



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Curso de Farmácia

Taís Ferreira Maia

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE '*IN VIVO*' DO PROTÓTIPO  
ANTITUMORAL 4BC, UM DERIVADO DIIDROPIRIMIDINONA (DHPM).**

Brasília, 2018

TAÍS FERREIRA MAIA

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE *'IN VIVO'* DO PROTÓTIPO  
ANTITUMORAL 4BC, UM DERIVADO DIIDROPIRIMIDINONA (DHPM).**

Monografia de Conclusão de Curso  
apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Farmacêutico, na  
Faculdade de Ciências da Saúde,  
Universidade de Brasília.

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Homem de Mello**

Brasília, 2018

TAIS FERREIRA MAIA

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE 'IN VIVO' DO PROTÓTIPO  
ANTITUMORAL 4BC, UM DERIVADO DIIDROPIRIMIDINONA (DHPM)**

Brasília, 29 de Junho de 2018

COMISSÃO AVALIADORA

---

Orientador: Prof. Dr. Maurício Homem de Mello

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade de Brasília

---

Avaliador: Luiz Alberto Simeoni

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade de Brasília

Brasília, 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço minha família, por me mostrar o que é amor incondicional. Ao meu pai Wagner Maia, que me ensina o que é determinação, à minha mãe Marcia Simone, que me demonstra diariamente o que é bondade e ao meu irmão, Vinícius Gabriel que além de me trazer água, me ensina que a vida é prismática e possui várias perspectivas.

Agradeço aos meus antepassados que me proporcionaram a oportunidade da Vida e ao Universo por sempre conspirar a meu favor.

Aos amigos agradeço a paciência, solidariedade e empatia. Especialmente minha eterna gratidão à minha amiga Dominique que não mediu esforços para me auxiliar nessa jornada acadêmica sempre fortalecendo nossa amizade, conte sempre comigo. Ao Rodrigo que me apoiou em todos os momentos me motivando, confortando e acreditando em mim quando precisei. Aos amigos de sempre, Gyan, Luaralica, Paloma e Ana Paula, obrigada por se fazerem presentes até em minha ausência.

Por fim, agradeço ao Professor Maurício por me proporcionar a oportunidade de expandir meus conhecimentos na ciência aceitando me orientar.

A todos muito obrigado por acreditarem nessa conquista.

## RESUMO

Diidropirimidinonas (DHPMs) são moléculas sintetizadas desde 1893 por Biginelli, possuem inúmeras atividades farmacológicas, entre elas antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral. Um derivado dessa classe, o monastrol, é um exemplo de fármaco que, através de sua característica de ligação com a proteína motora cinesina Eg-5 rompe o fuso mitótico apresentando propriedades antitumorais. Vários outros derivados DHPMs já foram propostos em literatura, sendo que dentre elas a 4bc já apresentou atividade contra linhagens de células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231). Estudos toxicológicos da molécula 4bc classificou o composto como categoria 5 para GHS. Estudos anteriores *in vivo* não foram efetivos para avaliar sua biodisponibilidade em plasma sanguíneo, portanto este trabalho apresenta os resultados da avaliação da biodisponibilidade do derivado diidropirimidinona (DHPM) 4bc, após administração oral e intravenosa do composto. Não foram determinados os compostos na parte celular do sangue após exposição aguda oral e intravenosa através da cromatografia líquida de alta eficiência, evidenciando a possível necessidade de uma nova metodologia de extração da molécula ou método de identificação do composto.

Palavras-chave: Diidropirimidinonas, 4bc, biodisponibilidade, câncer.

## ABSTRACT

Dihydropyrimidinones are molecules synthesized since 1893 by Biginelli, possess numerous pharmacological activities, among them antibacterial, antifungal, anti-inflammatory and antitumor. A derivative of this class, monastrol, is an example of a drug which, through its binding feature to the kinesin motor protein Eg5, breaks the mitotic spindle showing antitumor properties. Several other DHPM derivatives have already been proposed in the literature, with 4bc already showing activity against tumor cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). Toxicological studies of the molecule 4bc classified the compound as category 5 for GHS. Previous studies in vivo have not been effective in evaluating its bioavailability in blood plasma, so this project shows the results of the bioavailability evaluation of the dihydropyrimidinone derivative (DHPM) 4bc following oral and intravenous administration of the compound. The compounds were not determined in the cellular part of the blood after acute oral and intravenous exposure through High Performance Liquid Chromatography, evidencing the possible need for a new methodology for extraction of the molecule or method of identification of the compound.

**Keywords:** Dihydropyrimidinones, 4bc, bioavailability, cancer.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diidropirimidinona e suas posições no anel pirimidínico.....	13
<b>Figura 2.</b> Indução de fuso monoastral durante a mitose.....	14
<b>Figura 3.</b> Complexo Eg-5 e cada uma das 5 moléculas testadas e o controle monastrol.....	15
<b>Figura 4.</b> Molécula 4bc.....	16
<b>Figura 5.</b> DHPM adicionado indazol e amida.....	17
<b>Figura 6.</b> Metodologia para produção de formulação oral.....	22
<b>Figura 7.</b> Metodologia para produção de formulação intravenosa.....	23
<b>Figura 8</b> Esquema de método de extração do composto 4bc.....	25
<b>Figura 9</b> Curva analítica da 4bc em solvente.....	28
<b>Figura 10</b> Perfil cromatográfico da 4bc (5µg/mL) a 312nm.....	29
<b>Figura 11</b> Perfil cromatográfico do grupo controle. Ratos 1 a 5 sobrepostos.....	30
<b>Figura 12</b> Perfil cromatográfico do grupo IV. Ratos 1 a 5 sobrepostos.....	30
<b>Figura 13</b> Perfil cromatográfico do grupo VO. Ratos 1 a 5 sobrepostos.....	31

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Grupos e suas vias de administração.....	23
<b>Tabela 2.</b> Gradiente da fase móvel.....	26



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**4bc:** 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5etilcarboxilato

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BFGF:** *Basic fibroblast growth factor*

**CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**DHPMs:** Diidropirimidinonas

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**EDTA:** *Ethylenediamine tetraacetic acid*

**Eg-5:** Proteína promotora cinesina

**HPLC:** *High performance liquid chromatography*

**IV:** Intravenosa

**PBS:** Tampão fosfato salino

**ROCK1:** enzima serina/treonina quinase

**RPM:** Rotações por minuto

**TCA:** Ácido tricloroacético

**VEGF:** *Vascular endothelial growth factor*

**VO:** Via Oral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1. CÂNCER.....	11
1.2. DERIVADOS DIIDROPIRIMIDINONAS.....	12
1.3. FARMACOCINÉTICA NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER.....	18
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	21
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	21
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
3.1. MODELO ANIMAL.....	21
3.2. DERIVADO DHMP 4bc.....	22
3.3. FORMULAÇÕES.....	22
3.3.1. FORMULAÇÃO ORAL.....	22
3.3.2 FORMULAÇÃO INTRAVENOSA.....	22
3.4. AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE PONTUAL.....	23
3.5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO.....	24
3.6 ANÁLISE.....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>39</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER

O envelhecimento populacional e maior expectativa de vida possibilitada pelo desenvolvimento tecnológico são acompanhados do aumento de doenças crônicas, como o câncer, por exposição a fatores de risco. O câncer é um grupo de mais de 100 doenças que se caracterizam pelo crescimento celular desordenado e descontrolado. Esta é uma das doenças de maior prevalência no mundo, sendo o câncer de mama a maior causa de morte entre mulheres (TORRES et al., 2015).

Alguns fatores de risco incluem causas comportamentais, fatores genéticos, ambientais e infecções (BLOOM et al., 2012). Dentre os hábitos comportamentais que influenciam a incidência da doença se encontram o uso de tabaco, hábitos alimentares e atividade física. Atitudes de potencial preventivo para o desenvolvimento do câncer e políticas de prevenção são preconizadas atualmente pois, além de ser uma doença invasiva, possui tratamento oneroso e com muitos efeitos adversos (INCA, 2012).

As células cancerígenas são caracterizadas por problemas associados à proliferação celular. Os protooncogenes e genes supressores tumorais possuem a propriedade de regular o crescimento celular. A sinalização desenfreada de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição e a ausência de sinais de apoptose, somados à angiogênese, tornam o potencial replicativo praticamente ilimitado podendo haver invasão de tecido e metástase (WEINBERG, 1994).

O tratamento do câncer abrange não só células cancerígenas, mas também células que possuem as mesmas características de ciclo celular acelerado, como células da mucosa, cabelo

e células hematopoiéticas, sendo essa característica um limitante para o tratamento e uma das principais preocupações das pesquisas na área. Atualmente, os três principais tratamentos para o câncer são cirurgia para remoção do tumor, irradiação e quimioterapia, sendo a última de tratamento sistêmico (INCA, 2017).

Além dos efeitos adversos graves, há também a resistência das células tumorais ao tratamento. Um dos modelos de inibição são os de ciclo celular específicos que são inibidores de pontos específicos da mitose que, quando as células possuem resistência, seja intrínseca ou adquirida, tornam o tratamento ineficaz (HAYES; WOLFT, 1990), (LONGLEY; JOHNSTON, 2005).

Ainda assim, inibidores específicos do ciclo celular possuem amplo uso em tratamento contra o câncer atualmente. Inibidores específicos do ciclo celular possuem a subclasse dos agentes metabólitos, que exercem seu efeito na fase S do ciclo celular inibindo bioquimicamente a síntese do DNA. O metotrexato (análogo do ácido fólico) é um exemplo de medicamento dessa classe, outros com mesmo mecanismo são fluorouracil e citarabina (antagonistas das pirimidinas) e mercaptopurina (análoga de purina) (KATZUNG, 2010).

## **1.2 DERIVADOS DIIDROPIRIMIDINONAS**

As diidropirimidinonas (DHPMs) possuem semelhança estrutural às diidropirimidinas e ampla atividade biológica, incluindo antiviral, antibacteriana, antifúngica, anti-epiléptica, antimalária, antileishmania e a atividade mais reportada, antitumoral (MATOS et al., 2017).

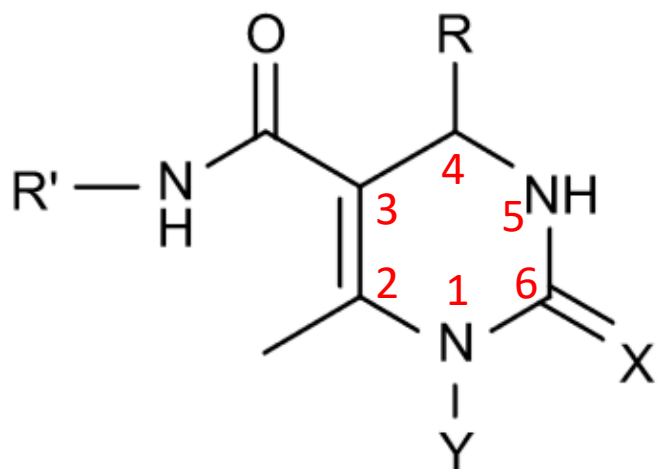
Diversos derivados DHPMs já foram desenvolvidos, e uma das principais rotas de produção desses compostos é uma reação denominada de “Biginelli”. A reação de Biginelli

explora a relação entre estrutura e atividade dos compostos da classe visto que possibilita alteração dos grupos de ligação e com isso modifica sítios de ligação e seletividade da molécula (CRESPO et al., 2013).

Na tradicional reação de Biginelli há a ciclocondensação catalisada por ácido do componente 1,3-dicarbonil com um aldeído aromático e com uma uréia ou tiouréia. A reação possui desvantagem por ter baixo rendimento quando utilizado o ácido clorídrico e etanol. (KAPPE, 2000)

A Reação de Biginelli possibilita a produção de novas derivações das primeiras moléculas dessa classe até mais potentes que as anteriores (WAN; PAN, 2012).

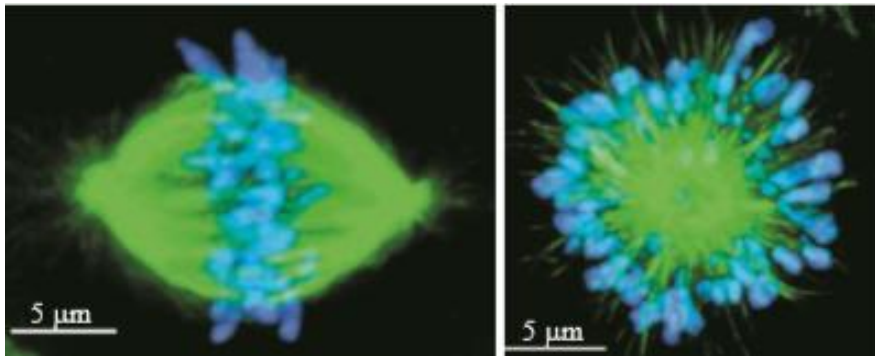
A relação estrutura-atividade foi evidenciada por Kumar *et al.* (2009) onde foi descrito que quando adicionado derivado de cinamoil, furano ou derivado de piridina na posição 4 (Figura 1) as DHPMs possuem maior atividade contra células de adenocarcinoma mamário.



**Figura 1.** Diidropirimidinona e suas posições no anel pirimidínico (Adaptado: KUMAR, 2009).

Dentre os derivados com atividade antitumoral, o mais conhecido é o monastrol que assim como outros DHPMs tem como principal característica farmacológica a inibição da

proteína motora cinesina Eg-5 através da inibição alostérica da hidrólise de ATP (adenosina trifosfato). A proteína promotora cinesina Eg-5 atua no início da divisão mitótica, sendo responsável pela formação do fuso ligando dois microtúbulos antiparalelos, permitindo o deslizamento dos filamentos e a formação do fuso bipolar dando continuidade à divisão. Sua inibição gera aspecto mono astral do fuso, impossibilitando a divisão celular (DE FÁTIMA et al., 2015), (KAPPE, 2000).



**Figura 2.** Indução de fuso monoastral durante a mitose celular. A) célula cultivada sem a adição de monastrol (controle). B) fuso monoastral em célula tratada com monastrol (68  $\mu\text{M}$ ). Em verde: microtubulinas; azul: cromatina (SOUZA FILHO, 2017).

A inibição da Eg-5 leva à parada do ciclo celular durante a mitose formando o fuso monoastral (Figura 2) que impede a proliferação celular por se tratar de uma proteína relacionada à formação e funcionamento do fuso mitótico (WOOD, 2001).

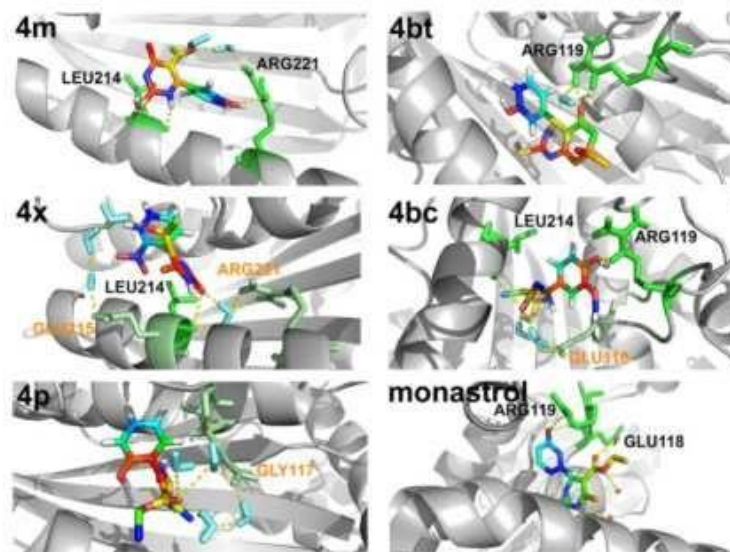
Os microtúbulos estão envolvidos em outros processos celulares além da mitose, como manutenção de organelas e estrutura e motilidade celular e em vesículas sinápticas, ocasionando a característica neurotóxica do tratamento quimioterápico (GARTNER et al., 2005).

A neurotoxicidade de agentes quimioterápicos é dependente da dose e da classe, alcaloides da vinca e taxanos por exemplo causam lesão ao danificar os microtúbulos interferindo no transporte axonal neuronal além da ruptura mitocondrial e efeitos tóxicos no DNA (PACHMAN, 2011).

Inibidores da proteína Eg-5 possuem como diferencial dos clássicos inibidores mitóticos a característica de não interferir em outros processos dependentes de microtúbulos, o que diminui efeitos adversos como a neurotoxicidade desses agentes (QUASTHOFF, 2002). O primeiro agente a ser específico foi o monastrol, sendo um inibidor alostérico moderado da proteína Eg-5 (MULLER, 2006).

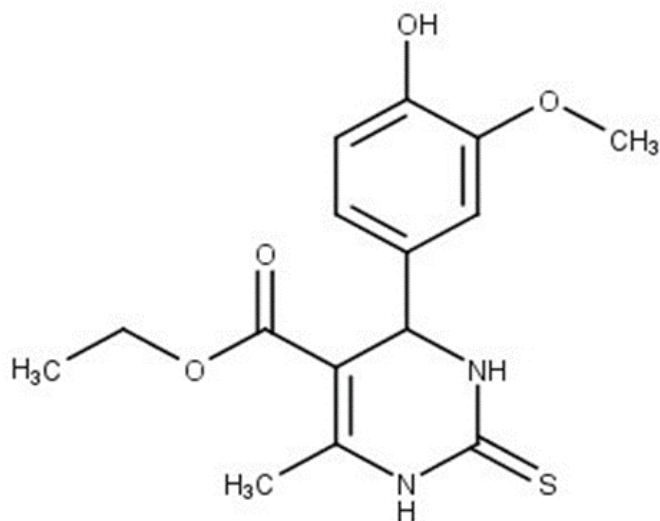
Apesar da atividade antimitótica do monastrol, sua inibição não é a mais efetiva e suas moléculas variantes já possuem melhor atividade (SCHNELL et al., 2000).

Em 2014, Guido *et al.* avaliaram a atividade antitumoral de 37 derivados DHPM, 5 dos quais promoveram redução das células cancerígenas. Desses 5 derivados (Figura 3), 4 possuíam maior seletividade para células tumorais, sinalizando potencial menor espectro de efeitos adversos ao tratamento em relação aos medicamentos existentes atualmente no mercado (GUIDO, 2015)



**Figura 3.** Complexo Eg-5 e cada uma das cinco moléculas testadas com suas ligações e o controle monastrol. (Adaptado: GUIDO et al., 2015)

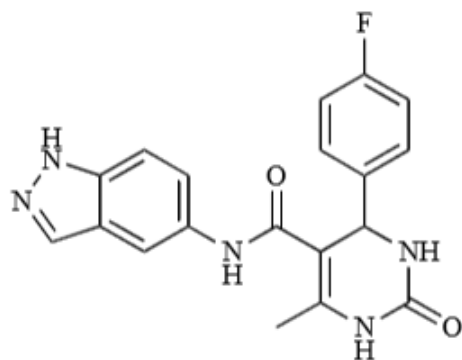
Um dos derivados, a molécula 4bc (Figura 4), possui atividade direta no sítio de ação e por isso possui forte estabilidade com a Eg-5, possuindo atividade inibitória de crescimento de células cancerígenas e pouca atividade em células normais (GUIDO, 2014).



**Figura 4.** Molécula 4bc (MATOS et al., 2017).

DHPMs possuem, entre outras, propriedades de inibição enzimática. A enzima serina/treonina quinase (ROCK1), importante em mediações de várias funções, entre elas a de reorganização, proliferação e mobilidade celular é inibida por um dos primeiros compostos descobertos na classe das DHPM a molécula 4bc (Figura 4), em que possui efeito inibitório da enzima com grande seletividade. Conforme as mudanças dos substituintes os compostos mudam suas afinidades por receptores e funções, bem como varia biodisponibilidade, evidenciando a importância da mudança estrutural e sua intrínseca relação com a função e o direcionamento da molécula (CRESPO et al., 2013).





**Figura 5.** DHPM adicionado indazol e amida. (Adaptado: CRESPO et al., 2013)

O monastrol se apresenta na forma de um racemato, sendo o enantiômero (S) -monastrol mais potente como inibidor alostérico (tanto *in vitro* como *in vivo*) da proteína Eg-5 em comparação ao seu enantiômetro (R). O monastrol liga-se ao domínio motor da cinesina Eg-5, impedindo a hidrólise do ATP pela proteína estabilizando sua conformação e assim inibindo sua ação enzimática de formação do fuso mitótico (MALIGA; KAPOOR; MITCHISON, 2002).

A avaliação da permeabilidade das moléculas pelo tecido intestinal e através da barreira hematoencefálica fornece dados relacionados à cinética e toxicidade de um composto. Foram avaliados 50 compostos DHPMs sintetizados por *Matias et al.* 2017 demonstrando que, de forma passiva, as DHPMs possuem facilidade de ultrapassar barreiras lipofílicas, porém há a necessidade de avaliar formas ativas de transporte. Modelos *in silico* estimam absorção intestinal humana em 90% para as 50 moléculas de DHMP's testadas (MATIAS et al., 2017).

Testes *in silico* apresentam também pouca ligação às proteínas plasmáticas, reduzindo interações cinéticas entre fármacos associadas ao mecanismo de transporte e aumentando valores de volume de distribuição (MATIAS et al., 2017).

Das 50 moléculas testadas, 66% obtiveram boa permeabilidade através da barreira hemato-encefálica. Todos esses dados podem ser explicados pela natureza lipofílica da molécula (MATIAS et al., 2017).

Quanto à toxicidade da classe, algumas substituições estruturais como 4-metil, 4-metoxil e 2,3-difluoro no anel fenil e principalmente presença de compostos clorados produziram aumento de hepatotoxicidade (MATIAS et al., 2017).

### **1.3. FARMACOCINÉTICA NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER**

Fármacos, após atravessarem membrana plasmática de forma passiva ou ativa (mediado por transportadores) passam pelo processo de absorção que é dependente da via de administração do fármaco. Após a absorção, passam pelo processo de distribuição que possui um primeiro momento onde há distribuição sanguínea regional no coração, fígado, rins e cérebro, e após, distribuição na musculatura e tecido adiposo, vísceras e pele dando lugar ao segundo momento de distribuição, mais lenta e que abrange maior parte do corpo. A distribuição dos medicamentos pode ser influenciada pelo fluxo sanguíneo, diferença de pH e presença de proteínas plasmáticas. A ligação a proteínas plasmáticas não é seletiva e pode ser um mecanismo que reforça eliminação do fármaco através de seu transporte até os locais de eliminação. Quando separado da proteína plasmática, o medicamento aumenta seu volume de distribuição, desencadeando uma eliminação modificada do fármaco. A competição dos fármacos por locais de ligação nas proteínas plasmáticas também pode provocar interpretação errada das concentrações plasmáticas medidas do fármaco. (KATZUNG, 2010)

Quando administrado via sistêmica, o fármaco pode ser transportado até o tumor por três vias principais: por vasos sanguíneos, através da parede vascular para os tecidos circulantes e

através do espaço intersticial dentro do tumor. A predileção dependerá tanto das propriedades físico-químicas da molécula quanto do tipo de tumor (JANG et al., 2003).

Para manutenção do tumor é necessária a produção de mais vasos sanguíneos com a finalidade de ser obter mais oxigênio e nutrientes. O processo se dá pelo crescimento de novos vasos através dos vasos sanguíneos já existentes, estes crescem em direção ao tumor. São acentuados pela presença de Fatores de Crescimento, como por exemplo o BFGF e o VEGF (KERBEL, 2000).

Tumores são perfundidos por vasos sanguíneos e seu crescimento é dependente dessa manutenção dos vasos e angiogênese. Esses vasos sanguíneos são diferenciados tanto morfológicamente quanto em sua função de vasos sanguíneos normais, já que são maiores e mais permeáveis (SHUBIK, 1982).

O fluxo sanguíneo é um determinante do transporte de medicamentos e é influenciado pela viscosidade do sangue e o diâmetro do vaso sanguíneo. Em tecidos tumorais o fluxo sanguíneo arterial é semelhante ao normal, porém possui menor pressão no fluxo venoso (JAIN, 1990).

Pela alta permeabilidade dos vasos sanguíneos tumorais o medicamento normalmente é transportado por difusão, de forma passiva. Essa diferença de permeabilidade entre vasos em tumores e vasos sanguíneos normais esclarece o direcionamento e a entrega seletiva ao tumor (SEYMOUR, 1992).

A entrega do medicamento ao tumor é influenciada também por ligação dos componentes celulares e o acúmulo ou a retenção da droga nos tumores, portanto, a característica de entrega do medicamento é dinâmica não só com a classe do medicamento e sua forma molecular, mas também é variável com o tempo de tratamento e o efeito da droga no tecido (JANG et al., 2003).

Moléculas que não se ligam a proteínas celulares atravessam membrana molecular mais facilmente e se distribuem uniformemente pelo tumor, enquanto células que se ligam a macromoléculas celulares ficam na periferia da massa tumoral e se apresentam em concentrações maiores em comparação ao grupo anterior. Porém, essa concentração não é um indicativo de distribuição dentro do tumor e eficácia do medicamento (NEDERMAN; CARLSSON, 1984).

A apoptose é um processo fisiológico natural em situações de risco que causam morte celular e pode ser induzida por medicamentos anticancerígenos, onde diminui a densidade de células tumorais e espaço intersticial expandido, possibilitando uma maior entrada de drogas no interior do tumor (AU; PANCHAL; GAN, 1997).

Para uma quimioterapia eficiente avalia-se fatores como tamanho, carga e lipossolubilidade da droga. Porém, não só características do medicamento devem ser levadas em consideração, mas também características fisiológicas como distribuição, fluxo nos vasos sanguíneos e componentes teciduais (DEWHIRST; SECOMB, 2017).

Em 2017, Matos avaliou a biodisponibilidade do composto 4bc em plasma sanguíneo através de análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Após administração oral e intravenosa, o composto 4bc não foi encontrado na fração plasmática de nenhuma das vias. Apesar de ter utilizado doses bastante altas do composto (300mg/kg por via oral e 5mg/kg pela via intravenosa), não foi possível encontrar a molécula na fração acelular do sangue. O esperado seria encontrar uma biodisponibilidade de 100% para a via intravenosa, pelo menos.

A análise da fração celular se fez necessária, portanto, para a compreensão dos processos cinéticos envolvidos. Com a ausência do composto no plasma sanguíneo surgiu a hipótese que a molécula estaria ligada a algum componente celular, o que levantou a necessidade de avaliar

esta fração, adaptando-se o método de extração desenvolvido por Matos (2017) para o plasma, para as características da amostra utilizada no presente trabalho.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Avaliar biodisponibilidade do composto 4bc em sangue de rato *wistar* através de análise em HPLC.

### **2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- Desenvolver método eficaz de extração da molécula de sangue de rato *wistar*.
- Avaliar perfil farmacológico do composto 4bc.

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 MODELO ANIMAL**

O projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília, com aprovação UnBDoc n° 129356/2015 (ANEXO I)

Foram utilizados ratos Wistar Hannover fêmeas (nulíparas e não grávidas), obtidos do Biotério de Produção de Ratos-Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) em temperatura ambiente na faixa de  $24^{\circ} \pm 1$  °C, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentos fornecidos ad libitum.

Os animais testados tinham idade entre oito e quatorze semanas e com a massa corpórea entre 180 e 220 g.

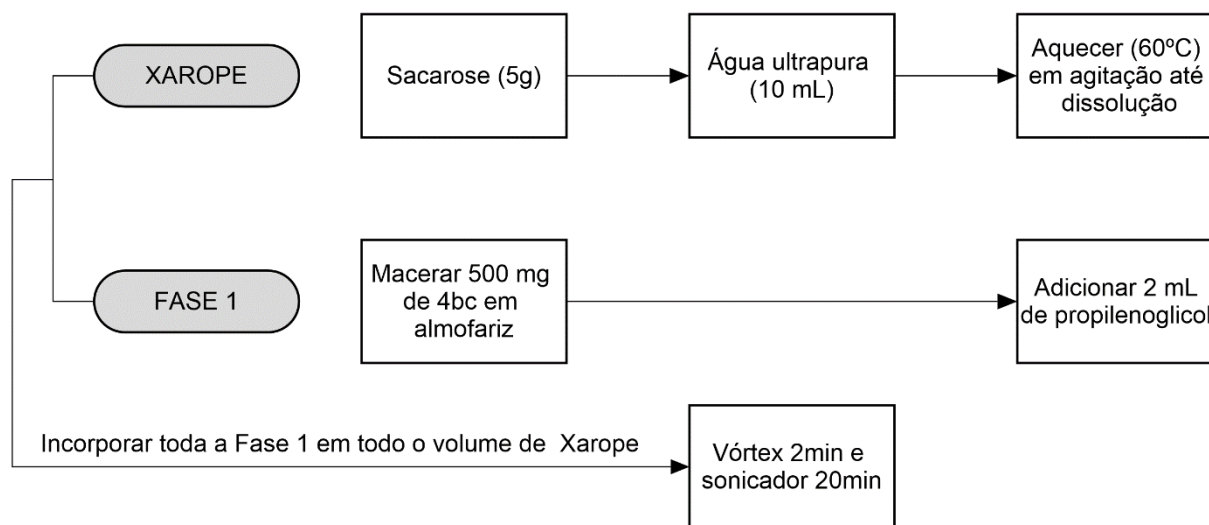
### 3.2 DERIVADO DHPM 4bc

O derivado 4bc foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Prof. Brenno Amaro da Silva Neto (Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica - Universidade de Brasília).

### 3.3 FORMULAÇÕES

#### 3.3.1 FORMULAÇÃO ORAL

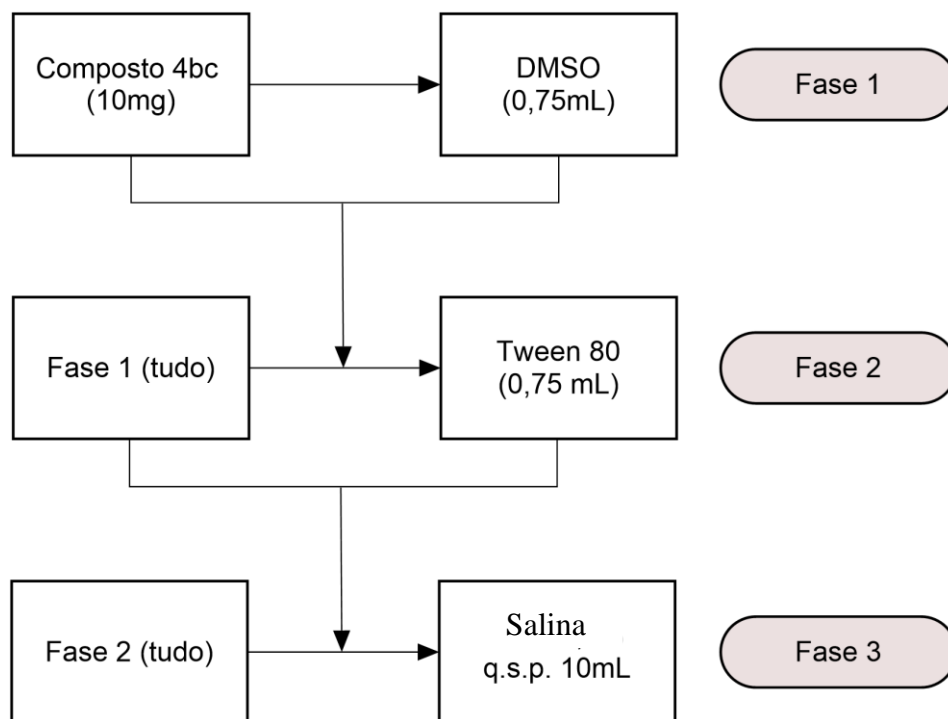
O composto 4bc foi incorporado a um xarope simples na concentração de 50mg/mL, seguindo metodologia descrita por Matos e colaboradores (2017). Em linhas gerais, a formulação foi realizada de acordo com a Figura 6.



**Figura 6.** Metodologia para produção de formulação oral. (Adaptado: MATOS et al., 2017)

#### 3.3.2 FORMULAÇÃO INTRAVENOSA

Desenvolvida como suspensão em concentração 5mg/mL, seguindo metodologia desenvolvida por Matos e colaboradores (2017), esquematizado na Figura 7.



**Figura 7.** Metodologia para produção de formulação intravenosa. (Adaptado: MATOS et al., 2017)

### 3.4 AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE PONTUAL

Foram separados três grupos com cinco ratos cada, de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1.** Grupos e suas vias de administração.

<i>Grupo</i>	<i>Forma de Administração</i>	<i>Quantidade de Ratos</i>	<i>Dose</i>
<i>Controle</i>	---	5	--
<i>Intravenoso</i>	Veia caudal	5	5mg/kg
<i>Oral</i>	Gavagem	5	250mg/kg

A administração da formulação no grupo Oral foi realizada por gavagem, utilizando sonda oral metálica, enquanto no grupo Intravenoso foi realizada por punção da veia caudal. Para esta via, os animais foram acondicionados em um dispositivo de acrílico próprio para a

contenção, tiveram então a cauda aquecida em água morna para induzir vasodilatação e facilitar a punção. O grupo controle não foi exposto ao estresse da administração, considerando que o teste tem a intenção de aferir a presença do composto na circulação, e não de verificar algum efeito que a via de administração poderia causar.

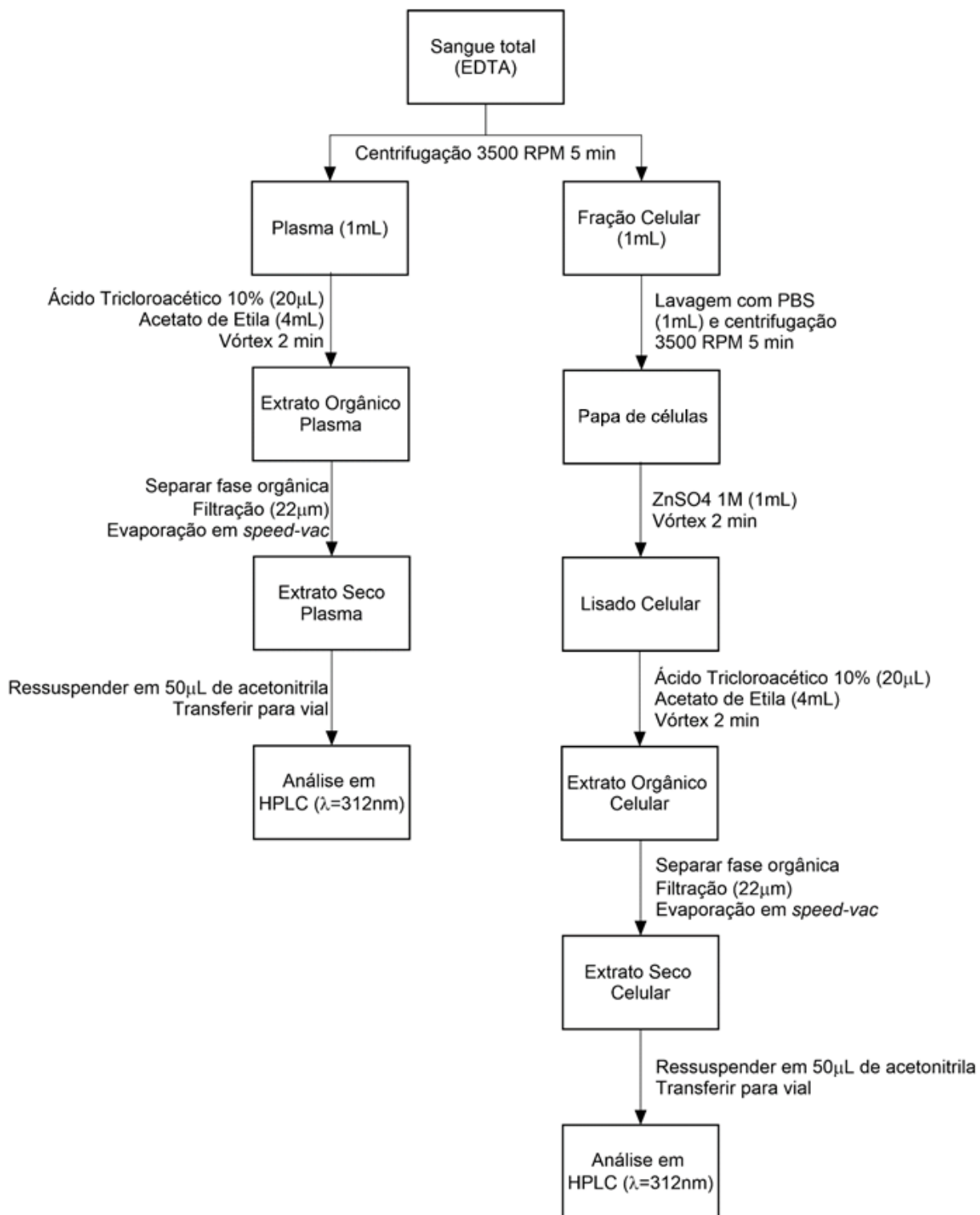
Após 30 minutos da administração (independente da via), os animais foram eutanasiados por administração de 180mg/kg tiopental sódico (Thiopentax®), seguido de exsanguinação por punção cardíaca. O sangue foi coletado e transferido para tubos contendo EDTA.

### **3.5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO**

Foi desenvolvido em Matos, 2017 um método para extração do composto 4bc da fração plasmática do sangue. O sangue obtido dos animais é submetido à sequência de tratamentos descritos abaixo para plasma (seta à esquerda, figura 8), onde a taxa de recuperação foi de 66,77% a 92,90% em relação à quantidade introduzida inicialmente no sangue. O método de extração proposto foi então ideal para recuperação da molécula 4bc em plasma sanguíneo *in vitro*.

Porém, a molécula não foi detectada quando extraída *in vivo*, após administração da molécula por veia caudal, ressaltando a possibilidade de que a molécula estaria no plasma, e presente na fração celular. Para tanto, foi adaptado o método de extração do composto do plasma para a tentativa de analisar a molécula em fração celular (seta à direita, figura 8).





**Figura 8.** Esquema de método de extração do composto 4bc de fração celular e plasma sanguíneo.

Após centrifugar o sangue por 5 minutos em 3500 rpm, o plasma foi separado e armazenado. Com a parte celular foi efetuada lavagem com PBS e centrifugação, repetindo 3

vezes obtendo a papa de células. Após a primeira etapa adiciona-se 1mL de sulfato de zinco 1M para hemólise levando à vórtex por 2 minutos produzindo o lisado celular. Após a produção do lisado celular adiciona-se 20 µL de ácido tricloroacético e 4 mL de acetato de etila, levando à vórtex por 2 minutos.

A parte orgânica é filtrada então em filtro de seringa nylon 0,22 micrômetros, o filtrado é evaporado à secura em um equipamento concentrador de amostras- Speed Vac. A amostra então é ressuspendida em acetonitrila grau HPLC em vial para análise.

### 3.6 ANÁLISE

A identificação e quantificação do composto 4bc foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo LaChrom Elite (Hitachi, Toquio, Japão) equipado com detector L2455 DAD (Hitachi, Toquio, Japão), injetor L2200, bomba L2130 e forno para coluna L2300. Os dados foram obtidos com o software EZChrom Elite (version 3.3.2 SP1 Scientific Software. Inc.). Foi utilizada uma coluna C18 Core Shell Kinetex (110mm x 4,6 mm, 5µm) Phenomenex®. O forno da coluna foi mantido a 25°C durante toda a corrida. O volume de injeção foi de 10 µL, o fluxo foi mantido a 1 mL/min e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 312 nm.

A fase móvel foi constituída de um gradiente de acetonitrila e água, como descrito na Tabela 2.

**Tabela 2.** Gradiente da fase móvel.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Acetonitrila (%)</i>	<i>Água (%)</i>
0-3,5	20	80
3,5-4,5	80	20
4,5-7,0	20	80

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No trabalho de Matos et al. (2017) a análise de plasma sanguíneo não foi capaz de observar a presença da molécula 4bc em nenhuma das vias de administração, ampliando a possibilidade da molécula estar associada a uma das células sanguíneas. Assim ressaltou-se a necessidade de se obter um processo de extração da molécula da fase celular.

Os ratos foram pesados e divididos em grupos (controle, via intravenosa e via oral), cada um com cinco ratos possuindo pesos aproximados (entre 180-220g). No dia da eutanásia os animais foram pesados novamente para verificar a semelhança de pesos entre os componentes dos grupos.

Foram propostas duas formulações distintas a fim de analisar o comportamento da molécula em diferentes vias. Portanto, a formulação oral foi obtida segundo os métodos descritos no item 3.3.1, página 22 e a formulação intravenosa de acordo com o item 3.3.2, página 23, realizadas 24 horas antes do dia programado para administração nos animais para manter estabilidade da formulação.

Para administração, os ratos do grupo intravenoso foram acondicionados no aparelho de contenção e a cauda foi aquecida em água morna para evidenciar a veia caudal, onde foi administrada a formulação. Já o grupo oral teve a formulação administrada por gavagem.

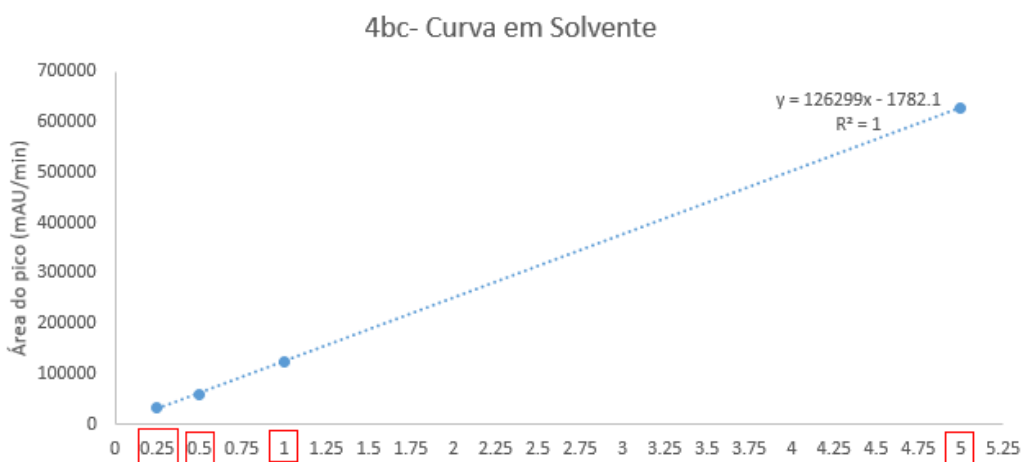
Após 25 minutos da administração, independente da via, os animais foram anestesiados com tiopental (180mg/kg) e o sangue foi coletado por punção cardíaca.

O sangue foi centrifugado a 3500rpm por 5 minutos. O plasma foi aliquoteado em um *ependorff* e armazenado em freezer a -80°C. A fração celular foi lavada com volume equivalente de PBS e centrifugado. Esse processo de lavagem foi repetido por três vezes.

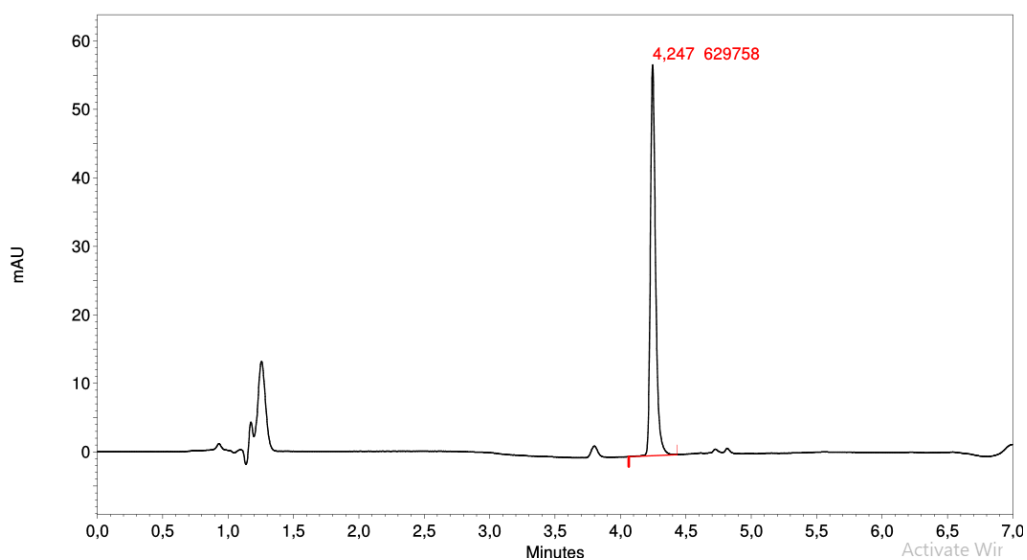
Adaptando o método produzido para extração da molécula da fração plasma e aplicando na fração celular, o método incluiu uma etapa de lise celular e processo de separação. Foram utilizados o sulfato de zinco (1mL de solução 1M) como agente de hemólise (TSZYRSZNIC et al., 2013), o ácido tricloroacético (20µL de solução a 10%) para desproteíntização e solvente orgânico para a extração líquido-líquido (4 mL de acetato de etila) (MATOS et al., 2017).

O extrato orgânico foi filtrado em membrana de 22µm de largura de poro e evaporado à secura em *speed vac*. O resíduo foi ressuspendido em 100 µL de acetonitrila grau HPLC e transferido para vial para subsequente análise em HPLC.

Para análise dos dados obtidos por HPLC foi utilizado o software Microsoft Excel ® 2016. A linearidade e o coeficiente de correlação da molécula 4bc dentro da faixa de trabalho (0.25- 5 µg/mL) estão dentro do exigido pela RE 899/2003, acima de 0.99, o que indica proporcionalidade entre as concentrações e as áreas dos picos (Figura 9).

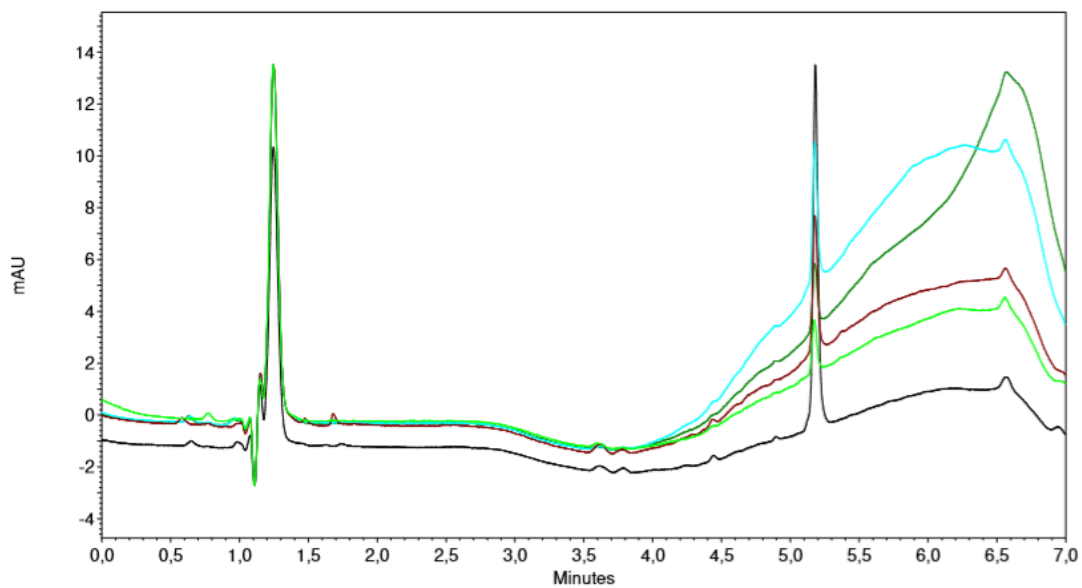


**Figura 9.** Curva analítica da 4bc em solvente.

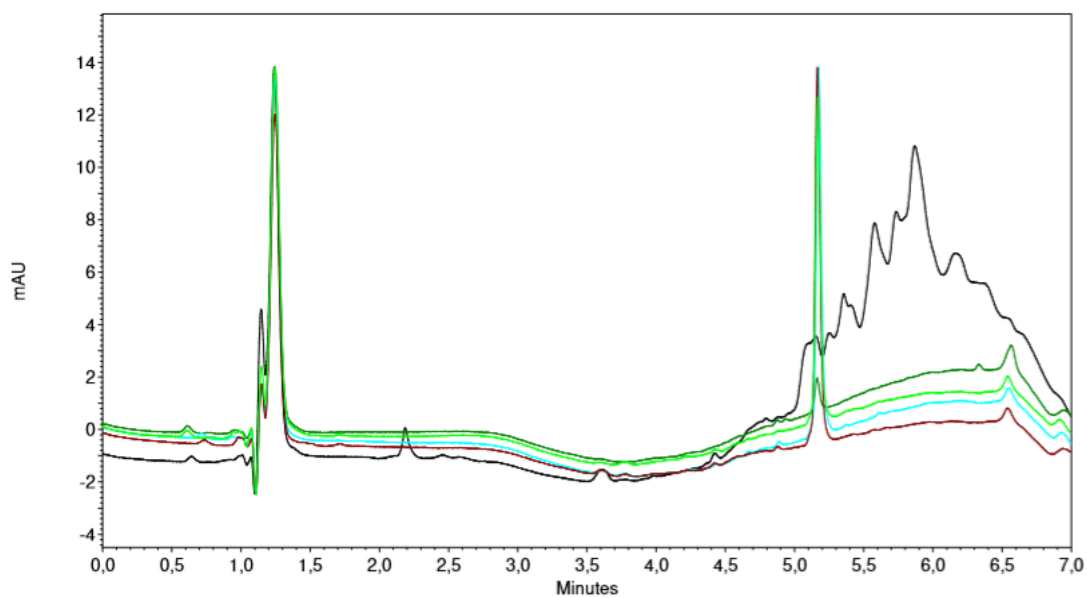


**Figura 10.** Perfil cromatográfico da 4bc (5 $\mu$ g/mL) a 312nm.

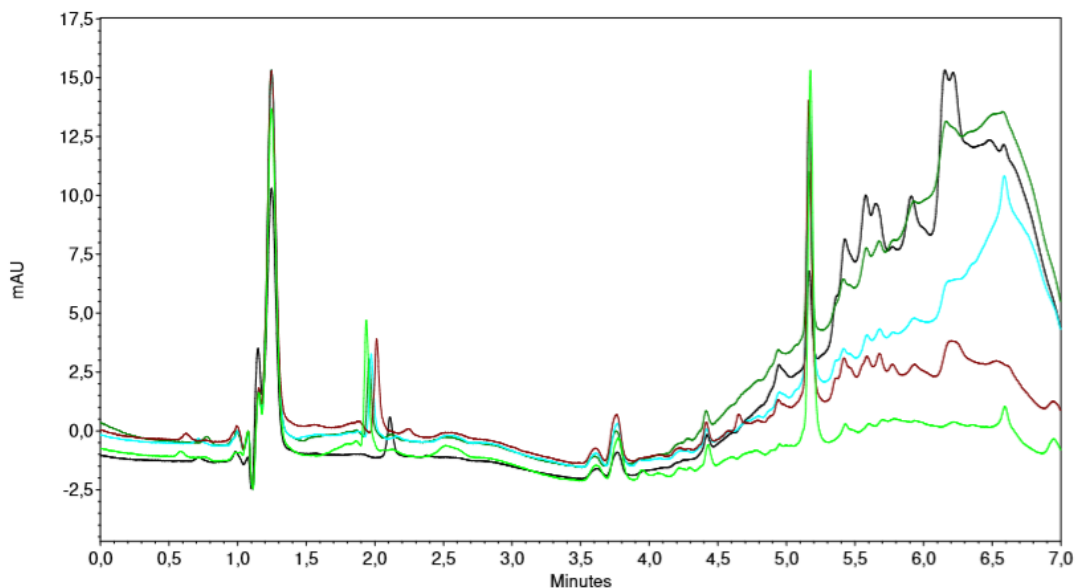
O perfil cromatográfico da molécula (Figura 10), detectado entre os tempos 4 e 4,5 minutos não foi observado em nenhum rato de nenhum grupo analisado (Figuras 11 a 13), demonstrando que o método de extração não foi eficiente em extrair o composto 4bc em nenhum dos grupos, sendo necessário mais estudos para avaliação da biodisponibilidade desse derivado.



**Figura 11.** Perfil cromatográfico do grupo controle. Ratos 1 a 5 sobrepostos.



**Figura 12.** Perfil cromatográfico do grupo Intravenoso. Ratos 1 a 5 sobrepostos.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico do grupo VO. Ratos 1 a 5 sobrepostos.

Esse resultado pode ser justificado no grupo de via oral se considerada a molécula 4bc com baixa biodisponibilidade; porém, no grupo de via intravenosa, que teria biodisponibilidade esperada de 100%, a molécula também não foi encontrada.

Existe a possibilidade de que a molécula tenha se degradado durante o processo de extração devido a necessidade de adição de ácido e fortes solventes orgânicos como o ácido tricloroacético. A redução da força desse ácido pode ser uma proposta para próximos experimentos.

Uma perspectiva analisada após os experimentos, e que poderia ser utilizada para novos estudos seria a diminuição dos interferentes no processo de extração. O sulfato de zinco poderia ser substituído por uma solução tampão hiperosmolar, que forneceria a mesma lise celular com menor inserção de componentes capazes de interagir com o analito.

Outra hipótese, seria uma possível reação da molécula com componentes do sangue, o que alteraria o seu perfil cromatográfico e impediria sua detecção no mesmo tempo de retenção

ou no mesmo comprimento de onda. Reações de polimerização, conjugação irreversível às proteínas plasmáticas ou processos de hidrólise poderiam alterar a molécula a ponto de torná-la indetectável com a metodologia proposta neste trabalho.

Uma terceira possibilidade, é que o método não teria sido capaz de extrair a molécula da fração celular. O método proposto, baseado na análise realizada em plasma por Matos e colaboradores (2017), é capaz de extrair a molécula do plasma. Para corretamente afirmar se o método é ou não capaz de extrair o composto da matriz, uma análise por adição de padrão em amostra não exposta ao composto (“spiked”) esclareceria o questionamento.

A redução de interferentes também se faz necessária em próximos estudos já que as formulações IV e oral possuem vários componentes. A molécula 4bc, assim como as outras moléculas de sua classe possui perfil lipofílico acentuado, sendo, portanto, de difícil solubilidade. Matos (2017) analisou a solubilidade do composto 4bc e obteve resultados já esperados para essa classe, onde o composto é praticamente insolúvel em soluções aquosas em pH neutro. Diante desta característica, a produção de formulações que diluam o composto demanda muitos componentes que podem estar servindo de interferentes cromatográficos.

Outra proposta é a reformulação do xarope e da suspensão intravenosa que podem estar dificultando a biodisponibilidade da molécula *in vivo*. No processo de extração de Matos, et al. (2017) o método de extração foi eficiente, mas a molécula não foi detectada em nenhuma das vias de administração. Formulações em suspensão não garantem a solubilização do composto nos fluidos biológicos, e a simples precipitação do composto no local de administração pode também estar ocorrendo. Não foi detectado, porém, nenhuma alteração no local da punção na veia caudal, nem problemas como flebite que poderiam ser decorrentes da precipitação do composto no local.



A classe das DHPMs possui grande perfil farmacológico que é proporcionado provavelmente pela sua capacidade de ligação a diversas proteínas e enzimas (WAN & PAN, 2012), o que é excelente para o desenvolvimento de novos fármacos, porém, dificulta a caracterização da molécula quanto a sua farmacodinâmica e farmacocinética.

## 5 CONCLUSÃO

Diidropirimidinonas são uma classe de medicamentos já utilizados como antineoplásicos, possuindo alta eficiência em interromper o ciclo celular de células com crescimento alterado. A molécula 4bc é então de interesse para futuros estudos.

A análise do plasma sanguíneo de ratos expostos por via oral ou via intravenosa não observou a presença do 4bc em nenhuma das vias de administração, levando à conclusão que a molécula poderia estar associada à fração celular do sangue. Assim, uma metodologia para avaliar a presença do 4bc nessa fração foi desenvolvida.

Entretanto, não foi possível verificar o perfil de biodisponibilidade da molécula 4bc através da metodologia de extração proposta, seguida da análise por CLAE, já que aparentemente o método de extração não foi o ideal para esta fase do sangue.

Foram levantadas hipóteses de soluções para resolver os problemas encontrados durante o processo, como a otimização dos interferentes e a análise de amostras “branco” com adição de padrão, para garantir o processo extrator.

Estudos posteriores se fazem necessários em busca de uma metodologia de extração que possibilite a análise proposta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AU, J L; PANCHAL, N; GAN, y. Apoptosis: a new pharmacodynamic endpoint. **Pharm Res.**, [s.i.], v. 14, n. 12, p.1659-1671, dez. 1997.

BLOOM, D. et al. **The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases**. Program on the Global Demography of Aging. 2012 Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro. 3: 20 p, 2012.

CRESPO, Abel et al. Discovery of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H) -ones As a Novel Class of Potent and Selective A2B Adenosine Receptor Antagonist. **Acs Medicinal Chemistry Letters**, Santiago de Compostela, v. 11, n. 4, p.1031-1036, 14 nov. 2013.

DE FÁTIMA, A. et al. A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 3, p. 363-373, 2015.

DEWHIRST, Mark W.; SECOMB, Timothy W.. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. **Nature Reviews Cancer**, [s.i.], v. 17, n. 738, p.738-750, nov. 2017.

GARTNER, Michael et al. Development and Biological Evaluation of Potent and Specific Inhibitors of Mitotic Kinesin Eg5. **Chembiochem**, Weinheim, v. 6, p.1173-1177, 2005.

GUIDO, B. C. **Avaliação da atividade antitumoral dos derivados da 3, 4dihidropirimidinona ( DHPMs ) sobre células do adenocarcinoma mamário humano**. 2014. 138 f. Dissertação (Doutorado em Patologia Molecular) -Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

GUIDO, B. C. et al. Impact of kinesin Eg5 inhibition by 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives on various breast cancer cell features. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 283, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2015.

HAYES, J. D.; WOLFT, C. R. Molecular mechanisms of drug resistance. **Biochemistry J**, v. 272, p. 281–295, 1990.

INCA. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. Ministério da Saúde. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ, 2012.

INCA. **Políticas e ações para prevenção do câncer no Brasil: alimentação, nutrição e atividade física.** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Brasil, 2017.

JAIN, Rk. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. **Cancer Res.**, [s.i.], v. 50, n. 3, p.814-819, fev. 1990.

JANG, S. H. et al. Drug delivery and transport to solid tumors. **Pharm Res**, Ohio, v. 9, n. 20, p.1337-1350, set. 2003.

KAPPE, C. O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli type - a literature survey. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 1043–1052, 2000.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica.** 10ª Edição. Porto Alegre: 2010.

KERBEL, R.s.. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. **Carcinogenesis**, [s.i.], v. 21, n. 3, p.505-515, mar. 2000.

KUMAR, B.r. Prashantha et al. Novel Biginelli dihydropyrimidines with potential anticancer activity: A parallel synthesis and CoMSIA study. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 10, p.4192-4198, out. 2009

WOOD, K. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. **Current Opinion In Pharmacology**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.370-377, 1 ago. 2001.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **Journal of Pathology**, v. 205, p. 275–292, 2005.

MALIGA, Zoltan; KAPOOR, Tarun M; MITCHISON, Timothy J. Evidence that Monastrol Is an Allosteric Inhibitor of the Mitotic Kinesin Eg5. **Chemistry & Biology**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.989-996, set. 2002.

MATIAS, Mariana et al. Screening of pharmacokinetic properties of fifty dihydropyrimidin(thi)one derivatives using a combo of in vitro and in silico assays. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 109, p.334-346, nov. 2017.

MATOS, L. H. S. **Avaliação toxicológica aguda dos derivados dihidropirimidinona 4p e 4bc.** 2017. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

MÜLLER, Christine et al. Inhibitors of kinesin Eg5: antiproliferative activity of monastrol analogues against human glioblastoma cells. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.157-164, 16 maio 2006.

NEDERMAN, Thore; CARLSSON, Jorgen. Penetration and binding of vinblastine and 5-fluorouracil in cellular spheroids. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, [s.i.], v. 13, n. 2, p.131-135, ago. 1984.

PACHMAN et al. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Prevention and Treatment. **Clin Pharmacol Ther**, [s.i], v. 3, n. 90, p.377-387, jan. 2011.

QUASTHOFF, S; Hartung, HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **J Neurol** 249:9–17. 2002.

SCHNELL, Barbara et al. Synthesis of enantiomerically pure 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones via enzymatic resolution: preparation of the antihypertensive agent (R)-SQ 32926 †Synthesis and reactions of Biginelli compounds, part 20; for part 19, see. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.1449-1453, abr. 2000.

SEYMOUR, L W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.**, [s.i.], v. 9, n. 2, p.135-187, jan. 1992.

SHUBIK, Philippe. Vascularization of tumors: A review. **Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology**, [s.l.], v. 103, n. 3, p.211-226, jul. 1982.

SOUZA FILHO, Roberto Yoshio de. **Reações multicomponentes em foco: investigações sobre o mecanismo reacional da reação Petasis borono-Mannich e a ação citotóxica de Diidropirimidinonas fluorescentes**. 2017. xvi, 84 f., il. Tese (Doutorado em Química) — Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

TORRES, L. A.. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a cancer journal of clinicians.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TSZYRSZNIC, Wlodzimierz et al. Two rapid ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants compared to immunoassay. **Journal Of Chromatography B**, [s.i.], v. 928, p.9-15, 1 jun. 2013.

WAN, J.; PAN, Y.. Recent Advance in the Pharmacology of Dihydropyrimidinone. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.337-349, 24 abr. 2012.

WEINBERG, R. A. Oncogenes and Tumor Suppressor Gene. **CA: a cancer journal of clinicians.**, v. 44, n. 3, p. 160–170, 1994.

## ANEXO I



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 20 de novembro de 2015.



### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA, TOXICOLÓGICA DE DOSES REPETIDAS (28 DIAS) E TOXICOCINÉTICA DOS DERIVADOS DIIDROPIRIMIDINONAS (DHPM's) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL 4BC E 4P.", UnBDoC n.º 129356/2015, sob responsabilidade do Professor Maurício Homem de Mello foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus*: 228. A presente aprovação é válida pelo período de 16/11/2015 a 10/8/2017.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA

\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Activate Windows  
Go to Settings to activate Windows.