

## ANÁLISE CITOTÓXICA DE ANÁLOGOS DE DIHIDROPIRIMIDINONAS: COMPOSTOS PROMISSORES PARA NOVOS FÁRMACOS

JEANIFER TEIXEIRA CAMACHO<sup>1</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>2</sup>; IGOR FRANZ  
SANTA BARBARA<sup>3</sup>; CAREM PERLEBERG<sup>3</sup>; CRISTINA JANSEN ALVES<sup>3</sup>;  
CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [jeanifertm@gmail.com](mailto:jeanifertm@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nathaliastark@hotmail.com](mailto:nathaliastark@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [lahbbiufpel@gmail.com](mailto:lahbbiufpel@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [claudiochemistry@gmail.com](mailto:claudiochemistry@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

As dihidropirimidinonas (DHPMs) e seus análogos são compostos heterocíclicos que podem ser obtidos por meio de reações multicomponentes clássicas, como a reação de Biginelli, além de suas variações de síntese. Essa classe de substâncias ganhou destaque na química medicinal, especialmente devido às pesquisas sobre as atividades biológicas do monastrol, um produto da reação de Biginelli. Desde então, outras DHPMs foram sintetizadas, revelando uma variedade de propriedades farmacológicas que ampliam seu potencial terapêutico (PRASAD et al., 2016; MATTOS et al., 2018).

Esses compostos se destacam por suas diversas atividades, incluindo propriedades anticâncer, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiparasitárias, antitireoidianas, antimuscarínicas, antidiabéticas e hipolipidêmicas. Além disso, estudos recentes indicam que a introdução de grupos específicos em regiões heterocíclicas pode modificar suas atividades biológicas, resultando em progressos na química medicinal e na síntese de compostos mais direcionados e com menor citotoxicidade (NIEMIROWICZ-LASKOWSKA et al., 2018).

Entretanto, para garantir a segurança e eficácia dos DHPMs para fins terapêuticos, é essencial realizar análises que avaliem sua citotoxicidade. A análise da citotoxicidade em fibroblastos é um modelo relevante para testar a toxicidade de novos compostos. Um perfil de baixa citotoxicidade em fibroblastos sugere que os compostos podem ser menos prejudiciais às células saudáveis, o que é um indicativo positivo para seu uso terapêutico (RAZZAGHI-ASL et al., 2016). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar a citotoxicidade em linhagens celulares de fibroblastos de três análogos de DHPMs, visando sua posterior utilização em formulações farmacêuticas de uso tópico. Essa abordagem permitirá não apenas entender melhor a segurança dos compostos, mas também potencializar suas aplicações clínicas.

### 2. METODOLOGIA

Para a síntese dos três análogos de dihidropirimidinonas (J1, J2 e J3), foram utilizados acetoacetato de etila, diferentes aldeídos substituídos, como, 4-CH<sub>3</sub> (J1), 4-Cl (J2), 4-OCH<sub>3</sub> (J3), ureia e ácido cítrico, estes foram misturados em etanol absoluto e agitados sob refluxo por 4 horas, conforme descrito por VASCONCELOS et al. (2012). O progresso da reação foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD). Após a reação, a fase orgânica foi extraída, lavada, seca com

sulfato de magnésio e o solvente removido. Por fim, o produto foi purificado pelo processo de recristalização.

A análise citotóxica foi realizada pelo Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer (NeuroBio). O protocolo experimental *in vitro* descreve o cultivo de linhagens celulares fibroblásticas de humano (MRC5), as células foram semeadas em placas de 96 para análises de citotoxicidade e mantidas em incubadora a 37 °C em atmosfera controlada.

Os compostos J1, J2 e J3 foram inicialmente dissolvidos em DMSO e, em seguida, diluídos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, obtendo soluções em concentrações finais de 5, 20, 80, 100 e 150 µM. As culturas foram expostas a esses compostos por 24 e 48 h para avaliação da citotoxicidade, com células de controle mantidas em 0,05% de DMSO.

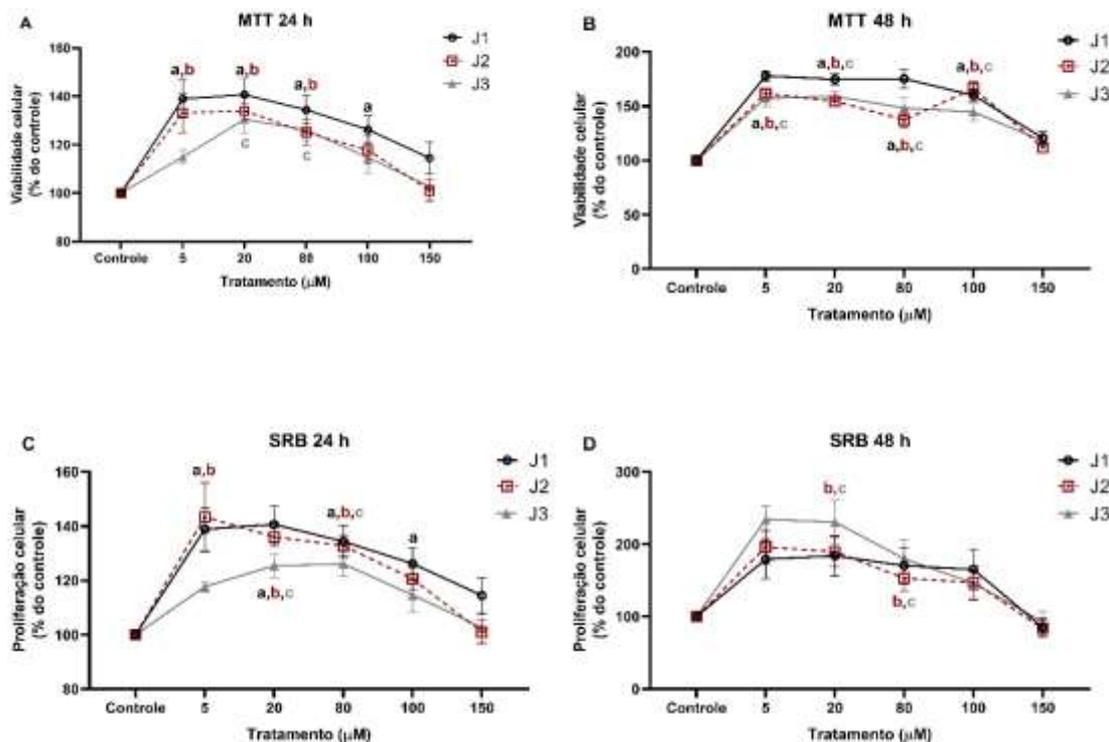
A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT, que mede a capacidade das células de reduzir o MTT a cristais de formazana, com a densidade óptica medida a 492 nm. A proliferação celular foi quantificada usando o ensaio SRB, que mede o conteúdo proteico celular, com a densidade óptica medida a 530 nm. Ambos os resultados foram expressos como média ± erro padrão e analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey, utilizando o software GraphPad PRISM 9.5. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para confirmar os três compostos sintetizados, foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas da Shimadzu (modelo GCMS-QP2020). A massa molecular encontrada foi de 274 (m/z), que corresponde à massa molecular (274,13) do composto *Ethyl 6-methyl-2-oxo-4-(p-tolyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate* (J1). Da mesma forma, a massa molecular de 293 (m/z) coincide com a massa (294) do composto *Ethyl 4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate* (J2). Por último, a massa (m/z) 290 corresponde à massa molecular (290) do *Ethyl 4-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate* (J3).

Os resultados da análise de citotoxicidade dos compostos J1, J2 e J3 em células MRC5 mostraram perfis distintos de viabilidade e proliferação celular após 24 e 48 horas de tratamento. No ensaio de MTT, os compostos aumentaram a viabilidade celular em concentrações baixas e moderadas, especialmente J1, exibiu aumento significativo da atividade mitocondrial até 100 µM, em 24 h de tratamento (Figura 1A). Após 48 h de exposição, todos os compostos induziram aumento significativo da viabilidade celular até a concentração de 100 µM (Figura 1B). No ensaio de SRB, os compostos estimularam a proliferação celular. Embora J1 tenha promovido um aumento significativo da biomassa proteica após 24 h de tratamento (Figura 1C), não foram observadas diferenças significativas após 48 h de exposição.

Reconhecidas como a população de células mais abundante dos tecidos conectivos de vários tecidos, os fibroblastos compreendem uma população heterogênea de células amplamente utilizada em estudos *in vitro* (KIRK, AHMED, ROGNONI, 2021). Além de serem responsáveis pela produção de componentes da matriz extracelular, como colágeno, e pela promoção da migração de queratinócitos, células epiteliais cruciais para a reepitelização durante a cicatrização, os fibroblastos ajudam na remodelação do tecido danificado, facilitando a substituição de células lesadas por células novas e saudáveis.



**Figura 1:** Análise citotóxica os análogos de DHPMs, *Ethyl 6-methyl-2-oxo-4-(p-tolyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate* (J1); *Ethyl 4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate* (J2); *Ethyl 4-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate* (J3) sobre linhagem celular de fibroblasto humano (MRC5). A viabilidade (A-B) e a proliferação celular (C-D) foram analisadas após 24 (A, C) e 48 h (B e D) de tratamento. (a) J1, (b) J2 e (c) significativamente diferente do controle ( $P < 0,05$ ).

Apesar de ter sido observado aumento no crescimento celular, J1, J2 e J3 não reduziram a viabilidade ou proliferação celular em nenhuma das concentrações ou tempos de tratamento avaliados. Evidências prévias reforçam que as DHPMs não induzem efeitos citotóxicos em células saudáveis (CASTO JARA et al., 2022).

Contudo, o aumento da biomassa proteica e da atividade mitocondrial, refletidas pelos ensaios de MTT e SRB, respectivamente, sugere que as células estão em um estado mais ativo de síntese de proteínas e outros componentes essenciais para a regeneração e reparo tecidual podendo estar relacionado com os substituintes agregados nas moléculas, visto que, a introdução nas posições *meta* e *para* melhora citotoxicidade bem como, a utilização de substituintes como (-Me) e (-OCH<sub>3</sub>) aumentam a densidade eletrônica no anel, diminuindo a zona de inibição (DOWARAH et al., 2021; CANTO et al., 2011).

A partir dos resultados de citotoxicidade é possível observar que os análogos são favoráveis para as atividades mencionadas na literatura, o que sugere um potencial para o desenvolvimento de futuros fármacos. No entanto, um aspecto negativo desses compostos é a baixa solubilidade, o que torna necessária a utilização de sistemas de liberação, especialmente carreadores. Esses sistemas podem modular as características biofarmacêuticas, melhorar a farmacocinética e a distribuição, além de reduzir os efeitos adversos (GIULIANO et al., 2018; PITORRE et al., 2017).

#### 4. CONCLUSÕES

Os análogos de DHPMs demonstraram um potencial significativo como agentes terapêuticos, evidenciado por suas diversas atividades farmacológicas, minimizando efeitos adversos em células saudáveis e auxiliando no processo de regeneração e cicatrização de tecidos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTRO JARA, M.; SILVA, A. C. A.; RITTER, M.; DA SILVA, A. F.; GONÇALVES, C. L.; DOS SANTOS, P. R.; BORJA, L. S.; DE PEREIRA, C. M. P.; DA SILVA NASCENTE, P. Dihydropyrimidinones Against Multiresistant Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1-9, 2022.
- CANTO, R. F. S., BERNARDI, A., BATTASTINI, A. M. O., RUSSOWSKY, D., & EIFLER-LIMA, V. L. Synthesis of dihydropyrimidin-2-one/thione library and cytotoxic activity against the human U138-MG and Rat C6 glioma cell lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 22(7), 1379–1388, 2011.
- COCHRAN, J. C.; GATIAL, J. E., 3rd; KAPOOR, T. M.; GILBERT, S. P. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12658–12667, 2005.
- DE VASCONCELOS, A.; FREITAG, R. A.; PIZZUTI, L.; RITTER, M.; BARSHACK, A. G.; QUINA, F. H.; STEFANELLO, F. M.; PEREIRA, C. M. P.; ROMANO, R. L.; OLIVEIRA, P. S. Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2H)-ones promoted by naturally occurring organic acids. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 26, p. 155-161, 2012.
- DOWARAH, J., PATEL, D., MARAK, B. N., YADAV, U. C. S., SHAH, P. K., SHUKLA, P. K., & SINGH, V. P. Green synthesis, structural analysis and anticancer activity of dihydropyrimidinone derivatives. **RSC advances**, 11(57), 35737–35753, 2021.
- GIULIANO, E.; PAOLINO, D.; FRESTA, M.; COSCO, D. Drug-Loaded Biocompatible Nanocarriers Embedded in Poloxamer 407 Hydrogels as Therapeutic Formulations. **Medicines (Basel)**, 2018, v. 6, n. 1, p. 7.
- KIRK, T., AHMED, A., ROGNONI, E. Fibroblast memory in development, homeostasis and disease. **Cells**, 2021, 10, 2840.
- MATOS, L. H. S.; MASSON, F. T.; SIMEONI, L. A.; HOMEM-DE-MELLO, M. Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 143, p. 1779–1789, 2018.
- NIEMIROWICZ-LASKOWSKA, K., GŁUSZEK, K., PIKTEL, E., PAJUSTE, K., DURNAŚ, B., KRÓL, G., WILCZEWSKA, A. Z., JANMEY, P. A., PLOTNIECE, A., & BUCKI, R. Bactericidal and immunomodulatory properties of magnetic nanoparticles functionalized by 1,4-dihydropyridines. **International Journal of Nanomedicine**, 2018, 13, 3411–3424.
- PITORRE, M.; GONDÉ, H.; HAURY, C.; MESSOUS, M.; POILANE, J.; BOUDAUD, D.; KANBER, E.; ROSSEMOND, G. A.; BENOIT, J. P.; BASTIAT, G. Recent advances in nanocarrier-loaded gels: Which drug delivery technologies against which diseases? **Journal of Controlled Release**, v. 266, p. 140–155, 2017.
- PRASAD, B. D., SASTRY, V. G., RAMANA, H., DEVILAL, J., and RAO, A. S. Multicomponent Biginelli's synthesis, antimycobacterial activity and molecular docking studies of dihydropyrimidine derivatives as thymidylate kinase protein targets. **Pharmacologia** 2016, 7, 256–263.
- RAZZAGHI-ASL, N., MIRI, R., & FIRUZI, O. Assessment of the Cytotoxic Effect of a Series of 1,4-Dihydropyridine Derivatives Against Human Cancer Cells. **Iranian journal of pharmaceutical research**. 2016 *IJPR*, 15(3), 413–420.