacas. Estes compostos também têm aplicações como antioxidantes (Figura 17) (PACKER & CADENAS, 1997).

Figura 17. Compostos sintéticos com atividade antioxidante

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante de azóis sintéticos e derivados de processos sintéticos limpos, pela metodologia Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio (ORAC).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a solubilidade dos compostos para definir metodologia hidrofílica ou lipofílica, na verificação antioxidante dos compostos;
- ✓ Medir a fluorescência dos compostos com atividade antioxidante e dos tiazóis, com intuito de verificar se a metodologia empregada foi adequada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente, foram definidos 34 compostos, como moléculas alvo para nossos estudos de atividade antioxidante. Dentre os compostos selecionados, encontram-se 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis. Para verificação do potencial antioxidante dos compostos foi empregada a metodologia ORAC (OU *et al.*, 2001).

Foi efetuada também a determinação dos espectros UV e espectros de fluorescência dos compostos que apresentaram atividade antioxidante e em todos os compostos da família dos tiazóis.

4.1 Equipamentos e acessórios

Aqui estão descritos todos os equipamentos e acessórios utilizados no processo de verificação da atividade antioxidante e determinação da fluorescência dos compostos usados no trabalho.

- Leitor de microplaca BIOTEK (Multi - Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Winooski, VT), que foi programado para medir a fluorescência a cada ciclo de 1 minuto após a adição do radical AAPH até 1 hora. A área sob a curva de decaimento da fluoresceína foi integrada utilizando-se o *software* Gen5, equipamento cedido para uso pelo Laboratório de Patologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo, coordenado pela Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros;

- Microplacas de 96 poços, Costar Corring Incorporated (Corring NY, USA);
- Todos compostos sólidos tiveram os pontos de fusão determinados utilizando-se capilares abertos em um aparelho digital Tecnopon PFM II. Essas análises foram efetuadas no Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente da Universidade de São Paulo (CEPEMA/USP) e no Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- Fluorímetro HITACHI F-4500 Fluorescence Spectrophotometer. Equipamento usado para determinar a fluorescência dos compostos. Foi cedido para uso pelo Laboratório de Dinâmica de Interfaces e Macromoléculas do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Prof. Dr. Frank Herbert Quina;
- Diode Array Spectrophotometer 8452A HEWLETT-PACKARD. Equipamento usado para determinar os espectros UV dos compostos. Foi cedido para uso pelo Laboratório de Dinâmica de Interfaces e Macromoléculas do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Prof. Dr. Frank Herbert Quina.

4.2 Soluções e reagentes

Abaixo estão descritas as soluções que foram utilizadas no trabalho para determinação da atividade antioxidante e verificação da fluorescência dos compostos.

- Solução Trolox 100 μM : foi preparada uma solução na concentração de 1mg/mL, pesando-se 0,001g de Trolox (marca Sigma-Aldrich, GmbH Steinheim, Alemanha). Em seguida foi feita a adição de 1mL de tampão fosfato pH 7,0 75mM. Posteriormente, dilui-se esta solução para 0,1mg/mL e prepararam-se as seguintes diluições 100, 50, 25, 12,5 e 5 μM , utilizando o tampão fosfato. No ensaio lipofílico foi substituída a solução tampão pela solução de β -ciclodextrina randomicamente metilada 0,7%;
- Tampão Fosfato: foram pesados 1,59g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Merck Darmstadt, Alemanha) e 1,03g Na_2HPO_4 (Merck Darmstadt, Alemanha). Em seguida, os sais foram adicionados em béquer contendo aproximadamente 200mL de H_2O mQ. Após, foi usado um agitador magnético para homogeneização e foi feito o ajuste do pH com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), com concentração arbitrária suficiente para deixar a solução em pH 7,0. Em seguida, a solução foi transferida para balão volumétrico e o volume foi completado com 250mL de água mQ;

- Trapsol® (Ciclodextrina: Randomly Methylated β -Cyclodextrin): foi pesado 1,40g de Ciclodextrina (Cyclodextrin Technologies Development Inc.). Em seguida, a ciclodextrina foi transferida para um béquer, sendo adicionada de acetona/água 1:2, agitando-se até completar 20mL;
- Solução Fluoresceína 40 nM (Fluorescein Sodium Salt): foi pesada e preparada uma solução 1mg/mL de Fluoresceína - Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha). Após, foram feitas duas diluições, uma de 10^{-2} mg/mL e a outra de 10^{-4} mg/mL. A partir daí foi tomada uma alíquota de 0,602 mL da solução 10^{-4} mg/mL e adicionaram-se 3,398 mL da solução de tampão fosfato;
- AAPH 153 mM: foi pesado 0,08298g do AAPH - Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e, em seguida, foram adicionados 2,0 mL de tampão fosfato 75mM pH 7,0;
- Metanol grau HPLC (CH_3OH): solvente usado Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Acetona grau HPLC (CH_3COCH_3): solvente usado Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.3 Compostos utilizados

Os compostos utilizados em nosso estudo são da classe dos azóis. Foram selecionados: 34 compostos (26 pirazolinas, 1 isoxazol e 7 tiazóis). Esses compostos foram sintetizados no Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente da Universidade de São Paulo (CEPEMA-USP). Os mesmos foram disponibilizados pelos Doutores Lucas Pizutti, Alex Fabiani Claro Flores e Claudio Martin Pereira de Pereira. A avaliação antioxidante dos compostos disponibilizados foi uma extensão do Projeto Jovem Pesquisador FAPESP (2006/56315-6), coordenado pelo Doutor Pereira (CEPEMA/USP) e Prof. Dr. Frank Herbert Quina (Instituto de Química/USP).

A determinação de uma potencial atividade biológica, destes compostos, servirá para a pesquisa e o desenvolvimento de novas substâncias de interesse para a saúde. Nas Figuras 18 e 19, estão descritos os compostos com suas respectivas estruturas, nomenclatura IUPAC e códigos adotados no manuseio dos compostos durante as análises.

3,5-dimetil-1-fenil-1H-pirazol	FP		3,5-difênil-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P01		3-fênil-5-(4-metoxifênil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P02		5-(4-clorofênil)-3-fênil-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P03		3-fênil-5-(4-fluorofênil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P04
3,5-dimetil isoxazol	I01		3-fênil-5-(2-metoxifênil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P08		3-fênil-5-(2-bromofênil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P09		5-(2,4-diclorofênil)-3-fênil-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P10		3-fênil-5-(2-tolil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P11
3,5-dimetil-1H-pirazol	P00		5-(3-bromofênil)-3-fênil-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P06		3-fênil-5-(4-metoxifênil)-4,5-diidro-1H-pirazol amidinopirazol	P13		3-fênil-5-(2-metoxifênil)-4,5-diidro-1H-pirazol amidinopirazol	P17		5-(2,4-diclorofênil)-3-fênil-4,5-diidro-1H-pirazol amidinopirazol	P18
3,5-dimetil-1-fênil-1H-pirazol	FP		5-(4-bromofênil)-3-fênil-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P05		3-fênil-5-(4-bromofênil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol	P12						

Figura 18. Quadro de compostos testados 2: 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis

<p>2-[5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]-4-phenylthiazol</p>	T01
<p>5-(2-bromophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-amidinopirazol</p>	P24
<p>3-fenil-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol</p>	P23
<p>3-fenil-5-(4-bromofenil)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol</p>	P22
<p>3-fenil-5-(3-nitrofenil)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol</p>	P21
<p>5-(3,4-dimetoxifenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-amidinopirazol</p>	P20
<p>3-fenil-5-(2-tolil)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol</p>	P19
<p>2-[5-(4-bromofenil)-3-phenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-yl]-4-feniltiazol</p>	T07
<p>2-[5-(4-bifenilil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-yl]-4-feniltiazol</p>	T06
<p>2-[5-(2-bromofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-yl]-4-feniltiazol</p>	T05
<p>2-[5-(4-clorofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-yl]-4-feniltiazol</p>	T04
<p>2-(3,5-difenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-yl)-4-feniltiazol</p>	T03
<p>2-[5-(3-nitrofenil)-3-phenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-yl]-4-feniltiazol</p>	T02

Figura 19. Continuação de quadro de compostos testados 2: 3,5,-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis

4.4 Metodologia ORAC

A primeira etapa para a verificação da determinação antioxidante pela metodologia ORAC é a escolha do solvente a ser usado; para isso realizamos testes simples de diluição com alguns solventes, acetona, metanol, acetato de etila, isopropanol. Estes testes foram realizados da seguinte forma: pesou-se 1mg do composto testado em tubos de ensaio e foi adicionada uma alíquota de 1mL do solvente em teste, após a adição do solvente o tubo foi agitado em vórtex para verificação da solubilidade do composto.

Após a escolha do solvente adequado (acetona) as amostras foram pesadas, adicionadas em tubos de ensaio de 3 mL e diluídas para soluções de 1mg/mL em acetona, sendo colocadas em banho de gelo. Em seguida, foram realizadas as diluições subsequentes em tampão fosfato 75mM pH 7,0 mantendo-as em banho de gelo. Esta etapa foi realizada para a determinação da metodologia a ser empregada. Quando o composto é hidrofílico, após a adição do tampão fosfato 75mM pH 7,0 não ocorre nenhuma alteração, já quando o composto é lipofílico, ocorre a precipitação do mesmo em presença do tampão fosfato 75mM pH 7,0, sendo necessário realizar suas diluições em β -ciclodextrina 7% no lugar do tampão fosfato, única etapa diferencial entre as duas metodologias na determinação ORAC.

O próximo passo foi a realização do teste da fluoresceína: adicionaram-se 150 μ L de (FL) com 50 μ L de tampão fosfato em um poço da microplaca de 96 poços. Após isso, foi feita uma leitura da fluoresceína no leitor de microplaca BIOTEK no qual o valor da solução de fluoresceína tem que ser mantido nos

intervalos entre 14.000 e 15.000 (R.F.U.) para o uso da solução na metodologia ORAC.

Em seguida foi iniciada a distribuição em placa: alíquotas de 25µL da amostra diluída, padrão (Trolox, Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e tampão (poços controle) (na metodologia lipofílica usou-se β-ciclodextrina) foram distribuídas em placa de 96 poços, seguidas da adição de 150µL de solução de fluoresceína sódica (40nM em tampão fosfato 75mM pH 7,0). A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de AAPH (153 mM em tampão fosfato 75mM pH 7,0), seguida de agitação por 10 segundos no leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Detection.

A fluorescência foi monitorada cineticamente a cada minuto durante uma hora, em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Detection com filtro de excitação de 485/20nm e de emissão de 528/20nm. A fluorescência foi medida a partir do fundo de cada poço com a sensibilidade do equipamento ajustada para 60. Os poços externos foram preenchidos com 300µL de água para garantir a homogeneidade térmica da placa (OU *et al.*, 2001; HELD, 2005).

4.5 Determinação do ensaio piloto

Foi preparada uma solução inicial do 1mg/mL do composto e, em seguida, foram feitas cinco diluições sucessivas nas seguintes concentrações: 500, 100, 50, 10 e 5µg/mL. Após essa etapa, os outros reagentes usados na análise ORAC foram preparados: a fluoresceína; a solução de Trolox que serviu de padrão nas seguintes concentrações: 100; 50; 25; 12,5; 6,25µM/mL; e o radical

peroxil AAPH 153 mM. O próximo passo foi a realização do teste da fluoresceína: 150µL de (FL) com 50µL de tampão fosfato em um poço da microplaca de 96 poços, seguindo os mesmos padrões usados na metodologia ORAC.

Após essa etapa foi iniciada a distribuição em placa segundo o modelo demonstrado na Figura 20. Nos poços externos foram adicionados 300µL de água (●) em volta da placa para manter uma proteção térmica no sistema; nos pontos brancos (○) foram adicionados 200 µL de tampão fosfato, quando o composto usado foi hidrofílico (para os compostos lipofílicos usou-se a ciclodextrina 7% em solução de acetona/água 1:1); nos pontos controles (●) foram adicionados 25µL de tampão fosfato (na metodologia lipofílica usou-se ciclodextrina 25µL) + 150µL de fluoresceína 40nm; nos pontos do Trolox (●) foram adicionados 150µL de fluoresceína 40nm + 25µL Trolox nas concentrações de 6,25-100 µM; nos pontos das amostras (●) foram adicionados 25µL das amostras nas concentrações usadas no PILOTO. Após a distribuição foram adicionados 150µL de fluoresceína 40nm diluída em tampão fosfato 75mM pH 7,0 em todos os poços, menos nos poços brancos. Depois da distribuição de todos os pontos necessários, a placa foi incubada a 37°C durante 30min. Após isso, a reação foi iniciada pela adição de 25 µL de AAPH (153mM em tampão fosfato 75mM pH 7,0) (exceto nos poços brancos), seguindo a ordem inversa de preenchimento: amostras, Trolox e controle. Em seguida foi realizada agitação por 10 segundos no leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Detection.

A fluorescência foi monitorada cineticamente, a cada minuto durante uma hora após a adição do AAPH, em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Detection com filtro de excitação de 485/20nm e de emissão de 528/20nm. A determinação da atividade dos compostos foi medida a partir do fundo de cada poço, com a sensibilidade ajustada para 60 (OU *et al.*, 2001; HELD, 2005). O resultado da integração dos dados obtidos foi a área sob a curva de fluorescência integrada ao longo do tempo, usando o *software* Gen5. Todos os valores encontrados foram corrigidos usando-se a área do controle (25μL de tampão + 150μL de fluoresceína 40nM + 25mL AAPH), para se obter a área sob a curva (AUC) de cada amostra. O procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra em cada concentração. Os valores foram expressos em micromoles equivalentes de Trolox/ g da amostra ± desvio padrão. Assim, os maiores valores de ET significam maior capacidade antioxidante da amostra. O resultado obtido nas análises foi representado através da equação de regressão entre a concentração de Trolox e a área sob a curva de decaimento

de fluorescência (AUC), utilizando o programa Microsoft Excel, e está representado pela Figura 21.

Figura 21. Determinação da atividade antioxidante do P08 expressa como a área sob a curva (AUC)

4.6 Medição da fluorescência dos compostos

Para verificação da fluorescência foram selecionados os seguintes compostos:

- ✓ 3,5-dimetil-1H-pirazol;
- ✓ 3-fenil-5-(4-fluorfenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol;
- ✓ 3-fenil-5-(2-metoxifenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol;

- ✓ 5-(2,4-diclorofenil)-3-fenil-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol e os derivados tiazóis 2-[5-(4-metoxifenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol;
- ✓ 2-[5-(3-nitrofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol;
- ✓ 2-(3,5-Diphenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazole;
- ✓ 2-[5-(4-Chlorophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]-4-phenylthiazole;
- ✓ 2-[5-(2-bromofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol;
- ✓ 2-[5-(4-bifenilil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol;
- ✓ 2-[5-(4-bromofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol.

O primeiro passo para a determinação da fluorescência dos compostos foi a verificação dos espectros ultravioleta UV, na intenção de saber o comprimento de onda de máxima absorção de cada composto, para determinação das análises de fluorescência. Abaixo, representado na Figura 22, está o espectro UV-Vis do composto P08.

3-fenil-5-(2-metoxifenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol

Figura 22. Espectro de absorção do composto P08

Os espectros UV-Vis foram medidos utilizando-se um espectrofotômetro Hewlett-Packard (modelo 8452A Diode Array) com varredura de 200 a 800nm. Estas análises foram realizadas como uma simulação da determinação da metodologia ORAC, ou seja, foram usadas as mesmas condições nas quais os compostos quantificados com atividade antioxidante foram determinados pela metodologia ORAC. Estas análises foram realizadas na busca de encontrar alguma possível interferência causada pelos compostos ao método usado no estudo.

Os compostos foram preparados nas concentrações de 1mg/mL em acetona e, após isso, foram diluídos nas concentrações em que foram determinados no teste ORAC, (FP: 14 – 4µg/mL; P04 6,5-1,5µg/mL; P08 6,5-1,5µg/mL; P10 5,5-1,5µg/mL; T01 10-5µg/mL; T02 15-10µg/mL). Tendo posse dos valores de máxima absorbância dos compostos, o segundo passo foi a realização das análises de fluorescência (Figura 23). Estas análises foram realizadas no fluorímetro HITACHI (modelo: F-4500 Fluorescence Spectrophotometer).

2-[5-(3-nitrofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-il]-4-feniltiazol

Figura 23. Espéctro de emissão do composto T02

Em um primeiro passo os compostos foram determinados individualmente apenas em solvente, para verificação da sua atividade de fluorescência. Após isso, verificamos a atividade de emissão e de excitação da fluoresceína na mesma solução usada no método ORAC. Seguindo a mesma sequência, foram realizadas algumas simulações para verificar se algum composto teria interferência na atividade de fluorescência da fluoresceína: fluoresceína com tampão fosfato e com duas vezes o tampão fosfato, fluoresceína com acetona e duas vezes a acetona, fluoresceína com os compostos e com duas vezes a concentração dos compostos com atividade antioxidante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos derivados sintéticos: 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis

Para a avaliação da atividade antioxidante dos compostos selecionados, a bioatividade foi avaliada inicialmente via DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Entretanto, estudos preliminares, denominados PILOTO, mostraram uma limitação desse método, com os compostos utilizados, haja vista que a metodologia DPPH utilizava solventes alcoólicos, que não solubilizavam totalmente os compostos alvo, o que impossibilitou o teste para a maioria dos compostos utilizados neste estudo.

A partir daí foi proposta a utilização de uma nova metodologia para o estudo. Essa metodologia deveria ter disponibilidade, ampla aplicação, ou seja, possibilidade de analisar substâncias com características físico-químicas diferentes, confiabilidade e reprodutibilidade na obtenção dos resultados.

Partindo das necessidades encontradas no estudo e da disponibilidade de aplicação do método, a metodologia selecionada para análise dos compostos foi a *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) (OU *et al.*, 2001). O método ORAC tem se mostrado uma metodologia eficiente para avaliação antioxidante de substâncias naturais e sintéticas, amostras hidrofílicas e lipofílicas, demonstrando, assim, ampla aplicação em diferentes substâncias. Desta forma, este método foi aplicado para uma série de compostos sintéticos derivados de pirazol, tiazol e 3,5-dimetil isoxazol.

5.2 Determinação da solubilidade dos derivados sintéticos: 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis para o método ORAC

Para análise exploratória e inicial, foi verificado qual o solvente mais adequado para as análises utilizando o método ORAC. E, dentre todos os solventes testados a acetona foi o mais indicado para as análises dos compostos estudados, pois a mesma solubilizou todas as amostras.

Após a verificação da solubilidade das amostras no solvente, foi verificado também qual das duas metodologias seria aplicada para análise antioxidante de cada composto nos quais: a metodologia hidrofílica foi usada para compostos com características hidrofílicas e a metodologia lipofílica foi usada para compostos com características lipofílicas.

Na segunda etapa, os compostos foram preparados em soluções de 1mg/mL em solução tampão fosfato. Essa etapa foi determinante para a análise, pois os compostos com características lipofílicas precipitam-se em presença do tampão fosfato, que é usado no preparo das soluções para a determinação hidrofílica do método ORAC (OU *et al.*, 2001). Com a precipitação de alguns compostos em tampão fosfato, verificamos que seria necessário utilizar as duas aplicações (hidrofílica e lipofílica) do método ORAC, para análise dos compostos. A única diferença entre as duas metodologias é o uso da β -ciclodextrina 7% (Trapsol®: Ciclodextrina: Randomly Methylated Beta Cyclodextrin) na metodologia lipofílica substituindo o tampão fosfato usado na metodologia hidrofílica (HUANG, 2002).

A ciclodextrina tem sido cada vez mais utilizada como veículo para melhorar a solubilidade de compostos lipossolúveis em meio aquoso e em produtos farmacêuticos e indústrias de alimentos (HUANG, 2002).

5.3 Determinação do ensaio piloto para avaliação antioxidante do 3,5-dimetil isoxazol , pirazóis e tiazóis via método ORAC

Com o resultado das características de solubilidade e com a solução de 1mg/mL pronta, foi realizado o ensaio denominado PILOTO. Esse ensaio foi muito importante, pois a partir dele foi possível detectar o potencial antioxidante do composto testado, ou seja, o ensaio PILOTO demonstrou o potencial antioxidante de cada composto e indicou a concentração que obteve melhor dose resposta. Isso determina se o composto vai ser quantificado ou não. De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, podem reduzir significativamente ou prevenir a oxidação deste substrato oxidável são consideradas bons antioxidantes. De acordo com o conceito de bons antioxidantes, foram selecionados 6 compostos possuindo estas características para quantificação no estudo, os outros 28 compostos não foram classificados dentro destas características e por isso não foram quantificados no estudo.

5.4 Perfil antioxidante dos compostos testados

No estudo realizado foram testados 34 compostos (26 pirazolinas, 1 isoxazol e 7 tiazóis). Dentre estes, seis compostos revelaram atividade antioxidante.

A utilização do método ORAC permitiu verificar não só a atividade antioxidante, como demonstrou, também, que, tratando-se de avaliação de atividade antioxidante, existe a necessidade de se utilizar uma metodologia adequada, pois alguns compostos possuem características específicas. Entre estas, destacam-se: características físico-químicas, hidrossolubilidade, lipossolubilidade e possível afinidade entre o composto e a molécula de radical livre utilizada no método. Estes fatores podem provocar resultados não confiáveis. Sendo assim, verificamos que a versatilidade e a amplitude de aplicação do método ORAC foram determinantes para os resultados obtidos no estudo (OU *et al.*, 2001).

Todos os compostos utilizados no trabalho foram testados pelo ensaio PILOTO, porém foram selecionados apenas os compostos com atividade antioxidante representativa em baixas concentrações. Estes mesmos compostos que obtiveram atividade antioxidante foram quantificados dentro das seguintes faixas de concentração: FP (14 – 4 μ g/mL); P04 (6,5 – 1,5 μ g/mL); P08 (6,5 – 1,5 μ g/mL); P10 (5,5 – 1,5 μ g/mL); T01 (10 – 5 μ g/mL); T02 (15 – 10 μ g/mL).

Os dados obtidos no experimento foram tratados utilizando o programa Microsoft Excel e foram representados através de gráficos (Figura 24), nas quais o eixo Y representa a diferença da área sobre a curva (AUC) e o eixo X a concentração utilizada do composto. Os gráficos representados demonstram a atividade antioxidante obtida de cada composto quantificado pela metodologia ORAC.

Figura 24. Gráficos da atividade antioxidante relativa dos compostos quantificados nas análises de ORAC

Os gráficos apresentados na Figura 24 demonstram a interação entre a concentração da amostra no eixo X e a diferença da área sobre a curva (AUC) no eixo Y; essa relação é diretamente proporcional à atividade antioxidante de cada composto. Esses resultados representam a atividade antioxidante relativa de cada amostra determinada pela metodologia ORAC no estudo.

Com a quantificação dos compostos com atividade antioxidante representativa foram feitas algumas comparações relacionadas aos resultados do método. A primeira está representada na Figura 25 na qual estão os resultados da atividade antioxidante dos seis compostos quantificados no trabalho em relação à atividade do padrão Trolox, usado no método ORAC. O Trolox possui atividade antioxidante máxima de 4.000 $\mu\text{mol/g}$.

Figura 25. Gráfico dos resultados das análises de ORAC

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 25, podemos observar que o composto com menor atividade determinada obteve atividade de 59,55% quando comparado ao valor obtido pelo Trolox, demonstrando atividade antioxidante maior que a metade do valor da atividade do Trolox. O composto com maior atividade no estudo obteve atividade de 218,47% maior, quando comparada ao valor obtido pelo Trolox, sendo mais antioxidante que duas vezes o padrão Trolox. Estes resultados foram considerados bastante representativos para estas moléculas, tendo em vista que algumas delas são inéditas na literatura.

Durante o tratamento dos dados obtidos com as análises ORAC, foi usada a média aritmética para determinar o valor médio de cada ponto analisado em triplicada. Porém, o uso da média não nos garante um resultado confiável, pelo fato de poder existir uma dispersão neste resultado. Por isso, para complementar os resultados, foram realizados os cálculos de desvio padrão dos compostos. O cálculo do desvio padrão representa o quanto os valores dos quais se extraiu a média são próximos ou distantes da própria média, ou seja, este fator calcula a dispersão dos resultados obtidos.

No estudo realizado determinamos o valor máximo de 10% de desvio padrão para os resultados obtidos com o uso da metodologia ORAC. Os valores dos dados analisados estão demonstrados na Figura 26, na qual foram comparados os valores obtidos com o valor máximo admitido no estudo.

Figura 26. Gráfico dos desvios padrão das amostras com atividade antioxidante

Como observado na Figura 26, o desvio padrão máximo obtido foi de 7,78% e o desvio padrão mínimo foi de 4,09%. Os resultados apresentaram valores menores que 10%, valor determinado para o estudo, demonstrado que os valores dos quais se extraiu a média são próximos da própria média, isto é, os resultados obtiveram baixa dispersão.

5.5 Verificação de fluorescência dos compostos com atividade antioxidante, pirazóis e tiazóis

A metodologia empregada no estudo verifica a atividade antioxidante, através da proteção da fluoresceína do radical livre presente no meio, ou seja, o composto antioxidante protege a fluoresceína do ataque do radical livre presente no meio reacional. Nesse caso, se o composto apresentar fluorescência ele pode interferir no resultado da análise, gerando um resultado falso na leitura do equipamento.

Para evitar resultados falso nas análises, foram feitas medidas de fluorescência dos compostos que obtiveram resultados representativos utilizando a metodologia ORAC e nos compostos tiazóis, para a verificação de alguma possível interferência dos resultados obtidos na metodologia empregada nos compostos estudados. A verificação da fluorescência dos compostos com atividade antioxidante foi realizada em 4 pirazóis e em todos os compostos da família dos tiazóis (7 tiazóis), pois estes se tratam de alguns compostos inéditos na literatura. Por isso, resolvemos ver como a classe de compostos se comportaria mediante ao teste.

Em particular, os compostos policíclicos aromáticos e heteroaromáticos têm atraído à atenção por sua eletroquímica e suas propriedades fotoquímicas, bem como aplicação como semicondutores orgânicos e materiais luminescentes. De acordo com Umeda *et al.*(2008), alguns compostos com núcleos aromáticos despertam um interesse especial devido sua estabilidade, sua maior capacidade de transporte carga e suas propriedades fluorescentes.

De acordo com as características dos compostos empregados nesse estudo e pelo fato do ORAC ser uma metodologia que usa a fluorescência para essa análise, verificamos a necessidade de realização da determinação da fluorescência dos 4 piazóis e 7 tiazóis, a fim de descartar qualquer interferência possível dos compostos no resultado da determinação da atividade antioxidante.

O primeiro passo na realização dos testes foi para a verificação da fluorescência da fluoresceína em uma simulação usando a fluoresceína com a adição de acetona, uma e duas vezes simulando um excesso de solvente na solução. Essa simulação foi realizada com a intenção de verificar uma possível interferência do solvente usado no método a fluoresceína. As medidas referentes à análise estão demonstradas na Figura 27.

Figura 27. Fluoresceína com a adição de acetona uma e duas vezes

Ao se analisar a Figura 27, verificamos que a fluorescência da fluoresceína em acetona sofre apenas o fenômeno de diluição e que o solvente usado não interfere na fluorescência da fluoresceína.

O próximo passo foi testar o comportamento da fluoresceína e da fluoresceína com os compostos que demonstraram atividade antioxidante.

A análise foi realizada reproduzindo novamente o método utilizado, além de simular um excesso de composto no meio para verificação de uma possível interferência dos compostos com fluorescência em concentrações dobradas. Essa análise está demonstrada na Figura 28, que apresenta, também, que o efeito provocado pela adição de até duas vezes a concentração dos compostos com atividade antioxidante em acetona na solução de fluoresceína teve o mesmo efeito demonstrado na Figura 27, onde a fluoresceína sofreu apenas um fenômeno de diluição, não havendo outra interferência por parte dos compostos usados na determinação ORAC.

Figura 28. Fluoresceína e compostos com adição de até duas vezes a concentração

Finalmente, foram feitas as medidas de fluorescência dos compostos com atividade antioxidante individualmente para verificar se os mesmos possuíam algum tipo de fluorescência e quais os seus valores.

Dos seis compostos com atividade antioxidante testados foi verificado que os compostos T01 (2-[5-(4-metoxifenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol) e T02 (2-[5-(3-nitrofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol) possuem fluorescência em torno de 450nm (Figura 29).

Figura 29. Espectro de emissão dos compostos com atividade antioxidante

Os valores obtidos nas análises de fluorescência demonstraram que nenhum dos compostos teve qualquer interferência nos resultados obtidos na determinação do método ORAC, nem por emissão nem por supressão de fluorescência, porque os compostos determinados possuem absorvidade abaixo de 425nm e fluorescência em 450nm, como demonstra a Figura 29. E a fluoresceína possui comprimento de excitação em 485nm e comprimento de emissão em 528, demonstrados nas Figuras 30 e 31.

Figura 30. Espectro de excitação da fluoresceína

Figura 31. Espectro de emissão da fluoresceína

A determinação rápida e eficaz da capacidade antioxidante de substâncias é de grande interesse para médicos e especialistas em nutrição, saúde e ciência. Este interesse vem da grande evidência da importância de ERO e de ERN no envelhecimento e na patogênese (OU *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2005). Para os pesquisadores da área de antioxidantes é muito importante conseguir conhecer e mensurar a capacidade antioxidante das mais diferentes substâncias, devido à complexidade e à composição de algumas substâncias. Separar cada composto antioxidante e estudá-lo é caro e ineficiente. Por isso, é muito atraente para os investigadores ter um método conveniente para tal análise.

No passado, o maior problema existente na determinação da atividade antioxidante era a falta de um método validado que pudesse medir de forma confiável a capacidade antioxidante de alimentos e de amostras biológicas (HUANG *et al.*, 2005). Nos dias atuais existem inúmeros métodos publicados e reconhecidos que medem a capacidade antioxidante total *in vitro* (HUANG *et al.*, 2005). Estes ensaios diferem um do outro em termos de substrato; nesse caso o substrato é denominado como molécula (podendo ser molécula UV ou uma molécula de fluorescência), condições reacionais e métodos de quantificação. É muito difícil comparar os resultados de diferentes ensaios, como Frankel e Meyer (2000) já concluíram. Entretanto, novos testes para medir a capacidade antioxidante continuam a ser relatados (HUANG *et al.*, 2005).

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Inicialmente, no estudo, foi testado o método DPPH (escrever por extenso) que não mostrou-se satisfatório, pois os compostos testados possuem diferentes características de solubilidade (hidrofílicas e lipofílicas). Esse fato nos levou à procura de outro método que suprisse essa aplicação, no caso o ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio – *Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay*), por ser uma metodologia reconhecida na literatura e por possuir capacidade de determinar substâncias com diferentes características de solubilidade; sendo, desta forma, um método adequado para avaliação antioxidante desejada.

Em relação à capacidade antioxidante, foram estudados azóis originados de processos sintéticos limpos. Através de análises de fluorescência dos azóis com proeminente atividade antioxidante, concluímos que, apesar dos compostos tiazós T01 (2-[5-(4-metoxifenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol) e T02 (2-[5-(3-nitrofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol) possuírem fluorescência, eles não provocam qualquer interferência no método, pois possuem uma faixa de excitação e emissão diferentes da fluoresceína. O método ORAC demonstrou-se realmente ideal para a determinação da atividade antioxidante para os compostos azóis estudados.

De acordo com os resultados obtidos no estudo, concluímos que alguns compostos azóis se mostraram bons antioxidantes quando comparados ao Trolox®. Os compostos P8 (3-fenil-5-(2-metoxifenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-

1H-pirazol); P4 (3-fenil-5-(4-fluorfenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol) P10 (5-(2,4-diclorofenil)-3-fenil-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol), apresentaram representativa capacidade antioxidante em relação ao Trolox. Em suma, o nosso estudo revelou que essas moléculas são estruturas promissoras no aspecto antioxidante, ampliando assim o espectro de bioatividade dessa importante classe de compostos.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, K.R.A.; CHOWDHURY, M.A.; DONG, Y.; DAS, D.; YU, G.; VELAZQUEZ, C.; SURESH, M.R.; KNAUS, E.E. Diazen-1-ium-1,2-diolated nitric oxide donor ester prodrugs of 5-(4-carboxymethylphenyl)-1-(4-methanesulfonylphenyl)-3-trifluoromethyl-1H-pyrazole and its aminosulfonyl analog: synthesis, biological evaluation and nitric oxide release studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, n.14, p.5182-5188, 2009.

ATKINS, P.W.; JONES, L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. p.92-93.

AUGUSTO, O. **Radicais livres**: bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. p.38, 41-45.

BANERJEE, R., ed. **Redox biochemistry**. Hoboken: Wiley-Interscience, 2008. p.56.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v.78, n.2, p.547-581, 1998.

BHANDARI, S.V.; DANGRE, S.C.; BOTHARA, K.G.; PATIL, A.A.; SARKATE, A.P.; LOKWANI, D.K.; GORE, S.T.; DESHMANE, B.J.; RAPARTI, V.T.; KHACHANE, C.V. Design, synthesis and pharmacological screening of novel nitric oxide donors containing 1,5-diarylpyrazolin-3-one as nontoxic NSAIDs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.11, p.4622-4636, 2009.

BOSCHI, D.; LAZZARATO, L.; ROLANDO, B.; FILIERI, A.; CENA, C.; DI STILO, A.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Nitrooxymethyl-substituted analogues of celecoxib: synthesis and pharmacological characterization. **Chemistry & Biodiversity**, v.6, n.3, p.369-379, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRUNE, K. The early history of non-opioid analgesics. **Acute Pain**, v.1, n.1, p.33-40, 1997.

CHOE, E.; MIN, D.B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, n.1, p.1-22, 2006.

CHOPRA, I.; KUMARI, B. Dissipation of Fipronil in water under laboratory conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.83, n.6, p.828-831, 2009.

DIAZ, J., SERRANO, E., ACOSTA, F., CARBONELL, L.F. References intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidase stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 2215-2217, 1998.

DAVIES, K.J.A.; PRYOR, W.A. The evolution of free radical biology & medicine: a 20-year history. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, n.10, p.1263-1264, 2005.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.

EICHER, T.; HAUPTMANN, S. **The chemistry of heterocycles**: structure, reactions, syntheses, and applications. Stuttgart, New York: George Thieme, 1995. p.180-184. (Thieme organic chemistry monograph series).

ELGUERO, J.; GOYA, P.; JAGEROVIC, N.; SILVA, A.M.S. Pyrazoles as drugs: facts and fantasies. In: ATTANSAI, O.A.; SPINELLI, D., eds. **Targets in heterocyclic systems**: chemistry and properties. Roma: Italian Society of Chemistry, 2002. v.6, p.167-203.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, n.13, p.1925-1941, 2000.

FORMAN, H.J.; THOMAS, M.J. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. **Annual Review of Physiology**, v. 48, p. 669-680, 1986.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *costus spicatus***. Canoas, 2005. 79p. Dissertação de Mestrado - Universidade Luterana do Brasil.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & Aging**, v.18, n.9, p.685-716, 2001.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.476, n.2, p.107-112, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. p.19-21, 30, 42, 79-82, 102, 105-106, 110, 113, 115.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, n.2, p.231-255, 2004.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v.11, n.3, p.298-300, 1956.

HARMAN, D. The free radical theory of aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.5, n.5, p.557-561, 2003.

HARMAN, D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. **Biogerontology**, v.10, p.773–781, 2009.

HELD, P. Performing oxygen radical absorbance capacity assays with Synergy™ HT. 2005. 9p. Disponível em: http://www.biotek.com/resources/docs/ORAC_Assay_Application_Note.pdf. Acesso em: 2 dez. 2009.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -Cyclodextrin as the solubility enhancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.7, p.1815-1821, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; PRIOR, R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.16, p.4437-4444, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

KANG, T.-S.; JO, H.-O.; PARK, W.-K.; KIM, J.-P.; KONISHI, Y.; KONG, J.-Y.; PARK, N.-S.; JUNG, Y.-S. Synthesis and antioxidant activities of 3,5-dialkoxy-4-hydroxycinnamamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, n.5, p.1663-1667, 2008.

KOOLMAN, A.H.; BLOKS, V.W.; OOSTERVEER, M.H.; JONAS, I.; KUIPERS, F.; SAUER, P.J.J.; VAN DIJK, G. Metabolic responses to long-term pharmacological inhibition of CB1-receptor activity in mice in relation to dietary fat composition. **International Journal of Obesity**, v.34, n.2, p.374-384, 2010.

LANGE, J.H.M.; KRUSE, C.G. Cannabinoid CB1 receptor antagonists in therapeutic and structural perspectives. **Chemical Record**, v.8, n.3, p.156-168, 2008.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. São Paulo, 2008. 182p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6056-6063, 1969.

OGA, S.; ZANINI, A.C. **Fundamentos de toxicologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.39-47.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.D. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p.4619-4626, 2001.

PACKER, L.; CADENAS, E. **Handbook of synthetic antioxidants**. New York: M. Dekker, 1997. p.16, 29-31,35. (Antioxidants in health and disease, 4).

SANTOS, A.B. **Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira**: estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria do funcional da densidade (TFD). Ribeirão Preto, 2006. 91p. Tese de Doutorado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, n.4, p.308-313, 2004.

SCHOFIELD, K.; GRIMMETT, M.R.; KEENE, B.R.T. **Heteroaromatic nitrogen compounds**: the azoles. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. p.86.

SELTZMAN, H.H. Recent CB1 cannabinoid receptor antagonists and inverse agonists. **Drug Development Research**, v.70, n.8, p.601-615, 2009.

SEO, H.J.; KIM, M.J.; LEE, S.H.; LEE, S.-H.; JUNG, M.E.; KIM, M.-S.; AHN, K.; KIM, J.; LEE, J. Synthesis and structure -activity relationship of 1,2,4-triazole-containing diarylpyrazolyl carboxamide as CB1 cannabinoid receptor-ligand. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, n.3, p.1149-1162, 2010.

TALAS, Z.S.; OZDEMIR, I.; YILMAZ, I.; GOK, Y.; ORUN, I. The investigation of the antioxidative properties of the novel synthetic organoselenium compounds in some rat tissues. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, n.5, p.575-579, 2008.

TORRES, L.H.L. **Efeitos da Inalação da fumaça do cigarro no estress oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens**. São Paulo, 2009. 100p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ULRICH-MERZENICH, G.; ZEITLER, H.; VETTER, H.; KRAFT, K. Synergy research: vitamins and secondary plant components in the maintenance of the redox-homeostasis and in cell signaling. **Phytomedicine**, v.16, n.2, p.2-16, 2009.

UMEDA, NOBUYOSHI; TSURUGI, HAYATO; SATOH, TETSUYA; MIURA, MASAHIRO. Fluorescent naphthyl- and anthrylazoles from the catalytic coupling of phenylazoles with internal alkynes through the cleavage of multiple C-H bonds. **Angewandte Chemie, International Edition**, v.47, n.21, p.4019-4022, 2008.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

WANG, Q.; WANG, Y.; YANG, Z.-Y. Synthesis, characterization, and the antioxidative activity of 4-[(3,4-dimethyl pyrrole-2-carbonyl)hydrazono](phenyl)-3-methyl-1-phenylpyrazol-5-ol and its zinc(II), copper(II), nickel(II) complexes. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.56, n.7, p.1018-1021, 2008.

WELKER, A.F. **Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres**. São Paulo, 2009. 270p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

APÊNDICES

	Pág.
Apêndice 1. Espectro de absorção e de emissão do FP.....	69
Apêndice 2. Espectro de absorção e de emissão do P04.....	70
Apêndice 3. Espectro de absorção e de emissão do P08.....	71
Apêndice 4. Espectro de absorção e de emissão do P10.....	72
Apêndice 5. Espectro de absorção e de emissão do T01.....	73
Apêndice 6. Espectro de absorção e de emissão do T02.....	74
Apêndice 7. Espectro de absorção e de emissão do T03.....	75
Apêndice 8. Espectro de absorção e de emissão do T04.....	76
Apêndice 9. Espectro de absorção e de emissão do T05.....	77
Apêndice 10. Espectro de absorção e de emissão do T06.....	78
Apêndice 11. Espectro de absorção e de emissão do T07.....	79
Apêndice 12. Ultrasound Irradiation promoted large-scale preparation in aqueous media and antioxidant activity of azoles	80
Apêndice 13. Antioxidant capacity of 2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> - pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles	84
Apêndice 14. Synthesis of 4-iodopyrazoles: A Brief Review	89

Espectro de absorção do FP

Espectro de Emissão do FP

Espectro de absorção do P04

3-fenil-5-(4-fluorfenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol

Espectro de Emissão do P04

3-fenil-5-(4-fluorfenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol

Espectro de absorção do P08**3-fenil-5-(2-metoxifenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol** **Espectro de Emissão do P08****3-fenil-5-(2-metoxifenil)-1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazol**

Espectro de absorção do P10

Espectro de Emissão do P10

Espectro de absorção do T01

2-[5-(4-metoxifenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol

Espectro de Emissão do T01

2-[5-(4-metoxifenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol

Espectro de absorção do T02 **Espectro de Emissão do T02**

Espectro de absorção do T03

Espectro de Emissão do T03

Espectro de absorção do T04

2-[5-(4-clorofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol

Espectro de Emissão do T04

2-[5-(4-clorofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol

Espectro de absorção UV do T05

Espectro de Emissão do T05

Espectro de absorção do T06

2-[5-(4-bifenilil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol

Espectro de Emissão do T06

2-[5-(4-bifenilil)-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol

Espectro de absorção do T07

Espectro de Emissão do T07

Ultrasound Irradiation Promoted Large-Scale Preparation in Aqueous Media and Antioxidant Activity of Azoles

F.A.N. Silva^{a,b,c}, M.P. Galluzzi^a, B. Albuquerque^a, L. Pizzuti^a, V. Gressler^c, D.P. Rivelli^{*b}, S.B.M. Barros^{*b} and C.M.P. Pereira^{*a,c,d,e}

^a*Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA-USP), Universidade de São Paulo, 11573-000, Cubatão, SP, Brazil*

^b*Laboratório de Patologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 055083-000, São Paulo, SP, Brazil*

^c*Laboratório de Análises Toxicológicas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 055083-000, São Paulo, SP, Brazil*

^d*Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05513-970, São Paulo, SP, Brazil*

^e*Departamento de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil*

Received February 01, 2009; Revised March 25, 2009; Accepted March 30, 2009

Abstract: The scaled-up preparation of 1H-pyrazole, 1-phenylpyrazole and isoxazole *via* sonocatalysis is reported. The products were isolated in good yields in short time reaction. These compounds had been assayed for antioxidant activity by ORAC and DPPH methodologies. The results showed that only 1-phenylpyrazole presented good antioxidant activity compared with Trolox[®].

Keywords: Green chemistry, Isoxazole, Pyrazole, Sonocatalysis, ORAC, DPPH.

INTRODUCTION

Azoles and derivatives constitute an interesting class of organic compounds with diverse chemical and pharmaceutical applications [1]. Several methods developed for the synthesis of isoxazole and pyrazole derivatives have been reported, including the use of microwaves and solid-supported or organic catalysts [2-4]. Recently, we described the synthesis of a variety of heterocycles under non-traditional conditions employing microwaves [5,6] and sonocatalysis methods [7-10]. The beneficial effects of ultrasonic irradiation are playing a significant role in process chemistry [11], including large-scale synthesis [12]. Reactions that are performed in water have gained increased interest in synthetic chemistry over the past decade not only for the advantages that result from avoiding extensive drying of reactants, catalysts and solvents, but also for the development of environmentally friendly processes [13-15]. As part of our program to investigate organic reactions amenable to sonocatalysis, we address here the scaled-up synthesis of 1H-pyrazole, 1-phenylpyrazole and isoxazole under mild conditions, with ultrasonic irradiation using water as the reaction solvent.

Antioxidants have become a topic of increasing interest. A literature search revealed that the number of publications on antioxidants and oxidative stress has nearly quadrupled in

the past decade (1684 in 1993; 6510 in 2003). It is of great interest to the general public, medical, nutritional experts, health and food science researchers to know the antioxidant capacity [16]. Therefore, it is very appealing to researchers to have a convenient method for the quick quantitation of antioxidant effectiveness. A total antioxidant capacity assay using one chemical reaction seems to be rather unrealistic and not easy to realize, yet there are numerous published methods claiming to measure total antioxidant capacity *in vitro* [16]. Between these methods, DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) and ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) were chosen because they join different kinds of free radicals and reaction medium. In the ORAC method there is a peroxide radical in an aqueous reaction medium and in the DPPH method, there is a nitrogen radical in organic medium. In the DPPH[°] method, the samples are allowed to react with a stable free radical. The reduction of DPPH[°] is followed by monitoring the decrease in its absorbance at a characteristic wavelength during the reaction [17]. In the ORAC method reaction the FL (fluorescein) is consumed decreasing the fluorescence intensity. In the presence of antioxidant, the FL decay is inhibited. It uses the following components: (a) AAPH (an azo radical initiator); (b) a molecular probe FL (fluorescein) for monitoring reaction progress; (c) antioxidant. The advantage of the ORAC approach is that it applies kinetics parameters (area under the curve) equally well for both antioxidants that exhibit distinct lag phases and those samples that have no lag phases. In fact, an antioxidant database has been generated applying the ORAC assay in combination with the total phenols assay [16]. Then we decided to use both methods to evaluate the same activity, to obtain more consistent results.

*Address correspondence to these authors at the Laboratório de Patologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 055083-000, São Paulo, SP, Brazil; E-mails: smbarros@usp.br, diogopineda@gmail.com
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05513-970, São Paulo, SP, Brazil; E-mail: claudio.martin@pq.cnpq.br

RESULTS AND DISCUSSION

Recently, we described the practice of biorenewable solvents in heterocyclic synthesis [8,14,18,19]. In the present work, we develop an environmentally friendly procedure for the synthesis of 3,5-dimethyl-1*H*-pyrazole (2), 3,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole (3) and 3,5-dimethylisoxazole (4) by the reaction of 2,4-pentanedione (1) with 1,2-dinucleophiles such as hydrazine hydrate, phenyl hydrazine and hydroxylamine hydrochloride, under ultrasound irradiation and aqueous media (Scheme 1). Our methodology is very simple and does not require a catalyst, acid or long reaction times. In addition, our method furnished the isoxazole (4) in one pot instead of the 4,5-dihydroisoxazole intermediate usually obtained in such reactions.

Scheme 1. Scaled-up preparation of azoles 2-4.

The reactants were mixed and sonicated until the condensation reaction had been completed. Using an ultrasonicator of 500 W with a frequency of 20 KHz at 25°C, the reactions were completed in 10 minutes. The comparative results with conventional conditions are shown in Table 1.

The progress of the reactions was monitored by CG. The products were extracted with ethyl acetate and obtained in high purity. Here are presented the advantages of the method *via* sonocatalysis: (i) the reaction is simple to execute; (ii) the products are isolated in good yields (70-99%); (iii) the work-up is very simple; (iv) the reaction time is short (10 min); (v) the isoxazole was obtained in one pot and (vi) the products are obtained in good purity. The products were identified by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and confirmed by mass spectrometry. Extension of this reaction to other substrates and organic species is currently in progress and will be reported in due course.

ORAC Method

The automatic ORAC assay was described by Ou *et al.* [16]. In this method, an azo initiator (AAPH) at 37°C to get hydrogen from the sodium fluorescein reduced the fluorescence measured by the time using a 485/20 nm excitation filter and 528/20 nm emission filter. If an antioxidant compound was added, the fluorescein was saved and kept constant until the end of the antioxidant action. It was made a preliminary ORAC assay to determine which of the three compounds presented antioxidant activity. Only the 3,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole (3) was elected to be submitted to quantification, because it was the only one that showed significant qualitative activity. Briefly, the antioxidant solutions were solubilized in methanol and diluted in phosphate buffer 75 mM pH 7.0. The appropriate dilutions of the samples were prepared, thereafter 25 µL of these solutions were transferred to microplates in triplicate, so was added 150 µL of fluorescein 40 nM diluted in phosphate buffer 75mM pH 7.0 was added. In the same microplate was made, a control (25 µL solvent + 150 µL fluorescein 40 nM) and a Trolox® (standard) curve (150 µL fluorescein 40 nM +

Table 1. Comparison Between Classical and Sonocatalytic Methodologies

Compound	Classical Methodology		Ultrasound Probe	
	Time (h)	Yields (%) ^a	Time (min)	Yields (%) ^a
	12	80	10	99
	12	77	10	76
	24 ^b	60	10	70

^aProducts isolated.^bUnder reflux.

25 μL from appropriate Trolox[®] dilution). To maintain the temperature in the plate, 300 μL water was added around the wells that would be read. After incubation (37°C/30 min) 25 μL AAPH (153 mM in phosphate buffer 75 mM pH 7.0) was added and the plate was shaken during 10 seconds at maximum intensity.

The plate reader (Multi-detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Winooski, VT) was programmed to record the fluorescence of each cycle of 1 minute after addition of AAPH until 60 minutes and the area under the curve of the fluorescence decay was integrated using a Gen5 software. All area values were subtracted from the control (25 μL solvent + 150 μL fluorescein 40 nM + 25 μL AAPH). This difference corresponded to the net area under the curve (net AUC) for each sample (Fig. 1). By the Trolox[®] calibration curve, expressed in its net area under the curve against its μM concentration, the antioxidant activity of the sample can be expressed as Trolox[®] equivalent (TE). This procedure was made for each sample at each concentration. Thus, higher values of TE meant higher antioxidant activity of the sample.

Fig. (1). Relation between sample concentration and net AUC.

DPPH Method

Sample solutions were prepared in methanol and DPPH solution was made in methanol 80% (v/v). Briefly, 50 μL of each sample dilution (determined in the preliminary assay) was added to 150 μL of DPPH solution (100 μM). The decrease in absorbance was determined at 517 nm after 2 hours of incubation in darkness at room temperature (Fig. 2). Trolox[®] was used as standard.

Fig. (2). Relation between absorbance and sample concentration.

The value of antioxidant activity of 3,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazole (3) was $41.01 \pm 2.49\%$ TE to ORAC method and 21.35% to DPPH method. Nevertheless, the dif-

ference between the results, the “*in vitro*” antioxidant assays represent only the activity expected in specific reaction medium. It means that the value of antioxidant activity can be different because there is variable chemical interaction between the free radical used in the assay and the substance being tested. In concern with our experiments, the antioxidant activity of azoles (2) and (4) was insignificant.

EXPERIMENTAL

NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 500 spectrometer (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C) at 300 K. Low resolution mass spectra were obtained on a Varian Saturn 2200 GC/MS spectrometer operating at 70 eV. Melting points were uncorrected. The progress of reactions was monitored on a Thermo Trace GC Ultra chromatograph. The reactions were carried out in a microtip probe connected to a Sonics Vibracell ultrasonic processor of 500 W operating at 20 KHz at 25% of the maximum power output.

General Procedure for the Synthesis of Azoles (2-4) in Water Under Ultrasound Irradiation

In a 250 mL beaker, 2,4-pentanedione (1) (100 mmol, 10 g) and appropriated dinucleophile (110 mmol) were added in water (100 mL), at 0°C. The mixtures were then sonicated by an ultrasonic probe with a frequency of 20 KHz at room temperature (25°C). The complete consumption of 2,4-pentanedione occurred after the time indicated (see the Table 1). After consumption of the starting material, the organic phase was extracted with ethyl acetate (2 $\times$ 40 mL) and washed with cold water (2 $\times$ 40 mL). The organic extract was dried (MgSO₄) and the solvent removed under reduced pressure to give the pure azoles without further purification.

Synthesis of Pyrazoles (2,3) in Water by Conventional Conditions

The 2,4-pentanedione (1) (100 mmol, 10 g) and appropriated hydrazines (110 mmol) were added in water (100 mL), at 0°C. The mixture was stirred at room temperature until the complete consumption of 2,4-pentanedione. The progress of the reaction was followed by GC. After 12 h, the organic phase was extracted with ethyl acetate (2 $\times$ 40 mL) and washed with cold water (2 $\times$ 40 mL). The organic extract was dried (MgSO₄) and the solvent removed under reduced pressure to give the pure azoles without further purification.

Synthesis of 3,5-Dimethylisoxazole (4) in Water by Conventional Conditions

The 2,4-pentanedione (1) (100 mmol, 10 g) and hydroxylamine hydrochloride (150 mmol) were added in water (100 mL), at 0°C. The mixture was stirred, under reflux, until the complete consumption of 2,4-pentanedione. The progress of the reaction was followed by GC. After 24 h, the organic phase was extracted with ethyl acetate (2 $\times$ 40 mL) and washed with cold water (2 $\times$ 40 mL). The organic extract was dried (MgSO₄) and the solvent removed under reduced pressure to give the pure 3,5-dimethylisoxazole without further purification.

3,5-Dimethyl-1H-pyrazole (2)

C₅H₈N₂, mw 96.13; mp 106–109°C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 2.12 (s, 6H, 2CH₃), 5.72 (s, 1H, H4); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 12.0, (2 CH₃), 101.7 (C4), 142.0 (C3, C5); MS (m/z, %): 96 (M⁺, 100).

3,5-Dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazole (3)

C₁₁H₁₂N₂, mw 172.23; Oil; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 2.12 (s, 6H, 2CH₃), 5.98 (s, 1H, H4), 7.30–7.59 (m, 5H, Ph); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 13.3, 12.2 (2 CH₃), 106.7 (C4), 124.6, 127.1, 128.8, 139.2 (6C, Ph), 139.7, 148 (C3, C5); MS (m/z, %): 172 (M⁺, 100), 130 (45), 77 (80).

3,5-Dimethylisoxazole (4)

C₅H₇NO, mw 97.12; Oil; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 2.14, 2.43 (2s, 6H, 2CH₃), 5.99 (s, 1H, H4); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 11.8, 11.1 (2 CH₃), 102.8 (C4), 159.8, 169.2 (C3, C5); MS (m/z, %): 98 (M⁺+1, 100).

CONCLUSIONS

In conclusion, we have described a greener and convenient procedure for the preparation of 3,5-dimethylpyrazoles (2,3) and 3,5-dimethylisoxazole (4) in large-scale, which gets completed 10 minutes at room temperature and may provide an useful method for rapid drug discovery. Our procedure in ultrasound is facile and does not require a catalyst and the water as reaction medium is an additional eco-friendly attribute of this synthetic protocol. Furthermore, 3,5-Dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazole (3) showed satisfactory antioxidant activity compared with Trolox® in both methods used.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to FAPESP (06/58124-3, 06/56315-6), CEPEMA-USP (Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio-ambiente), CNPq (310472/2007-5), Program INCT-CNPq, and CAPES for financial support. Authors also thank Professor Frank H. Quina for valuable contributions on the preparation of this manuscript.

REFERENCES

- [1] Elguero, J.; Goya, P.; Jagerovic, N.; Silva, A. M. S. In *Targets in Heterocyclic System*; Italian Society of Chemistry: Roma, 2002; Vol. 6, pp. 167-203.
- [2] De Luca, L.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Salaris, M.; Taddei, M. Cellulose beads: a new versatile solid support for microwave-assisted synthesis. Preparation of pyrazole and isoxazole libraries. *J. Comb. Chem.*, 2003, 5, 465-471.

- [3] Martins, M. A. P.; Cunico, W.; Pereira, C. M. P.; Sinhorin, A. P.; Flores, A. F. C.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N. 4-Alkoxy-1,1,1-trichloro-3-alken-2-ones: preparation and applications in heterocyclic synthesis. *Curr. Org. Synth.*, 2004, 1, 391-403.
- [4] Shi, C.-L.; Shi, D.-Q.; Kim, S. H.; Huang, Z.-B.; Ji, S.-J.; Ji, M. A novel and efficient one-pot synthesis of furo[3',4':5,6]pyrido[2,3-c]pyrazole derivatives using organocatalysts. *Tetrahedron*, 2008, 64, 2425-2432.
- [5] Martins, M. A. P.; Pereira, C. M. P.; Beck, P.; Machado, P.; Moura, S.; Teixeira, M. V. M.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N. Microwave-assisted synthesis of 5-trichloromethyl substituted 1-phenyl-1H-pyrazoles and 1,2-dimethylpyrazolium chlorides. *Tetrahedron Lett.*, 2003, 44, 6669-6672.
- [6] Martins, M. A. P.; Pereira, C. M. P.; Moura, S.; Frizzo, C. P.; Beck, P.; Zanatta, N.; Bonacorso, H. G.; Flores, A. F. C. Microwave assisted regioselective synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydropyrazoles and pyrazoles. *J. Heterocycl. Chem.*, 2007, 44, 1195-1199.
- [7] Stefani, H. A.; Pereira, C. M. P.; Almeida, R. B.; Braga, R. C.; Guzen, K. P.; Cella, R. A mild and efficient method for halogenation of 3,5-dimethyl pyrazoles by ultrasound irradiation using N-halosuccinimides. *Tetrahedron Lett.*, 2005, 46, 6833-6837.
- [8] Martins, M. A. P.; Pereira, C. M. P.; Cunico, W.; Moura, S.; Rosa, F. A.; Peres, R. L.; Machado, P.; Zanatta, N.; Bonacorso, H. G. Ultrasound promoted synthesis of 5-hydroxy-5-trihalomethyl-4,5-dihydroisoxazoles and beta-enamino trihalomethyl ketones in water. *Ultrason. Sonochem.*, 2006, 13, 364-370.
- [9] Stefani, H. A.; Oliveira, C. B.; Almeida, R. B.; Pereira, C. M. P.; Braga, R. C.; Cella, R.; Borges, V. C.; Savegnago, L.; Nogueira, C. W. Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, 41, 513-518.
- [10] Pereira, C. M. P.; Stefani, H. A.; Guzen, K. P.; Örfão, A. T. G. Improved synthesis of benzotriazoles and 1-acylbenzotriazoles by ultrasound irradiation. *Lett. Org. Chem.*, 2007, 4, 43-46.
- [11] Mason, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 1997, 26, 443-451.
- [12] Cravotto, G.; Cintas, P. Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications. *Chem. Soc. Rev.*, 2006, 35, 180-196.
- [13] Andrade, C. K. Z.; Alves, L. M. Environmentally benign solvents in organic synthesis: current topics. *Curr. Org. Chem.*, 2005, 9, 195-218.
- [14] Stefani, H. A.; Pereira, C. M. P.; Dörr, F. A.; Cella, R. Synthesis of trifluoroacetylketene O,N-acetals in water. *Arkivoc*, 2005, vi, 19-24.
- [15] Li, C. J.; Chan, T. H. *Organic Reactions in Aqueous Media*; Wiley: New York, 1997.
- [16] Huang, D. J.; Ou, B. X.; Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 1841-1856.
- [17] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 1995, 28, 25-30.
- [18] Martins, M. A. P.; Blanco, R. F.; Pereira, C. M. P.; Beck, P.; Brondani, S.; Cunico, W.; Zimmermann, N. E. K.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N. 5-trifluoromethyl-1,2-dimethyl-1H-pyrazolium chlorides: synthesis and H-1, C-13, F-19 and Cl-35 NMR chemical shifts. *J. Fluorine Chem.*, 2002, 118, 69-72.
- [19] Pereira, C. M. P.; Quina, F. H.; Silva, F. A. N.; Emmerich, D. J.; Machulek, A. Synthesis of 4-iodopyrazoles: a brief review. *Mini-Rev. Org. Chem.*, 2008, 5, 331-335.

Trabalho aceito para publicação na Revista Letters in Drug Design & Discovery

July 30, 2010

Dear Dr. Pereira

Thank you for your email. Please note that your article is included in vol.:7 issue 9, November 2010.

Good Day to you!

Best regards,
Saima Izhar

Ms. Saima Izhar
Editorial Assistant

Letters in Drug Design & Discovery
Bentham Science Publishers Ltd
Email: saimaizhar@benthamscience.org

AMBREEN IRSHAD
Senior Manager Publications
Publications Department
Bentham Science Publishers
Email: ambreenirshad@benthamscience.org

ldddd@bentham.org
URL: www.bentham.org

-----Original Message-----

From: claudio.martin@pq.cnpq.br [<mailto:claudio.martin@pq.cnpq.br>]

Sent: Friday, July 30, 2010 1:10 AM

To: LDDD - Online

Subject: (paper 2010 148)

Dear. Ms. Saima Izhar
Editorial Assistant

Please, do you have the number and vol. of our manuscript?
(paper 2010 148)

TITLE: Antioxidant capacity of

2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles

Filipe .A.N. Silva, Lucas Pizzuti, Frank .H. Quina, Sérgio .P. Souza,
Pauline

.F. Rosales, Geonir .M. Siqueira, Claudio .M.P. Pereira,* Silvia .B.M.
Barros*

and Diogo P. Rivelli*

Thanks in advance

Prof. Dr. Claudio M.P. Pereira
Universidade Federal de Pelotas BRAZIL
+55 53 3275 7358

Antioxidant capacity of 2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles

F.A.N. Silva^{a,b}, L. Pizzuti^{c,d,f}, F.H. Quina,^{c,d} S.P. Souza^d, P.F. Rosales,^e G.M. Siqueira,^e C.M.P. Pereira^{*,b,d,e} S.B.M. Barros^{*,b} and D.P. Rivelli^{*,b}

^aLaboratório de Patologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 055083-000, São Paulo, SP, Brazil.

^bLaboratório de Análises Toxicológicas, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 055083-000, São Paulo, SP, Brazil.

^cInstituto de Química, Universidade de São Paulo, 05513-970, São Paulo, SP, Brazil.

^dCentro de Capacitação e Pesquisa em Meio-ambiente, Universidade de São Paulo, 11573-000, Cubatão, SP, Brazil.

^eDepartamento de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

^fUniversidade Federal de Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia.

*Corresponding authors:

E-mail: Silvia B. M. Barros - smb Barros@usp.br

E-mail: Diogo P. Rivelli - diogopineda@gmail.com

E-mail: Claudio M. P. Pereira - claudio.martin@pq.cnpq.br

Abstract: The antioxidant capacity of 2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles was evaluated. The values of antioxidant capacities of compounds 2d and 2e were found to be, respectively, $2,700 \pm 150$ and $3,135 \pm 230$ TE by the ORAC method, corresponding to a significant antioxidant capacity.

Keywords: antioxidant, antioxidant synthetic, green chemistry, thiazole, Trolox, ORAC.

INTRODUCTION

Thiazole derivatives possess a broad spectrum of biological activities, which have attracted much recent attention from medicinal chemists.¹⁻⁵ Several drugs containing the thiazole nucleus, such as bleomycane, bleomycin and tiazofurin, are known antineoplastic agents.⁶

The antioxidant capacity of several thiazolyl compounds has also been reported.⁷⁻⁹ Recently, antioxidants have become a topic of increasing interest.¹⁰⁻¹³ Characterization of the antioxidant capacity of natural and synthetic compounds with potential pharmacological activity is of great interest to medical and nutritional experts, to health and food science researchers and to the public in general.¹⁰⁻¹² Although there is no total antioxidant capacity assay based on a single, easily executable chemical reaction, there are numerous published methods that claim to measure total antioxidant capacity *in vitro*.¹⁰⁻¹² The ORAC method for determining antioxidant capacity uses: (a) AAPH (*an azo radical initiator*) which degrades the fluorescence of the probe; (b) the molecular probe fluorescein (FL) for monitoring the reaction progress and (c) the antioxidant of interest. In the presence of an antioxidant, the decrease in fluorescence is inhibited. The advantage of the ORAC approach is that it provides kinetics parameters (area under the curve) equally well for antioxidants that exhibit distinct lag phases and for those samples that have no lag phases.¹⁰⁻¹² In recent publication, we reported the antioxidant capacity of phenylpyrazole using the ORAC method.¹⁴ In continuation of our research program, we report here the antioxidant evaluation of 2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles, synthetic derivatives compounds of facile preparation (**Scheme 1**).

RESULTS AND DISCUSSION

A preliminary ORAC assay screening was carried out to determine which compounds exhibited the most significant antioxidant capacity. This led to the selection of 2-(5-(3-nitrophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazole (**2d**) and 2-(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-

pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazole (**2e**) for more careful quantification **Table 1**, because the other compounds did not show measurable antioxidant potential by the ORAC method.

Scheme 1. Preparation of 4-phenylthiazole **2a-2e**.

Table 1. Selected experimental compounds (**2**).

Compound 2a	Compound 2b	Compound 2c	Compound 2d*	Compound 2e*

* Compound with antioxidant capacity

The values of antioxidant capacities of 2-(5-(3-nitrophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazole (**2d**) and 2-(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazole (**2e**) were found to be, respectively, $2,700 \pm 150$ and $3,135 \pm 230$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g (TE)}$ by the ORAC method (**Table 2**), corresponding to quite good antioxidant capacity (Trolox itself is 4000 $\mu\text{mol/g}$). Of course, it should be kept in mind that *in vitro* antioxidant assays only represent the observed response in the given reaction medium, meaning that the values of the apparent antioxidant activities might also be influenced by differences in the chemical reaction between the free radical used in the assay and the substance being tested.

ORAC methodology, antioxidant evaluation

This method was employed because it uses a physiological relevant free radical as well as its reaction medium. The automatic ORAC assay was described by Ou et al.¹⁰ In this method, an azo initiator (AAPH) decomposing at 37°C abstracts hydrogen from sodium fluorescein, reducing its fluorescence (485/20 nm excitation filter and 528/20 nm emission filter). When a test compound with antioxidant capacity is added, the reaction with fluorescein and the resultant decrease in its fluorescence are delayed until the antioxidant capacity of the test compound is completely exhausted. The putative antioxidants were solubilized in acetone and diluted in 7% randomly methylated β -cyclodextrin solution. After appropriate dilution, 25 μL of these solutions were transferred to microplates in triplicate and 150 μL of 40 nM fluorescein diluted in 75mM phosphate buffer pH 7.0, were added. On the same microplate a control (25 μL of solvent + 150 μL of 40 nM fluorescein) and a Trolox (standard) curve (150 μL fluorescein 40 nM + 25 μL aliquot from a Trolox® solution of known concentration) were made. To maintain the plate temperature, 300 μL of water were added around the wells. After the incubation (37°C/30 min), 25 μL of AAPH (153 mM in 75 mM phosphate buffer, pH 7.0) were added and the plate shaken during 10 seconds at maximum intensity. The plate reader (Synergy – BIOTEK Multi-detection microplate reader, Winooski, VT) was programmed to record the fluorescence at each cycle from 1 minute after addition of AAPH up to 60 minutes and the area under the fluorescence curve integrated over time by using Gen5 software. All area values were corrected for the control (25 μL of solvent + 150 μL of 40 nM fluorescein + 25 μL AAPH) to obtain the net area under the curve (net AUC) for each sample.

Table 2: ORAC antioxidant capacity as the concentration of compound 2d and 2e (values were expressed as mean $\pm$ standard deviation).

Compound	Antioxidant capacity	Correlation coefficient (r^2)
2d	2,700 $\pm$ 150 μ mol eq. trolox/g	0,9722
2e	3,135 $\pm$ 230 μ mol eq. trolox/g	0,9849

Using the Trolox® calibration curve, expressed as net area under the curve versus concentration (μ M), the antioxidant capacity of each sample can be expressed in terms of its μ mol equivalents of Trolox/g $\pm$ standard deviation or Trolox® equivalent (TE) (**Table 2**). This procedure was carried out in triplicate for each sample at each concentration. Thus, higher values of TE mean higher antioxidant capacity of the sample.

FLUORESCCEIN X COMPOUNDS WITH 1 AND 2x CONCENTRATION

Figure 1: Absorbance (nm) of compounds **2d** and **2e** in acetone.

Finally, care was taken to demonstrate that compounds **2a** - **2e** do not interfere with the fluorimetric analysis itself. All five compounds fluoresce at about 450nm when excited below 425nm, where they absorb (**Figure 1**). Thus competitive absorption and emission can be ruled out under the conditions of excitation of fluorescein 485nm. Quenching of the fluorescence of fluorescein by compounds **2a** - **2e** was also ruled out by demonstrating that the effect of addition of up to a two-fold excess of these compounds in acetone to an aqueous solution of fluorescein had the made effect (due merely to dilution of the solution) as addition of acetone alone.

As it empts were made to quantify the antioxidant capacity by the DPPH method but, unfortunately, due to the lack of solubility of these compounds in the reaction media tested (methanol, ethanol and isopropanol), this was not possible.

Synthesis and structure confirmation

The 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H pyrazoles (**1**) were prepared according literature.¹⁵ The 2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles (**2**) were prepared from the 1-thiocarbamoyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole (**1**) by reaction with phenacyl bromine in ethanol in the presence of potassium hydroxide (**Scheme 1**).¹⁶

The structure of compounds (**2**) were confirmed by NMR and mass spectra. NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 500 spectrometer (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C) at 300 K. Low resolution mass spectra were obtained on a Varian Saturn 2200 GC/MS spectrometer operating at 70 eV.

Selected experimental data for compounds **2a-e**

2-(3,5-Diphenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazole (**2a**): Yield (70%); yellow solid; mp 213–215°C; IR (KBr): ν (cm^{-1}) 3115–3028, 1953–1756, 1541, 1520, 1492, 1443, 707, 694; ^1H NMR

(CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 3.33 (dd, 1H, $J=6.7$ Hz, $J=17.4$ Hz), 3.90 (dd, 1H, $J=12.0$ Hz, $J=17.4$ Hz), 5.68 (dd, 1H, $J=6.7$ Hz, $J=12.0$ Hz), 6.80 (s, 1H), 7.20–7.77 (m, 15H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) 43.4, 64.7, 103.3, 125.8, 126.3, 126.6, 127.4, 127.7, 128.4, 128.6, 128.7, 129.7, 131.5, 135.0, 141.8, 151.5, 151.5, 164.9.

2-[5-(2-Methylphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]-4-phenylthiazole (**2b**): Yield (74%); yellow solid; mp 172–174°C; IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3117–2915, 1943–1875, 1542, 1489, 1440, 713, 683; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 2.55 (s, 3H), 3.15 (dd, 1H, $J=7.0$ Hz, $J=17.3$ Hz), 3.84 (dd, 1H, $J=12.2$ Hz, $J=17.3$ Hz), 5.82 (dd, 1H, $J=6.9$ Hz, $J=12.2$ Hz), 6.78 (s, 1H), 7.10–7.74 (m, 14H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) 19.6, 42.7, 61.4, 103.3, 125.7, 125.8, 126.3, 126.6, 127.3, 127.4, 128.3, 128.6, 129.6, 130.4, 131.5, 134.7, 135.0, 139.9, 151.3, 151.5, 164.7; Mass: calcd 395.15, found 396.2; LC/MS/MS: m/z 396.1 (M+1, 100), 222.3, 175.2, 148.1, 104.1.

2-[5-(4-Biphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]-4-phenylthiazole (**2c**): Yield (65%), yellow solid; mp 161–163°C; IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3124–2911, 1982–1680, 1546, 1482, 1444, 708, 693; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 3.41 (dd, 1H, $J=6.4$ Hz, $J=17.5$ Hz), 3.97 (dd, 1H, $J=12.0$ Hz, $J=17.5$ Hz), 5.91 (dd, 1H, $J=6.4$ Hz, $J=12.0$ Hz), 6.82 (s, 1H), 7.22–7.81 (m, 19H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) 43.6, 64.5, 103.3, 126.0, 126.5, 127.1, 127.1, 127.3, 127.5, 128.4, 128.7, 128.7, 129.0, 130.0, 140.7, 140.7, 147.5, 154.3, 165.0;

2-[5-(3-Nitrophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]-4-phenylthiazole (**2d**): Yield (69%), white solid; mp 172–174°C; IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3410, 3246–3060, 1961–1760, 1596, 1530, 1462, 1442, 1346, 686; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 3.36 (dd, 1H, $J=7.5$ Hz, $J=17.5$ Hz), 4.00 (dd, 1H, $J=12.1$ Hz, $J=17.5$ Hz), 5.75 (dd, 1H, $J=7.5$ Hz, $J=12.1$ Hz), 6.86 (s, 1H), 7.21–8.16 (m, 14H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) 43.2, 64.1, 103.9, 122.3, 122.8, 125.7, 126.4, 127.6, 128.5, 128.8, 129.7, 130.1, 131.0, 132.8, 134.6, 148.2, 151.4, 151.5, 164.9;

2-[5-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]-4-phenylthiazole (**2e**): Yield (81%), yellow solid; mp 182–184°C; IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3123–2833, 1959–1647, 1544, 1515, 1443, 1249, 789, 672; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 3.29 (dd, 1H, $J=6.6$ Hz, $J=17.4$ Hz), 3.75 (s, 3H), 3.83 (dd, 1H, $J=12.0$ Hz, $J=17.4$ Hz), 5.61 (dd, 1H, $J=6.6$ Hz, $J=12.0$ Hz), 6.78 (s, 1H), 6.84–7.76 (m, 14H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) 43.3, 55.2, 64.1, 103.3, 114.0, 125.8, 126.3, 127.4, 127.9, 128.3, 128.6, 129.6, 131.5, 133.8, 135.0, 151.4, 151.5, 159.0, 164.9.

CONCLUSIONS

In conclusion, 2-(5-(3-nitrophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazole (**2d**) and 2-(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazole (**2e**) showed good antioxidant capacity compared comparable to that of Trolox®. More investigations are currently in progress to explore the reaction and relationship structure-activity of 4-phenylthiazoles.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to CEPEMA-USP (Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente), CNPq (310472/2007-5, 475575/2008-3), INCT Estudos do Meio Ambiente/CNPq (573.667/2008-0), CAPES and Fapesp for financial support.

REFERENCES

- [1] Rostom, S. A. F.; El-Ashmawy, I. M.; El Razik, H. A. A.; Badr, M. H.; Ashour, H. M. A. Design and synthesis of some thiazolyl and thiadiazolyl derivatives of antipyrine as potential non-acidic anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 882.
- [2] Al-Saadi, M. S.; Faidallah, H. M.; Rostom, S. A. F. Synthesis and biological evaluation of some 2, 4, 5-trisubstituted thiazole derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2008**, *341*, 424.
- [3] Bell, F. W.; Cantrell, A. S.; Högberg, M.; Jaskunas, S. R.; Johansson, N. G.; Jordon, C. L.; Kinnick, M. D.; Lind, P.; Morin Jr., J. M.; Noréen, R.; Öberg, B.; Palkowitz, J. A.; Parrish, C. A.; Pranc, P.; Sahlberg, C.; Ternansky, R. J.; Vasileff, R. T.; Vrang, L.; West, S. J.; Zhang, H.; Zhou, X. -X. Phenethylthiazolethiourea (PETT) compounds, a new class of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. I. synthesis and basic structure-activity relationship studies of PETT analogs. *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4929.
- [4] Abdel-Wahab, B. F.; Mohamed, S. F.; Amr, A.El-G. E.; Abdalla, M. M. Synthesis and reactions of thiosemicarbazides, triazoles, and Schiff bases as antihypertensive α -blocking agents. *Monatsh. Chem.*, **2008**, *139*, 1083.
- [5] Dayan, F. E.; Vincent, A. C.; Romagni, J. G.; Allen, S. N.; Duke, S. O.; Duke, M. V.; Bowling, J. J.; Zjawiony, J.K. Amino- and Urea-Substituted Thiazoles Inhibit Photosynthetic Electron Transfer. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 3689.
- [6] Milne, G. W. A.; editor. *Ashgate Handbook of Antineoplastic Agents*; Gower: London, UK, **2000**, 192.

- [7] Harnett, J. J.; Roubert, V.; Dolo, C.; Charnet, C.; Spinnewyn, B.; Cornet, S.; Rolland, A.; Marin, J.-G.; Bigg, D.; Chabrier, P.-E. Phenolic thiazoles as novel orally-active neuroprotective agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 157.
- [8] Shih, M. -H.; Ke, F. -Y. Syntheses and evaluation of antioxidant activity of sydnonyl substituted thiazolidinone and thiazoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 4633.
- [9] Shih, M. -H.; Su, Y. -S.; Wu, C. -L. Syntheses of aromatic substituted hydrazino-thiazole derivatives to clarify structural characterization and antioxidant activity between 3-arylsydnonyl and aryl substituted hydrazino-thiazoles. *Chem. Pharm. Bull.*, **2007**, *55*, 1126.
- [10] Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, *7*, 1815.
- [11] Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Prior, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, *16*, 4437.
- [12] Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Proor, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 4619.
- [13] Stefani, H. A.; Oliveira, C. B.; Almeida, R. B.; Pereira, C. M. P.; Braga, R. C.; Cella, R.; Borges, V. C.; Savegnago, L.; Nogueira, C. W. Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 513.
- [14] Silva, F. A. N.; Galluzzi, M. P.; Pizzuti, L.; Gressler, V.; Rivelli, D. P.; Barros, S. B. M.; Pereira, C. M. P. Ultrasound irradiation-promoted large-scale preparation in aqueous media and antioxidant activity of azoles. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2009**, *6*, 323.
- [15] Pizzuti, L.; Piovesan, L. A.; Flores, A. F. C.; Quina, F. H.; Pereira, C. M. P. Environmentally friendly sonocatalysis promoted preparation of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles. *Ultrason. Sonochem.*, **2009**, *16*, 728.
- [16] Turan-Zitouni, G.; Chevallet, P.; Kiliç, F. S.; Erol, K. Synthesis of some thiazolyl-pyrazoline derivatives and preliminary investigation of their hypotensive activity. *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, *35*, 635.

Synthesis of 4-iodopyrazoles: A Brief Review

Claudio M. P. Pereira,^{a,*} Frank H. Quina,^{a,b} Filipe A. N. Silva,^{a,c} Daniel J. Emmerich,^d and Amílcar Machulek Jr.^{a,b}

^aCentro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA-USP), Universidade de São Paulo, 11573-000, Cubatão, Brazil

^bInstituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970, São Paulo, SP, Brazil

^cLaboratório de Análise Toxicológicas, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo 055083-000 São Paulo, SP, Brazil

^dLaboratório de Química Ambiental, Departamento de Química, Ciências Exatas e da Terra, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, Brazil

Abstract: The selective incorporation of halogen into organic molecules provides a challenge to academic and industrial research. This microreview presents an overview of the available methodologies for the synthesis of 4-iodopyrazoles, valuable precursors for the selective construction of highly functionalized organic molecules of synthetic and biological importance.

Keywords: Pyrazoles, 4-iodopyrazoles, heterocycles, green chemistry.

I. INTRODUCTION

Pyrazoles exhibit a variety of pharmacological properties, including anti-hyperglycemic, analgesic, antiinflammatory, anti-pyretic, anti-bacterial, hypoglycemic and sedative-hypnotic activities [1]. Recently, several pyrazole derivatives were reported to have non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity [2]. Extensive studies have been devoted to pyrazole derivatives such as celecoxib, the well-known cyclooxygenase-2 inhibitor [3a]. In particular, 4-iodopyrazoles (Fig. 1) are key substructures for the synthesis of a large variety of compounds with important biological activities [3b].

Halopyrazoles are capable of undergoing transition-metal-catalyzed cross-coupling reactions, such as the Heck reaction [4], Sonogashira reaction [5], Suzuki reaction [6] and other important reactions [7]. In view of the importance of 4-iodopyrazoles in organic synthesis, the aim of this review is to highlight recent methodologies for the iodination of pyrazoles.

In general, pyrazoles are produced synthetically through the reaction of 1,3-diketones with hydrazine. Quite simply, double condensation of a 1,3-diketone, or synthetic equivalent, with a hydrazine produces the aromatic pyrazole directly (Fig. 1). Electrophilic substitutions with carbon electrophiles such as in Friedel-Crafts processes, are virtually unknown in azole chemistry. Electrophilic substitution takes place normally at C-4 of the pyrazole nucleus [8]. Under special conditions, reaction of pyrazoles with appropriate reagents leads to iodopyrazoles. In particular, 4-iodopyrazoles have been extensively applied in synthetic organic chemistry [7]. We report here a brief review of the preparation of 4-iodopyrazoles.

4-iodo-3,5-dimethylpyrazole

Fig. (1).

II. CONVENTIONAL SYNTHETIC APPROACHES FOR THE PREPARATION OF 4-IODOPYRAZOLES

In 1988, Ohsawa and co-authors reported the preparation of 4-iodo-1,3,5-trimethyl pyrazole from 1,3,5-trimethylpyrazole using iodine monochloride in methylene chloride [9]. (Scheme 1).

Scheme 1. Iodination of 3,5-dimethylpyrazole using ICl.

Vedso and co-workers proposed the synthesis of 1-(benzyloxy)-4-iodopyrazole by benzylation of 1-hydroxypyrazole followed by iodination of crude 1-(benzyloxy)pyrazole in 81% yield, using 3 equivalents of iodine monochloride (Scheme 2) [10].

Scheme 2. Iodination and benzylation of 1-(hydroxy)pyrazole using ICl and benzyl bromide.

Rodriguez-Franco and co-workers reported an alternative synthesis of 4-iodo alkylpyrazoles via the reaction of alkyl pyrazoles of interest with iodine and CAN [ammonium hexanitratoceric(IV)] in acetonitrile under reflux for 3-6 hours. After extraction, the products were purified on silica gel using flash column chromatography. The isolated 4-iodopyrazoles were obtained in satisfactory yields, 79-98% (Scheme 3, Table 1). In the same work, another alternative for the synthesis of 4-iodopyrazoles employing a mixture of I₂/NaI and CH₃COONa in water was reported [11]. Using the I₂/CAN procedure for iodination of pyrazoles, Casida and co-workers synthesized compounds analogous to Fipronil. Fipronil is the most important example of the phenylpyrazole or fiprole insecticides [12].

Scheme 3. Iodination of pyrazoles via CAN and I₂.

In recent years, solid supports have received special attention due to the enhanced selectivity, milder reaction conditions, and the ease of manipulation typical of these supported reagents. The combined reagent of iodobenzene diacetate plus iodine was used as an alternative iodinating agent for conversion of pyrazoles to the corresponding 4-iodopyrazole derivatives at room temperature [13]. The 4-iodopyrazoles were isolated in good yields (Scheme 4, Table

*Address correspondence to this author at the Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05513-970, Brazil; Tel: ++55-11-3091-2162; Fax: ++55-11-3815-5579; E-mail: claudiom@usp.br and claudiochemistry@gmail.com

Table 1. Iodination of Pyrazoles via I_2/NaI or I_2/CAN [12]

Entry	R ¹	R ²	R ³	Time (t, h)	Yield ^a (%)
1 ^b	H	OCH ₃	CH ₃	24	80
2 ^b	H	CH ₃	CH ₃	48	55
3 ^c	H	CH ₃	CH ₃	3	93
4 ^c	H	H	H	3	98
5 ^c	H	H	CH ₃	3	90
6 ^c	CH ₂ Ph	H	H	4	79
7 ^c	CH ₂ Ph	CH ₃	CH ₃	6	80

^aIsolated yields of 4-iodopyrazole derivatives^bMethod: 2I₂, 6NaI, 2CH₃CO₂Na, H₂O.^cMethod: 0.6I₂, 0.5CAN, CH₃CN.

Scheme 4. Iodination of pyrazoles via iodobenzene diacetate.

Table 2. Iodination of Pyrazoles via IBD, PIBD and Recycled Resin [13]

Entry	R ¹	R ²	R ³	Time (t, min)	Yield ^a (%)
1 ^a	H	CH ₃	CH ₃	15	90
2 ^a	H	CH ₃	C ₆ H ₅	20	88
3 ^a	H	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	15	91
4 ^a	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	20	86
5 ^a	2,4-(NO ₂) ₂ C ₆ H ₃	CH ₃	CH ₃	30	90
6 ^a	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	CH ₃	C ₆ H ₅	30	91
7 ^b	H	CH ₃	CH ₃	25	87
8 ^b	H	CH ₃	C ₆ H ₅	30	87
9 ^b	H	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	30	89
10 ^b	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	30	86
11 ^b	2,4-(NO ₂) ₂ C ₆ H ₃	CH ₃	CH ₃	40	87
12 ^b	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	CH ₃	C ₆ H ₅	35	89
13 ^c	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	CH ₃	C ₆ H ₅	40	87

^a Isolated yields of 4-iodo pyrazole derivatives, employing iodobenzene diacetate^b Isolated yields of 4-iodo pyrazole derivatives, employing polymer-supported iodobenzene diacetate^c Isolated yields of 4-iodo pyrazole derivatives, employing recycled resin Scheme 5. Iodination of pyrazoles via polymer-supported iodobenzene diacetate (PIBD) and I₂.

2). These same authors [13] also described the preparation of 4-iodopyrazoles using polymer-supported iodobenzene diacetate (PIBD) with short reaction times and good yields (Scheme 5, Table 2). The regenerated resin was used to repeat the reaction with no loss of activity. After removal of the solvent, the products were recrystallized from ethanol or water.

The use of water as solvent in organic synthesis has been extensively studied [14-15], with applications in many organic reactions. Recently, Katzenellenbogen and co-workers [7] prepared 1,3-diaryl-4-iodo-pyrazoles by the reaction of 1,3-diarylpyrazoles with KI/I₂ in sodium acetate (Scheme 6, Table 3).

In 1956, Larsen and co-workers first reported the use of potassium dichloriodate (KICl₂) as an iodinating agent [16] for aromatic molecules. More recently, the synthesis was improved and the scope of this reaction extended to hydroxyquinoline, imidazoles and

Scheme 6. Iodination of aryl pyrazoles via KI/I₂ and NaOAc.

1-*H*-pyrazole [17]. The conversion of 1-*H*-pyrazole to 4-iodo-1-*H*-pyrazole required 6 hours of reaction (Scheme 7).

Table 3. Iodination of 1,3- via KI/I₂ and NaOAc in Water [7]

Entry	R ¹	R ²	R ³	Time (t, h)	Yield ^a (%)
1	OMe	OMe	Et	3	87
2	OMe	H	Pr	3	85
3	OMe	H	Et	3	83
4	H	H	Et	3	74

^aIsolated yields based on iodo-pyrazole derivatives Scheme 7. Iodination of pyrazole via KICl₂ in water. Scheme 8. Reaction of 3,4-Bis(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole with I₂. Scheme 9. Reaction of 3-(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole with I₂. Scheme 10. Reaction of 5-(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole with I₂.

C-Silyl azoles undergo substitution of the C-silyl groups with electrophilic reagents making silylazoles synthetic equivalents of organometallic derivatives [18]. Effenberger and Krebs published extensive studies of halo- and carbodesilylation of (trimethylsilyl)-1-methylpyrazoles [19]. The authors showed the synthesis of 4,5-diiodo-1-methylpyrazole via the reaction of 3,4-Bis(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole with iodine (Scheme 8) [19].

Although 3-(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole reacts with iodine to give 3-iodo-1-methylpyrazole in moderate yield (46%) (Scheme 9), the reaction of 5-(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole with iodine results in 4-methyl-5-(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole in good yield (90%) (Scheme 10) [19].

The reaction of 4,5-bis(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole with iodine results in iododesilylation, furnishing 3-iodo-5-(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole. After a reaction time of 89 hours (Scheme 11) [19].

Cuadrado and co-workers described important studies utilizing silyl azoles. These authors reported the one-pot synthesis of 4-iodo-5-silylpyrazoles in good yield (79-82%) [20], based on the reaction of silyl hydrazones with I₂ in THF (Scheme 12).

Scheme 11. Reaction of 4,5-Bis(trimethylsilyl)-1-methylpyrazole with I₂.

Scheme 12. One-pot synthesis of 4-iodo-5-silylpyrazoles.

Scheme 13. Reaction of sydnone with DMAD.

Scheme 14. Iodination of 3,5-dimethylpyrazole by sonochemistry using NIS.

The transformation of sydnone into pyrazoles by 1,3-dipolar cycloaddition reactions with acetylenic esters has been studied by Huisgen and co-workers [21]. The synthesis of 5-iodopyrazoles by direct iodination of sydnone with ICl [22] and posterior treatment with dimethyl acetylenedicarboxylate (DMAD) has also been reported (Scheme 13).

III. ULTRASOUND- AND MICROWAVE-ASSISTED SYNTHESIS OF 4-IODOPYRAZOLES

Recently, we described the synthesis of a variety of compounds under non-traditional conditions employing microwaves [23-25] and sonochemistry [26-29]. The beneficial effects of ultrasonic irradiation are playing an increasing role in process chemistry [30-31], especially in cases where classical methods require drastic conditions or prolonged reaction times. When the process involves sensitive reagents or there is the possibility of decomposition under prolonged reaction conditions, ultrasound also has advantages. The potential of ultrasonic irradiation to decrease reaction times and

Table 4. Iodination of Pyrazoles via NIS and Sonochemistry

Entry	R	Sonochemistry [32]		Conventional Method [Lit.]	
		Time (min)	Yield	Time (h)	Yield
1	H	20	85	48	55 [11]
2	Me	15	75	1	80 [9]
3	Ph	60	92	48	[33] ^a
4 ^b	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	20	76	-	-
5 ^b	C ₆ F ₅	90	97	-	-

^a The yield was not reported^b Literature [32]

improve yields has been demonstrated [30-31]. As part of our work in this area, we reported the convenient C-4 iodination of 3,5-dimethylpyrazoles using *N*-iodosuccinimide under ultrasonic irradiation in good yields (75-97%) with short reaction times (15-90 minutes) in the absence of catalyst or without using toxic reagents like ICl (Scheme 14, Table 4) [32]. In addition, halogenation of 3,5-dimethylpyrazole on a larger scale (20 mmol) furnished the corresponding product in good yield (70-82%) under the same reaction conditions. The important aspect of this reaction procedure is the work-up, in which treatment with aqueous Na₂S₂O₃ was found to give the 4-iodopyrazole products without the necessity of further purification [32].

Microwave irradiation offers a considerable advantage over conventional heating because it results in substantial rate enhancements for a wide range of organic reactions. Cleaner reactions are also commonly achieved, together with improvements in yield and selectivity. The increasing demand for clean and "green" chemical syntheses has resulted in increased use of microwave irradiation [34,35]. Cheung and co-workers reported the preparation of 3-aryl-4-iodopyrazoles [36] via the microwave-promoted reaction with sodium iodide, sodium carbonate and iodine in aqueous THF (Scheme 15).

Scheme 15. Microwave-assisted iodination of 4-arylpzrazoles via NaI/I₂.

In a very recent publication, Li and co-workers demonstrated the use of microwave irradiation for the iodination of 1-phenylpyrazole by reaction with *N*-iodosuccinimide (NIS) in acid medium [37]. The product, 4-iodo-1-phenylpyrazole, was isolated in 83% yield after 10 minutes of reaction (Scheme 16).

Scheme 16. Iodination of 1-phenylpyrazole with NIS in CH₃COOH under microwave irradiation.

Sosnowski and Sluski reported a comparison of the microwave-accelerated and conventionally heated iodination reactions of sev-

Scheme 17. Iodination of 1-*H*-pyrazole via *ortho*-periodic acid and I₂.

eral arenes and heterocycles with *ortho*-periodic acid (Scheme 17). With conventional heating, 4-iodo-1-*H*-pyrazole was isolated after 30 minutes in 75 % yield. Under microwaves, the product was isolated after 7 minutes of irradiation in 77% yield [38].

IV. CONCLUSIONS

4-Iodopyrazoles are valuable precursors for the selective construction of highly functionalized organic molecules of high synthetic and biological importance. Currently available methodologies permit the synthesis of a wide variety of 4-iodopyrazoles using conventional iodination reagents such as ICl and polymer-supported iodobenzene diacetate. Of particular interest are recent studies reporting "green chemical" approaches to the synthesis of 4-iodopyrazoles that also furnish these compounds in good yield and purity with short reaction times, minimal work-up and the potential of rather simple scale-up.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to FAPESP (06/58124-3, 06/56315-6), CEPEN-UNP (Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente), CAPES and CNPq for financial support.

REFERENCES

- [1] Elguero, J.; Goya, P.; Jagerovic, N.; Silva, A.M.S. *Targets in Heterocyclic System*; Italian Society of Chemistry, Roma, 2002, Vol 6, pp. 167-203.
- [2] Han, Q.; Chang, C.-H.; Li, R.; Ru, Y.; Jadhav, P. K.; Lam, P. Y. S. *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 2019.
- [3] (a) Weber, A.; Casini, A.; Heine, A.; Kuhn, D.; Supura, C. T.; Scozzafava, A.; Klebe, G. *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 550. (b) Vasilevsky, S. F.; Klyatskaya, S. V.; Elguero, J. *Tetrahedron*, 2004, 60, 6685.
- [4] Sliskovic, D. R.; Roth, B. D.; Wilson, M. W.; Hoefle, M. L.; Newton, R. S. *J. Med. Chem.*, 1990, 33, 31.
- [5] Manfredini, S.; Bazzanini, R.; Baraldi, P. G.; Simone, D.; Vertuani, S.; Pani, A.; Pinna, E.; Scintu, F.; Lichino, D.; La Colla, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 1279.
- [6] Stauffer, S.R.; Huang, Y.; Coletta, C. J.; Tesdesco, R.; Katzenellenbogen, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 9, 141.
- [7] Rodriguez-Franco, M. I.; Dorrosoro, I.; Martinez, A. *Synthesis*, 2001, 11, 1711.
- [8] Joule, J. A.; Mills, K. *Heterocyclic Chemistry at a Glance*; Wiley-Blackwell, 2007, pp. 70-80.
- [9] Ohsawa, A.; Kaihoh, T.; Itoh, T.; Okada, M.; Kawabata, C.; Yamaguchi, K.; Igeta, H. *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, 36(10), 3838.
- [10] Felding, J.; Kristensen, J.; Bjerregaard, T.; Sander, L.; Vedso, P.; Begtrup, M. *J. Org. Chem.*, 1999, 64, 4196.

Synthesis of 4-iodopyrazoles

Mini-Reviews in Organic Chemistry, 2008, Vol. 5, No. 4 335

- [11] Rodríguez-Franco, M. I.; Dorrosomro, I.; Hernández-Higueras, A. I.; Antequera, G. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 863.
- [12] Sammelson, R. E.; Casida, J. J. *J. Org. Chem.* **1993**, *68*, 8075.
- [13] Cheng, D.-P.; Chen, Z.-C.; Zheng, Q.-G. *Synth. Commun.*, **2003**, *33*(14), 2671.
- [14] Andrade, C. K. Z.; Alves, L. M. *Curr. Org. Chem.*, **2005**, *9*, 195.
- [15] Stefani, H. A.; Pereira, C. M. P.; Dörr, F. A.; Cella, R. *Arkivoc*, **2005**, vi, 19.
- [16] Larsen, A. A.; Moore, C.; Sprague, J.; Cloke, B.; Moss, J.; Hoppe, J. O. *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, *78*, 3210.
- [17] Garden, S.J.; Torres, J.C.; Melo, S.C.S.; Lima, A.S.; Pinto, A.C.; Lima, E.L. *S. Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 2089.
- [18] Lopyrev, V. A.; Larina, L. I.; Voronkov, M. G. *Russ. J. Org. Chem.* **2001**, *37* (2), 149.
- [19] Effenberger, F.; Krebs, A. *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 4687.
- [20] Cuadrado, P.; González-Nogal, A.M.; Valero, R. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 4975.
- [21] Huisgen, R.; Gotthardt, H.; Grashey, R. *Chem. Ber.*, **1968**, *101*(2), 536.
- [22] Dumitracu, F.; Drăghici, C.; Dumitrescu, D.; Laszlo, T.; Răileanu, D. *Liebigs Ann.*, **1997**, 2613.
- [23] Martins, M.A.P.; Pereira, C.M.P.; Beck, P.; Machado, P.; Moura, S.; Teixeira, M.V.M.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 6669.
- [24] Martins, M.A.P.; Cunico, W.; Pereira, C.M.P.; Sinhorin, A.P.; Flores, A.C.F.; Bonacorso, H.G.; Zanatta, N. *Curr. Org. Synth.*, **2004**, *1*, 391.
- [25] Martins, M.A.P.; Pereira, C.M.P.; Moura, S.; Frizzo, Beck, P.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; Flores, A.F.C. *J. Heterocycl. Chem.*, **2007**, 1195.
- [26] Martins, M.A.P.; Pereira, C.M.P.; Cunico, W.; Moura, S.; Rosa, F.; Peres, R. L.; Machado, P.; Zanatta, N.; Bonacorso, H.G. *Ultrason. Sonochem.*, **2006**, *13*, 364.
- [27] Stefani, H.A.; Oliveira, C.B.; Almeida, R.B.; Pereira, C.M. P.; Braga, R.C.; Cella, R.; Borges, V.C.; Savegnago, L.; Nogueira, C.W. *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 513.
- [28] Pereira, C.M.P.; Stefani, H.A.; Guzen, K.P.; Órfão, A.T.G. *Lett. Org. Chem.*, **2007**, *4*, 43.
- [29] Guzen, K.P.; Guarezemini, A.S.; Órfão, A.T.G.; Cella, R.; Pereira, C.M.P.; Stefani, H.A. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 1845.
- [30] Manson, T.J. *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, *26*, 447.
- [31] Cravotto, G.; Cintas, P. *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *35*, 180.
- [32] Stefani, H. A.; Pereira, C. M. P.; Almeida, R. B.; Braga, R. C.; Guzen, K. P.; Cella, R. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 6833.
- [33] Han, Y.; Huynh, H. V. *Chem. Commun.*, **2007**, 1089.
- [34] Hayes, B. L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed Of Light*, Matthews NC, CEM Publishing, **2002**.
- [35] Seijas, J.A.; Vázquez-Tato, M. P. *Chim. Oggi*, **2007**, *25*, 20.
- [36] Cheung, K.-M.J.; Matthews, T.P.; James, K.; Rowlands, M.G.; Boxall, K.J.; Sharp, S.Y.; Maloney, A.; Roe, S.M.; Prodromou, C.; Pearl, L.H.; Aherne, G.W.; McDonald E.; Workman, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 3338.
- [37] Li, G.; Kakarla, R.; Gerritz, S.W. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 4595.
- [38] Sosnowski, M.; Skulski, L. *Molecules*, **2005**, *10*, 401.

Received: May 22, 2008

Revised: July 17, 2008

Accepted: July 17, 2008