



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA
E MEIO AMBIENTE - PPGSHMA

André Severino da Silva

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DOS COMPOSTOS 4-
AMINOPYRIMIDÍNICOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA E TESTE SMART
EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Vitória de Santo Antão

2016

André Severino da Silva

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DOS COMPOSTOS 4-AMINOPYRIMIDÍNICOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA E TESTE SMART EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Rohde

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

S586 a Silva, Andre Severino da.

Avaliação da atividade mutagênica dos compostos 4-aminopirimidínicos através do ensaio cometa e teste smart em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. / André Severino da Silva. - 2016.

xi, 53 folhas: il., graf., tab.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão.

Coorientador: Claudia Rohde.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Nome do Curso ou do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Pirimidinas. 2. Genotoxicidade. 3. Testes de Mutagenicidade. I. Falcão, Emerson Peter da Silva (Orientador). II. Rohde, Claudia (Coorientador). III. Título.

615.31 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE- 58/2016



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - MESTRADO ACADÊMICO



Dissertação de Mestrado apresentada por **André Severino da Silva** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DOS COMPOSTOS 4-AMINOPIRIMIDÍNICOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA E TESTE SMART EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*”**, orientada pelo Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão e coorientada pela Prof.^a Dr.^a Claudia Rohde, aprovada no dia 23 de fevereiro de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Cristiano Aparecido Chagas
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Dr.^a Ana Cristina Lauer Garcia
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Dr. Sebastião José de Melo
Departamento de Antibióticos – UFPE

Autor:

André Severino da Silva

À minha mãe Estelita Severina dos Santos,
ao meu pai Severino Francisco da Silva (*in memoriam*),
à minha pequena Ana Vitória Celerino da Silva e
à minha esposa Anadeje Celerino dos Santos Silva.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e proteção. Por maiores que fossem os obstáculos, senti a tua presença me capacitando e fortalecendo.

Aos meus Pais, que sempre acreditaram em mim e pela educação transferida. Verdadeiros exemplos de força e superação.

A minha esposa Anadeje Celerino dos Santos Silva, pela compreensão e companheirismo. Alcançamos juntos mais essa conquista.

Ao Professor Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, pela orientação e ensinamentos valiosos para a minha carreira acadêmica e crescimento profissional.

À Professora Dra. Claudia Rohde, pela coorientação e apoio dedicado a mim desde a graduação.

Ao corpo docente e técnicos administrativos do PPGSHMA, pelo apoio e dedicação à pesquisa.

À colega Érima Maria de Amorim, pelas correrias e sorrisos, essa parceria segue. Há amigos mais achegados que irmãos. Tuas palavras e incentivo e amizade foram de grande relevância.

Ao amigo Aroldo Vieira de Moraes Filho, que mesmo distante e ocupado sempre esteve disposto a contribuir com suas valiosas dicas.

A minha cunhada Jéssica Celerino dos Santos, grande parceira desse trabalho, pelos finais de semana e feriados dedicados à pesquisa.

Aos colegas do laboratório de genética, Robson Gomes dos Santos e Cícero Jorge Verçosa, Géssica Galdino da Silva e Ícaro Fillipe de Araújo Castro que não mediram esforços para contribuírem muitas vezes nos finais de semana e feriados.

Ao grupo do Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Maria Aparecida Conceição de Lira, Tamiris Alves Rocha e Gerllyni Bezerra de Oliveira, pela ajuda nas sínteses dos compostos.

A todos os familiares e amigos, que sempre torceram por esse momento.

A FACEPE, pelo suporte financeiro a essa pesquisa e apoio ao crescimento científico no País e em Pernambuco.

Aos grandes mestres que conheci durante minha trajetória estudantil nas instituições onde estudei: Escolas (Severino André de Luna, Almirante Antônio Heráclio, Presidente João Pessoa, Rita Maria da Conceição) e Universidade Federal de Pernambuco (Centro Acadêmico de Vitória UFPE/CAV). A vocês, meus parabéns e obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	14
1.1 Introdução	14
1.2 Objetivos	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2. Objetivos Específicos	16
1.3 Revisão da Literatura	17
1.3.1 Pirimidinas	17
1.3.2 Síntese de derivados pirimidínicos	17
1.3.3 Algumas propriedades biológicas de compostos pirimidínicos	19
1.3.4 Genotoxicidade e o fenômeno mutação	20
1.3.5 Testes de genotoxicidade	21
1.3.6 Organismo modelo <i>Drosophila melanogaster</i>	27
CAPÍTULO 2	29
Ausência de efeito tóxico genético dos compostos 4-aminopirimidínicos em larvas de <i>Drosophila</i>	
2.1. Resumo	29
2.2 Abstract	30
2.3 Introdução	31
2.4 Material e Métodos	32
2.5 Resultados	35
2.6 Discussão	40
2.7 Referências Bibliográficas	42
CAPÍTULO 3	44
Avaliação tóxica genética de composto derivado de 4-aminopirimidínicos em larvas de <i>Drosophila melanogaster</i>	44
3.1 Referências	45
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura da Pirimidina	17
Figura 1.2	Síntese de novos 6-fenil-2,4-di-substituído-pirimidina-5-carbonitrilos.	18
Figura 1.3	Síntese de pirazo [3,4-d] pirimidina	19
Figura 1.4	Classificação visual baseada no comprimento da cauda e quantidade de DNA nos nucleóides	22
Figura 1.5	Pelos normais, <i>mwh</i> e <i>flr</i> ³	23
Figura 1.6	Cruzamento padrão	24
Figura 1.7	Cruzamento padrão Mancha simples pequena (A), mancha simples grande (B) e mancha gêmea (C) nas asas de <i>D. melanogaster</i>	25
Figura 1.8	Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	28
Figura 2.1	Esquema de síntese dos compostos 5a, 5b e 5c	32
Figura 3.1	Esquema de síntese de compostos 4-amino-pirimidínicos	43
Figura 3.2	Composto 5 ^a	45
Figura 3.3	Composto 5b	45
Figura 3.4	Curvas de sobrevivência de indivíduos	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Tratamentos realizados com os compostos 5a , 5b e 5c , e grupos controle negativo e positivo, no Ensaio Cometa com larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> .	33
Tabela 2.2	Avaliação de índice e frequência de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas ao controle negativo e a diferentes concentrações dos compostos pirimidínicos 5a , 5b e 5c .	36
Tabela 2.3	Análise estatística de Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%) comparadas par a par, entre o grupo de controle negativo e concentrações dos compostos 5a , 5b e 5c estudadas.	37
Tabela 3.1	Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste binomial condicional (Kastenbaum e Bowman).	47

LISTA DE ABREVIATURAS

5a	4-Amino-2-(fenil)-6-(<i>m</i> -nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina
5b	4-Amino-2- (fenil) - 6- (<i>p</i> -nitrofenil) - 5 - carbonitrila - pirimidina
5c	4-Amino-2- (fenil) - 6- (<i>p</i> -anisil) – 5 - carbonitrila -pirimidina
P7	4-amino-2-(fenil)-6-(<i>p</i> -fluorofenil)-pirimidina-5-carbonitrila
P14	4-amino-2-(<i>p</i> -anisil)-6-(<i>p</i> -anisil)-pirimidina-5-carbonitrila
ANOVA	Análise de Variância (Do inglês “Analysis of Variance ”)
ASA	Ácido acetilsalicílico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDK	Quinase dependente de ciclina
DL ₇₀	Dose letal a 70%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Doutor
DRA	Doutora
FD	Frequência de dano
<i>flr</i> ³	<i>flare</i>
FM	Fórmula molecular
ID	Índice de dano
<i>mwh</i>	<i>multiple wing hairs</i>
PM	Peso molecular
QSAR	Análise de relação quantitativa de estrutura e atividade
R _f	Fator de retenção
RNA	Ácido ribonucleico
SCGE	Ensaio de eletroforese em gel de célula única
SMART	Teste de mutação e recombinação somática
UV	Ultra violeta

RESUMO

Compostos com núcleo pirimidínico têm grande potencial e importância farmacológica para a saúde humana, pois apresentam várias propriedades biológicas como atividade anti-inflamatória, antitumoral, bioherbicida, entre outras. Este trabalho busca analisar os efeitos genotóxicos dos compostos 4-Amino-2-(fenil)-6-(*m*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5a**), 4-Amino-2-(fenil)-6-(*p*-nitrofenil)-5-carbonitrila- pirimidina (**5b**) e 4-Amino-2-(fenil)-6-(*p*-anisil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5c**), obtidos por síntese, por meio do teste SMART (Teste de Mutação e Recombinação Somática) e Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster*. Para o Ensaio Cometa, larvas de *D. melanogaster* da linhagem Oregon-R foram expostas por 24 horas aos compostos **5a**, **5b** e **5c**, nas concentrações 0,39, 0,78, 1,56 e 3,12 mg/mL, e ao solvente (grupo controle negativo), além de um grupo controle positivo (Ciclofosfamida 1 mg/mL). Para a análise microscópica dos possíveis danos genéticos causados pelos compostos foram observadas as células da hemolinfa (hemócitos) de larvas. No processo metodológico do SMART, larvas de *D. melanogaster* foram expostas às concentrações 0,04, 0,09, 0,19, 0,39, 0,78, 1,56 e 3.12 mg/mL dos compostos **5a** e **5b**, além dos grupos controle negativo (tratado apenas com o solvente) e controle positivo (tratado com mitomicina 1mg/mL). Foi estabelecida uma curva de sobrevivência de acordo com o nascimento dos indivíduos adultos para verificar a citotoxicidade dos compostos. As manchas e pelos mutantes das asas dos indivíduos adultos tratados foram analisadas em microscópio óptico e comparados aos resultados do grupo controle negativo. Os resultados indicaram que não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e os controles negativos, tanto para o teste SMART, quanto para o Ensaio Cometa. No teste SMART, as curvas de sobrevivência mostraram que os compostos **5a** e **5b**, não apresentaram toxicidade para os drosofilídeos testados. Podendo-se concluir, assim, que nas condições experimentais testadas em *D. melanogaster* os compostos não apresentaram atividade tóxica nem mutagênica, o que contribui para o uso dos compostos pirimidínicos aqui investigados na composição de novos fármacos para o tratamento da saúde humana.

Palavras-Chave: Pirimidinas, Teste de Mutação e Recombinação Somática, hemolinfa, novos fármacos.

ABSTRACT

Compounds of the core pyrimidine have great potential and pharmacological importance to human health and the environment and therefore exhibit different biological properties as anti-inflammatory, antitumor, bioherbicide among others. This work intent to analyze the genotoxic effects of the compounds 4-Amino-2-(phenyl)-6-(*m*-nitrophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine (**5a**) 4-Amino-2-(phenyl)-6-(*p*-nitrophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine (**5b**) and 4-Amino-2-(phenyl)-6-(*p*-anisyl)-5-carbonitrile-pyrimidine (**5c**) obtained by chemical synthesis using the SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) and Comet Assay in *Drosophila melanogaster*. For SMART, *D. melanogaster* larvae were exposed to concentrations of 0.04, 0.09, 0.19, 0.39, 0.78, 1.56 and 3.12 mg/mL of the compounds **5a** and **5b**, and a negative control group treated only with the solvent. A survival curve was established in accordance with the birth of adults in order to check the cytotoxicity of the compounds. The spots and the mutants were analyzed by light microscopy and the results of the groups treated were compared to the negative control group. During the methodological process of the Comet Assay, larvae of *D. melanogaster* Oregon-R strain were exposed for 24 hours to the compounds **5a**, **5b** and **5c**, at the concentrations 0.39, 0.78, 1.56 and 3.12 mg/mL, and to the solvent (the negative control group). To microscopic analysis of possible genetic damage caused by the compounds, were observed cells from the hemolymph (hemocytes) of larvae. The results indicated that in both tests there were no significant difference between the treated groups and the negative control. It leads us to conclude that the tested compounds showed neither toxic effect, nor mutagenic activity in *D. melanogaster* over the experimental conditions in *D. melanogaster* model.

Keywords: Pyrimidine, Somatic Mutation and Recombination Test, hemolymph, new drugs.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

A Química orgânica é um dos ramos da ciência que vem crescendo bastante nas últimas décadas e um dos fatores responsáveis por esse desenvolvimento é a expansão dos compostos sintéticos com utilidade medicinal para combater diversas patologias (MONTEIRO, 2005).

Compostos heterocíclicos derivados de núcleos pirimidínicos apresentam diversas propriedades biológicas como, antiviral, antitumoral entre outras, além de se comportarem como antioxidantes, anticorrosivos e constituírem a estrutura química de corantes e pigmentos (HO, 2005). Numerosos compostos heterocíclicos foram sintetizados, mas devido às várias utilidades à saúde humana no combate a doenças e algumas vezes ao meio ambiente como herbicidas, as pirimidinas merecem destaque. Bases formadas por pirimidinas fundamentam a transmissão de informação gênica, os ácidos nucleicos (DNA e RNA), importantes para a manutenção da vida no Planeta (PORTE, 2011).

Compostos heterocíclicos pirimidínicos apresentam propriedades biológicas, entre elas, analgésicas (YEJELLA; ATLA, 2011), agroquímicas, como pesticidas antibacterianas (SHILPA et al., 2012), e antimicrobianas (BASAVARAJA et al., 2010). Devido esses fatores apresentados e recentemente comprovados por meio de pesquisas, tais estruturas têm sido muito estudadas (VITAL et al., 2009).

Falcão e colaboradores (2006) demonstraram que compostos 4-amino-pirimidínicos apresentam grande potencial anti-inflamatório, com atividade superior ao ácido acetilsalicílico. Outros pesquisadores também relatam que novas pirimidinas derivadas de pirimido [2',1':2,3] tiazol [4,5-b] quinoxalina apresentam atividades analgésicas e anti-inflamatórias (ABU-HASHEM et al., 2010).

Outra ação bastante descrita na literatura é a antineoplásica, existindo diversos fármacos no mercado com este núcleo, como é o caso do 5-Flúor-uracil. Xie et al. (2009) relataram a eficiente atividade anticancerígena com a inibição de quinase dependente de ciclina (CDK). Por inibirem a CDK, derivados de pirimidina têm ação

antitumoral, reduzindo o crescimento de tumores, motivo pelo quais novos compostos com essa atividade têm sido sintetizados (EL-NASSAN, 2011).

Com tantas propriedades biológicas é de grande importância que avaliações genotóxicas de compostos pirimidínicos sintéticos sejam realizadas, a fim de garantir uma maior segurança no seu uso como possíveis fármacos.

Para avaliar os prováveis danos causados ao material genético de um organismo exposto a um determinado agente tóxico-genético, são utilizados testes *in vivo* e *in vitro*. Esses testes ainda são utilizados como sinalizadores para o possível surgimento de doenças carcinogênicas, as quais apresentam relação com efeitos genotóxicos (SIVIERO; MACHADO-SANTELLI, 2008; BATISTA; CAMPOS, 2015). Neste contexto, genotoxicidade pode ser entendida como a capacidade que uma determinada substância tem para causar dano ao material genético (DNA) em determinado organismo. Se esse dano não for reparado e se estabelecer, torna-se uma mutação (SILVA et al., 2003).

A mutação é um fenômeno que pode acometer células germinativas ou somáticas de diversos organismos e é caracterizada por qualquer alteração súbita no material genético que não seja oriunda de uma recombinação (SNUSTAD; SIMONS, 2001; ROUSE; JACKSON, 2002). Durante a replicação do DNA podem ocorrer erros de forma natural, por lesões ou elementos transponíveis, resultando assim em uma mutação espontânea (BROWN, 1999). Por outro lado, existem as mutações induzidas, que advêm de um tratamento proposital ou exposição de um organismo a agentes causadores de mutação (SNUSTAD; SIMONS, 2001).

Como visto, os compostos pirimidínicos representam um grupo químico com grande potencialidade biológica, incluindo-se a atividade antineoplásica. Igualmente os compostos 4-aminopirimidínicos apresentam grandes potencialidades como fármacos. Apresentam baixa toxidez, como relatado por Falcão et al. (2006). Entretanto, não existem trabalhos que relatem sua toxidez gênica o que pode dar informações valiosas a respeito de seus efeitos crônicos.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Analisar o efeito genotóxico e mutagênico dos compostos 4-Amino-pirimidínicos **5a**, **5b** e **5c** em *Drosophila melanogaster* através do teste SMART e do Ensaio Cometa.

1.2.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar, qualitativa e quantitativamente, o potencial mutagênico, clastogênico e/ou recombinogênico dos compostos de núcleo pirimídico **5a-b** sobre a descendência de linhagens específicas de *Drosophila melanogaster*, através da aplicação do teste SMART;
- b) Identificar o possível efeito genotóxico dos compostos de núcleo pirimídico **5a-c**, por meio do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R;
- c) Contribuir para um maior conhecimento dos riscos ou das vantagens Do uso dos produtos derivados de núcleos pirimidínicos.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Pirimidinas

Pirimidinas são aminas heterocíclicas aromáticas, isoeletrônicas ao benzeno, nas quais os átomos de carbono da posição 1 e 3 são substituídos por nitrogênio (**Figura 1.1**) (GUPTA et al., 2010). E fazem parte da classe das diazinas, das quais as pirimidinas que, apresentam 6 membros com dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3, são as mais importantes (LAGOJA, 2005).

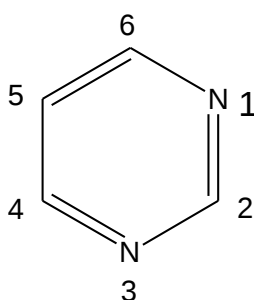


Figura 1.1 - Pirimidina. Fonte: Desenhada no ChemSketch.

As pirimidinas são bases nitrogenadas formadas por um anel aromático, e estão presentes na estrutura dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). No DNA há duas bases pirimidínicas que são citosina e timina, já no RNA existe a uracila, em substituição a timina (ALBERTS et al., 2010). Devido essa relação tão profunda com a célula e, conseqüente, à sua importância nos sistemas biológicos, compostos derivados de núcleos pirimidínicos têm apresentado várias aplicações na indústria farmacêutica (BOOYSEN et al., 2008). Suas atividades farmacológicas e biológicas são observadas principalmente quando o grupo amino está ligado ao anel pirimidínico nas posições 2 e/ou 4 (SILVA et al., 2008).

1.3.2 Síntese de derivados pirimidínicos

Compostos pirimidínicos podem ser obtidos por meio de reações de condensação, envolvendo a participação da malononitrila ou seus derivados (TAYLOR; MCKILLOP 1970). Na maioria dos casos, a síntese de pirimidina é baseada na combinação de reagentes com esqueletos contendo N-C-N com aqueles contendo C-C-C (GILCHRIST, 1992).

Uma reação feita a partir da condensação de guanidina e uréia com a malonitrila, catalisada por base de 4,6-diamino-pirimidina, mostrou que é possível obter pirimidina através da condensação de amidinas (BROWN, 1962). Ou uma série de novos 6-fenil-2,4-di-substituido-pirimidina-5-carbonitrilos, por aquecimento de benzaldeído, cianoacetato de etila e tioureia em etanol com carbonato de potássio. E, por fim, foram obtidos em reações sucessivas os derivados **5a-d**, **6**, **7a-d** e **8** (**Figura 1.2**) (AL-ABDULLAH et al., 2011).

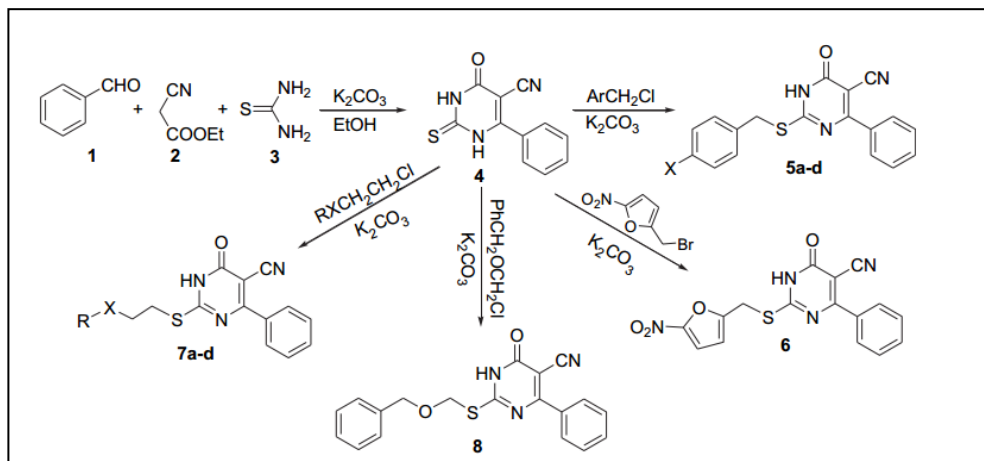


Figura 1.2 - Síntese de novos 6-fenil-2,4-di-substituido-pirimidina-5-carbonitrilos.
Fonte: Al-Abdullah et al. (2011).

Os autores Liu et al. (2015) descrevem a síntese de pirazol [3,4-*d*] pirimidinas em que, de início, utilizaram três reagentes para a síntese (**Figura 1.3**). No entanto quando o benazaleído (**Figura 1.3A**) foi substituído por anisaldeído (**Figura 1.3B**) obtiveram como produto o pirazol [3,4-*d*] piriminidina. A partir daí, os autores propuseram uma nova rota para a síntese de pirazol [3,4-*d*] piriminidina, obtida por reação de condensação de quatro componentes: fenil-hidrazinas, metilenomalonitrilas, aldeídos e álcoois.

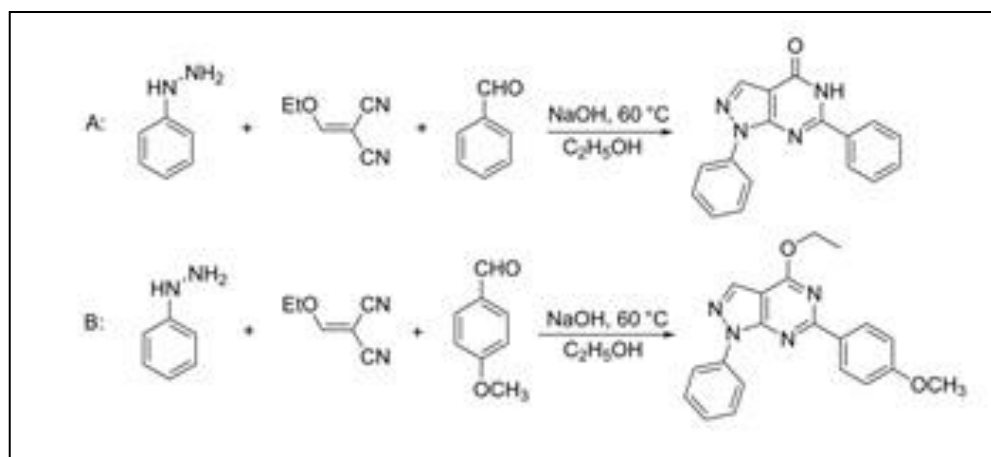


Figura 1.3 - Síntese de pirazol [3,4-d] pirimidina. Fonte: Liu et al. (2015).

1.3.3 Algumas atividades biológicas de compostos pirimidínicos

Compostos derivados de 4-amino-2,6-diaril-5-carbonitrila-pirimidínicos se mostraram ativos contra os processos de inflamação, quando testados em ratos swiss albinos, por administração intraperitoneal, e comparados aos resultados obtidos com o tratamento com o ácido acetilsalicílico (ASA) (FALCÃO et al., 2006). Além disso, esses compostos sintéticos também apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade em análise de relação quantitativa de estrutura e atividade (QSAR), após a administração intraperitoneal em ratos albinos (SILVA et al., 2008).

Derivados de pirimido-[2',1':2,3]-thiazol-[4,5-*b*]-quinoxalina, após terem sido testados em edema de pata de rato, demonstraram uma satisfatória ação anti-inflamatória quando comparado com o diclofenaco de sódio. Também foi comprovado efeito analgésico, feito através do teste de placa quente e ensaio de contorção induzida por ácido acético (ABU-HASHEM et al., 2010).

O composto sintetizado 5-(4-fluorofenil)-6-metil-4-metilpiperazina-1-il)-5,8-diidropirazol-[4',3':5,6]-pirano-[2,3-d]-[1,2,3]-triazina mostrou ação antibacteriana ligeiramente superior e mais potente que a norfloxacin (medicamento bactericida) quando testado *in vitro*. E nesse mesmo estudo outro composto o N-[4-(4-flúor-fenil)-3-metil-7-tioxo-1,4,7,8-tetraidropirazol-[4',3':5,6]-pirano-[2,3-d]-pirimidina-5-il]-tiourea apresentou uma ação antifúngica mais potente que o fluconazol, um medicamento da família dos triazólicos, utilizado no tratamento de diversas micoses, principalmente candidíase vaginal, entre outras (HAFEZ et al., 2015).

Com diferentes substituições na posição 3, novos derivados de pirido-[2,3-d]-[1,2,4]-triazol-[4,3-a]-5-pirimidinona apresentaram propriedade antitumoral frente ao teste realizado *in vitro* na linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano, quando comparados com a doxorrubicina, que é uma droga de referência no tratamento quimioterápico contra o crânio (EL-NASSAN, 2011).

Xie et al. (2011) relataram que uma série de 2,4,5-pirimidinas substituídas se mostraram inibidoras da polimerização da tubulina, e com atividade antiproliferativa contra células de carcinoma hepatocelular humano do fígado. Além disso, verificaram que um derivado dessa série se liga ao sítio de ligação da colchicina na tubulina. Essa substância retém a célula na fase G2 do ciclo celular.

1.3.4 Genotoxicidade e o fenômeno mutação

A genética toxicológica e a genotoxicidade tem seus estudos centrados em danos causados ao material gênico de determinados organismos. Estes estudos verificam anormalidades nos genes do DNA (mutação gênica) ou nos cromossomos que podem ser do tipo clastogênica (como quebras e geração de fragmentos acêntricos) ou aneugênica (erros na migração dos cromossomos na divisão celular, ou segregação anormal devido a disfunções no aparato mitótico), causadas ou induzidos por variadas substâncias (BRAGA; LOPES, 2015; FREITAS et al., 2015).

Quando determinado organismo é exposto a uma substância genotóxica, o seu DNA sofre lesões tanto estruturais como funcionais. Se esses danos não forem reparados e se estabelecerem nas linhagens germinais, tornam-se uma mutação (SILVA et al., 2003). Esta se caracteriza, portanto, como qualquer alteração súbita no material genético que não seja oriunda de uma recombinação. Indivíduos com células germinativas comprometidas por uma mutação poderão transmitir esse efeito para seus descendentes. No entanto, se as células afetadas forem as células somáticas, os efeitos se restringem apenas ao organismo acometido pelo dano (SNUSTAD; SIMONS, 2001; ROUSE; JACKSON, 2002).

Durante a replicação do DNA podem ocorrer erros de forma natural, por lesões ou elementos transponíveis, resultando assim em uma mutação espontânea (BROWN, 1999). Por outro lado, existem as mutações induzidas, que advém de um tratamento proposital ou exposição de um organismo a agentes causadores de mutação (SNUSTAD; SIMONS, 2001). Sendo assim, o reconhecimento do potencial genotóxico e/ou mutagênico de um fármaco ou de compostos presentes no meio ambiente é uma

informação essencial tanto para as agências regulatórias como para o desenvolvimento de novos fármacos, no que se refere aos riscos para o homem e o ambiente.

1.3.5 Testes de genotoxicidade

Segue abaixo uma breve descrição de dois importantes testes genotóxicos.

Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa, também conhecido como Eletroforese de Gel de Célula Única (SCGE - *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) foi primeiramente desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e em seguida modificado por Singh et al. (1988). A modificação na técnica foi de grande importância para o aperfeiçoamento do teste, pois permitiu detectar danos no DNA em condições experimentais alcalinas, com avaliação da presença de quebras de fita simples e locais alcalinos lábeis (TICE et al., 2000).

No decorrer da metodologia desse ensaio, as células são incorporadas a lâminas cobertas por agarose e em seguida submetidas a um processo de lise para a ruptura das membranas e dos constituintes celulares solúveis. O material genético assume o formato de uma célula, sendo denominado de “nucleóide”, o qual é formado devido o relaxamento do DNA e da retirada do envoltório nuclear (UMBUZEIRO; ROUBICEK 2006). Através de eletroforese o DNA migra quando submetido a uma corrente elétrica, formando uma cauda semelhante a um cometa. Isso pode ser visualizado em microscopia de fluorescência, seja com uso de *softwares* ou de forma visual.

O Ensaio Cometa é um teste bastante utilizado para detecção de danos genéticos induzidos por diferentes agentes genotóxicos e também reparo no DNA. Pode ser aplicado no biomonitoramento humano, monitoramento ecológico e como ferramenta de investigação de danos causados no DNA e reparo aos vários tipos celulares submetidos a agentes nocivos ao material genético (COLLINS et al., 2008).

A contagem e avaliação dos danos pode ser feita pelo Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%) (COLLINS et al., 2008), que mostram resultados muito semelhantes aos dos *softwares* (TICE et al., 2000). As lesões ao material genético são classificadas de zero a quatro (0 a 4), sendo quatro, o dano máximo, de acordo com o comprimento de migração da cauda com fragmentos de material genético e assim identificados os índices de dano (**Figura 1.4**).

O Ensaio Cometa pode ser utilizado para o estudo da qualidade ambiental com uso de células de peixes, excelentes organismos biomarcadores para monitoramento de água contaminada. Quando há metais pesados acima do permitido, as células do

sangue desses animais apresentam níveis de danos no DNA estatisticamente significativos em relação a grupos controle (MACEDA et al., 2015). Também Klingelfus et al. (2015) identificaram danos genéticos causados ao tecido renal de peixes, após contaminação trófica por sulfato de alumínio presentes na água.

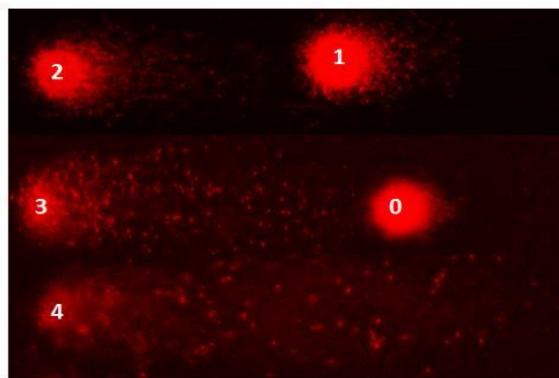


Figura 1.4 - Classificação visual baseada no comprimento da cauda e quantidade de DNA nos nucleóides. O dano 0 representa a ausência de dano ao DNA, danos 1-3 danos intermediários, e dano 4, o máximo. Imagens de nucleóides gerados a partir de leucócitos humanos, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente (SILVA, 2012).

A utilidade do Ensaio Cometa vai além de seu uso no controle biológico, e tem sido aplicado, por exemplo, no estudo de nanopartículas de prata. No estudo recente de Ávalos et al. (2015) o teste foi aplicado em quatro relevantes linhagens celulares humanas: hepatoma, leucemia, dérmica e fibroblastos pulmonares. Em todas as linhagens testadas, principalmente nos fibroblastos pulmonares, esses nanomateriais produziram danos ao DNA.

Relatos da literatura dos últimos anos mostram a aplicação do Ensaio Cometa em outros organismos como, por exemplo, em hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas a prodigiosina, um composto com aplicações farmacológica e antitumoral, que se mostrou como forte agente indutor de danos genéticos (LIMA, 2014). No estudo de dois compostos inorgânicos de chumbo (o cloreto de chumbo e nitrato de chumbo) capazes de aumentar significativamente os níveis de danos ao DNA, com um padrão de dose-resposta direta (CARMONA et al., 2011). E no estudo nanopartículas de dióxido de titânio, amplamente utilizadas em preparações de protetores solares, cosméticos e alimentos (CARMONA et al., 2015). Uma ampla

revisão das aplicações desta metodologia pode ser encontrada em Gaivão e Sierra (2014), pioneiros no estudo da metodologia com *D. melanogaster*.

Teste de mutação e recombinação somática (SMART)

O teste SMART, ou teste da asa, foi inicialmente descrito por Graf et al. (1984). É um teste realizado exclusivamente com *D. melanogaster* e tem a capacidade de mostrar a perda da heterozigose, que acontece devido a eventos genéticos que levam à homozigose ou hemizigose das células filhas (ANDRADE; LEHMANN, 2003). A metodologia SMART pode detectar danos genéticos, tais como mutação e recombinação (GRAF et al., 1984).

No SMART são identificadas alterações por perda da heterozigose em genes marcadores que originam fenótipos identificados nas asas de *D. melanogaster*. Para isso são utilizadas células somáticas e podem ser detectados vários eventos genéticos em uma só geração (F_1). O teste baseia-se no fato de que, durante o desenvolvimento embrionário inicial da larva de *D. melanogaster*, grupos de células (discos imaginais das asas) proliferam mitoticamente até que, durante a metamorfose, se diferenciam em estruturas das asas da mosca adulta. Se houver uma alteração genética em algumas destas células do disco imaginal, um clone de células mutantes vai ser formado e será detectado como uma mancha sobre as asas da mosca adulta mutante (GUZMÁN-RICÓN; GRAF, 1995). Essas manchas se caracterizam por alterações no formato dos pelos ou tricomas das asas, diferenciando os pelos normais dos alterados. Dois genes marcadores são responsáveis pela mudança da forma dos pelos, os fenótipos, que podem ser do tipo *multiple wing hairs* ou simplesmente *mwh*, e *flare* (*flr³*), que apresentam pelos em formato semelhante ao de “chama de vela” (Figura 1.5).

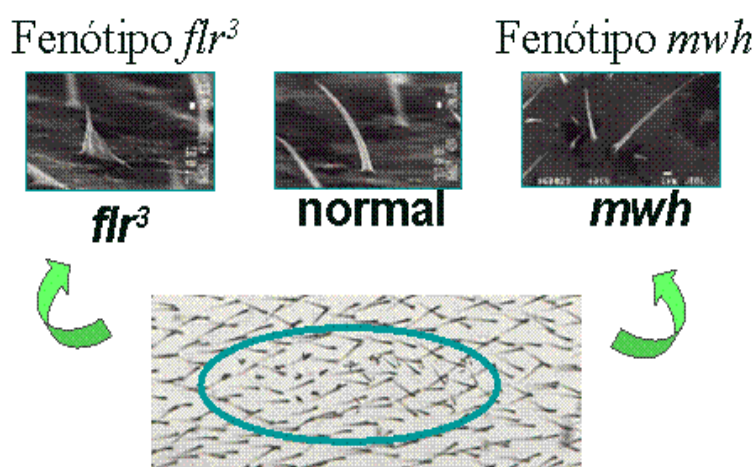


Figura 1.5 – Pelos avaliados para a análise SMART: *flr³*, normais e *mwh*. Fonte: Andrade e Lehmann (2003).

Esses dois marcadores fenotípicos específicos estão localizados no cromossomo 3 de duas diferentes linhagens de *D. melanogaster*, que têm as seguintes constituições genotípicas: linhagem *flr³* - *flr³/ln(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^s* e linhagem *mwh* – *mwh/mwh*.

A linhagem *flr³* apresenta o cromossomo balanceador TM3, que é indispensável para a manutenção do gene marcador em heterozigose, pois este é um gene letal zigótico (GARCIA-BELLIDO et al., 1976).

No teste SMART, indivíduos das linhagens *flr³* e *mwh* são submetidos a um cruzamento padrão (**Figura 1.6**), sendo as fêmeas virgens *flr³* e os machos *mwh*. As larvas descendentes deste cruzamento (as quais serão expostas às concentrações dos compostos de interesse) terão duas constituições genotípicas:

mwh +/+ flr³ (trans-heterozigotos para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³*) ou

mwh +/ TM3, Bd^s (heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3 *Bd^s*).

O marcador *Bd^s* confere às asas desses indivíduos um formato recortado, o que os torna diferentes em relação aos trans-heterozigotos, que apresentam asas com formato normal.

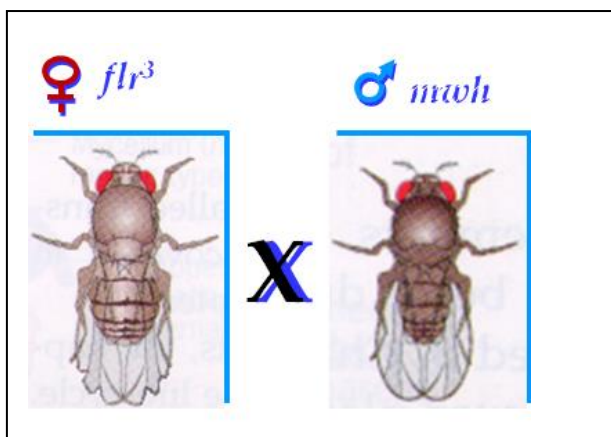


Figura 1.6 - Cruzamento padrão, entre *D. melanogaster* fêmea da linhagem *flr³* com macho *mwh*.

A ocorrência e a quantidade de marcadores avaliados nos descendentes pelo teste SMART vai depender da possível ação genotóxica do composto testado. Assim,

podem ser geradas **manchas simples** (pequenas ou grandes) (**Figura 1.7A e B**), que são aquelas que apresentam apenas um dos fenótipos (*flr³* ou *mwh*) e indicam a ocorrência de mutação pontual, alterações cromossômicas ou recombinação mitótica; ou **manchas gêmeas** (**Figura 1.7C**), que são aquelas que apresentam simultaneamente os dois fenótipos, e têm sua origem exclusivamente por recombinação, indicando uma ação recombinogênica do composto testado (GRAF et al., 1984).

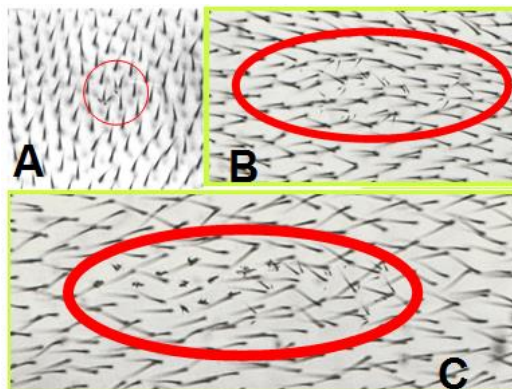


Figura 1.7 - Mancha simples pequena (A), mancha simples grande (B) e mancha gêmea (C) nas asas de adultos de *D. melanogaster*. Fonte: Andrade e Lehmann (2003).

Durante o período de exposição às concentrações dos compostos testados em larvas de *D. melanogaster*, as células dos discos imaginais passam por sucessivas divisões mitóticas, até atingirem o estágio de pupa. E, logo após esse período, eclodirão em drosófilas adultas machos e fêmeas, cujas asas serão destacadas e coladas sobre lâminas de vidro para a futura análise ao microscópio de luz, no aumento de 400x. Para a colagem é utilizada a solução de Faure, preparada com 30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de H₂O destilada, segundo a descrição original de Graf et al., (1984).

As bases genéticas para o teste SMART estão na observação dos fenótipos manifestados nas asas dos adultos trans-heterozigotos, onde, manchas simples e grandes foram originadas por mutações gênicas, cromossômica e/ou recombinação mitótica. Já as manchas gêmeas têm origem exclusivamente em recombinação simples entre *flr³* e o centrômero, com posterior segregação de um cromossomo recombinado e um parental. Nas asas dos adultos heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3,

células mutantes observadas nesses indivíduos são resultantes de mutação gênica e/ou cromossômica (GRAF et al., 1984).

A análise estatística dos resultados é feita pelo teste Binomial Condicional de Kastenbaum e Bowman (1970) ao nível de significância de 5%. E a distinção dos resultados avaliada do ponto de vista de duas hipóteses estatísticas é feita segundo o procedimento de decisão múltipla estabelecida por Frei e Würzler (1988), que apresenta quatro diagnósticos diferentes: positivo (+), fraco positivo (f+), negativo (-) e inconclusivo (i).

Com base nesses resultados a hipótese nula (H_0), poderá ser rejeitada ou não. No caso de aceitar a hipótese nula, significa dizer que não houve diferença significativa na frequência de mutações entre o grupo tratado e o controle negativo (frequência espontânea). Rejeitando a hipótese nula, é sinal que se aceita a hipótese alternativa (H_A), justificando que o tratamento resultou em mutações n vezes maior quando comparado com a frequência causada pelos compostos presentes no solvente das diluições. O resultado final será positivo (rejeita H_0) ou negativo (rejeita H_A) para a ação genotóxica do composto testado (FREI; WÜRGLER, 1988).

O SMART é um teste que possibilita avaliar possíveis efeitos genotóxicos de uma série de compostos de interesse à saúde humana, como por exemplo, a ação recombinogênica de dois medicamentos, como o Orlistate, utilizado para emagrecimento (ORSOLIN et al., 2012) e o Pantoprazol, utilizado como um dos principais inibidores da bomba de prótons no tratamento de uma variedade de doenças do trato gastrointestinal superior (LOPES et al., 2015). Também podem ser testados compostos de origem natural com atividade anticâncer, como o ácido betulínico isolado a partir da raiz de *Scoparia dulcis* (Scrophulariaceae), que apresentou um resultado negativo para a indução de mutação (DE FREITAS et al., 2014). Segundo Aciole et al. (2014) os larvicidas dilapiol e espinosade apresentaram ação genotóxica através do teste SMART, uma vez que demonstraram a capacidade de indução ao aumento de manchas mutantes com maior frequência quando comparados com o controle negativo. E ambos os compostos se mostraram tóxicos para *D. melanogaster*, com efeito dose-dependente.

Já em testes feitos com compostos inorgânicos como o cloreto de chumbo ($PbCl_2$) e nitrato de chumbo ($Pb(NO_3)$), em tratamentos combinados com radiação gama, não houve indução significativa na frequência de manchas mutantes, indicando que não houve interação dos compostos com o reparo do dano genético induzido por radiação ionizante (CARMONA et al., 2011). Outro resultado negativo para ação

mutagênica através do teste SMART foi sua aplicação em nanotubos de carbono (MACHADO et al., 2013).

O teste SMART também pode ser aplicado em uma série de fármacos para se avaliar a capacidade de indução a manchas mutantes em *D. melanogaster*. A análise tóxico-genética de uma combinação de antirretrovirais demonstrou um aumento significativo de manchas mutantes indicando um resultado positivo para ação mutagênica de antirretrovirais (GUIMARÃES et al., 2013). E também Cunha et al. (2002) demonstraram que dois medicamentos quimioterápicos análogos de desoxicidina apresentaram um efeito genotóxico significativo em células de *D. melanogaster*.

1.3.6 Organismo modelo *Drosophila melanogaster*

A família Drosophilidae (Insecta, Diptera) é composta por pelo menos 4.200 espécies, distribuídas em 78 gêneros (BÄCHLI, 2015), de duas subfamílias: Steganinae e Drosophilinae. Esses dípteros apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo em praticamente todo o planeta. Suas espécies são conhecidas popularmente como “mosca da banana” ou “mosca do vinagre”.

Drosophila melanogaster é um organismo eucarioto, diploide e apresenta em sua estrutura genética quatro cromossomos, sendo um par sexual e três pares autossômicos com um total aproximado de 14.000 genes. Devido a várias características e aplicações, entre elas o fato de ter sido o primeiro organismo complexo a ter seu genoma sequenciado (ADAMS et al., 2000), no final do século XX *Drosophila melanogaster* foi considerada o organismo modelo mais significativo na ciência. Fato que continua a ser confirmado a partir dos inúmeros artigos científicos publicados com este organismo, nas mais diferentes áreas do conhecimento (ROBERTS, 2006). Aproximadamente 75% dos genes relacionados a doenças em seres humanos possuem genes homólogos na mosca, incluindo-se aí os relacionados a distúrbios do sistema nervoso central, doenças inflamatórias, cardiovasculares, câncer, diabetes e genes necessários para a função visual, auditiva e do sistema imunitário (BIER, 2005; LLOYD; TAYLOR, 2010; PANDEY; NICHOLS, 2011).

Uma das vantagens em utilizar esse organismo é sua fácil manipulação em laboratório. Além disso, seu ciclo de vida é rápido. Em cerca de nove dias (**Figura 1.8**) se dá a transformação entre ovo e adulto. No período do ovo ocorre a embriogênese, com duração de em 24 horas, e nos três dias seguintes os estágios larvais (1º, 2º e 3º), quando as larvas mudam de cutícula e crescem. Ao final do terceiro estágio as larvas tendem a migrar para regiões mais secas e a cutícula fica mais rígida formando a pupa.

Essa nova fase de desenvolvimento dura em média cinco dias, tempo suficiente para que todos os tecidos sejam formados e os discos imaginais proliferem, permitindo que da pupa ocorra à eclosão do indivíduo adulto. Outra vantagem em utilizar a *Drosophila* como organismo modelo é poder reduzir o número de organismos experimentais nos ensaios toxicológicos, diferente do é feito para mamíferos, tais como camundongos (SIDDIQUE, 2005).

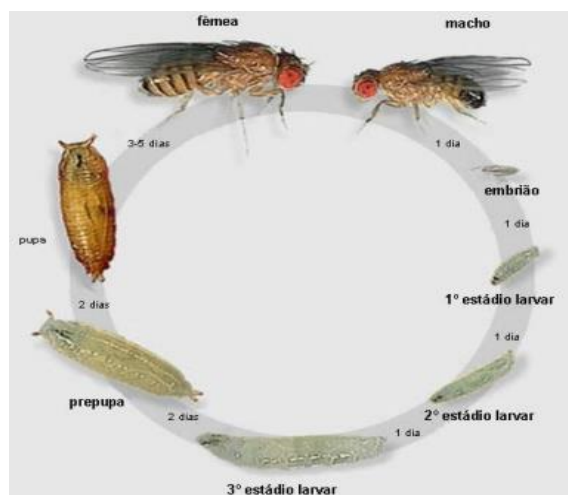


Figura 1.8 - Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Fonte: FLYMOVE, 2014.

CAPÍTULO 2



Trabalho a ser submetido para
Food and Chemical Toxicology
Fator de Impacto – 2,895
Qualis – B1 (Biodiversidade)



Ausência de efeito tóxico genético dos compostos 4-aminopirimidínicos em larvas de *Drosophila*

André S. Silva^{1,2,3}, Erima M. Amorim^{2,3}, Jessica C. Santos², Robson G. Santos², Icaro F.A. Castro², Tamiris A. Rocha³, Maria Aparecida C. Lira³, Claudia Rohde², Emerson P. S. Falcão^{3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão – PE, Brasil;

² Laboratório de Genética, CAV, UFPE;

³ Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, CAV, UFPE.

*Autor para correspondência: E-mail: emerson_falcao@yahoo.com.br, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil, Tel: +55-81-3523 3351 (fone/fax).

2.1 Resumo

Compostos derivados de núcleos pirimidínicos têm apresentado diversas propriedades biológicas de interesse farmacológico. Os compostos 4-Amino-2-(fenil)-6-*m*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5a**) e 4-Amino-2-(fenil)-6-(*p*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5b**) têm sido descritos na literatura como compostos com propriedades anti-inflamatórias e como possíveis novos fármacos. O teste SMART (teste de mutação e recombinação somática), baseia-se na identificação de fenótipos (*flr³* e/ou *mwh*) mutantes em *Drosophila melanogaster* que representam a ocorrência da

expressão fenotípica da mutação. E o ensaio cometa é um teste bastante sensível à detecção de danos genotóxicos ao DNA. As finalidades deste estudo foram: investigar o efeito mutagênico dos compostos, 4-Amino-2-(fenil)-6-(*m*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5a**) e 4-Amino-2-(fenil)-6-(*p*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5b**), análogos de base pirimidínica reconhecidos como substâncias anti-inflamatórias; e avaliar o possível efeito genotóxico desses compostos por meio do Ensaio Cometa em células somáticas de *D. melanogaster*. Durante a aplicação do teste SMART larvas de *D. melanogaster* resultantes do cruzamento padrão (fêmeas *flr*³ com machos *mwh*) foram submetidas a diferentes concentrações dos compostos **5a** e **5b**: 0,04, 0,09, 0,19, 0,39, 0,78, 1,56 e 3,12 mg/mL. Após o tratamento, as células das asas dos adultos foram analisadas por microscopia óptica a 400x. Os dados foram comparados com o grupo controle, tratado com solvente (90 % água destilada, 5% tween80 e 5% etanol) e o positivo (mitomicina 1 mg/mL). Para o ensaio cometa, Larvas da linhagem Oregon-R foram submetidas aos compostos nas concentrações de 0,39, 0,78, 1,56 e 3,12 mg/mL. Um grupo controle negativo, tratado apenas com o solvente, e um grupo controle positivo, exposto à ciclofosfamida (1mg/mL) também foram estabelecidos. A hemolinfa de 180 larvas foi coletada em cada tratamento, sendo sobrepostas em lâminas cobertas por agarose e submetidas à eletroforese. Os possíveis danos ao DNA foram classificados em cinco categorias, sendo 0 correspondente a nucleóides intactos, e de 1 a 4 os demais, em ordem crescente do dano apresentado. Os resultados da análise microscópica mostraram que os compostos não apresentaram ação mutagênica nem genotóxica, uma vez que não foram estatisticamente diferentes dos apresentados no controle negativo, sob as condições experimentais testadas. Este resultado apoia a ideia já apresentado na literatura que os compostos de 4-aminopirimidínicos têm baixa toxicidade, pois, duas curvas de sobrevivência mostraram que os compostos não têm a capacidade de induzir a morte de mais de 30% dos indivíduos testados.

Palavras-Chaves: Pirimidinas; genotoxicidade; SMART; ensaio cometa.

2.2 Abstract

Key Words:

2.3 Introdução

As pirimidinas se apresentam como aminas heterocíclicas aromáticas, isoeletrônicas ao benzeno, onde, dos seis átomos de carbono que constituem o anel benzênico dois são substituídos por nitrogênio nas posições 1 e 3 (Joule, 2000). Compostos derivados de núcleos pirimidínicos têm sido de grande importância para a farmacologia, uma vez que estudos recentes comprovam a presença de propriedades biológicas de interesse à saúde humana. Entre essas atividades a literatura mostra sintéticos com atividades como, antitumoral de compostos 2-aminopirimidinas frente a células tumorais (GOKHALE, 2015), atividade antiviral contra herpes simples tipo I (Mescic et al., 2013), antifúngica e antimicrobiana (HAFEZ, 2015) e um derivado sintético de oxazolo [5,4-d] pirimidina mostrou uma ação antiangiogênica significativa em testes *in vitro* e *ex vivo* (LIU, 2015). Sintéticos com núcleo pirimidico têm apresentado ação anticancerígena por inibirem a quinase dependente de ciclina (CDK) (EL-NASSAN, 2011).

Uma série de compostos 4-amino-pirimidínicos quando testados em camundongos demonstraram ação anti-inflamatória, sendo superior a atividade do ácido acetilsalicílico (FALCÃO et al, 2006). No entanto, é de suma importância a avaliação genotóxica de compostos dessa natureza. Este trabalho busca sintetizar os compostos, 4-Amino-2- (fenil) - 6-(*m*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5a**) e 4-Amino-2-(fenil)-6-(*p*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5b**) segundo metodologia descrita por Melo et al., (2002) e avaliar o potencial mutagênico e genotóxico desses sintéticos através do teste SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) em *Drosophila melanogaster*, ou teste da asa foi inicialmente descrito por Graf et al. (1984); e ensaio cometa em hemócitos de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R.

O teste SMART está baseado na identificação de perda da heterozigose em genes que expressam os fenótipos *flr*³ ou *mwh* nos pelos das asas das moscas adultas (ANDRADE; LEHMANN, 2003). No entanto a quantidade de ocorrências de pelos mutantes apresentados vai depender da ação mutagênica do composto testado. Podendo apresentar manchas simples (com a presença de apenas um dos fenótipos), ou gêmeas com os dois fenótipos se expressando simultaneamente (GRAF et al., 1984).

Uma grande variedade de compostos de interesse à saúde humana e ao meio ambiente pode ser facilmente testada através do SMART. Cunha et al. (2002),

avaliaram a capacidade genotóxica de dois análogos de desoxicitidina, e perceberam um efeito positivo em relação ao aumento significativos de manchas mutantes induzidas por medicamentos quimioterápicos dessa classe. E os larvicidas dilapiol e espinosade também apresentaram um resultado positivo para indução de ação genotóxica (ACIOLE et al, 2014).

O ensaio cometa é um teste bastante sensível à detecção de danos ao material genético deste organismo (Gaivão e Sierra, 2014), enquanto que *Drosophila* é um organismo recomendado como alternativa para redução do uso de pequenos mamíferos em estudos genotóxicos.

2.4 Material e Métodos

Síntese dos compostos

Para a síntese dos compostos 4-Amino-2-(fenil)-6-*m*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5a**) e 4-Amino-2-(fenil)-6-*p*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5b**) utilizou-se a metodologia de Melo et al., (2002), detalhada na **Figura 2.1**. As reações foram acompanhadas através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com placas de sílica gel Merck® f₂₅₄nm. O sistema de eluição utilizado foi *n*-hexano/acetato de etila, 8:2 (v:v). A visualização das bandas resultantes do processo ocorreu com o auxílio de luz UV, a 254/312 nm.

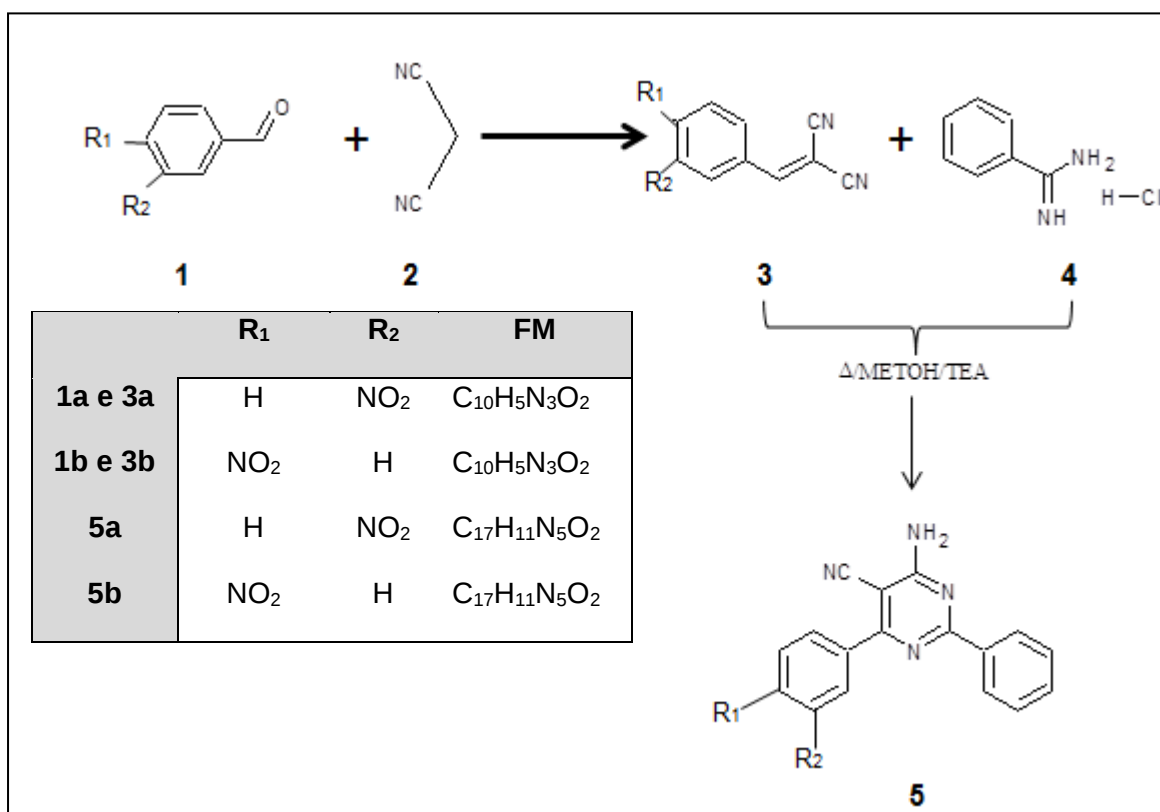


Figura 2.1 - Esquema de síntese dos compostos **5a**, **5b** e **5c**, FM = fórmula molecular. Quantidades equimolares de aldeídos aromáticos substituídos (**1**) reagem com malononitrila (**2**) à temperatura ambiente, originando as bisnitrilas (**3**) convenientemente substituídas. Em seguida, estas reagem com cloridrato de benzamidina substituída (**4**) na presença de metanol, à temperatura de refluxo e em presença de quantidades catalíticas de trietilamina, originando os compostos (**5**).

Teste de mutação e recombinação (SMART)

O teste SMART está baseado na identificação de alterações fenotípicas causadas por mutações cromossômicas ou recombinação mitótica expressas nos pelos das asas de indivíduos adultos de *Drosophila melanogaster*. Decorrentes de perda da heterozigosidade dos genes marcadores *flr³* e *mwh*. Para aplicação do teste, 80 fêmeas virgens adultas de *D. melanogaster* da linhagem flare-3 (*flr³*, 3-38. 8) e 40 machos adultos da linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0. 3), foram submetidos ao cruzamento padrão por 72 horas (ANDRADE E LEHMANN, 2003). Em seguida, esses indivíduos foram colocados em potes descartáveis, contendo uma base sólida de ágar (5%) e uma camada espessa de fermento biológico, onde as fêmeas depositaram seus ovos por um período de 8 horas. Após 72 horas eclodiram larvas em terceiro estágio que foram contadas (100 larvas) e transferidas para cada um dos tubos contendo 0,9 g de purê de batata instantâneo hidratado com 3 mL das concentrações (0,09, 0,04, 0,19, 0,39, 0,78, 1,56 e 3,125 mg/mL) de cada um dos compostos **5a** e **5b**. Também foi estabelecido um grupo controle negativo (90 % água destilada, 5% tween80 e 5% etanol), além de um controle positivo (mitomicina 1 mg/mL).

Após esse período as drosófilas adultas machos e fêmeas que eclodiram foram contabilizados para avaliação do possível efeito tóxico dos compostos testados e elaboração da curva de sobrevivência. Após a contagem os adultos os mesmos foram mantidos em álcool a 70% até a montagem das lâminas das asas. Estas lâminas foram montadas com 10 pares de asas, sendo cinco de fêmeas e cinco de macho, segundo descrição de Graf et al., (1984). Posteriormente as lâminas foram armazenadas por 24 horas para secagem e cobertas por lamínula com o auxílio da solução de Faure.

A análise microscópica para a verificação dos diferentes tipos de manchas (simples pequenas, simples grandes e manchas gêmeas) de pelos mutantes *mwh* e/ou *flr³*, foi realizada em microscópio óptico, sob aumento de 400X.

A análise estatística dos resultados foi feita pelo teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), com um nível de confiança a 5%. A significância dos resultados foi avaliada segundo o procedimento de decisão múltipla estabelecida por (Frei, 1988), que apresenta quatro diagnósticos diferentes: positivo (+), fraco positivo (f+), negativo (-) e inconclusivo (i).

Ensaio cometa

Fêmeas adultas de *D. melanogaster* da linhagem Oregon-R depositaram seus ovos em potes de vidro contendo uma base sólida de ágar e fermento biológico. Esse processo se deu durante 72 horas e logo após, as larvas em terceiro estágio que emergiram foram coletadas, lavadas e contabilizadas. Aproximadamente 60 larvas foram expostas por 24 horas em potes descartáveis contendo 0,9 g de purê de batata hidratado com os compostos **5a** e **5b**, nas concentrações, 0,39, 0,78, 1,56, e 3,12, mg/mL, dissolvidos em solução solvente (90% água destilada, 5% tween80 e 5% etanol). Outros dois grupos de indivíduos também foram estabelecidos: o grupo controle negativo, com larvas submetidas ao meio hidratado apenas com o solvente, e o grupo positivo, com larvas submetidas à ciclofosfamida 1mg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Ao final da exposição, a hemolinfa das larvas foi coletada com o auxílio de uma pinça de relojoeiro e submetida à centrifugação antes da sobreposição nas lâminas previamente lixadas e cobertas por agarose. Em seguida, o material foi colocado sobre a lâmina, coberto com uma lamínula e refrigerado de 10 a 15 minutos, para solidificar o gel. Após esse período as lamínulas foram removidas e as lâminas armazenadas em cubetas com solução de lise, sendo mantidas refrigeradas por 72 horas antes da etapa de eletroforese. Para a eletroforese foi utilizada uma solução tampão (1.200 mL de H₂O destilada gelada, 10 mL de EDTA e 64 mL de solução de NaOH) submetida a uma corrente de 40V e 300mA por 20 minutos. Após a eletroforese as lâminas permaneceram imersas em solução de neutralização por 15 minutos e, posteriormente, em etanol absoluto por 5 minutos, sendo secas ao ar.

Momentos antes da análise microscópica, as lâminas foram coradas com GelRed™ (diluído 1:500) e observadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com filtro de excitação de 515-560 nm, e em aumento de 400X. Para cada concentração 300 nucleóides foram contabilizados, sendo, 100 de cada réplica.

Para a quantificação da genotoxicidade, os cometas foram classificados em cinco categorias, de acordo com o tamanho da cauda e intensidade do núcleo, segundo

Collins (2008). Os danos considerados 0 (zero) se referem aos nucleóides intactos (cabeça integra e sem cauda); os danos de 1 a 3 nucleóides com danos crescentes e intermediários; e o dano 4 os nucleóide com o máximo de desintegração da cabeça e longa cauda. Com estas informações, dois parâmetros foram calculados: o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%), calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{ID total} = 0 (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe } 0) + 1 (\text{n}^\circ \text{ classe } 1) + 2 (\text{n}^\circ \text{ classe } 2) + 3 (\text{n}^\circ \text{ classe } 3) + 4 (\text{n}^\circ \text{ classe } 4)$$

$$\text{Frequência de Dano} = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ classe } 0) \cdot 100]}{\text{n}^\circ \text{ total}}$$

A análise estatística dos resultados foi feita através do teste não paramétrico de Análise da Variância (ANOVA), seguido do teste Bonferroni para comparações par a par, a um nível de significância de $p \leq 0,05$, utilizamos o *software STATA* na versão 12.0.

3.5 Resultados

Compostos obtidos

A obtenção dos compostos (**5a-b**) foi confirmada através de comparação de seus fator de retenção (Rf) e Pontos de fusão (Pf) com os dados da literatura (Falcão et al. 2006).

Composto 4-Amino-2-(fenil)-6-(m-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (5a)

O composto **5a** (**Figura 2.2**) foi obtido com rendimento de 36%, na forma de cristais amarelos após refluxo em metanol, e seu Rf foi calculado ao final de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em sistema de eluição: *n*-hexano/acetato de etila, 8:2 (v:v). O valor calculado foi Rf=0,36, visualizado em luz UV de 254nm; PM=317; e fórmula geral de C₁₇H₁₁N₅O₂. A obtenção do composto foi confirmada através de comparação de seu Rf e Pf com os dados de Falcão et al. (2006).

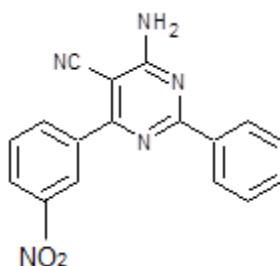


Figura 2.2 - Composto **5a**.

Composto 4-Amino-2- (fenil)-6-(p-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (5b)

O composto **5b** (**Figura 2.3**) foi obtido com rendimento de 31,38%, na forma de cristais amarelos após refluxo em metanol. Seu R_f foi calculado ao final de CCD, em sistema de eluição: *n*-hexano/acetato de etila, 8:2 (v:v). O valor obtido foi $R_f=0.39$, visualizado em luz UV de 254 nm; PM=317; e fórmula geral de $C_{17}H_{11}N_5O_2$.

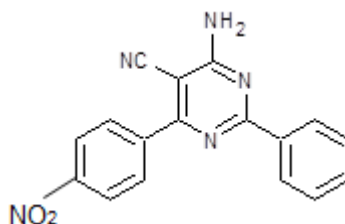


Figura 2.3 - Composto **5b**.

Efeito tóxico

Duas curvas de sobrevivência foram estabelecidas para cada um dos compostos administrados. Duas concentrações se mostraram tóxicas não foram consideradas para a montagem das asas (e apenas as quatro mais concentradas daquelas não tóxicas foram analisadas. Desta forma tanto o resultado do tratamento com o composto **5a** apresentado na **figura 2.4A**, quanto o do composto **5b** (**Figura 2.4B**), mostram que, em todas as concentrações testadas os compostos não apresentaram toxicidade para *Drosophila*. Levando em consideração a DL_{70} fica evidente que o composto testado não teve a capacidade de causar a morte de mais de 30% dos drosofilídeos nas condições testadas.

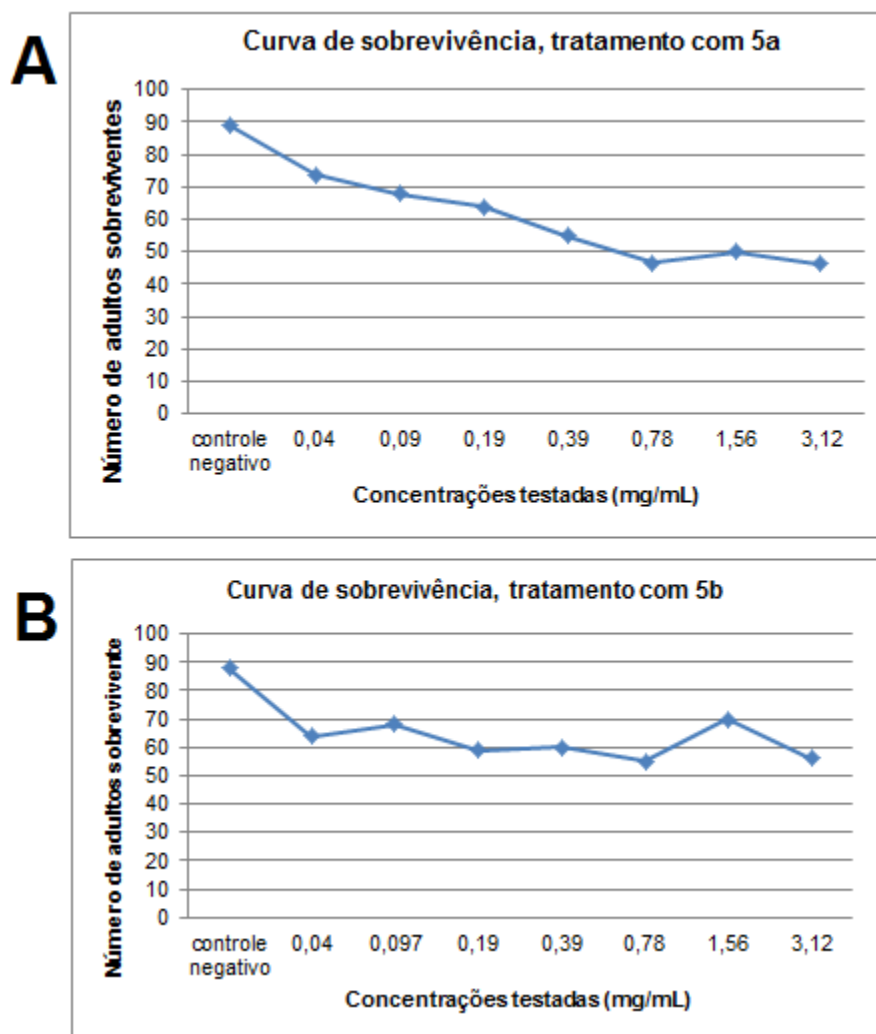


Figura 2.4 - Curvas de sobrevivência de indivíduos adultos de *D. melanogaster*, resultantes da metamorfose de larvas expostas a diferentes concentrações dos compostos pirimidínicos **5a** e **5b**.

Avaliação mutagênica

Os resultados da avaliação mutagênica através do teste SMART estão apresentados na **Tabela 2.1**. Onde se pode observar que todas as concentrações testadas quando, comparadas com o controle negativo se mostraram com um resultado negativo, em relação possível ação genotóxica dos compostos testados.

Tabela 2.1 Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste binomial condicional (Kastenbaum e Bowman, 1970).

Concentrações (mg/mL) do genótipo <i>mwh/flr³</i>	N	Frequência de manchas por indivíduo (nº de manchas)				Total de manchas
		MSP	MSG	MG	TM	

		(1-2célis) ^b <i>m</i> =2	D	(>2célis) ^b <i>m</i> =5	D	<i>m</i> =5	D	<i>m</i> =2	D	<i>mwh</i> ^c (<i>n</i>)
5a										
Cont. Negativo	20	0,40 (08)		0,25 (05)		0,05 (01)		0,70 (14)		13
Cont. Positivo	25	12,36 (309)	+	16,72 (418)	+	3,24 (81)	+	32,32 (808)	+	727
0,39	20	0,45 (09)	i	0,05 (01)	-	0,00 (00)	i	0,50 (10)	-	10
0,78	20	0,55 (11)	i	0,00 (00)	-	0,00 (00)	i	0,55 (11)	-	11
1,56	20	0,50 (10)	i	0,00 (00)	-	0,10 (02)	i	0,60 (12)	-	10
3,12	20	0,45 (09)	i	0,20 (04)	i	0,00 (00)	i	0,65 (13)	-	13
5b										
Cont. Negativo	20	0,40 (08)		0,25 (05)		0,05 (01)		0,70 (14)		13
Cont. Positivo	25	12,36 (309)	+	16,72 (418)	+	3,24 (81)	+	32,32 (808)	+	727
0,39	20	0,65 (13)	i	0,05 (01)	-	0,00 (00)	i	0,70 (14)	-	14
0,78	20	0,55 (11)	-	0,05 (01)	-	0,00 (00)	i	0,60 (12)	-	12
1,56	20	0,30 (06)	-	0,05 (01)	-	0,10 (02)	i	0,45 (09)	-	7
3,12	20	0,30 (06)	-	0,00 (00)	-	0,00 (00)	i	0,30 (06)	-	6

D=Diagnóstico estatístico de acordo com Frei & Würigler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo. MSP = manchas simples pequenas; MSG = manchas simples grandes; MG = manchas gêmeas; TM = total de manchas; *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $p < 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr3*raras. ^cTotal de manchas, considerando clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para manchas gêmeas. N=total de indivíduos analisados.

Genotoxicidade

Os resultados da contagem dos danos (0 a 4) e os valores calculados de ID e FD por cada réplica (e suas respectivas médias) do controle negativo e positivo dos tratamentos com os compostos pirimidínicos **5a** e **5b**, estão apresentados na **Tabela 2.2**. Comparando as médias obtidas das três réplicas de cada tratamento com a média obtida no controle negativo percebe-se que os valores foram superiores em todas as concentrações testadas, tanto para ID quanto para FD%. Entretanto, os resultados da análise estatística indicam que estas diferenças não foram significativas, com exceção de três comparações de ID, feitas com o composto **5b**, conforme destacado na **Tabela 2.3**.

A análise geral dos resultados apresentados indica que os compostos testados não foram genotóxicos sob as condições experimentais aplicadas.

Tabela 2.2 - Avaliação de índice e frequência de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* submetidas aos controles negativo e positivo a diferentes concentrações dos compostos pirimidínicos **5a** e **5b**.

Composto/ Concentração (mg/mL)	Nível de dano genético					ID	FD %
	0	1	2	3	4		
Controle positivo	18	21	29	12	20	195	82
Controle positivo	17	21	16	26	20	211	83
Controle positivo	17	21	29	15	18	196	83
Média	17,8	21,0	24,7	17,7	19,3	200,7	82,7
Controle negativo	84	12	4	0	0	20	16
Controle negativo	63	26	10	1	0	49	37
Controle negativo	76	17	6	1	0	32	24
Média	74,3	18,3	6,7	0,7	0	33,7	25,7
5a							
0,39	60	40	0	0	0	40	40
0,39	72	28	0	0	0	28	28
0,39	65	34	1	0	0	36	35
Média	65,7	34,0	0,3	0	0	34,7	34,3
0,78	63	34	3	0	0	40	37
0,78	45	42	9	4	0	72	55
0,78	81	18	1	0	0	20	19
Média	63,0	31,3	4,3	1,3	0	44,0	37,0
1,56	12	58	26	4	0	122	88
1,56	67	31	2	0	0	35	33
1,56	42	50	8	0	0	66	58
Média	40,3	46,3	12	1,33	0	74,3	59,7
3,12	84	6	9	1	0	27	16
3,12	62	30	6	2	0	48	38
3,12	28	46	24	2	0	100	72
Média	58,0	27,3	13,0	1,7	0	58,3	42,0
5b							
0,39	79	20	1	0	0	22	21
0,39	79	19	1	0	0	23	21
0,39	23	57	19	1	0	98	77
Média	60,3	32	7,33	0,3	0	47,7	39,7
0,78	65	19	15	1	0	52	35
0,78	71	22	7	0	0	36	29
0,78	44	39	17	0	0	73	56
Média	60,0	26,7	13,0	0,3	0	53,7	40,0
1,56	31	32	36	1	0	107	69
1,56	57	23	20	0	0	63	43
1,56	70	16	12	2	0	46	30
Média	52,7	23,7	22,7	1	0	72,0	47,3
3,12	83	12	5	0	0	22	17
3,12	50	42	8	0	0	58	50
3,12	38	49	13	0	0	75	62
Média	57	34,3	8,6	0	0	51,7	43,0

Tabela 2.3. Análise estatística das médias de Índice de Dano (ID) e de Frequência de Dano (FD%), comparadas par a par, entre o grupo controle negativo e concentrações dos compostos **5a** e **5b** estudadas.

Composto 4-Amino-2-(fenil)-6-(<i>m</i> -nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (5a)				
Comparação do ID entre os grupos (teste Bonferroni)				
Concentrações em mg/mL	Controle negativo	0,39	0,78	1,56
0,39	1,000			
0,78	1,000	1,000		
1,56	1,000	1,000	1,000	
3,12	1,000	1,000	1,000	1,000
Comparação do FD% entre os grupos (teste Bonferroni)				
Concentrações em mg/mL	Controle negativo	0,39	0,78	1,56
0,39	1,000			
0,78	1,000	1,000		
1,56	0,655	1,000	1,000	
3,12	1,000	1,000	1,000	1,000
Composto 4-Amino-2-(fenil)-6-(<i>p</i> -nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (5b)				
Comparação do ID entre os grupos (teste Bonferroni)				
Concentrações em mg/mL	Controle negativo	0,39	0,78	1,56
0,39	0,045*			
0,78	0,069	1,000		
1,56	0,260	1,000	1,000	
3,12	1,000	0,013*	0,020*	0,071
Comparação do FD% entre os grupos (teste Bonferroni)				
Concentrações em mg/mL	Controle negativo	0,39	0,78	1,56
0,39	0,059			
0,78	0,061	1,000		
1,56	0,127	1,000	1,000	
3,12	0,083	1,000	1,000	1,000

* Estatisticamente significativo $p \leq 0.05$.

3.6 Discussão

Este trabalho investigou a possível ação mutagênica dos compostos 4-Amino-2-(fenil)-6-(*m*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5a**) e 4-Amino-2-(fenil)-6-(*p*-nitrofenil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5b**) através do teste SMART. Os resultados mostraram que os compostos não têm ação mutagênica sobre os indivíduos de *D. melanogaster* nas condições testadas.

Conforme resultados obtidos quanto a ação tóxica dos compostos nos drosofilídeos testados, pode-se perceber que em todas as concentrações testadas ambos os compostos demonstraram não apresentarem efeito tóxico. Falcão (2003) demonstrou que o composto 5b quando testada sua toxidez aguda não apresentou letalidade em camundongos até a dose de 1000mg/Kg. E ainda segundo Falcão et al., (2006) compostos derivados de núcleos pirimidínicos testados frente a linhagens de células Hep-2 não apresentaram atividade citotóxica. Os dados obtidos nesse trabalho

mostram que mesmo em organismos diferentes os compostos **5a** e **5b** se mostraram como agentes não citotóxicos, uma vez que mais de 70% dos drosophilídeos testados com os sintéticos conseguiram sobreviver como mostrado na **Figura 4**.

Derivados pirimidínicos de 7-*aril*-2,3-diidro-*tiazolo*[3,2-*a*]pirimidin-5-ona-6-carbonitrila, não apresentaram efeitos tóxicos quando testados em camundongos na dose de 2000 mg/Kg e uma baixa toxicidade frente a células Hep-2 segundo, VITAL et al., (2009).

Em relação ao possível efeito mutagênico, os resultados para indução de manchas mutantes não foi significativo, indicando que tanto o **5a** quanto o **5b** não têm ação mutagênica nas condições testadas. Nosso grupo já avaliou anteriormente dois outros compostos da mesma natureza os análogos de base P7 {4-amino-2-(*fenil*)-6-(*p*-fluorofenil)-pirimidina-5-carbonitrila} e P14 {4-amino-2-(*p*-anisil)-6-(*p*-anisil)-pirimidina-5-carbonitrila} sintetizados por FALCÃO et al., (2006), e os dados se assemelham com os obtidos neste trabalho, uma vez que também se mostraram não significativos para a indução de mutação em *D. melanogaster* (SILVA, 2013).

O Ensaio Cometa é bastante utilizado para detecção de quebras nas cadeias simples e dupla do DNA, através do índice de dano (ID) e frequência de dano (FD). Uma metodologia simples e rápida nesse sentido possui uma vasta aplicação. Plantas medicinais conhecidas como eficazes no tratamento de neoplasias, a exemplo *Xanthium spinosum*, se mostrou não ter a capacidade de induzir danos ao material genético (GÜEZ et al., 2012). A literatura relata uma série de trabalhos que desenvolveram a metodologia ensaio cometa com o organismo *D. melanogaster*. Com algumas modificações foi possível isolar células desse indivíduo para uma adequação ao teste. Isso gerou mais conhecimento científico, quando se avaliou a ação da exposição de drosophilídeos a compostos de chumbo inorgânico (CARMONA et al., 2011), a quimioterápicos como a ciclofosfamida e cisplatina e antineoplásicos a exemplo a bleomicina (SHARMA et al., 2011).

Os resultados obtidos com este trabalho trazem uma maior segurança na utilização dos compostos derivados de núcleos pirimidínicos, uma vez que nas condições testadas não houve diferença significativa entre o grupo controle negativo e o grupo tratado com as concentrações utilizadas.

Financiamento

Este trabalho teve o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio de infraestrutura cedido pelo Centro Acadêmico de Vitória e o suporte financeiro e bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor fornecidos pela Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco - FACEPE.

2.7 Referências bibliográficas

- ACIOLE, Eliezer H. Pires et al. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pest management science**, v. 70, n. 4, p. 559-565, 2014.
- ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test. IN: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagenese Ambiental**, Canoas: ULBRA, p. 281-307, 2003.
- CARMONA, E.R.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1, p. 35-40, 2011.
- CUNHA, Kênya Silva et al. Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolite chemotherapeutic drugs in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 514, n. 1, p. 95-103, 2002.
- EL-NASSAN, H. B. Synthesis and antitumor activity of novel pyrido-[2,3-d]-[1,2,4]-triazolo[4,3-a]-pyrimidin-5-one derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2031-2036, 2011.
- FALCÃO, E. P. S.; MELO, S. J.; SRIVASTAVA, R. M.; CATANHO, M. T. J. A.; NASCIMENTO, S. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3-and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. **Eur. J. of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 276-282, 2006.
- FALCÃO, E. P. S. Novas pirimidinas: síntese e avaliação de suas propriedades farmacológicas. **Tese de Doutorado**. 2003.
- FREI, H.; WÜRLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive results. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.

- GAIVÃO, I.; SIERRA, L.M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 304, p. 1-8, 2014.
- GOKHALE, Nikhila; DALIMBA, Udayakumar; KUMSI, Manjunatha. Facile synthesis of indole-pyrimidine hybrids and evaluation of their anticancer and antimicrobial activity. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2015.
- GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, p. 59-67, 1984.
- GÜEZ, Camila Martins et al. In vivo and in vitro genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 461-467, 2012.
- HAFEZ, Hend N.; ALSHAMMARI, Abdulrahman G.; EL-GAZZAR, Abdel-Rhman. Facile heterocyclic synthesis and antimicrobial activity of polysubstituted and condensed pyrazolopyranopyrimidine and pyrazolopyranotriazine derivatives. **Acta pharmaceutica**, v. 65, n. 4, p. 399-412, 2015.
- JOULE, J. A.; MILLS, K. – Heterocyclic Chemistry. 4th ed. Blackwell Publishing, 2000.
- KASTENBAUM, M.A.; BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, p. 527–549, 1970.
- LIU, J. et al. CPU-12, a novel synthesized oxazolo [5, 4-d] pyrimidine derivative, showed superior anti-angiogenic activity. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 1, p. 9-17, 2015.
- MELO, S. J.; SANTOS A, L. C. D.; FALCÃO, E. P. D. S.; SRIVASTAVA, R. M.; e LUUDUC, C. Synthesis of new 4-amino-2, 6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles. **Journal of Chemical Research**, v. 2002, n. 5, p. 216-217, 2002.
- MESCIC, A.; BETZEL, T.; MÜLLER, A.; SLAVIK, R.; CERMAK, S.; RAIC-MALIC, S.; AMETAMEY, S.M. Synthesis and Biological Evaluation of a New Acyclic Pyrimidine Derivative as a Probe for Imaging Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase Gene Expression. **Molecules**, v. 18, p. 8535-8549, 2013.
- SHARMA, Anurag et al. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 721, n. 2, p. 142-146, 2011.
- SILVA, A.S. Avaliação da atividade mutagênica e recombinogênica de compostos pirimidínicos com propriedades anti-inflamatórias em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Trabalho de Conclusão de Curso**. 2013.

- SILVA, E. J. Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar. **Dissertação de Mestrado (Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco**, p.53, 2012.
- VITAL, Fernando A. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e das atividades citotóxica, antimicrobiana e antiinflamatória de 7-amil-2, 3-diidrotiazolo [3, 2- α] pirimidin-5-on-6-carbonitrila. **Lat Am J Pharm**, v. 28, p. 507-512, 2009.

CAPÍTULO 3

SHORT PAPER

Avaliação tóxica genética de composto derivado de 4-aminopirimidínicos em larvas de *Drosophila melanogaster*

André S. Silva^{1,2,3}, Erima M. Amorim^{2,3}, Robson G. Santos², Icaro F.A. Castro², Maria Aparecida C. Lira³, Claudia Rohde², Emerson P. S. Falcão^{3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão – PE, Brasil;

² Laboratório de Genética, CAV, UFPE;

³ Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, CAV, UFPE.

*Autor para correspondência: E-mail: emerson_falcao@yahoo.com.br, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil, Tel: +55-81-3523 3351 (fone/fax).

Palavras-Chaves: Novos fármacos; genotoxicidade; ensaio cometa

Compostos derivados de núcleos pirimidínicos têm apresentado diversas propriedades biológicas de interesse farmacológico. O composto 4-Amino-2-(fenil)-6-(*p*-anisil)-5-carbonitrila-pirimidina (**5c**) é descrito na literatura como composto com propriedades anti-inflamatórias (Falcão et al., 2003) e como possível novo fármaco. O objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito genotóxico desse composto por meio

do Ensaio Cometa em células somáticas de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R.

O composto **5c** foi sintetizado segundo metodologia descrita por Melo et al., 2002 e mostrados na **figura 1**. A metodologia do ensaio cometa é bastante aceita no meio científico por permitir reconhecer quebras simples ou duplas no DNA após a exposição de indivíduos a compostos de interesse (COLLINS et al, 2008).

Larvas em terceiro instar de *D. melanogaster* foram submetidas ao **5c** nas concentrações de 0,39, 0,78, 1,56 e 3,12 mg/mL. Um grupo controle negativo, tratado apenas com o solvente (água destilada, tween80 e etanol), e um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 1mg/mL) também foram estabelecidos. Foram coletados os hemócitos de 180 larvas em cada tratamento e em seguida o material biológico foi sobreposto em lâminas cobertas por agarose e submetidas à eletroforese por 20 minutos. Para a análise microscópica os danos ao DNA foram classificados em cinco categorias, sendo 0 correspondente a nucleóides intactos, e de 1 a 4 os demais, em ordem crescente do dano apresentado (COLINNS et al, 2008). A partir dos danos encontrados se calculou a frequência de danos (FD%) e o índice de danos (ID) segundo TICE et al., 2000. Os resultados presentes na **tabela 1** mostram que nas condições experimentais testadas não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e o grupo de controle negativo, o que significa que o composto não é genotóxico para os drosofilídeos testados.

Tabela 1. Análise estatística das médias de Índice de Dano (ID) e de Frequência de Dano (FD%), comparadas par a par, entre o grupo controle negativo e concentrações do composto **5c** estudadas.

Composto 4-Amino-2-(fenil)-6-(<i>p</i> -anisil)-5-carbonitrila-pirimidina (5c)				
Comparação do ID entre os grupos (teste Bonferroni)				
Concentrações em mg/mL	Controle negativo	0,39	0,78	1,56
0,39	0,678			
0,78	0,575	1,000		
1,56	0,074	1,000	1,000	
3,12	0,153	1,000	1,000	1,000
Comparação do FD% entre os grupos (teste Bonferroni)				
Concentrações em mg/mL	Controle negativo	0,39	0,78	1,56
0,39	0,186			
0,78	0,057	1,000		
1,56	0,055	1,000	1,000	
3,12	0,039	1,000	1,000	1,000

* Estatisticamente significativo $p \leq 0.05$).

Referências

- COLLINS A.R., et al. The Comet Assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-151, 2008.
- FALCÃO, E.P.S. **Novas pirimidinas: síntese e avaliação de suas propriedades farmacológicas**. Tese (Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco 2003.
- MELO, S. J.; SANTOS A, L. C. D.; FALCÃO, E. P. D. S.; SRIVASTAVA, R. M.; e LUUDUC, C. Synthesis of new 4-amino-2, 6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles. **Journal of Chemical Research**, v. 2002, n. 5, p. 216-217, 2002.
- TICE, R. R. et al. Single cell gel / comet assay : guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Os compostos pirimidínicos **5a** e **5b**, nas condições experimentais testadas pelo teste SMART em *Drosophila melanogaster*, apresentaram uma baixa toxicidade uma vez que não foram capazes de causar a morte de mais de 30% dos indivíduos submetidos ao tratamento. Em todas as concentrações testadas com ambos os sintéticos, foi observado que mais de 70% das larvas de drosofilídeos expostos conseguiram eclodir em moscas adultas, reforçando dados da literatura de que os compostos não apresentam toxicidade elevada. Em um estudo realizado por Falcão et al., (2006) derivados pirimidínicos de mesma natureza apresentaram uma baixa toxicidade em camundongos e não foi observada ação citotóxica frente a células Hep-2.

E em relação à mutagenicidade o teste SMART mostrou que os compostos 5a e 5b não são mutagênicos para *D. melanogaster*, pois, os resultados obtidos nos tratamentos mostraram que não houve diferença significativa quando comparados o controle negativo. Nosso grupo também já avaliou a mutagenicidade outros compostos dessa natureza com o teste SMART, os análogos de base, P7 {4-amino-2-(fenil)-6-(p-fluorofenil)-pirimidina-5-carbonitrila} e P14 {4-amino-2-(p-anisil)-6-(p-anisil)-pirimidina-

5-carbonitrila} sintetizados por FALCÃO et al., (2006), e os mesmos também apresentaram resultado negativo para agentes indutores de mutação em *Drosophila melanogaster* (SILVA, 2013).

Para o ensaio cometa, os compostos **5a**, **5b** e **5c**, foram testados em larvas de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R e se apresentaram nas concentrações, 0,39, 0,78, 1,56 e 3,12 mg/mL, como agentes não genotóxicos uma vez que não se mostraram capazes de causar danos ao material genético dos drosofilídeos testados. Esses dados reforçam os encontrados por Morais (2014) onde, compostos derivados de núcleos pirimidínicos foram submetidos ao teste de micronúcleo *in vitro* para verificar a mutagenicidade dos compostos com células das linhagens HeLa e HepG2, e os resultados mostraram que não houve ação genotóxica dos sintéticos.

REFERÊNCIAS

- ABU-HASHEM, A. A.; GOUDA, M. A.; BADRIA, F. A. Synthesis of some new pyrimido-[2',1':2,3]-thiazolo-[4,5-*b*]-quinoxaline derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1976-1981, 2010.
- ACIOLE, E.H.P. et al. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 4, p. 559-565, 2014.
- ADAMS, M.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, p. 2185-2195, 2000.
- AL-ABDULLAH, EBTEHAL S. et al. Synthesis of novel 6-phenyl-2, 4-disubstituted pyrimidine-5-carbonitriles as potential antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4642-4647, 2011.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed. Porto Alegre: ArtMed, 1054 p., 2010.

- ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test. In : RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: ULBRA, p. 281-307, 2003.
- ÁVALOS, A.; HAZA, A. I.; MORALES, P. Manufactured silver nanoparticles of different sizes induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in hepatoma and leukemia cells and in dermal and pulmonary fibroblasts. **Folia Biologica**, v. 61, p. 33-42, 2015.
- BACHLI, G. 2015. Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae. Disponível em <<http://www.taxodros.unizh.ch/>>. Acesso em: dezembro de 2015.
- BASAVARAJA, H.S.; JAYADEVAIAH, K.V.; HUSSAIN, M.M.; VIJAY, K.M.M.J.; PADMASHALI, B. Synthesis of novel piperazine and morpholine linked substituted pyrimidine derivatives as antimicrobial agents. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 1, p. 5-12, 2010.
- BATISTA, C.R.; CAMPOS, E.O. Avaliação de genotoxicidade em células de pacientes fumantes e não fumantes por meio do teste do micronúcleo. **Revista GeTeC**, v. 3, n. 6, 2015.
- BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 9–23, 2005.
- BOOYSEN, I; GERBER, T.I.A.; MAYER, P. Oxidation of 5,6-Diamino-1,3-dimethyl-2,4-dioxypyrimidine by Perrhenate: the crystal structure of 1, 3, 6, 8-Tetramethylpyrimidopteridine-2, 4, 5, 7-tetrone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 1, p. 199-202, 2008.
- BRAGA, J.R.M.; LOPES, D.M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 1, p. 130-140, 2015.
- BROWN, T.A. Alteração do material genético. IN: **Genética: Um enfoque molecular**. 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, p. 135-151, 1999.
- BROWN, D.J.; MASON, S.F. **The Pyrimidines**. Interscience Publishers, New York, pp 31–115, 1962.
- CARMONA, E.R.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1, p. 35-40, 2011.
- CARMONA, E.R.; ESCOBAR, B.; VALES, G.; MARCOS, R. Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the comet assay

- in *Drosophila*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 778, p. 12–21, 2015.
- COLLINS A.R., et al. The Comet Assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-151, 2008.
- CUNHA, K.S. et al. Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolite chemotherapeutic drugs in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 514, n. 1, p. 95-103, 2002.
- DE FREITAS, P.L. et al. Antimutagenic action of the triterpene betulinic acid isolated from *Scoparia dulcis* (Scrophulariaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9745-9752, 2014.
- EL-NASSAN, H.B. Synthesis and antitumor activity of novel pyrido-[2,3-d]-[1,2,4]-triazolo[4,3-a]-pyrimidin-5-one derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2031-2036, 2011.
- FALCÃO, E.P.S. **Novas pirimidinas: síntese e avaliação de suas propriedades farmacológicas**. Tese (Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco 2003.
- FALCÃO, E.P.S.; MELO, S.J.; SRIVASTAVA, R.M.; CATANHO, M.T.J.A.; NASCIMENTO, S. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3-and4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 276-282, 2006.
- FLYMOVE 2014. Disponível em <<http://www.open.ac.uk / personal pages / r. d. saunders / WhyFlies.html>>. Acesso em: 17 maio 2014.
- FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive results. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.
- FREITAS, J.V. et al. Prospecção fitoquímica e avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, 2015.
- GAIVÃO, I.; SIERRA, L.M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 304, p. 1-8, 2014.
- GARCIA-BELLIDO, A., RIPOLL, P., MORATA, G. Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. **Developmental Biology**, v. 48, p.132-147, 1976.

- GILCHRIST, T. L. **Heterocyclic chemistry**. Longman Scientific & Technical, 2th ed.7, p. 249-276, 1992.
- GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, p. 59-67, 1984.
- GUIMARÃES, N.N. et al. Comparative analysis of genetic toxicity of antiretroviral combinations in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 299-309, 2013.
- GUPTA, J.K. et al. A review on the synthesis and therapeutic potential of pyrimidine derivatives. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 5, p. 34-49, 2010.
- GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. **Environmental Science Research**, v. 50, p. 169-182, 1995.
- HAFEZ, H.N.; ALSHAMMARI, A.G.; EL-GAZZAR, A. Facile heterocyclic synthesis and antimicrobial activity of polysubstituted and condensed pyrazolopyranopyrimidine and pyrazolopyranotriazine derivatives. **Acta Pharmaceutica**, v. 65, n. 4, p. 399-412, 2015.
- HO, Y.W. Synthesis of some new azo pyrazolo[1,5- α]pyrimidine-thieno[2,3-*b*] pyridine derivatives and their application as disperse dyes. **Dyes and Pigments**, v.64, p. 223-230, 2005.
- KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, n. 5, p. 527-549, 1970.
- KLINGELFUS, T. et al. DNA damage in the kidney tissue cells of the fish *Rhamdia quelen* after trophic contamination with aluminum sulfate. **Genetics and molecular biology**, n. AHEAD, 2015.
- LAGOJA, I.M. Pyrimidine as Constituent of Natural Biologically Active Compounds. **Chemistry & Biodiversity**. v. 2, n. 1, p. 1-50, 2005.
- LIMA, C. D. S. **Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação do potencial genotóxico do metabólito secundário de *Serratia marcescens*, a Prodigiosina**. Dissertação (Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco 2014.
- LIU, MINGXING et al. A convenient four-component one-pot strategy toward the synthesis of pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 2125-2131, 2015.

- LLOYD TE, TAYLOR, J. P. Flightless Flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1184, p. 1–20, 2010.
- LOPES, J. C. et al. Recombinogenic activity of Pantoprazole® in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 101-106, 2015.
- MACEDA, E. B. et al. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 1, p. 117-129, 2015.
- MACHADO, N. M. et al. Lack of mutagenic effect by multi-walled functionalized carbon nanotubes in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 355-360, 2013.
- MONTEIRO. M. R. L. **6-Aril-pirimidinas contendo uma função imida: Síntese e Avaliação das Propriedades Antimicrobianas**. Dissertação (Biotecnologia de produtos bioativos), Universidade Federal de Pernambuco. 2005.
- MORAES. J. P. G. **Análise de genotoxicidade de compostos 4-amino-2, 6-diaril-5-carbonitrila-pirimidínicos**. Dissertação (Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco. 2014.
- ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2598-2604, 2012.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.
- PANDEY UB, NICHOLS CD. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. **Pharmacol Rev.** v.63, p. 411-436, 2011.
- PORTE, L.M.F. **Estudo do Comportamento Químico de Heterociclos Trifluormetil Substituídos em Reações com Dast**. Dissertação (Química), Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

- ROBERTS, D.B. *Drosophila melanogaster*: the model organism. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 121, p. 93-103, 2006.
- ROUSE, J.; JACKSON, S. P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. **Science**, v. 297, p. 547-551, 2002.
- SHILPA, C.; DIPAK, S.; VIMUKTA, S.; ARTI, D. Microwave and Conventional Synthesis of Pyrimidine Derivatives and their Pharmacological Activity- A Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 21, n. 10, p.1-11, 2012.
- SIDDIQUE, H. R; CHOWDHURI, D. K; SAXENA, D. K.; DHAWAN, A. Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 20, p. 285-290, 2005.
- SILVA, A. S. **Avaliação da atividade mutagênica e recombino gênica de compostos pirimidínicos com propriedades anti-inflamatórias em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, 2013.
- SILVA, J. B. P. et al. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) of 4-amino-2, 6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles with anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 2, p. 337-343, 2008.
- SILVA, E. J. **Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar**. Dissertação (Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, 2012.
- SILVA, J. ERDTMANN, B. e HENRIQUES, J.A.P. Genética Toxicológica. **Porto Alegre: Alcance**. v. 344, 2003.
- SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of two levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SIVIERO, F.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Mutagênese Carcinogênese, In: OGA, S., CAMARGO, M. M. A., BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**, 3ª ed, SãoPaulo – SP, editora: Atheneu, p.83-86, 2008.

- SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Mutação, Reparo do DNA e Recombinação. In: **Fundamentos de Genética**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 14, p. 312-314, 2001.
- TAYLOR, E.C.; McKILLOP, A. The Chemistry of Cyclic Enaminonitriles and O-aminonitriles. **Advances in organic Chemistry: Methods and results**. New York. John Wiley & Sons 7, p. 103-126, 1970.
- TICE, R. R. et al. Single cell gel / comet assay : guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.
- UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**, São Carlos: RiMa, cap. 14, p. 327-346, 2006.
- VITAL, F. A. C. et al. Avaliação da Toxidade aguda e das Atividades Citotóxica, Antimicrobiana e Anti-inflamatória de 7-aril-2,3-diidrotiazolo[3,2-a]pirimidin-5-ona-6-carbonitrila. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 507-512, 2009.
- XIE, F.; ZHAO, H.; ZHAO, L.; LOU, L; HU, Y. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4,5-substituted pyrimidine derivatives for anticancer activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 275-278, 2009.
- XIE, FUCHUN et al. Synthesis and biological evaluation of 2, 4, 5-substituted pyrimidines as a new class of tubulin polymerization inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3200-3205, 2011.
- YEJELLA, R.P.; ATLA, S.R. A study of anti-inflammatory and analgesic activity of new 2, 4, 6-Trisubstituted-Pyrimidines. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 9, p. 1079-1082, 2011.