

Campus Rio de Janeiro
Graduação em Ciências Biológicas

Talita Alves Menengat

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE UM GRUPO DE QUINAZOLINONAS
PRODUZIDAS NO IFRJ EM CÉLULAS VERO IN VITRO

Rio de Janeiro
2019



PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Campus Rio de Janeiro

Talita Alves Menengat

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE UM GRUPO DE
QUINAZOLINONAS PRODUZIDAS NO IFRJ EM CÉLULAS VERO *IN VITRO***

RIO DE JANEIRO – RJ
2019

Talita Alves Menengat

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE UM GRUPO DE
QUINAZOLINONAS PRODUZIDAS NO IFRJ EM CÉLULAS VERO *IN VITRO***

Monografia apresentada a Disciplina de TCC II do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Cristiano Gonçalves Ponte

Supervisor do IFRJ: Profa. Joana Reis Santos de Oliveira

Rio de Janeiro - RJ

2019

Ficha catalográfica elaborada por
Sergio Pinheiro Rodrigues
CRB7 3684

M542 Menengat, Talita Alves.

Avaliação do potencial citotóxico de um grupo de
quinazolinonas produzidas no IFRJ em células VERO *in vitro*. /
Talita Alves Menengat. – Rio de Janeiro, 2019.
50 f.: il.; 21 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências
Biológicas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
do Rio de Janeiro, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gonçalves Ponte

1. Quinazolinonas. 2. Toxicidade celular *in vitro*. I. Ponte,
Cristiano Gonçalves. II. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 616.12-008.33.1

Talita Alves Menengat

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE UM GRUPO DE
QUINAZOLINONAS PRODUZIDAS NO IFRJ EM CÉLULAS VERO *IN VITRO***

Monografia apresentada a Disciplina de TCC II do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Data de aprovação: _____.

Prof. Dr. Cristiano Gonçalves Ponte – IFRJ

Prof. Dr^a. Joana Reis Santos de Oliveira – IFRJ

Prof. Dr^a. Fabricia Viana Fonseca

Rio de Janeiro – RJ

2019

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me ensinou a nunca desistir e sempre ir à busca de meus sonhos, independentemente do tempo e esforço para alcançá-lo. Em especial ao meu PAI JORGE MENENGAT (IN MEMÓRIAN).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ser a minha força e alicerce. Pelos grandes feitos em minha vida, e O único de receber toda honra e toda glória. A minha família e amigos pelo apoio nas horas difíceis. Ao meu orientador, pelo incentivo, confiança e auxílio durante este processo. E a todos do laboratório de cultura celular do Instituto Federal do Rio Janeiro que de alguma forma me apoiaram neste feito, em especial, o monitor Leonardo Oliveira.

EPÍGRAFE

“A maior recompensa para o trabalho de um homem não é o que ele ganha com isso,
mas o que ele se torna com isso”.

John Ruskin

MENENGAT, Talita Alves. *Avaliação do potencial citotóxico de um grupo de quinazolinonas produzidas no IFRJ em células VERO in vitro*. 50p. Monografia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

RESUMO

O cultivo de células é uma prática existente há muitas décadas e seu desenvolvimento técnico foi fundamental para pesquisa com células-tronco, órgãos em 3D, áreas biomédicas, produção de fármacos, dentre muitas outras. Para o desenvolvimento de um novo fármaco são necessários processos de estudos, o qual inclui os testes de citotoxicidade *in vitro* com células, testes pré-clínicos e com humanos na fase clínica. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, objetiva avaliar o efeito de quinazolinonas sintéticas produzidas no Instituto Federal do Rio de Janeiro na eficácia do tratamento de doenças hipertensivas. Para tal, foi evidenciada que alguns de seus membros apresentam potente efeito, com IC₅₀ na faixa de 1 µM sobre vasos arteriais isoladas de ratos *in vitro*. Nesse contexto, nosso trabalho foi o de avaliar o potencial citotóxico das quinazolinonas que apresentaram efeito relaxante em artérias. Neste caso, as substâncias testes foram identificadas como QUIN-2, QUIN-4 e QUIN-8 para manutenção do sigilo visando futuras patentes. Células epiteliais estabelecidas do rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops* (linhagem VERO) são mantidas em meio de cultura DMEM com 10% SFB e expostas a diferentes concentrações (0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM) das substâncias teste para avaliar a toxicidade com o auxílio do método de MTT. Após os ensaios iniciais para ajuste do protocolo de MTT para placas de 24 poços, ficou estabelecido a concentração celular da linhagem VERO para teste em 20x10⁴ células / poço. De acordo com os gráficos de porcentagem de viabilidade celular x concentração das quinazolinonas teste (QUIN-2, QUIN-4 e QUIN-8) que indicaram não haver, nessa faixa de concentração, efeitos citotóxicos significativos comparados ao grupo controle. Na avaliação morfológica ao microscópio não foram observadas alterações celulares. De acordo com os resultados de viabilidade celular não foram observados efeitos citotóxicos significativos. Estes testes são iniciais e carecem de outros para uma avaliação completa da existência ou não de outras formas de toxicidade celular, como a genotoxicidade, mas já auxiliam na decisão de passarmos à etapa de ensaios com modelos animais com mais segurança. Assim os objetivos de contribuir com o desenvolvimento do projeto de identificação de novas substâncias com potencial anti-hipertensivo foram atingidos dentro da proposta desse trabalho.

Palavras-chave: Quinazolinonas, Células VERO, MTT e Toxicidade celular *in vitro*.

MENENGAT, Talita Alves. Evaluation of the cytotoxic potential of quinazolines and quinazolinones produced in IFRJ in VERO cells in vitro. 50p. Monograph, Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

ABSTRACT

The cultivation of cells is an existing practice for many decades and its technical development was essential for research with stem cells, organs in 3D, biomedical areas, production of pharmaceuticals, among many others. For the development of a new drug are necessary processes of studies, which includes the testing of in vitro cytotoxicity with cells, pre-clinical testing and with humans in the clinical phase. Studies conducted by our research group, aiming to evaluate the effect of quinazolinone fibers produced at the Federal Institute of Rio de Janeiro in the effectiveness of the treatment of hypertensive diseases. For such, it was evidenced that some of its members have a powerful effect, with IC₅₀ in the range of 1 µM on arteries isolated from rats in vitro. In this context, our study was to evaluate the cytotoxic potential of quinazolinones that showed muscle relaxing effect in arteries. In this case, the substances tested were identified as QUIN-2, QUIN-4 and QUIN-8 for maintaining the secrecy to future patents. Established epithelial cells of the African Green monkey kidney *Cercopithecus aethiops* lineage (VERO) are maintained in DMEM culture medium with 10% fetal calf serum and exposed to different concentrations (0.3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM) of substances test to evaluate the toxicity with the aid of the MTT method. After the initial trials to adjust the protocol of MTT for 24-well plates, it was determined the concentration of Vero cell lineage for testing on 20x10⁴ cells/well. According to the graphs of percentage cell viability x concentration of quinazolinone test (QUIN-2, QUIN-4 and QUIN-8) who indicated that there is, in this range of concentration, significant cytotoxic effect compared to the control group. In morphological evaluation under the microscope cellular alterations were not observed. According to the results of cell viability were not observed significant cytotoxic effects. These tests are initial and need of others for a full assessment of the existence or not of other forms of cellular toxicity, such as genotoxicity, but already assist in the decision to move to stage of trials with animal models with more security. Thus the objective of contributing to the development of project identification of new substances with potential anti-hypertensive drugs were achieved within the proposed in this work.

Key words: Quinazolinones, VERO cells, MTT and cellular toxicity in vitro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1	Compostos de Quinazolina, Quinazolinona e seus derivados. Adaptado de TIWARY <i>et al.</i> , 2015.	17
Figura 1.2	Estrutura química dos sais de tetrazólio mais utilizados. Adaptado de BERRIDGE; HERST; TAN, 2015.	20
Figura 1.3	Registro típico da adição de concentrações cumulativas das substâncias QUIN-2 (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M e 30 μ M) em anéis de aorta pré-contraídos com Phe, com endotélio intacto e Dados de nomenclatura das moléculas e os respectivos valores de IC50. (Dados do nosso grupo de pesquisa).	21
Figura 1.4	Efeito das substâncias QUIN-2 (A), QUIN-4 (B), QUIN-8 (C) em anéis de aorta de rato com o endotélio intacto pré-contraídos com Phe (1 μ M). As concentrações cumulativas (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M e 30 μ M) foram adicionadas ao platô da contração obtida por Phe (n=4). Os dados foram expressos como média \pm EPM (** P < 0.01, *** P < 0.001).	21
Fotografia 2.5	Célula Vero	23
Fotografia 2.6	Preparo do Meio de cultura DMEM com 10% de SFB	25
Fotografia 2.7	Filtração das Substâncias Quin	28
Figura 2.8	Esquema de diluições das substâncias para obtenção das concentrações em micromolar.	29
Figura 2.9	Placa de 24 poços com células VERO incubadas previamente por 24h sendo tratadas com 2ml de Meio de cultura DMEM à 10% SFB nas diferentes concentrações das substâncias QUIN em micromolar.	30
Gráfico 3.10	Absorbâncias nas diferentes concentrações celulares iniciais do grupo controle pelo método de MTT	32
Gráfico 3.11	Viabilidade celular das células VERO sob tratamento pela substância QUIN-2 em diferentes concentrações cumulativas (0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M) por 48 horas.	34
Gráfico 3.12	Viabilidade celular de células VERO sob tratamento pela substância QUIN-4 em diferentes concentrações cumulativas (0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M) por 48 horas	36
Gráfico 3.13	Viabilidade celular de células VERO sob tratamento pela substância derivado de QUIN-8 em diferentes concentrações cumulativas (0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M) por 48 horas. P = 0,00036 em relação ao controle (100%).	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Registro de pesagem de substâncias utilizadas no meio de cultura	24
Tabela 2.2	Total de células por placa de 24 poços	27
Tabela 2.3	Volume inicial nos tubos contendo Meio de cultura DMEM	29
Tabela 2.4	Valores de volume transferido na diluição seriada.	29
Tabela 3.5	Resultado das médias e (DP) das absorbâncias em diferentes concentrações celulares do grupo controle pelo método de MTT.	32
Tabela 3.6	Resultado das placas de 24 poços em diferentes concentrações da substância QUIN-2, dividida por placa. Em vermelho estão indicados os pontos caracterizados como <i>outliers</i> .	33
Tabela 3.7	Médias e Desvio Padrão (DP) em porcentagem das triplicatas de placa de células VERO da substância QUIN-2.	34
Tabela 3.8	Resultado das placas de 24 poços em diferentes concentrações da substância QUIN-4, dividida por placa. Em vermelho estão indicados os pontos caracterizados como <i>outliers</i> .	35
Tabela 3.9	Médias e Desvio Padrão (DP) em porcentagem das triplicatas de placa de células VERO da substância QUIN-4.	35
Tabela 3.10	Resultado das placas de 24 poços em diferentes concentrações da substância QUIN-8, dividida por placa. Em vermelho estão indicados os pontos caracterizados como <i>outliers</i> .	36
Tabela 3.11	Médias e Desvio Padrão (DP) em porcentagem das triplicatas de placa de células VERO da substância QUIN-8.	37

.
.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	<i>Trifosfato de Adenosina</i>
CMF-PBS	<i>Calcium and Magnesium-Free Phosphate-Buffered Saline</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
HCl	Ácido Clorídrico
KCl	Cloreto de Potássio
Milli-Q	Água Tridestilada
Na ₂ HPO ₄	Fosfato Dissódico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
HEPES	Ácido 4- (2-Hidroxi-etil) -1-Piperazinoetanossulfônico).
K ₂ HPO ₄	Fosfato Dipotássico
LT	Levemente Citotóxica
MT	Moderadamente Citotóxica
MTS	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)-5-(3-Carboximetoxifenil)-2-(4-Sulfofenil)-2h-Tetrazólio
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)-2,5-Difenil Brometo De Tetrazólio)
NT	Não Citotóxica
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
Phe	Fenilefrina
Quin	Quinazolinona
RPM	Rotação Por Minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
ST	Severamente Citotóxica
WST	8 2-(2-Methoxy-4-Nitrophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-(2,4-Disulfophenyl)-2h-Tetrazolium)

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO	14
1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS	14
1.2. QUINAZOLINAS E QUINAZOLINONAS	16
1.3. CULTURA CELULAR	17
1.4. CITOTOXICIDADE CELULAR	18
1.5. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	19
1.6. JUSTIFICATIVA	20
1.7. OBJETIVO	22
1.7.1. Objetivo Geral	22
1.7.2. Objetivos Específicos	22
2.0. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. LINHAGEM CELULAR	23
2.2. PREPARO DO MEIO DE CULTURA	24
2.2.1. Garrafas de Cultura Celular	25
2.2.2. Tripsinização	26
2.2.3. Contagem na Câmara de Neubauer	26
2.3. ENSAIOS DE PADRONIZAÇÃO	27
2.4. SUBSTÂNCIAS QUINAZOLINONAS	27
2.4.1. Diluição das Substâncias (QUIN)	28
2.5. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO PARA O ESTUDO DE CITOTOXICIDADE	30
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
3.0. RESULTADOS	32
3.1. ENSAIOS DE PADRONIZAÇÃO	32
3.2. ENSAIOS DE CITOTOXIDADE	33
3.3. SUBSTÂNCIA QUIN-2	33
3.4. SUBSTÂNCIA QUIN-4	35
3.5. SUBSTÂNCIA QUIN-8	36
4.0. DISCUSSÃO	38
5.0. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	45

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS

O cultivo de células é uma prática existente há mais de cem anos e seu desenvolvimento técnico foi fundamental para diversos procedimentos existentes na atualidade, assim, como em diferentes processos moleculares e paralelamente como ferramenta científica (PERES;CURI,2005).

Amaral e Machado-Santelli (2011), em sua pesquisa sobre a cultura de células definem que esse processo ocorre quando se isola a célula de um tecido, seja ele vegetal ou animal, mas permite que a sua viabilidade seja mantida, assim como a sua proliferação dentro de um meio, que possua os nutrientes e as condições inerentes à sua sobrevivência, incluindo fatores controlados como: o *pH*, a temperatura e a osmolaridade, como é o caso do sistema *in vitro*, que quer dizer, "em vidro", ou seja, fora de um organismo vivo, em um meio de cultura externo, igual aos tubos de ensaio (ALVES; GUIMARÃES, 2010; FERREIRA, 1999).

A cultura celular foi originária da cultura de tecido e se firmou no fim do século XIX, com Wilhelm Roux (1885), um embriologista alemão, que manteve por um curto período o tecido medular de galinha, imerso em solução salina aquecida. A partir desta fragmentação de porções de tecido que esta técnica foi nomeada de cultivo de tecido, do inglês *tissue culture*. Por esta prática ter permanecido predominante por mais de 50 anos é utilizada para denominar também a cultura de órgãos e células (BAZÉ *et al.*, 2018).

Alguns anos depois, Ross G. Harrison decidiu provar que as fibras nervosas eram advindas de células nervosas e para isso ele dissecou o tubo medular de um embrião de rã e o manteve na sua própria linfa por um tempo muito maior. Ele se beneficiou do fato do experimento ter sido com células de anfíbio que tem a capacidade de se adaptar, não sendo necessário o controle da temperatura (ALVES; GUIMARÃES, 2010; HARRISON, 1907).

Em 1912, Alexis Carrel usou células do coração do embrião de uma galinha. Em sua pesquisa, utilizou plasma de galinha e colocou em uma garrafa com a entrada inclinada, que ficou conhecida posteriormente como Frasco de Carrel. Ele percebeu a necessidade de mudar o meio de cultura, pois, o maior contato das células com os nutrientes permite uma maior viabilidade e aumento da taxa de proliferação, o que foi benéfico para o cultivo em monocamada (ALVES; GUIMARÃES, 2010; BAZÉ *et al.*, 2018; WITKOWSKY; 1979).

Ainda nessa perspectiva de cultura celular foi desenvolvida em 1951, pelo médico e pesquisador George Gey, a Linhagem HeLa, abreviatura do nome de Henrietta Lacks, como uma forma de homenagem a esta paciente pela sua colaboração científica (SKOLLOT, 2011). Ao fazer um exame ginecológico, seu médico viu o tumor e resolveu retirar uma pequena parte e entregar a Gey para análise (LUCEY; NELSON-REES; HUTCHINS, 2009).

Ao receber o material, Gey colocou as células em meio de cultura onde as células não só sobreviveram como também se multiplicaram (SKOLLOT, 2011). Assim Gey enviou para todo o mundo parte deste material para que fossem feitos todos os experimentos possíveis e alcançassem a tão esperada descoberta do causador do Câncer. Embora, não se tenha descoberto a cura definitiva do câncer, inúmeras outras utilidades foram possíveis a partir dessas células, como a vacina da poliomielite, estudos de biologia celular e molecular, além da própria biologia tumoral (SKOLLOT, 2011).

Esse pensamento de que as células tinham uma proliferação interminável, a exemplo das células de linhagem HeLa, e que só bastava trocar o meio de cultura, permaneceu no mundo científico por muitos anos. Só houve uma modificação em 1961, quando os pesquisadores Leonard Hayflick e Paul Moorhead perceberam que as células humanas não tinham esta mesma capacidade, ou seja, elas tinham limite de divisão. Esse fenômeno ficou conhecido como Limite Hayflick e sua descoberta incentivou os estudos sobre o envelhecimento celular (HAYFLICK, 1965).

Em 27 de março de 1962, Yasumura e Kawakita, dois estudiosos da Universidade de Chiba, no Japão deram início a linhagem celular VERO, a qual foi obtida a partir do rim do macaco verde africano (YASUMURA; KAWAKITA, 1963). Essa espécie, *Cercopithecus aethiops* possuía uma linhagem celular diferenciada com característica de multiplicar suas células por muitos ciclos e não se tornar senescente. Desta forma, foram coletadas células do epitélio do rim do macaco-verde africano para estudo (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Essa linhagem foi denominada VERO, que são abreviações de *Verda Reno*, ou seja, rim verde, em esperanto. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as células VERO são uma das poucas aprovadas para a produção de vacinas (WHO, 2009). A utilização destas células para produção de biofármacos para uso humano, também é autorizada pela (OMS) por ser isenta de propriedades oncogênicas e não representar risco a saúde humana (CHEN; CHEN, 2009).

A utilização da técnica de cultivo de células para o desenvolvimento de novos fármacos tem sido muito utilizada. Para que um fármaco seja liberado para teste ou uso em humanos, estudo pré-clínico tem como foco principal a utilização de sistemas

in vitro e animais *in vivo* para avaliar farmacologicamente o produto e ofertar um maior conhecimento quanto as suas propriedades, efeitos adversos e interações. Além da avaliação da dose-resposta, estudos sobre os efeitos na fertilidade e reprodução também são realizados e, por isso, teste de mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade são realizados (GRAHAME-SMITH; ARONSON,2004).

O processo de pesquisa e desenvolvimento de fármaco é longo, complexo e de alto custo, pois consiste na investigação farmacodinâmica e farmacocinética da substância. Parcerias entre as empresas e grupos de pesquisas identificados em universidades com objetivo de impulsionar o desenvolvimento de novos fármacos vem sendo adotadas (JORGENSEN *et al.*, 2012; TRALAU-STEWART *et al.*, 2009).

Considerando doenças crônicas como a Hipertensão Arterial, por exemplo, e seus impactos em saúde pública, a busca por novos fármacos segue em evidência. Pesquisas mostram a importância do desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica onde a baixa adesão é uma das principais causas de controle inadequado da pressão arterial (LOWRY *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, as quinazolinonas e os seus análogos têm sido o foco nas pesquisas devido à sua notável atividade farmacológicas. Estudos demonstraram que substâncias da classe das quinazolinonas, onde algumas substâncias sintéticas como os derivados das quinazolinonas já apresentaram um efeito anti-hipertensivo associado a mecanismos de ação distintos (MANJULA *et al.*, 2011).

1.2. QUINAZOLINAS E QUINAZOLINONAS

A Quinazolina é um composto formado pela união de dois anéis aromáticos simples com formato hexagonal, sendo um anel benzeno e um anel de pirimidina. Na forma cíclica, feita de carbono, hidrogênio, nitrogênio, sua fórmula molecular é C₈H₆N₂. Atualmente, as pesquisas procuram manter o foco na síntese de novos derivados e novas funções (RASHIMI *et al.*, 2011).

A característica de criação de novos compostos, a partir de pequenas alterações em seu ciclo permitiu a criação das quinazolinonas (Figura 1.1), as quais serviram como base para outros derivados e permitiu seu uso em diversas áreas, principalmente pela facilidade de manipulação, desenvolvimento de novos fármacos e o potencial terapêutico (JAFARI *et al.*, 2016; BANU; PRASAD; BHARATHI, 2014).

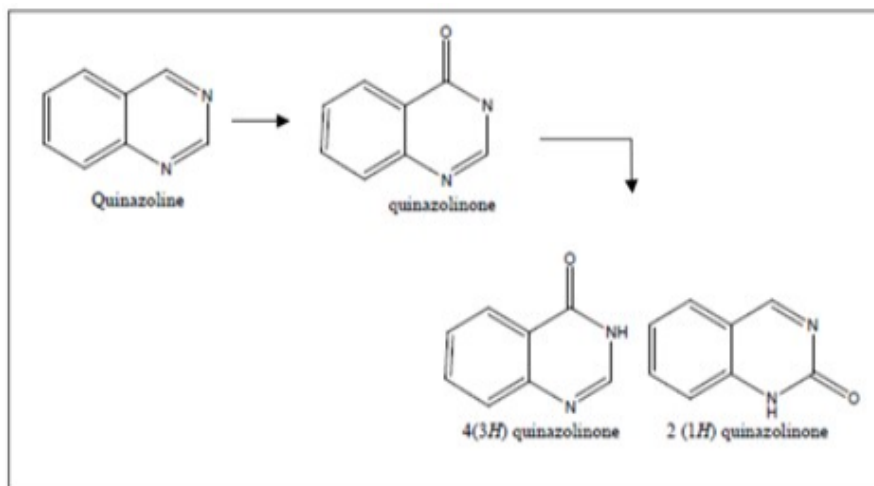


Figura 1.1 Compostos de Quinazolina, Quinazolinona e seus derivados.
 Fonte: Adaptado de TIWARY *et al.*, 2015.

As Quinazolinonas se apresentam na forma de cristais sólidos de alta concentração, não solúveis nem em água nem em ácidos concentrados, sendo que a estrutura básica possui apenas o acréscimo do oxigênio em sua composição (C₈H₆N₂O). Já os seus derivados, além da molécula de oxigênio possuem outros radicais, o que os transforma em novos compostos (Figura 1.1.) (JAFARI *et al.*, 2016).

Dois isômeros estruturais são mais utilizados nos estudos, o 2(1H)-quinazolinonas e o 4(3H)-quinazolinonas. O composto 4(3H)-quinazolinona possui uma característica interessante para os estudos na biologia e medicina, devido a sua atividade antitumoral, anticonvulsivante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antituberculosa e analgésica (JAFARI *et al.*, 2016). A ação anti-hipertensiva também tem sido relacionada às moléculas advindas das quinazolinonas (BANU; PRASAD; BHARATHI, 2014).

1.3. CULTURA CELULAR

O processo de cultivo de células é uma alternativa para substituir os experimentos de pesquisa com animais. Para que ela ocorra é necessária a presença de uma matriz biológica ativa e viva, a qual será colocada em um meio de crescimento apropriado e em seguida as células desejadas serão separadas das demais. Após esta extração as células serão transferidas e isoladas dando origem à primeira cultura de células ou cultura primária, como é mais comumente conhecido (MIGITA, 2012).

Além da cultura primária, a qual possui morfologia idêntica ao tecido original, à cultura celular ainda possui mais dois tipos: a cultura finita, que seria um cultivo

secundário, pois é originada a partir da primária e tem como característica uma proliferação finita e um processo apoptótico. E a cultura continuada, que é formada por células com poder mutagênico e divisão infinita, ou imortal. Este tipo, pelo grande poder de mutação pode sofrer alteração genética com o tempo, o que irá diferenciá-la do tecido original (PONEC, 2002).

A cultura de células pode ser dividida ainda em dois subtipos: células não-aderentes, que podem ser cultivadas suspensas no meio de cultura, por não precisarem de ancoragem, durante a proliferação, como é o caso das células hematopoiéticas e tumorais. Este modelo é utilizado no cultivo em 3D. As células aderentes, por sua vez, são advindas de tecidos mais rígidos, que necessitam de uma ancoragem geralmente feita em frascos ou placas, as quais possuem uma carga negativa para atrair as células (*coating*), característica do cultivo em monocamada (OLIVEIRA, 2009).

A observação das células auxilia no processo de cultivo celular, pois ao acompanhar seu crescimento através do microscópio é garantido um crescimento saudável e permite a percepção da saturação do meio (BARBOSA; SANTOS;STEPHANO, 2015).

As células VERO apresentam um padrão diferenciado das demais linhagens. Advindas do tecido epitelial do rim do macaco verde *Cercopithecus aethiops*, elas possuem um crescimento em monocamada e inibição por contato (GOVORKOVA *et al.*, 1996). A linhagem VERO é bastante utilizada na produção de vacinas, na avaliação da citotoxicidade de materiais biológicos, na detecção de toxinas, testes de meios e micoplasmas, além da produção comercial de novos anticorpos monoclonais. As pesquisas mais recentes visam à produção de vacina contra a encefalite japonesa, contra a influenza (H5N1) e outros subtipos de influenza A (TSENG *et al.*, 2012; LOBIGS *et al.*, 2010; BRETAS, 2011).

1.4. CITOTOXICIDADE CELULAR

O controle rigoroso em relação ao uso de animais em laboratórios fez com que pesquisadores precisassem criar medidas de segurança mais rígidas durante o processo de pesquisa e, assim, a necessidade de padronizar os testes *in vitro* surgiu.

Os ensaios pré-clínicos realizados tanto *in vivo* quanto *in vitro* auxiliam na mensuração da eficácia e da toxicidade das substâncias. Os testes *in vitro* envolvem cultura de células realizadas nas placas de Petri, com parte de tecido ou células. Os testes realizados *in vivo* ocorrem dentro de um organismo vivo ou em um tecido vivo, geralmente com animais e ensaios clínicos (LESCANO,2017).A avaliação da

toxicidade do material é importante, pois evita a ocorrência de lesões no organismo humano ou reações adversas após o uso (ROGERO *et al.*, 2003).

A ISO 10993, instituída pelo Órgão Internacional de Padronização define que o ensaio de toxicidade celular *in vitro* deve ser o primeiro teste a ser utilizada, como forma de avaliar a biocompatibilidade de qualquer material destinado ao uso biomédico. Só após a comprovação de quais são os níveis de toxicidade que os estudos podem continuar (ISO, 2009).

A citotoxicidade é definida como a capacidade de indução de uma substância de alterar a ação metabólica das células, ou seja, ocorre o processo de destruição celular a partir da liberação de substâncias nocivas às células (FERREIRA, 1999). Os métodos para avaliar a toxicidade dos biomateriais podem ser diversos e baseiam-se no contato do material com o meio de cultura, seja de forma direta ou indireta.

Dessa maneira é possível avaliar quais serão as alterações celulares nessas colônias (ISO, 2009). A diferença entre eles se dá pela forma como o método expõe as células ao material e, além disso, os testes de contato indireto só trazem dados de avaliação qualitativa. As de contato direto oferecem dados qualitativos e quantitativos. (ISO, 2009).

Neste trabalho, foi utilizado o teste por contato direto pelo método de MTT. A técnica é baseada pelo ensaio quantitativo onde uma determinada quantidade do material é colocada diretamente sobre uma monocamada de cultura de células recoberta por meio de cultura. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazan, produto este formado pela redução de tetrazolio pelas enzimas desidrogenase mitocondrial. (MOSMANN, 1983; LOBNER, 2000)

A ISO 10993 3-5 define que a avaliação qualitativa da citotoxicidade das substâncias é dividida nas seguintes categorias: não citotóxica (NT), levemente citotóxica (LT), moderadamente citotóxica (MT) e severamente citotóxica (ST) (ISO, 2009).

1.5. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Os testes de viabilidade baseiam-se na avaliação *in vitro* do potencial tóxico das substâncias. A diferença básica entre eles é o produto ou célula com que reagem. O objetivo dos testes de biocompatibilidade é incentivar as reações biológicas dos tecidos quando colocados em contato com determinadas substâncias, assim os pesquisadores conseguem saber quais serão as reações celulares causadas por

essas substâncias antes de iniciar as pesquisas em vivo (SCHMALZ; SCHWEIK, 1994).

Existem diversos tipos de testes de viabilidade, como os ensaios de redução de resazurina, o ensaio de viabilidade de protease, o ensaio de ATP, o ensaio *Real-time* e o ensaio de redução de tetrazólio (MTT, MTS, WST) (RISS *et al.*, 2013).Dentre eles, o parâmetro mais usado é o ensaio de redução de tetrazólio (Figura 1.2). Os testes de biocompatibilidade têm altas taxas de efetividade, além de serem realizados de forma rápida e sensíveis.

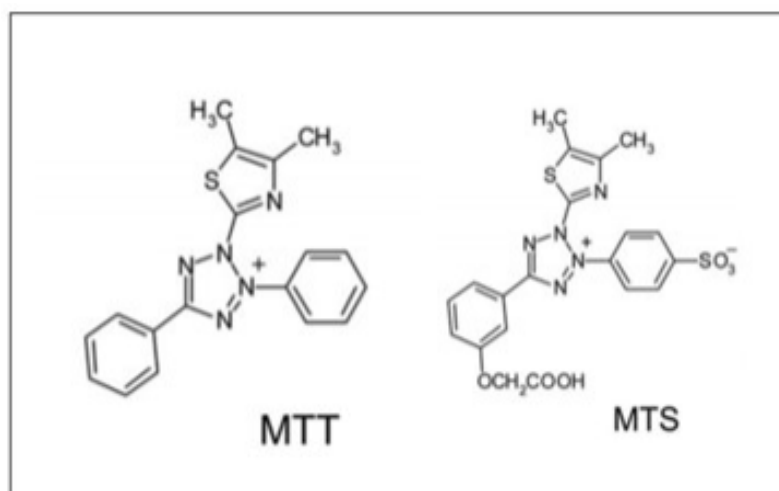


Figura 1.2 Estrutura química dos sais de tetrazólio mais utilizados.
Fonte: Adaptado de BERRIDGE; HERST; TAN, 2015.

A viabilidade celular pode ser avaliada quantitativamente por métodos colorimétricos. Para que seja realizado é necessário o uso de corante, como o MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) e o MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (NOZAKI *et al.*, 2012).

O método do MTT se baseia na clivagem do tetrazólio pelas enzimas desidrogenase mitocondrial quando este incubado em células vivas, onde o composto de coloração amarela se torna de cor roxo escuro pela formação dos cristais de formazan. A produção de formazan está relacionada ao funcionamento da cadeia respiratória, onde tem sido utilizado nas experiências com cultura de células como instrumento de avaliação de viabilidade celular. (PERES *et al.*, 2007).

1.6. JUSTIFICATIVA

Para o desenvolvimento de um novo fármaco é necessário processos de estudos, o qual inclui os testes de citotoxicidade *in vitro*, *in vivo* com células, testes

pré-clínicos e com humanos. A partir do estudo com quinazolinonas foram realizados experimentos em tecidos de aorta de rato (TEIXEIRA, 2018) (Figura 1.3).

Em testes com anéis de aorta foram adicionadas concentrações de forma cumulativas ao tônus contrátil os quais se mantinham intactos induzidas por Fenilefrina (Phe) de 1 μ M. Foram realizados os experimentos com as substâncias “QUIN” através da adição de concentrações cumulativas (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M e 30 μ M) (DADOS DO NOSSO GRUPO DE PESQUISA).

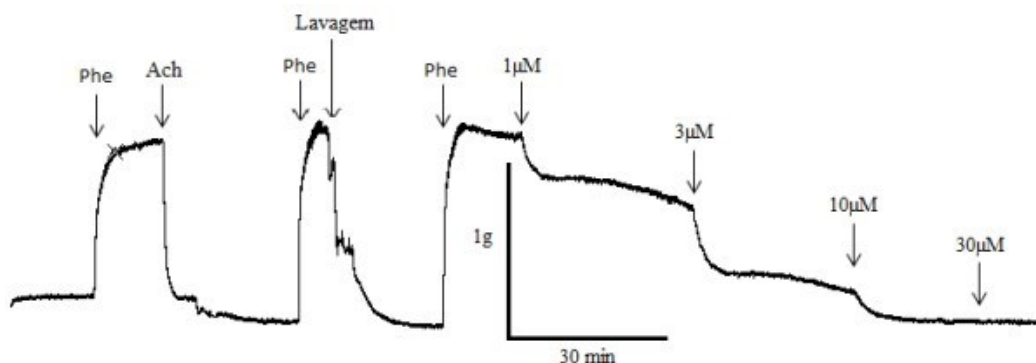


Figura 1.3 Registo típico da adição de concentrações cumulativas das substâncias QUIN-2 (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M e 30 μ M) em anéis de aorta pré-contraídos com Phe, com endotélio intacto e Dados de nomenclatura das moléculas e os respectivos valores de IC₅₀. Dados do nosso grupo de pesquisa.

O resultado dos experimentos com estas substâncias mostrou que as Quinazolinonas 2, 4 e 8 apresentaram efeitos consideráveis em relação às concentrações testadas com IC₅₀ em torno de 1 a 3 μ M (Figura 1.4).

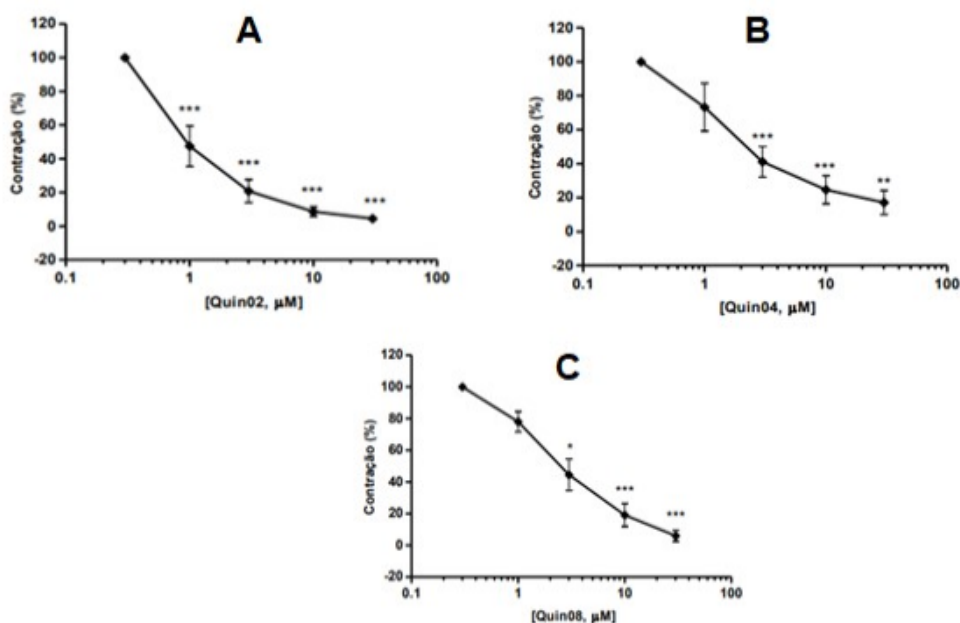


Figura 1.4 Efeito das substâncias QUIN-2 (A), QUIN-4 (B), QUIN- 8 (C) em anéis de aorta de rato com o endotélio intacto pré-contraídos com Phe (1 μ M). As concentrações cumulativas (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M e 30 μ M) foram adicionadas ao platô da contração obtida por Phe (n=4). Os dados foram expressos como média \pm EPM (** P < 0.01, *** P < 0.001).

1.7. OBJETIVO

1.7.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial citotóxico de um grupo de Quinazolinonas produzidas no IFRJ em células VERO *in vitro*.

1.7.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer uma rotina de cultivo de células *in vitro* com a linhagem VERO.
- Fazer as adaptações do protocolo de teste com MTT paraplacas de 24 poços com células VERO.
- Realização de experimentos de incubação das substâncias testes (QUIN-2, QUIN-4 e QUIN-8) em diferentes concentrações com células VERO e analisar o potencial citotóxico através do ensaio de MTT.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

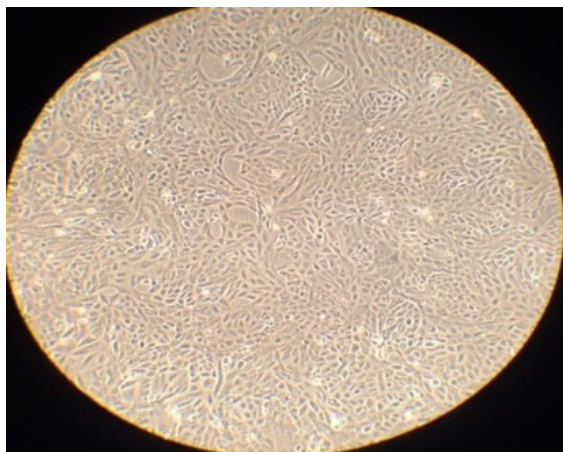
2.1. LINHAGEM CELULAR

O presente estudo foi possível a partir da utilização da linhagem VERO, células epiteliais de rins de macaco Verde africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas no banco de células do Instituto Federal do Rio de Janeiro – IFRJ (Fotografia 2.5).

Para realização dos experimentos foram descongelados criotubos de 1ml, contendo células VERO. As células estavam armazenadas em tanque de nitrogênio líquido à -196°C em soluções contendo 95 % de Soro Fetal Bovino (SFB) e 5% do crioprotetor DMSO (*Ludwig Biotec*). Após o descongelamento da amostra, os criotubos foram levados à câmara de fluxo laminar e transferidas com auxílio da pipeta *Pasteur* estéril, para tubos de centrifuga estéril, contendo 5ml de *Calcium and Magnesium-Free Phosphate-Buffered Saline* (CMF-PBS).

Em seguida, o material foi centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos, sendo descartado o sobrenadante e ressuspensão o *pellet* em 3ml de Meio de Cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *High Glucose* 10% de Soro Fetal Bovino da marca Life Technologies Co. (Grand Island, NY, USA) em fluxo laminar.

Ao fim deste processo, uma alíquota de 1ml da suspensão de células foi transferida, para garrafas estéril de cultivo celular com superfície igual a 25cm² (nº 90025, TPP®, Trasadingen, Suíça) contendo 9 ml de meio de cultura DMEM suplementado a 10 % de SFB. Após observação das células na garrafa de cultura em microscópico, foram acondicionadas em estufa de Dióxido de Carbono (CO₂) 5% a 37°C, sendo necessária a troca do meio de cultura a cada 48h.



Fotografia 2.5 Célula VERO
Fonte: Própria

2.2. PREPARO DO MEIO DE CULTURA

O meio de cultura é a composição de substâncias, no qual as células crescem se multiplicam e podem ser diferentes de acordo com a linhagem celular. De acordo com a Eagle (1959), o meio mínimo essencial é composto por 13 aminoácidos, 08 vitaminas, sais iônicos e o soro de dialisado. Este composto foi denominado de Meio Mínimo Essencial de *EAGLE* (EMEM) (STEPHANO, 2015).

A partir deste formulado criado por Eagle novos meios surgiram. Dentre eles o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)High Glucose. Sua formulação é suplementada por glicose e aminoácidos contendo também ferro e fenol vermelho, o qual permite a avaliação do pH (DIEL *et al.*, 2017). O meio de cultura utilizado nessa pesquisa foi o *Dulbecco's Modified Eagle Medium High (DMEM) Glucose* da marca *Life Technologies Co.* (Grand Island, NY, USA).

Sua formulação é livre de Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3) e HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil) -1-piperazinoetanossulfônico). Assim, foi necessário o acréscimo de ambos, como agente tamponante de pH, esuplementado com 10 % de SFBinativado e estéril. Para o preparo de 1L de meio foi preciso pesar em balança analítica as seguintes substâncias, com o propósito de obter exatamente as concentrações (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Registro de pesagem de substâncias utilizadas no meio de cultura.

SUBSTÂNCIA	PESO (GRAMAS)
MEIO DE CULTURA BASE	13,4
NaHCO_3	3,7
HEPES	2,0

Fonte: *Life Technologies Co.* (Grand Island, NY, USA).

Após a pesagem, as concentrações foram solubilizadas em 500 ml de água tridestilada (Mili-Q) no *Becker* de 1L e homogeneizadas com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, a solução foi transferida e avolumada com água Milli-Q em balão volumétrico de 1L até a altura do menisco correspondente (Figura2.6).



Figura 2.6 Preparo do Meio de cultura DMEM com 10% de SFB
Fonte: Própria.

Para ajuste de *pH* 7,4 foi utilizado o *pHmetro* de marca *Metrohm swissmade827 pH lab*, previamente calibrado. A solução foi corrigida com Ácido Clorídrico (HCl) 1mol/L ou Hidróxido de Sódio (NaOH)1 mol/L, quando necessário.

Para esterilização da solução foi realizado a filtração a vácuo, em fluxo laminar, utilizando filtro estéril com membrana 0,22 μm acoplada à bomba de sucção. A solução foi transferida para o filtro onde passou pela membrana, transferindo a solução esterilizada para um recipiente estéril. Para obtenção do meio de cultura DMEM a 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), foi retirada uma alíquota de 100 mL do meio DMEM filtrada solução de 1L, sendo acrescentados 100 mL de SFB inativado, estéril e previamente aquecido a 37°C em banho Maria por 30min.

Após este procedimento foi retirada uma alíquota de 5ml sendo colocado em tubo de centrífuga estéril e acondicionado em estufa a 37°C durante 7 dias para observação de possíveis contaminantes, assegurando assim o uso do meio na cultura celular. O meio de cultura filtrado foi identificado e estocado em torno de 4°C na geladeira por no máximo 15 dias.

2.2.1. Garrafas de Cultura Celular

Para manutenção das células VERO em garrafas de cultura foi necessário à troca do meio a cada 48h. O procedimento iniciava pela visualização macroscópica, através da observação da coloração e turbidez do meio. Em seguida, observava em microscópico, a morfologia, confluência e possíveis efeitos citopáticos celulares por contaminantes.

Para troca do meio de cultura e retirada de resíduos celulares, utilizou-se *Phosphate Buffered Saline* (PBS) composto de: 8g/L de Cloreto de Sódio (NaCl);

0,2g/L de Cloreto de Potássio (KCl); 1,2g/L de Fosfato Dissódico (Na_2HPO_4) e 0,2g/L de Fosfato Dipotássico (K_2HPO_4). Após a troca do Meio de cultura, as células foram acondicionadas em estufas com 5% de CO_2 a 37 °C.

O controle do meio de cultura, principalmente pela dosagem correta dos substratos e temperatura deve ser rigoroso, pois são eles que irão fornecer o ambiente adequado para a divisão e manutenção das células (BRASIL, 2013). A troca do meio no tempo correto constitui de etapa importante neste processo, visto que quanto mais tempo as células permanecem no mesmo meio, menos substâncias estarão disponíveis, fator contributivo para morte celular.

2.2.2. Tripsinização

A extração de células de um meio para outro pode ser feito de forma simples quando são células não aderentes, ou através de outros métodos como a incubação com tripsina, raspagem das células, e o uso de detergente suave em células aderentes. (JÚNIOR, 2012).

O uso da protease Tripsina foi utilizado para transferência celular quando a confluência da monocamada ocupava toda a área da garrafa de cultura, e quando se fazia necessário o uso das células para realização dos testes das substâncias.

Esse método se baseia na hidrólise das cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginina, proteínas de adesão celular responsáveis pelo ancoramento, além do quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), para cálcio e magnésio, que são íons importantes para adesão, e inibirem a ação da própria Tripsina (INCQS/Fiocruz). A solução de tripsina foi preparada a partir do meio PBS que recebia ainda 2,5 g/L de tripsina e 0,4 g/L de EDTA e pH 7,8 (DIAS *et al.*, 2012).

2.2.3. Contagem na Câmara de Neubauer

A contagem celular é utilizada para determinar se elas são ou não viáveis, de acordo com o método empregado. O método mais utilizado é através da Câmara de Neubauer. Neste processo ocorre diferenciação quanto à coloração das células não viáveis pelo corante azul de Tripán colorindo seletivamente tecidos mortos, e células viáveis não são coradas.

Para estabelecer a quantificação celular foi utilizado o método direto pela contagem de células na câmara de *Neubauer*. Uma alíquota de suspensão celular foi adicionada sobre a câmara com auxílio de uma micropipeta P20 e fixada sob uma lamínula. O espaço entre a câmara e a lamínula é equivalente a 0,1mm, e cada

quadrante da câmara será equivalente ao volume de 0,1m³, quando este é corrigido pelo fator de correção da câmara de Neubauer (10⁴) (LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2004).

A equação para obtenção das células por ml da suspensão é feita pela média da contagem dos 4 quadrantes periféricos multiplicado pelo fator de correção e pelo valor de diluição, conforme a equação (2.1). Utilizou-se uma alíquota de 20µl da suspensão celular e 20µl do corante azul de Trypan (0,4g diluído em CMF-PBS 100ml e pH 7,2)

$$\frac{Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4}{4} \times 10^4 \times \text{fator de diluição} = n^\circ \text{ de células / mL}$$

(2.1)

2.3. ENSAIOS DE PADRONIZAÇÃO.

A fim de se testar as substâncias, foram realizados ensaios para padronizar a melhor concentração celular pelo método de MT em placas de 24 poços (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 Total de células por placa de 24 poços

CONCENTRAÇÃO CEL/ POÇO	TOTAL DE CÉLULAS
3,0x10 ⁴	72 x10 ⁴
10x10 ⁴	24x10 ⁵
20x10 ⁴	48x10 ⁵
60x10 ⁴	1,44 x10 ⁶

Fonte: Própria.

As células VERO, depois de estabelecida sua quantificação na câmara de *Neubauer*, foram transferidas para placas de 24 poços, em fluxo laminar, onde se estabeleceu diferentes concentrações celulares: (3,0x10⁴), (10x10⁴), (20x10⁴) e (60x10⁴) contendo 2ml de meio de cultura por 48 h.

2.4. SUBSTÂNCIAS QUINAZOLINONAS

Para realização dos testes de citotoxicidade as substâncias testes foram

fornecidas pelo Prof. Gabriel Oliveira de Resende do Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro. Elas foram acondicionadas em *ependorfs*, identificadas como QUIN-2, QUIN-4 e QUIN-8, com peso molecular 286,78 g/mol, 272,75 g/mol, 270,71 g/mol, respectivamente.

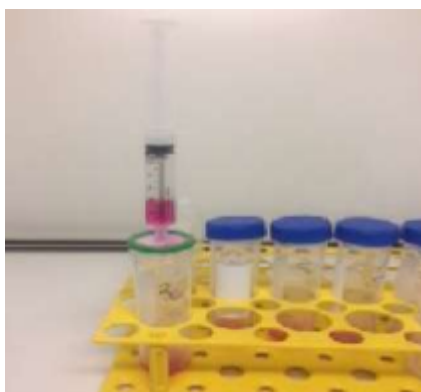
As substâncias testes compreendem moléculas inéditas e/ou com rotas sintéticas ainda não publicadas na literatura, onde por um possível processo de obtenção de patente não serão identificadas as estruturas neste trabalho.

Para solubilização das substâncias foi utilizado DMSO 100% e homogeneizadas com auxílio de um agitador, obtendo uma solução estoque na concentração 10 mM e mantidos em -20°C.

2.4.1. Diluição das substâncias (QUIN)

Para os testes das substâncias foram estabelecidas as concentrações em micromolar. A partir da concentração estoque (10mM) diluída em solução 100% de DMSO, retirou-se uma alíquota de (0,042 μ l) com auxílio de uma micro pipeta (P 200) sendo ressuspensa em 8 ml de meio de cultura DMEM a 10 % SFB em tubo de centrífuga.

Para filtração desta solução, utilizou-se em fluxo laminar, o filtro *swinex* (*Micro lab scientific*), de poro 0,22 μ m acoplada a uma seringa estéril de 10 ml sem o êmbolo (Fotografia 2.7).



Fotografia 2.7 Filtração das substâncias QUIN
Fonte: Própria

A solução foi transferida para a seringa e com o auxílio do êmbolo foi injetada passando assim pelos poros do filtro *swinex*. O filtrado estéril foi adicionado a 6ml de meio de cultura DMEM a 10 % SFB, obtendo uma solução na concentração de 30 μ M com volume final de 14 ml (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Volume inicial nos tubos contendo Meio de cultura DMEM

Concentração	Volume inicial
30 μ M	6ml
10 μ M	9,4ml
3 μ M	9,8ml
1 μ M	8,7ml
0,3 μ M	7ml

Fonte: Própria.

Para realização do cálculo foi utilizado a seguinte formula (2.2):

$$C1.V1= CF.VF$$

A partir da solução de 30 μ M foram realizadas as diluições seriadas para obtenção das concentrações de 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 Valores de volume transferido na diluição seriada.

CONCETRAÇÃO	VOLUME
30 μ M	0,042 μ l*
10 μ M	4,6ml
3 μ M	4,2ml
1 μ M	4,3ml
0,3 μ M	3ml

Fonte: Própria.

* Tubo de concentração 30 micro molar foi adicionado (0,042 μ l) da solução estoque (10mM)contendo 8 ml de meio de cultura, sendo adicionado em seguida 6ml de meio de cultura após filtração.

A diluição seriada foi realizada como mostra o esquema abaixo (Figura 2.8), iniciado da maior concentração para a menor.

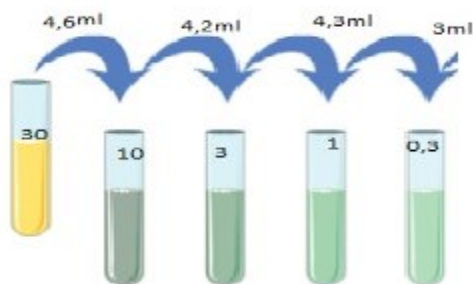


Figura 2.8 Esquema de diluições seriadas para a obtenção das concentrações em micromolar.

Para transferência das substâncias testes nas placas de 24 poços, previamente plaqueados com as células VERO por 24h, foi retirado o meio de cultura com auxílio de uma pipeta *Pasteur* de plástico estéril, em fluxo laminar (Figura 2.9).

Em seguida foi adicionado 2ml das diluições seriadas das substâncias em cada poço com auxílio de uma pipeta estéril 10 ml, sendo aplicado às substâncias de menor concentração para o de maior concentração conforme os poços da coluna correspondente para cada concentração na placa.

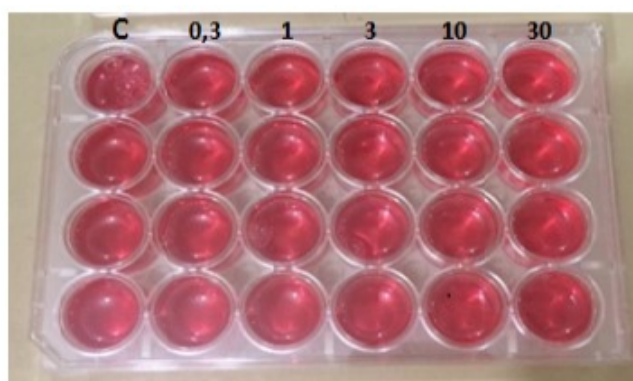


Figura 2.9 Placa de 24 poços com células VERO incubadas previamente por 24h sendo tratadas com 2ml de Meio de cultura DMEM à 10% SFB nas diferentes concentrações das substâncias QUIN em micromolar.

Realizado também a troca do meio de cultura do grupo controle, no qual não foi tratada pelas substâncias testes. Em seguida as placas foram acondicionadas em estufa úmida a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48h. Os testes foram realizados em triplicatas oriundas de diferentes dias de cultivo de células VERO.

2.5. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO PARA O ESTUDO DE CITOTOXICIDADE.

Para detectar possíveis efeitos citotóxicos dos análogos, a viabilidade celular foi avaliada através do método de metabolização intracelular do MTT *in vitro* (MOSMANN, 1983).

Preparou-se uma solução de 25 mL de meio de cultura com 0,5 mg/mL de MTT para 2 placas de 24 poços a serem testadas. Em seguida retirou-se o meio de cultura presente na placa contendo as substâncias testes. Adicionou-se 500 μ L da solução de MTT em todos os poços com auxílio da micropipeta (P1000) sendo condicionado por 3 horas para ocorrer à reação. Em seguida, homogeneizou-se a placa sob leve agitação e retirou-se a solução de MTT. Adicionou 500 μ L de DMSO em cada poço para solubilização dos cristais de formazam.

Homogeneizaram-se novamente os poços com uma leve agitação da placa e transferiu alíquotas de 100 μ L para as placas de 96 poços para leitura no espectrofotômetro de placa *SpectraMax* modelo 190 - *Molecular Devices, Sunnyvale, EUA*, através do programa *Soft Max Pro*, sob absorvância medida em 550nm de comprimento de onda, descontando (0,056) do valor médio de branco.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação das curvas de concentração, os dados de absorvância, após terem sido normalizados em relação ao controle (100%), tiveram o seguinte tratamento considerando-se que os valores esperados têm uma distribuição normal: identificação de “*outliers*” usando o teste de Dixon, após realiza-se.

Primeiro: Avaliação da distribuição normal realizados com o teste de *Shapiro-Wilk* para cada grupo (controle e diferentes concentrações), depois a identificação de *outliers* usando o teste de Dixon para retirada de valores fora da normalidade esperada. Para análise estatística para avaliar a hipótese de que os grupos são diferentes, usamos o teste *Oneway anova* com pós-teste de Tukey. Todas as análises estão disponíveis na seção de Anexos.

3.0. RESULTADOS

3.1. ENSAIOS DE PADRONIZAÇÃO.

A realização do ensaio de padronização ocorreu pela necessidade de adaptação do protocolo de placas de 96 poços para uma de 24 poços. Assim, foi possível perceber o comportamento do grupo controle de acordo com as concentrações utilizadas (Tabela 3.5) e as suas absorbâncias através do método de MTT (Gráfico 3.10).

Tabela 3.5 Resultado das médias e (DP) das absorbâncias em diferentes concentrações celulares do grupo controle pelo método de MTT

Número de células	Média absoluta	Desvio Padrão
3.000	0,356	0,039
10.000	0,354	0,237
20.000	0,595	0,223
60.000	2,156	0,066

Fonte: Própria.

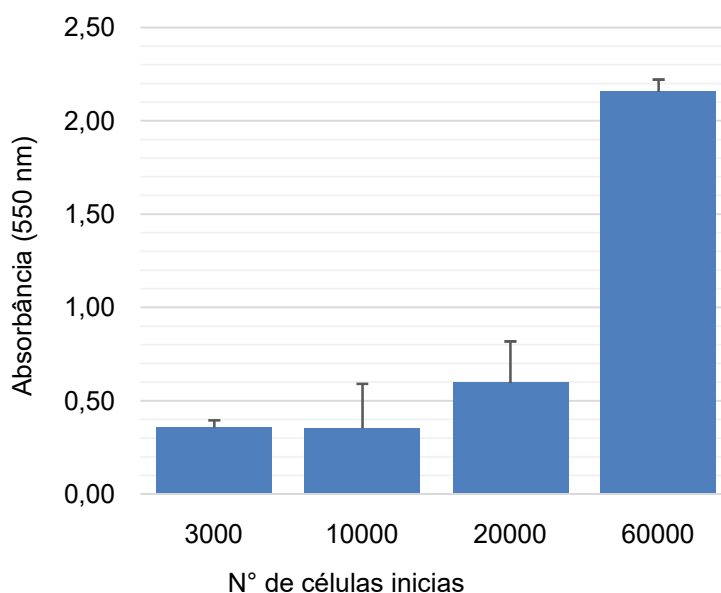


Gráfico 3.10 Absorbâncias nas diferentes concentrações celulares iniciais do grupo controle pelo método de MTT

Ficou estabelecido que a concentração célula de (20×10^4) por poço apresentou melhores resultados comparada aos parâmetros iniciais com as demais

concentrações. Na concentração inicial de (60×10^4) células, devido ao maior pico de absorvância, poderia apresentar resultados errôneos caso houvesse um estímulo de proliferação celular induzido pelas substâncias teste.

Em testes de absorvância, a intensidade da luz emitida decresce exponencialmente quando a concentração da solução aumenta aritmeticamente conforme descrito na Lei de *Lambert-Beer*. Sendo assim, o número gerado de cristais de formazam em altas concentrações na solução ocasionaria possíveis resultados falso positivos já que o valor de absorvância do grupo controle já se encontra elevado.

3.2. ENSAIOS DE CITOTOXIDADE

Os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem das triplicatas nas concentrações cumulativas (0,3µM,1µM,3µM, 10µM,30µM) das substâncias testes em células VERO, sendo a linhagem celular do grupo controle considerada como 100% de viabilidade.

3.3 SUBSTÂNCIA QUIN-2

Foram testadas três placas de células VERO com a substância QUIN-2 (Tabela 3.6), sendo tratadas por 48 horas sob diferentes concentrações cumulativas (0,3 µM, 1µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM) por 48 horas (Tabela 3.7).

Tabela 3.6 Resultado das placas de 24 poços em diferentes concentrações da substância QUIN-2, dividida por placa (n=3). Em vermelho estão indicados os pontos caracterizados como *outliers*.

	CONTROLE	100	100	100	100
1ª Placa	0,3 uM	103,9951	109,4038	110,3872	103,2575
	1 uM	107,9287	111,1248	109,158	103,9951
	3 uM	112,8457	106,4536	102,52	98,3405
	10 uM	111,1248	105,9619	104,4868	106,2077
	30 uM	106,9453	105,4702	106,2077	102,7658
	CONTROLE	100	100	100	100
2ª Placa	0,3 uM	101,2708	104,7898	102,0528	97,1652
	1 uM	102,0528	103,6168	106,5494	104,3988
	3 uM	99,31574	99,51124	107,5269	108,5044
	10 uM	90,12708	98,33822	102,8348	98,92473
	30 uM	82,89345	84,45748	86,41251	84,65298

	CONTROLE	100	100	100	100
3ª Placa	0,3 uM	109,0493	108,362	108,362	105,3837
	1 uM	101,7182	123,2532	125,315	109,2784
	3 uM	87,74341	102,6346	93,92898	98,51088
	10 uM	102,4055	93,69989	109,9656	79,2669
	30 uM	89,11798	88,65979	98,96907	79,95418

Fonte: Própria.

Tabela 3.7 Médias e Desvio Padrão (DP) em porcentagem das triplicatas de placa de células VERO da substância QUIN-2*.

	Controle	0,3 µM	1 µM	3Mm	10 µM	30Mm
Média	100	105,2899	109,0324	101,4863	100,2787	93,04221
DP		3,984331	7,731731	6,843586	9,050977	10,21446

Fonte: Própria.

*Os valores das concentrações da tabela anterior foram resumidos em uma única tabela com as médias dos dados e o Desvio Padrão (DP). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, sendo a linhagem celular (controle) considerada como 100% de viabilidade

Observa-se no gráfico que a viabilidade celular da substância QUIN-2 nas diferentes concentrações cumulativas se mantém próxima ao do grupo controle. (Gráfico 3.11). Pelas análises estatísticas conforme anexo, não foram encontradas diferenças significativas nas diferentes concentrações.

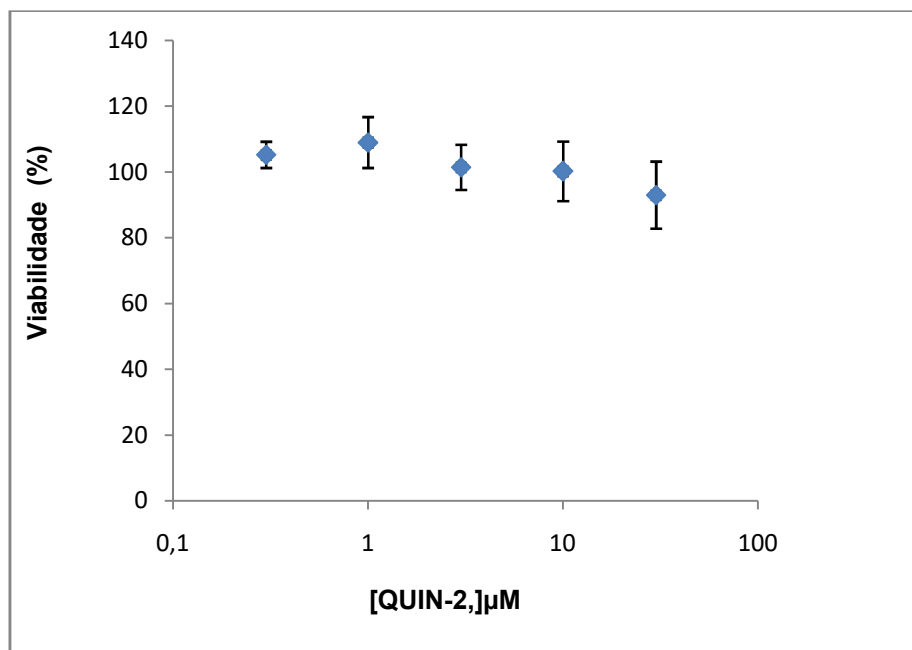


Gráfico 3.11 Viabilidade celular das células VERO sob tratamento pela substância QUIN-2 em diferentes concentrações cumulativas (0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM) por 48 horas

3.4. SUBSTÂNCIA QUIN-4

Foram testadas três placas de células VERO com a substância QUIN-4 (Tabela 3.8), sendo tratadas por 48 horas sob diferentes concentrações cumulativas (0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM) por 48 horas (Tabela 3.9).

Tabela 3.8 Resultado das placas de 24 poços em diferentes concentrações da substância QUIN-4, dividida por placa (n=3). Em vermelho estão indicados os pontos caracterizados como *outliers*.

	CONTROLE	100	100	100	100
1ª Placa	0,3 uM	101,3462	97,68726	101,6643	112,0839
	1 uM	86,22713	88,29824	91,09986	94,93488
	3 uM	84,77736	85,32965	145,5861	114,6165
	10 uM	102,865	105,5575	112,5904	109,3343
	30 uM	104,7981	99,68933	87,8437	92,04052
	CONTROLE	100	100	100	100
2ª Placa	0,3 uM	100,5147	97,90441	99,08088	101,25
	1 uM	98,01471	91,80147	93,38235	90,07353
	3 uM	98,75	90,99265	87,42647	97,72059
	10 uM	90	88,30882	87,94118	81,17647
	30 uM	81,39706	86,91176	88,27206	85,95588
	CONTROLE	100	100	100	100
3ª Placa	0,3 uM	106,8065	98,08858	102,7506	96,22378
	1 uM	102,0047	108,951	92,12121	90,90909
	3 uM	96,82984	101,4452	103,5431	84,00932
	10 uM	81,6317	86,85315	73,19347	78,46154
	30 uM	93,24009	88,71795	76,45688	107,4592

Fonte: Própria.

Tabela 3.9 Médias e Desvio Padrão (DP) em porcentagem das triplicatas de placa de células VERO da substância QUIN-4*

	Controle	0,3	1	3	10	30
Média	100%	101,2834	93,98485	99,25224	91,4928	91,06521
DP		4,421617	6,322052	17,21086	12,95245	9,102116

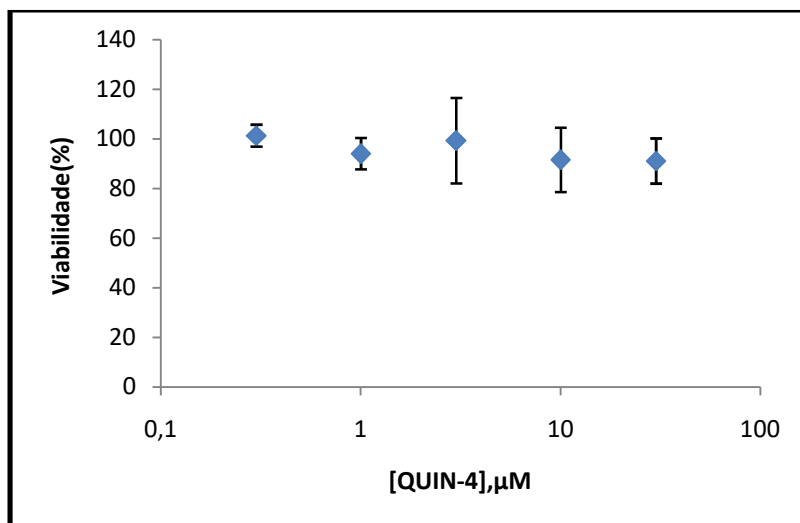
Fonte: Própria.

* Os valores das concentrações da tabela anterior foram resumidos em uma única tabela com as médias dos dados e o Desvio Padrão (DP). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, sendo a linhagem celular (controle) considerada como 100% de viabilidade.

Observa-se pelo gráfico que as concentrações cumulativas estão próximas ao do grupo controle. (Gráfico 3.12). Pelas análises estatísticas conforme anexo, não

foram encontradas diferenças significativas entre concentrações cumulativas comparados ao grupo controle para substância QUIN-4.

Gráfico 3.12 Viabilidade celular de células VERO sob tratamento pela substância QUIN-4 em diferentes concentrações cumulativas (0,3µM, 1µM, 3µM, 10 µM, 30µM) por 48 horas



3.5. SUBSTÂNCIA QUIN-8

Foram testadas três placas de células VERO com a substância QUIN-8, sendo tratadas por 48 horas sob diferentes concentrações cumulativas (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 Resultado das placas de 24 poços em diferentes concentrações da substância QUIN-8, dividida por placa (n=3). Em vermelho estão indicados os pontos caracterizados como *outliers*

	CONTROLE	100	100	100	100
1ª Placa	0,3 uM	96,14552	88,00346	86,09788	90,08229
	1 uM	80,2945	88,00346	88,34994	100,0433
	3 uM	114,2486	90,60199	92,33434	145,7774
	10 uM	88,78302	86,27111	77,17627	95,10611
	30 uM	58,55349	65,56951	72,75877	62,62451
2ª Placa	0,3 uM	94,49955	95,76195	96,66366	95,76195
	1 uM	101,8936	100,0902	95,40126	98,28674
	3 uM	101,1722	98,82777	94,67989	93,41749
	10 uM	95,22092	97,02435	94,13886	92,15509
	30 uM	86,02344	83,3183	85,12173	86,02344

	CONTROLE	100	100	100	100
3ª Placa	0,3 uM	102,6843	94,51796	102,8355	72,74102
	1 uM	85,74669	83,62949	93,30813	107,8261
	3 uM	102,3819	100,8696	112,6654	104,3478
	10 uM	92,55198	103,8941	88,77127	77,58034
	30 uM	79,39509	70,62382	93,00567	66,23819

Fonte: Própria.

Tabela 3.11 Médias e Desvio Padrão (DP) em porcentagem das triplicatas de placa de células VERO da substância QUIN-8.

	Controle	0,3	1	3	10	30
Média	100	92,98292	93,57278	104,277	90,72279	75,77133
DP		8,119507	8,405066	15,03417	7,706718	11,13788

A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, sendo a linhagem celular (controle) considerada como 100% de viabilidade. Nesta substância a concentração de 30 μM , apresenta um desvio em relação às outras concentrações e ao grupo controle (Gráfico 3.13). Pelas análises estatísticas conforme anexo, não foram encontradas diferenças significativas na viabilidade celular nas concentrações cumulativas que representasse efeito citotóxico comparado ao grupo controle (Tabela 3.11).

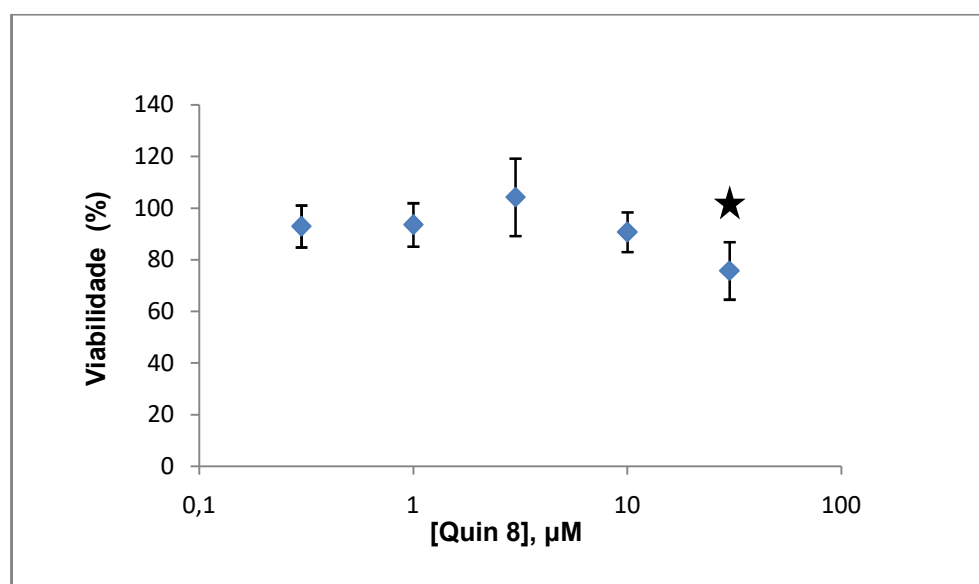


Gráfico 3.13 Viabilidade celular de células VERO sob tratamento pela substância derivado de Quinazolina 8 em diferentes concentrações cumulativas (0,3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM) por 48 horas.

P = 0,00036 em relação ao controle (100%).

4.0. DISCUSSÃO

As células da linhagem VERO possuem como padrão característica em sua morfologia alongada, adesão celular e dependência de contato para crescimento. (ATCC, 2019).

Na observação das placas no microscópico de luz invertido, tanto nas concentrações celulares ($3,0 \times 10^4$) e (10×10^4), as células apresentavam morfologia condizentes de células não saudáveis sendo observados prolongamentos citoplasmáticos por possível dispersão entre elas em área nos poços.

A baixa confluência da monocamada indicaria uma quantidade inicial baixa de células por poço que poderia levar ao estresse celular e resultados não condizentes. Ambas as concentrações apresentaram absorvâncias aproximadas o que reforça a baixa concentração celular.

Tendo estabelecidas as concentrações celulares da linhagem VERO em (20×10^4) por poço, foi possível obter resultados que resultaram nos gráficos de porcentagem de viabilidade celular onde se observou que não houve efeitos estatísticos significativos comparados ao grupo controle que representasse um caráter citotóxico para as substâncias testes QUIN-2, e QUIN-4 nas diferentes concentrações cumulativas. Com a substância QUIN-8 nas concentrações $0,3 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$ não foi observada diferença estatística comparados ao grupo controle, que foi visto com a concentração de $30 \mu\text{M}$ com um $P = 0,00036$.

Conforme a ISO 10993:5 (2009), amostras em teste que reduzem a viabilidade celular para valores inferiores a 70% devem ser consideradas citotóxicos. Por este parâmetro, a concentração de ($30 \mu\text{M}$) da substância QUIN-8 apresentou concentração celular em torno de (75%) comparado ao grupo controle (100%), sendo o valor considerado dentro dos parâmetros de viabilidade celular.

Em relação aos efeitos morfológicos, não foram observados efeitos citopáticos pela observação microscópica para nenhuma linhagem celular submetida às substâncias testes. As variações de porcentagem apresentadas nas diferentes concentrações de todas as substâncias testes podem estar relacionadas ao inóculo de células distribuídas por poços relacionados à pipetagem, ou possíveis estabelecimentos de adesão celular que podem variar em cada poço sendo pra mais ou para menos, porém de baixo valor significativo.

5.0. CONCLUSÃO

Os ensaios foram de maneira geral eficazes na avaliação de citotoxicidade pelo método de MTT. Nesse sentido é importante que a natureza do material e sua finalidade de aplicação sejam consideradas na escolha do ensaio de citotoxicidade.

Algumas características como concentração celular, por exemplo, podem causar interferência nos ensaios e influenciar na interpretação dos resultados. Assim, é importante que se avalie o método de menor interferência observando também para escolha dos controles. A viabilidade celular das substâncias Quinazolinonas (QUIN-2, QUIN-4 e QUIN-8) encontra-se no nível considerado satisfatório em todas as concentrações cumulativas conforme os parâmetros da ISO 10993:5 para os testes de citotoxicidade. Estes testes são iniciais e carecem de outros para uma avaliação completa da existência ou não de outras formas de toxicidade celular, como a genotoxicidade, mas já auxiliam na decisão de passarmos à etapa de ensaios com modelos animais com mais segurança, onde os dados mostram não serem tóxicas a princípio.

O desenvolvimento desse projeto, de maneira geral, contribuiu na visão da metodologia científica, frente ao processo de aprendizagem, tais como: rotina de cultura celular, técnicas laboratoriais, pesquisa acadêmica e análises estatísticas, contribuindo assim, na identificação de novas substâncias com potencial anti-hipertensivo dentro da proposta desse trabalho.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D.S.; DICK, P.C.; SILVA, C.J.; MEDEIROS, I.P.; OLIVEIRA, C.C.P.; HOKAMA, D.A.; SANTOS, J. E.; ALVES, P.S.; WERNECK, L.M.C.; SERÓDIO, L.R.; FRIEDRICH, K.; MATTOS, K.A. Estudo colaborativo nacional para o estabelecimento do material de referência de trabalho da vacina contra sarampo/caxumba e rubéola: evolução para a auto-suficiência na produção nacional da vacina tríplice viral. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, v. 74, n.03, p. 178-89, 2015.

ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A.C.R. *Cultivo celular*. In: MOLINARO, E.M; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215-253.

AMARAL, J.B.; MACHADO-SANTELLI, G.M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. *Naturalia*. Rio Claro, v. 34, p.1-20, 2011.

BARBOSA, J.E.; SANTOS, I.K.F.M.;STEPHANO, M.A. *Seleção e sequenciamento do DNA e produção de anticorpos monoclonais humanos (scFv) inibidores, in vivo e in vitro das ações tóxicas do veneno bruto, da melitina e da PLA2 purificadas de Apismellifera africanizada*. 2015. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

BANU, H.; BHARATHI, K.; PRASAD, K.V.S.R.G. Biological importance of quinazolin-4-one scaffold and its derivatives-a brief update. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v. 7, n. 6, p.1-7, 2015.

BAZÉ, A.; PARMENTIER, C.; HENDRIKS, D.F.G.; HURRELL, T.; HEYD, B.; BACHELLIER, P.; SCHUSTER, C.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; RICHERT, L. Tissue Engineering Part C: methods. *Mary Ann Liebert, Inc*. v. 24, n. 09, 2018. Available from: <<https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/ten.tec.2018.0134>>. Access on: 03 mai. 2019.

BERRIDGE, M.V., HERST, P.M. AND TAN, A.S. Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction. *Biotechnology Annual Review*, v.11, p. 127-152, 2015. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)>. Access on: 24 mai. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. Brasília: Anvisa, 2013. 95p..: il. 9 volumes

BRETAS, J.R.S.; OHARA, C.V.S.; JARDIM, D.P.; AGUIAR JUNIOR, W.; OLIVEIRA, J.R. Aspectos da sexualidade na adolescência. *Ciênc. saúde coletiva*. Rio de Janeiro, v. 16, n. 7, p. 3221-3228, 2011. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000800021&lng=en&nrm=iso>. Access on: 03 Jun. 2019.

CHEN, T.; CHEN, K. Investigation and Application Progress of Vero Cell Serum-free Culture. *International Journal of Biology*. v. 1, n. 2, p. 41-47, 2009.

DIAS, M.T. *Caracterização genotípica e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de cepas patogênicas de Escherichia coli isoladas de queijo Minas Frescal*. Campinas: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

DIEL, L.F.; MATTE, B.F.; RIBEIRO, F.P.; BRAND, L.M.; BERNARDI, L.; LAMERS, M.L. Desenvolvimento de uma cultura celular organotípica para triagem de medicamentos. In: 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos: São Paulo, Maresias, 2017.

FERREIRA, A.B.H. Novo Aurélio Século XXI: o dicionário da língua portuguesa. 3 ed. totalmente rev. e ampl. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.

FERREIRA, F. G.; POLLI, M. C.; OSHIMA FRANCO, Y.; FRACETO, L. F. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. *Revista Eletrônica de Farmácia*. Goiás, v. 6, n. 1, p.14-24, 2009.

GOVORKOVA, E.A.; MURTI, G.; MEIGNIER, B.; TAISNE, C.; WEBSTER, R.G. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J. Virol.* v. 70, p. 5519-5524, 1996.

GRAHAME SMITH, D. G.; ARONSON, J. K. Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia. 3.ed. Rio de Janeiro: Nova Guanabara, 2004. 83p.

HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* v. 37, p. 614-636, 1965.

HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. *Anatomical Record*. v. 1, p. 116-118, 1907.

INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009. 24p.

JAFARI, E., KHAJOU EI, M. R., HASSANZADEH, F., HAKIMELAHI, G. H., KHODARAHMI, G. A. Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures

with potent antimicrobial and cytotoxic activities. *Research in pharmaceutical sciences*, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2016.

JORGENSEN, N.B.; DIRKSEN, C.; HOLST, J.J.; MADSBAD, S. Gastric by pass and duodenal and gastric feeding: a comment to Hansen *et al.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. v. 301, p. 938 - 41, 2012.

JUNIOR, H.A.O.; SILVA, J.S.P.; BARBOZA, C.A.G.; ROCHA, H.A.O. *Estudo da descclularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxertos*. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

LESCANO, C.H. *Avaliação in silico, in vitro e in vivo de compostos candidatos a inibidores de fosfodiesterase 5*. 2017. 122f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-graduação *strictu sensu* em Ciências Médicas, Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

LOBIGS, M.; LEE, E.; NG M.L.; PAVY, M.; LOBIGS, P. A flavivirus signal peptide balances the catalytic activity of two proteases and thereby facilitates virus morphogenesis. *Virology*. v.401, n.1, p.80-9, 2010.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J. Neurosci. Methods*. V. 96, p. 147 – 52, 2000. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027099001934>>. Access on: 16 mai. 2019.

LOWRY, K. P., DUDLEY, T. K., ODDONE, E. Z. Intentional and unintentional nonadherence to antihypertensive medication. *Ann Pharmacother*. v. 39, p.1198–203, 2005.

LUCARINI, A.C.; SILVA, L.A. da; BIANCHI, R.A.C. Um sistema para contagem semi-automática de microorganismos. *Pesquisa & Tecnologia FEI*, v, 15, p. 36-40, 2004.

LUCEY, B.P.; NELSON-REES, W.A.; HUTCHINS, G.M. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of pathology & laboratory medicine*. v. 133, n. 09, p. 1463-7, 2009.

MIGITA, N.A. *Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares*. 2012. 69f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo, Botucatu, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

NOZAKI, A.C.M.; MARQUES, R.F.C.; DINIZ, I.M.A.; MARQUES, M.M.; MARCHI, J. Cytotoxicity evaluation of collagen membranes aiming the application as a biomaterial. In: *Congresso latinoamericano de órgãos artificiais e biomateriais - COLAOB*. São Paulo, v. 07, 2012.

OLIVEIRA, I.R. et al. Dispersão e empacotamento de partículas. *Cerâmica*. v. 55, p. 18-32, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ce/v55n333/03.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. (2007). *Microbiology*. 5th Tata McGraw-Hill. pp. 455-457.

PERES, L.A.B.; DELFINO, V.D.A.; MOCELIN, A.J.; TUTIDA, L.A.; FAVERO, M.E.; MATSUO, T. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. *J Bras Nefrol*. v. 30, n.1, p. 48-53. 2008.

PERES, C. M.; CURTI, R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

PONEC, M.; BOELSMA, E.; GIBBS, S.; MOMMAS, M. *Characterization of reconstructed skin models*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15 Suppl 1:4–17 62. In: *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Ulrich Meyer, Thomas Meyer, Jörg Handschel, Hans Peter Wiesmann Springer Science & Business Media, 2009, 1049p.

RANG, I. L. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 692 p.

RASHMI, A.; ASHISH, K.; GIL, N.; RANA, a. Quinazolinone: an overview. *IRJP*, v. 02, n. 12, p. 22-28, 2011. Available from: <www.irjponline.com>. Access on: 24 mai 2019.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T.J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. 2013 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam, G.S.; Coussens, N.P.; Brimacombe, K.; et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Access on: 22 mai. 2019.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat. Res*. São Carlos, v.

6, n. 3, p. 317-320, June 2003. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151614392003000300003&lng=en&nrm=iso>. Access on: 18 Apr. 2019.

SANTOS JR, A.R., FERREIRA, B.M.P., DUEK, E.A.R., DOLDER, H.; WADA, R.S.; WADA, M.L. Differentiation Pattern of Vero cells Cultured on Poly(L-Lactic Acid)/Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Blends. *Artificial Organs*, v. 28, n. 4, p. 381-389, 2004.

SCHMALZ G, SCHWEIK H. Characterization of an in vitro dentin barrier test using standard toxicant. *J Endod*. V. 20, n. 12, p. 592-4, 1994.

SKOLLOT, R. A vida imortal de Henrietta Lacks. São Paulo: Companhia das Letras, 2011. Título original: The immortal life of Henrietta Lacks. ISBN 978-85-359-1815-1.

TEIXEIRA, R.G.S. *Avaliação farmacológica de novos protótipos de fármacos para o tratamento da hipertensão arterial e da síndrome da bexiga hiperativa*. 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. 2018.

TIWARY, B.K.; PRADHAN, K.; NANDA, A.K.; CHAKRABORTY, R. Synthesis and biological properties of 4(3H)-quinazolone derivatives. *European J Med Chem*. v. 42, p. 1234-1238, 2015. Available from: <<https://www.omicsonline.org/open-access/implication-of-quinazoline43hones-in-medicinal-chemistry-a-briefreview-jcibt-1000104.pdf>>. Access on: 15 mar. 2019.

TRALAU-STEWART, C. J.; WYATT, C. A; KLEYN, D. E.e AYAD, A. Drug discovery: new models for industry–academic partner ships. *Drug Discovery Today*, v.14, n.1/2, p.95- 101. 2009.

TSENG, P.; HSU, T.Y.; CHANG, C.F.; TZENG, O.J.L.; HUNG, D.L.; MUGGLETON, N.G. et al. Unleashing potential: tdcs over the right posterior parietal cortex improves change detection in low-performing individuals. *Journal of Neuroscience*, v. 32, p. 10554-10561, 2012.

WITKOWSKI, J. A. Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture. *Medical History*. v. 23, p. 279-296, 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. The Mumps Vaccine. 2009 [acesso 2014 Jul 10]. Available from: <http://www.who.int/vaccines-diseases/diseases/mumps_vaccine.shtm>. Access on: 15 mar. 2019.

YASUMURA, Y.; KAWAKITA, Y. Studies on SV40 in tissue culture - preliminary step for cancer research in vitro. *NihonRinsho*. v. 21, p.1201-1215, 1963.

ANEXOS

- ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

A. Quin-02

Dados removidos após o uso do teste de *Dixon's outlier test* em vermelho:

Controle	0,3 uM	1 uM	3 uM	10 uM	30 uM
100	104,0	107,9	112,8	103,5	106,9
	109,4	111,1	106,5	106,0	105,5
	110,4	109,2	102,5	104,5	106,2
	103,3	104,0	98,3	106,2	102,8
100	101,3	102,1	99,3	90,1	82,9
	104,8	103,6	99,5	98,3	84,5
	102,1	106,5	107,5	102,8	86,4
	97,2	104,4	108,5	98,9	84,7
100	109,0	101,7	87,7	102,4	89,1
	108,4	123,3	102,6	93,7	88,7
	108,4	125,3	93,9	110,0	99,0
	105,4	109,3	98,5	79,3	80,0
Média	96,6168	104,613	99,7971	96,9757	89,2842
Des. Pad	16,1305	10,6922	7,34874	8,87844	11,2383

Pós análise de normalidade (com os *outliers* em vermelho removidos) usando o teste de Shapiro-Wilk:

Shapiro-Wilk			
	DF	Statistic	Prob<W
0.3	11	0,92794	0,39038
1	9	0,91466	0,34983
3	11	0,94222	0,54691
10	11	0,90516	0,21347
30	11	0,87098	0,0798

C: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 D: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 E: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 F: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 G: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.

Para avaliar a hipótese se os grupos com Quin-2 são estatisticamente diferentes do Controle, usamos o teste *Oneway Anova* com pós-teste de Tukey.

[-] Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	1366,41987	273,28397	5,93138	2,1415E-4
Error	51	2349,78677	46,07425		
Total	56	3716,20664			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.
 At the 0.05 level, the population means are significantly different.

[+] Fit Statistics

[-] Means Comparisons

[-] Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Level2 Level1	5,40764	3,96322	1,92963	0,74757	0,05	0	-6,32665	17,14194
Level3 Level1	5,7658	4,07896	1,99905	0,71875	0,05	0	-6,31118	17,84277
Level3 Level2	0,35815	3,05089	0,16602	1	0,05	0	-8,67491	9,39122
Level4 Level1	0,45365	3,96322	0,16188	1	0,05	0	-11,28064	12,18795
Level4 Level2	-4,95399	2,89433	2,4206	0,53071	0,05	0	-13,5235	3,61553
Level4 Level3	-5,31214	3,05089	2,4624	0,51188	0,05	0	-14,3452	3,72092
Level5 Level1	-0,70735	3,96322	0,25241	0,99997	0,05	0	-12,44164	11,02695
Level5 Level2	-6,11499	2,89433	2,98788	0,29725	0,05	0	-14,68451	2,45452
Level5 Level3	-6,47314	3,05089	3,00057	0,29279	0,05	0	-15,50621	2,55992
Level5 Level4	-1,161	2,89433	0,56728	0,99858	0,05	0	-9,73052	7,40851
Level6 Level1	-8,22171	3,96322	2,93379	0,3167	0,05	0	-19,956	3,51259
Level6 Level2	-13,62935	2,89433	6,65951	2,70277E-4	0,05	1	-22,19887	-5,05983
Level6 Level3	-13,9875	3,05089	6,48379	4,09103E-4	0,05	1	-23,02057	-4,95444
Level6 Level4	-8,67536	2,89433	4,23892	0,04565	0,05	1	-17,24488	-0,10585
Level6 Level5	-7,51436	2,89433	3,67163	0,11681	0,05	0	-16,08388	1,05516

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

B. Quin-04

Dados removidos após o uso do teste de *Dixon's outlier test* em vermelho:

	Controle	0,3 uM	1 uM	3 uM	10 uM	30 Um
100		101,3	86,2	84,8	102,9	104,8
		97,7	88,3	85,3	105,6	99,7
		101,7	91,1	145,6	112,6	87,8
		112,1	94,9	114,6	109,3	92,0
100		100,5	98,0	98,8	90,0	81,4
		97,9	91,8	91,0	88,3	86,9
		99,1	93,4	87,4	87,9	88,3
		101,3	90,1	97,7	81,2	86,0
100		106,8	102,0	96,8	81,6	93,2
		98,1	109,0	101,4	86,9	88,7
		102,8	92,1	103,5	73,2	76,5
		96,2	90,9	84,0	78,5	107,5
Média	93,0	92,1	98,4	92,1	92,6	
Des. Pad	20,6	15,9	25,2	20,9	8,0	

Pós análise de normalidade (com os *outliers* em vermelho removidos) usando o teste de Shapiro-Wilk:

Shapiro-Wilk			
	DF	Statistic	Prob<W
0.3uM	11	0,93755	0,49216
1uM	10	0,98132	0,97185
3uM	11	0,92384	0,35193
10uM	12	0,92107	0,29491
30uM	12	0,9473	0,59797

0.3uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 1uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 3uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 10uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 30uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.

Para avaliar a hipótese se os grupos com Quin-4 são estatisticamente diferentes do Controle, usamos o teste *Oneway Anova* com pós-teste de Tukey.

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	787,22537	157,44507	2,16213	0,07219
Error	53	3859,42919	72,81942		
Total	58	4646,65456			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.
 At the 0.05 level, the population means are not significantly different.

Fit Statistics

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Level2 Level1	0,30156	5,55815	0,07673	1	0,05	0	-16,13119	16,73432
Level3 Level1	-8,31375	5,61739	2,09304	0,67821	0,05	0	-24,92164	8,29414
Level3 Level2	-8,61532	3,72852	3,26775	0,20806	0,05	0	-19,63875	2,40811
Level4 Level1	-4,95994	5,55815	1,262	0,9467	0,05	0	-21,3927	11,47282
Level4 Level2	-5,2615	3,63867	2,04495	0,69915	0,05	0	-16,01927	5,49626
Level4 Level3	3,35381	3,72852	1,27209	0,94493	0,05	0	-7,66961	14,37724
Level5 Level1	-8,50721	5,50831	2,18416	0,63771	0,05	0	-24,79258	7,77817
Level5 Level2	-8,80877	3,56205	3,49727	0,15084	0,05	0	-19,34003	1,72249
Level5 Level3	-0,19345	3,6538	0,07488	1	0,05	0	-10,99595	10,60904
Level5 Level4	-3,54727	3,56205	1,40834	0,91725	0,05	0	-14,07853	6,98399
Level6 Level1	-8,93479	5,50831	2,29394	0,58801	0,05	0	-25,22017	7,35059
Level6 Level2	-9,23635	3,56205	3,66703	0,11695	0,05	0	-19,76761	1,29491
Level6 Level3	-0,62104	3,6538	0,24037	0,99998	0,05	0	-11,42353	10,18146
Level6 Level4	-3,97485	3,56205	1,5781	0,87265	0,05	0	-14,50611	6,55641
Level6 Level5	-0,42758	3,48376	0,17358	1	0,05	0	-10,72736	9,87219

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

C. Quin-08

Dados removidos após o uso do teste de *Dixon's outlier test* em vermelho:

controle	0,3 uM	1 uM	3 uM	10 uM	30 uM
100	96,1	80,3	114,2	88,8	58,6
	88,0	88,0	90,6	86,3	65,6
	86,1	88,3	92,3	77,2	72,8
100	90,1	100,0	145,8	95,1	62,6
	94,5	101,9	101,2	95,2	86,0
	95,8	100,1	98,8	97,0	83,3
	96,7	95,4	94,7	94,1	85,1
100	95,8	98,3	93,4	92,2	86,0
	102,7	85,7	102,4	92,6	79,4
	94,5	83,6	100,9	103,9	70,6
	102,8	93,3	112,7	88,8	93,0
	72,7	107,8	104,3	77,6	66,2
Média	93,0	93,6	104,3	90,7	75,8
Des. Pad	8,1	8,4	15,0	7,7	11,1

Pós análise de normalidade (com os *outliers* em vermelho removidos) usando o teste de Shapiro-Wilk:

Normality Test

Shapiro-Wilk

	DF	Statistic	Prob<W
0.3uM	11	0,92597	0,37155
1uM	12	0,96643	0,87009
3uM	11	0,92625	0,37415
10uM	12	0,93422	0,42704
30uM	12	0,93996	0,49753

0.3uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 1uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 3uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 10uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
 30uM: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.

Para avaliar a hipótese se os grupos com Quin-8 são estatisticamente diferentes do Controle, usamos o teste *Oneway Anova* com pós-teste de Tukey. A análise indica que a concentração de 30 μ M (level 6) é significativamente diferente do controle (level 1) com $P = 0,00036$.

ANOVA OneWay (25/06/2019 16:02:32)

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	4255,16791	851,03358	12,71702	3,17702E-8
Error	55	3680,64492	66,92082		
Total	60	7935,81284			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Level2 Level1	-5,1769	5,32829	1,37403	0,92497	0,05	0	-20,90893	10,55512
Level3 Level1	-6,42722	5,2805	1,72133	0,82664	0,05	0	-22,01815	9,16371
Level3 Level2	-1,25031	3,41474	0,51782	0,99909	0,05	0	-11,3325	8,83187
Level4 Level1	0,50427	5,32829	0,13384	1	0,05	0	-15,22776	16,2363
Level4 Level2	5,68117	3,48818	2,30332	0,58359	0,05	0	-4,61786	15,9802
Level4 Level3	6,93149	3,41474	2,87067	0,33924	0,05	0	-3,1507	17,01367
Level5 Level1	-9,27721	5,2805	2,48461	0,50137	0,05	0	-24,86814	6,31372
Level5 Level2	-4,10031	3,41474	1,69814	0,8346	0,05	0	-14,18249	5,98188
Level5 Level3	-2,84999	3,33968	1,20685	0,95576	0,05	0	-12,71056	7,01058
Level5 Level4	-9,78148	3,41474	4,051	0,06212	0,05	0	-19,86366	0,3007
Level6 Level1	-24,22867	5,2805	6,48888	3,63863E-4	0,05	1	-39,8196	-8,63774
Level6 Level2	-18,05177	3,41474	7,90028	1,10523E-5	0,05	1	-28,13205	-7,96958
Level6 Level3	-17,60143	3,33968	7,53816	2,71226E-5	0,05	1	-27,66202	-7,94086
Level6 Level4	-24,73294	3,41474	10,24314	5,67804E-8	0,05	1	-34,81512	-14,65076
Level6 Level5	-14,95146	3,33968	6,33131	5,29919E-4	0,05	1	-24,81203	-5,09089

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.