



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

WANDA JULIANA LOPES E SILVA

**PIRIMIDINAS: SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Recife

2019

WANDA JULIANA LOPES E SILVA

**PIRIMIDINAS: SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia química para a saúde

Orientador: Prof. Dr. Sebastião José de Melo

Coorientadora: Prof. Dr^a Gláucia Manoella de Souza Lima

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Wanda Juliana Lopes e
Pirimidinas: síntese de novos derivados e avaliação das
atividades biológicas / Wanda Juliana Lopes e Silva - 2019.
93 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Sebastião José de Melo
Coorientadora: Gláucia Manoella de Souza Lima
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Pirimidinas 2. Propriedades biológicas 3. Sinergismo
I. Melo, Sebastião José de (Orient.) II. Lima, Gláucia Manoella de
Souza (Coorient.) III. Título

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-372

WANDA JULIANA LOPES E SILVA

**PIRIMIDINAS: SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 06/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. SEBASTIÃO JOSÉ DE MELO (Presidente e Orientador)
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS-UFPE

Prof^a Dr^a LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO COELHO
(Examinador Interno)
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-UFPE

Prof^a Dr^a NORMA BUARQUE GUSMÃO (Examinador Externo)
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS-UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar por sempre me proteger e iluminar meu caminho, sem ele eu não estaria nesse momento escrevendo essas palavras.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe Maria José, por sempre ter me incentivado a estudar e ter me dado o suporte devido.

A minha irmã gêmea, Wana, por ser minha companhia em Recife e está comigo em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a meu noivo Thiago, por sempre me incentivar a buscar o melhor para mim e por todo o suporte nesses sete anos de relacionamento.

Ao meu orientador, Professor Sebastião Melo, pelos ensinamentos, por acreditar em mim e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

A minha co-orientadora professora Gláucia Lima, pelos anos de parceria, desde 2013, pelos conselhos e todo o suporte a mim dado, desde a graduação em Biomedicina.

A Pós-doutoranda do laboratório Sínteses e Química de Produtos Naturais, Zenaide Monte, por todo suporte a mim dispensado, pelos ensinamentos e conselhos.

Aos meus amigos do DANTI, Suellen, Hanna, Diego, Vinicius e Iranildo pela amizade, as risadas e os conhecimentos trocados.

Agradeço a Fátima, Marcela e Amanda, da Coleção de micro-organismos, pela amizade e apoio nesses anos de graduação e mestrado.

Aos meus amigos do DCFAR, Camilla, Carlos e Beatriz, vocês fizeram a minha jornada, de conciliar uma graduação nova com um mestrado, mais leve, sentirei saudades.

RESUMO

No presente estudo foram sintetizados novos derivados pirimidínicos, em seguida, foram avaliadas suas atividades antimicrobiana, sinérgica, antioxidante leishmanicida e citotóxica. Foram sintetizados os compostos 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina(**3-a**), 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-anisil)-pirimidina(**3-b**) e Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-clorofenil)-primidina (**3-c**), as estruturas moleculares dos compostos foram confirmadas por métodos convencionais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Infravermelho (IV). Os compostos testados apresentaram atividade antimicrobiana com amplo espectro, demonstrando ação antagônica frente a bactérias Gram-positivas e negativas nas concentrações de 62,55 µg /mL a 250 µg /mL, em sua grande maioria. O (**3-a**) apresentou atividade sinérgica com o antibiótico Ampicilina+ sulbactam frente a cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025-b e *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1024-b, evidenciando uma redução da concentração do antibiótico 16 e 64 vezes, respectivamente. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciaram que células do controle positivo da cepa de *A.baumannii* UFPEDA(1024b), por MEV, apresentavam-se de forma numerosa com morfologia bacteriana preservada na forma de cocobacilos. Células bacterianas que foram submetidas ao tratamento apenas com o antibiótico mostraram morfologia bacteriana alongada, disformes, com extravasamento de conteúdo intracelular. As células tratadas com (**3-a**), se mostraram, em grande maioria, disformes, rompidas, com extravasamento de conteúdo citoplasmático. Pode-se observar que as células que foram expostas a combinação sinérgica do antibiótico com (**3-a**), apresentaram-se fragmentadas, com raras células integras. Os compostos apresentaram atividade antioxidante baixas, (**3-a**)e(**3-c**), ou irrelevante, (**3-b**), para os testes com DPPH e ABTS. A atividade leishmanicida, para forma promastigota, dos compostos variou com um IC 50% de 13,06 µg/mL (**3-b**) para 73,52 µg/mL (**3-c**) e para a forma amastigota de 49,93 µg/mL (**3-a**) para 113 µg/mL (**3-c**). Com relação a citotoxicidade todos os compostos se mostraram menos tóxicos que o medicamento, com CC50% variando entre 43,84 µg/mL a 97,51 µg/mL, enquanto que o antiparasitário apresentou um CC50% de 23, 10 µg/mL.

Palavras- chaves: Pirimidinas. Propriedades biológicas. Sinergismo.

ABSTRACT

In the present study new pyrimidine derivatives were synthesized, then their antimicrobial, synergistic, leishmanicidal and cytotoxic antioxidant activities were evaluated. For this, the compounds 4-amino-5-cyano-2- (p-dimethylaminophenyl) -6- (m, p-chlorophenyl) pyrimidine (**3-a**), 4-amino-5-cyano-2- (p-trifluoromethylphenyl) -6- (p-anisyl) -pyrimidine (**3-b**) and amino-5-cyano-2- (p-trifluoromethylphenyl) -6- (p-chlorophenyl) -pyrimidine (**3-c**), the molecular structures of the compounds were confirmed by conventional methods of nuclear magnetic resonance (nmr) and infrared spectrometry (IR). The compounds tested showed antimicrobial activity with a broad spectrum, showing antagonistic action against gram-positive and negative bacteria in the concentrations of 62,55 µg / mL to 250 µg / mL, in the great majority. Compound (**3-a**) showed synergistic activity with the antibiotic ampicillin + sulbactam against clinical strains of *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025b and *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1024b, evidencing a reduction in the concentration of antibiotic 16 and 64 fold, respectively. The images obtained by scanning electron microscopy (SEM) showed that cells of the positive control of the strain *A.baumannii* UFPEDA1024b, by mev, were numerous with bacterial morphology preserved in the form of coccobacilli. Bacterial cells that were submitted to treatment with only the antibiotic showed elongated bacterial morphology, deformed, with extravasation of intracellular content. The cells treated with (**3-a**), were mostly disformed, ruptured, with extravasation of cytoplasmic content. We can evidence that the cells that were exposed to the synergistic combination of the antibiotic with (**3-a**), presented fragmented, with rare integral cells. The compounds showed low antioxidant activity, (**3-a**) and 3-c, or irrelevant, (**3-b**), for the dpsh and abts tests. The promastigote leishmanicidal activity of the compounds varied with a 50% ci of 13.06 µg / mL (**3-b**) to 73.52 µg / mL(**3-c**) and for the amastigote form of 49.93 µg / mL (3-a) to 113 µg / mL (3-c). Regarding cytotoxicity, all compounds were less toxic than the drug, with cc 50% ranging from 43.84 µg / mL to 97.51 µg / mL, whereas the antiparasitic showed a cc 50% of 23.10 µg / mL.

Keywords: Pyrimidines. Biological properties. Synergism.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 -	Anel da pirimidina.....	17
Figura 2 -	Estrutura de ressonância do anel pirimidínico nas substituições nucleofílicas.....	18
Figura 3 -	Estruturas químicas de vitaminas constituídas por anel pirimidínico.....	19
Figura 4 -	Derivados pirimidínicos de drogas de sulfã.....	19

METODOLOGIA

Figura 5 -	Esquema reacional para síntese dos análogos pirimidínicos.....	25
------------	--	----

ARTIGO 1

Figura 1 -	Esquema reacional para síntese dos análogos pirimidínicos 3a-c	39
Figura 2 -	Microscopia eletrônica de varredura de células de <i>A. baumannii</i> UFPEDA 1024b.....	47

ARTIGO 2

Figura 1 -	Esquema reacional para síntese dos análogos pirimidínicos 3a-c	60
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 -	Concentração inibitória mínima [MIC (em $\mu\text{g mL}^{-1}$)] valores dos análogos pirimidínicos sintetizados, e agentes antimicrobianos padrão em ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	42
Tabela 2 -	Determinação da atividade antimicrobiana dos análogos pirimidínicos (3a-c) com o antibiótico padrão Ampicilina + sulbactam (em combinação e associado) contra as cepas de <i>A. baumannii</i>	45
Tabela 3 -	Potencial antioxidante por DPPH – IC 50%.....	48
Tabela 4 -	Potencial antioxidante por ABTS – IC 50%.....	48

Artigo 2

Tabela 1 -	Atividade leishmanicida e citotóxica dos derivados de pirimidina 3a-c	63
------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
CC 50%	Concentração Citotóxica em 50%
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
d	Dupleto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMSO	Dimetil Sufóxido Deuterado
Hz	Hertz
IC 50%	Concentração Inibitória em 50%
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IDSA	The Infectious Disease Society of America
J	Constantes de acoplamento
LSPQN	Laboratório de Sínteses e Química de Produtos Naturais
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
OMS	Organização Mundial de saúde
PPM	Medida em partes por milhão

RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
S	Singleto
T	Tripleto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	ASPECTOS QUÍMICOS GERAIS DA PIRIMIDINA.....	16
2.2	SÍNTESE E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE COMPOSTOS PIRIMIDÍNICOS.....	18
2.3	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA ÀS DROGAS COMERCIAIS.....	21
2.4	LEISHMANIOSES, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO...	23
3	METODOLOGIA	25
3.1	SÍNTESE DOS ANÁLOGOS PIRIMIDÍNICOS.....	25
3.1.1	Síntese das amidinas	25
3.1.2	Síntese de 4-amino-pirimidina-5-carbonitrila (3a-c).....	25
3.2	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	26
3.3	ATIVIDADE SINÉRGICA.....	27
3.4	ANÁLISE DA MORFOLOGIA BACTERIANA PELA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	27
3.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	28
3.5.1	A atividade antioxidante DPPH.....	28
3.5.2	Atividade de eliminação de radicais cátions de ABTS.....	28
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	29
3.6.1	Atividade forma promastigota.....	29
3.6.2	Atividade forma amastigota.....	29
3.7	CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS.....	30
4	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ANÁLOGOS PIRIMIDÍNICOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO E SINÉRGICO.....	31

5	SÍNTESE DE ANÁLOGOS PIRIMIDÍNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	55
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO A - ESPETROS DE IV, 1H RMN, 13C RMN DOS COMPOSTOS.....	77
	ANEXO B - NORMAS DA REVISTA: EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES.....	89

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços da medicina, doenças infecciosas e seus patógenos ainda são um problema de saúde mundial, gerando custos onerosos para os sistemas de saúde, devido principalmente às internações prolongadas e a necessidade de usar medicamentos mais potentes e conseqüentemente mais caros (MEDINA; PIEPER, 2016).

A resistência a antibióticos é um dos maiores desafios do século XXI, de acordo com o relatório “*Antibacterial agents in clinical development - an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including Mycobacterium tuberculosis*”, de 2017 da Organização Mundial de Saúde (OMS), a produção de antibióticos potentes é inferior ao número de bactérias multirresistentes que vem surgindo ao longo dos anos. Segundo o mesmo documento, os fármacos hoje desenvolvidos, são modificações de classes de antimicrobianos já existentes, que em curto prazo resolvem o problema, porém não pode garantir a eficácia dos mesmos com o passar dos anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Além, da recente busca pelos sistemas de saúde, por conter bactérias multirresistentes, há a emergência por esses órgãos de sanar problemas causados por doenças tropicais negligenciadas, entre elas estão às leishmanioses, são enfermidades causadas por parasitas intracelulares do gênero *Leishmania*, costumam acometer animais e seres humanos (DOMÍNGUEZ-BERNAL et al., 2018).

Existem inúmeros estudos a respeito das leishmanioses e suas formas de tratamento, contudo, ainda não há vacinas para tratar a doenças em humanos, além dos medicamentos disponíveis no mercado possuírem alta toxicidade, custo oneroso e o tratamento ocorrer por longos períodos (MAIA; DANTAS-TORRES, 2018).

Portanto há uma busca constante na química para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial biológico e com baixa toxicidade. Os compostos pirimidínicos surgem como uma alternativa eficaz para o controle de diversas infecções.

Pirimidina são moléculas heterocíclicas aromáticas de grande importância biológica, compõem os ácidos nucleicos, sendo assim, importantes para a manutenção na vida na terra. Estão presentes em inúmeros medicamentos, além de

possuírem atividade farmacológica bastante diversificada, como anticancerígena, anti-inflamatória, anti-hipertensiva (RANI et al., 2016).

Ao longo dos anos, vários trabalhos demonstram a importância farmacológica dos derivados pirimidínicos. Tomma, Khazaaal e Al-Dujaili (2014) descreveram que derivados pirimidínicos possuem atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Falcão et al. (2006), comprovaram que compostos 4-amino-pirimidínicos possuem atividade anti-inflamatória superior ao ácido acetil salicílico e indometacina. De Melo et al. (2018) sintetizaram compostos com elevada atividade tripanomicida, demonstrando ação até cinco vezes mais potente que o medicamento padrão. Desai, Makwana e Senta (2015) demonstraram ação antimicrobiana frente a bactérias gram negativas e positivas, incluindo cepas multirresistentes.

Tendo em vista as propriedades farmacológicas associadas às pirimidinas, suscitou-se a ideia de sintetizarmos uma nova série de compostos pirimidínicos **3 a-c**, e avaliar atividades biológicas dos compostos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar novos análogos pirimidínicos e avaliar suas atividades antimicrobiana, antioxidante e leishmanicida e citotóxica em macrófagos.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1.1.2.1 Sintetizar novos derivados pirimidínicos;
- 1.1.2.2 Elucidar a estrutura química dos derivados pirimidínicos por meio dos métodos físicos: RMN de ^1H e ^{13}C e espectroscopia de Infravermelho.
- 1.1.2.3 Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bacteriostática (CMB) dos derivados pirimidínicos inéditos.
- 1.1.2.4 Avaliar a capacidade sinérgica de três compostos pirimidínicos.
- 1.1.2.5 Avaliar o efeito ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do composto pirimidínico 3-a em nível da célula bacteriana de *A. baumannii* UFPEDA 1024b.
- 1.1.2.6 Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos análogos pirimidínicos.
- 1.1.2.7 Determinar a IC 50% de compostos pirimidínicos frente às formas promastigotas e amastigota da *L. amazonensis*. Avaliar a citotoxicidade dos análogos pirimidínicos em macrófagos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS QUÍMICOS GERAIS DA PIRIMIDINA

Os heterocíclicos têm sido alvo de estudo na busca incessante pela descoberta e desenvolvimento de novas substâncias bioativas. Mais de 90% dos fármacos contêm pelo menos um heterocíclico em sua estrutura, sendo estes responsáveis por aproximadamente 55% da literatura de química orgânica (KATRITZKY; RACHWAL, 2011; SAINI et al., 2013). Essas substâncias apresentam pelo menos um elemento diferente do átomo de carbono na composição de um sistema cíclico aromático ou não aromático (JOULE; MILLS; SMITH, 2000), sendo amplamente utilizadas na química medicinal uma vez que pequenas modificações estruturais, como por exemplo, a inserção de novos grupos funcionais, permite alterações nas suas propriedades químicas, físicas e biológicas, por decorrência pode vir a potencializar fármacos (DO MONTE et al., 2016).

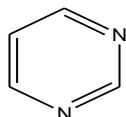
Em virtude dos fatos acima apresentados, as indústrias, química e farmacêutica, investem na obtenção de novos derivados heterocíclicos, podendo ser encontrados em corantes, agroquímicos, polímeros e principalmente em fármacos (KATRITZKY, 2004; CASARIN et al., 2008; KATRITZKY; RACHWAL, 2011). Os heteroátomos mais encontrados nos heterocíclicos são os átomos de oxigênio (o), nitrogênio (n) e enxofre (s). Como exemplos, a síntese de nucleotídeos de purina-e pirimidina são fundamentais para a replicação celular, manutenção e função celular (EICHE, 2003). Os nucleotídeos de purinas e pirimidinas servem como precursores de unidades monoméricas de ácidos nucleicos, o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). Estes são sequências de nucleótídeos amplamente utilizadas, estão presentes em uma ampla gama de fármacos com aplicações variadas (FROMTLING, 1988; DEVLIN et al., 1997).

Portanto, os compostos heterocíclicos constituem uma classe de compostos orgânicos para a manutenção da vida. Visto que, a presença de diversos heterocíclicos na estrutura de fármacos determina e potencializa diferentes atividades biológicas e farmacológicas. Na química medicinal, compostos heterocíclicos de seis

membros aromáticos contendo dois ou mais átomos de nitrogênio são muito empregados no planejamento de substâncias bioativas, por exemplo, na literatura há inúmeros trabalhos que mostram um amplo espectro de ação antagônica de derivados pirimidínicos frente a bactérias e fungos, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Syncephalastrum racemosum*, entre outros (DANSENA; DHONGADE; CHANDRAKAR, 2015; SCHAEENZER et al., 2017), além de apresentarem atividades antiprotozoários, ansiolíticos e anti-inflamatórios (SAINI et al., 2013).

As pirimidinas fazem parte da classe de composto orgânicos que contêm um anel de seis membros, com quatro átomos de carbonos e dois átomos de nitrogênio, sendo estes últimos na posição 1,3 do anel (Figura 1) (JOULE; MILLS; SMITH, 2000; EICHER; HAUPTMANN, 2003).

Figura 1. Anel da Pirimidina.



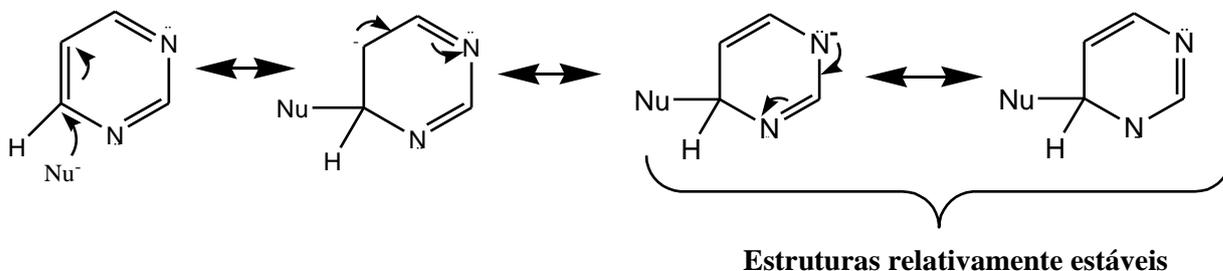
Fonte: Joule; Mills; Smith (2000); Eicher; Hauptmann (2003).

A nomenclatura segue a regra dos heterociclos, no caso os nitrogênios recebem as menores numerações, em sendo assim o nome de 1,3-diazina ou metadiazina, ou 1,3-diazobenzeno (SOLOMONS, 2009).

A pirimidina é pouco suscetível ao ataque eletrofílico pelo fato de ser uma estrutura π deficiente, uma vez que a eletronegatividade do nitrogênio um aceptor de elétrons, conferindo à pirimidina as propriedades de uma base fraca (CAREY; SUNDBERG, 2007).

Considerando a distribuição de densidades eletrônicas e os híbridos de ressonância da pirimidina, o carbono C-5 corresponde ao mais susceptível sítio de ataque eletrofílico (SINGH, 1982). Já os ataques nucleofílicos seriam confinados às posições C-2, C-4 e C-6 do anel pirimidínico, pois há uma maior carência eletrônica nestas posições (figura 2). A adição de substituintes aumenta este afeito, enquanto que os eletrodoadores o diminuem (BROWN, 1984).

Figura 2. Estruturas de ressonância do anel pirimidínico nas substituições nucleofílicas.



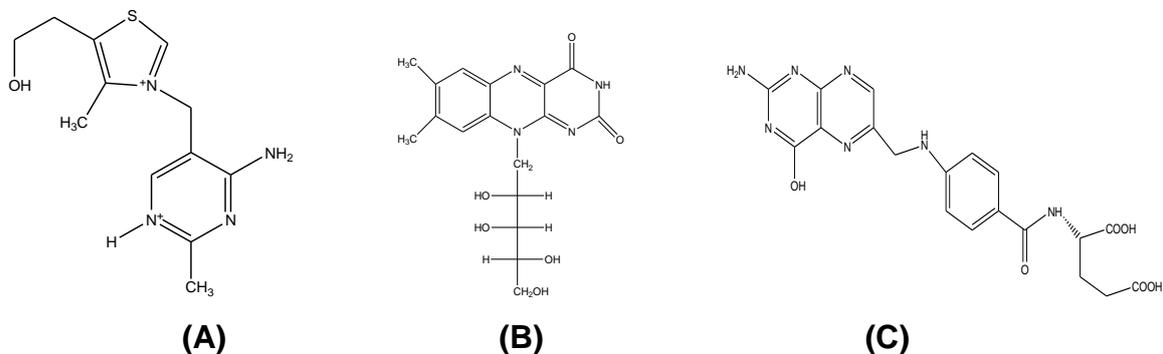
Fonte: Brown (1984).

2.2 SÍNTESE E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE COMPOSTOS PIRIMIDÍNICOS

As primeiras pirimidinas foram originalmente obtidas por reações catalíticas da formamida e o HCN e em temperaturas moderadas (SALADINO et al.,2002). As pirimidinas, na sua maioria, são obtidas através de reações de condensação, catalisada por base, entre malonitrila com suas amidinas substituídas e não substituídas, ocorre entre reagentes com grupos contendo N-C-N e C-C-C (TAYLOR; MCKILLOP, 1970).

A história da pirimidina se estende desde sua descoberta na composição dos ácidos nucleicos até os dias atuais, com a presença de derivados pirimidínicos em diversas áreas da terapêutica. Como o anel pirimidínico além de constituir as bases nitrogenadas está presente em vitaminas, como a, tiamina, riboflavina e ácido fólico (Figura 3), que são de fundamental importância para a manutenção das funções homeostáticas dos seres humanos (PATIL, 2018).

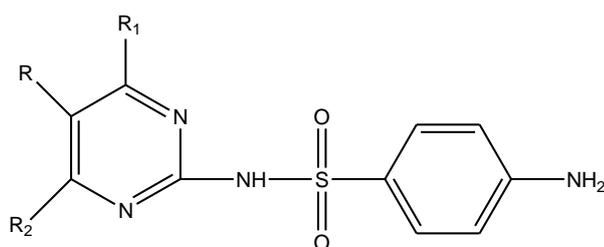
Figura 3. Estruturas químicas de vitaminas constituídas por anel pirimidínico. (A) Tiamina; (B) Riboflavina e (C) Ácido fólico.



Fonte: Patil (2018).

Derivados pirimidínicos também podem ser obtidos a partir de sulfas, a sulfadiazina, sulfamerazina e a sulfadimidina (Figura 4), possuem atividade antibacteriana superior a outras sulfas. São usadas na terapêutica no combate a meningite aguda e em pacientes que são alérgicos a penicilina, além de possuir boa solubilidade em água, baixo risco de danos aos rins, sendo assim seguras para pacientes com insuficiência renal (PATIL, 2018).

Figura 4. Derivados pirimidínicos de drogas de sulfa.



	R	R ₁	R ₂
Sulfadiazina	H	H	H
Sulfamerazina	H	CH ₃	H
Sulfadimidina	H	CH ₃	CH ₃

Fonte: Patil (2018).

Antimicrobianos são agentes importantes no combate de patógenos. Ao longo dos anos, a resistência a antibióticos se tornou um problema mundial. Tal fato se deve principalmente ao uso indiscriminado de medicamentos, pois as bactérias com o passar do tempo, se adaptam aos antibióticos, adquirindo assim, mecanismos de defesa contra o mesmo. Por tanto, a ciência sempre está em busca de desenvolver medicamentos mais potentes contra bactérias patogênicas (CHANDRA et al., 2017).

Compostos pirimidínicos apresentam atividade antagônica para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando possuir um amplo espectro de ação (RANI et al., 2016). Existem alguns antibióticos análogos de pirimidinas, os mais simples deles são a bacimetrina (5-hidroximetil-2-metoxipirimidina-4-amina), é usado na terapêutica no combate de infecções estafilocócicas, tendo sido descoberto da década de 1960. O Gourgetin é um derivado de citosina ativo contra micobactérias, além de demonstrar ação antagônica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (PATIL, 2018).

Em estudo recente Kahrman et al. (2019), obtiveram uma nova série de análogos pirimidínicos 2,4,6 trissubstituídos com atividade antibacteriana alta para bactérias Gram-positivas, com concentração mínima inibitória (CMI) $< 7,81 \mu\text{g/mL}$ para *Streptococcus gordonii*, enquanto que os antibióticos sulbactam + cefoperazona apresentaram um CMI de $125 \mu\text{g/mL}$ para a mesma cepa.

Hafez et al. (2016) investigaram a CMI de derivados pirazolo[4,3-d]-pirimidina para cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus lactis* e *Staphylococcus aureus*, obtendo uma concentração mínima de inibição dos análogos pirimidínicos frente as cepas testadas variando entre $5-50 \mu\text{g/mL}$. Alguns compostos demonstraram ser mais potente que o antibiótico cefatoxima, com CMI variando entre $10-15 \mu\text{g/mL}$.

Além de estudos a respeito das propriedades antimicrobianas dos análogos pirimidínicos, outros numerosos trabalhos descrevem particularidades dos efeitos biológicos de compostos contendo o anel pirimidínico.

Trabalhos recentes demonstram o potencial antiparasitário de compostos pirimidínicos. Chaturvedi et, al. (2018) sintetizou uma série de vinte compostos (3, 2-a) pirimidinas, em que duas moléculas apresentaram atividade promissora leishmanicida com concentração inibitória 50% (IC 50%) entre $42, \text{mM}$ e $25,1 \text{mM}$,

enquanto que o medicamento de referência mitefosina apresentou IC 50% de 37,68 mM. Alzahrani et, al. (2017) relatam em seu trabalho uma série de nucleosídeos de pirimidinas 5'- norcabocíclicos, com destaque para o composto 21, que apresentou um IC 50% de 8 μ M para cepas de selvagens de *T. brucei*.

Nosso grupo LSPQN (Laboratório de Sínteses e Química de Produtos Naturais) de pesquisa em uma recente publicação descreve a síntese de 28 derivados de pirimidina, dos quais oito eram novos. Todos os 28 compostos foram avaliados in vitro contra dois diferentes estágios do *Trypanosoma cruzi*: epimastigota e tripomastigotas. Nove compostos apresentaram maior atividade que o benzonidazol (BZN) para tripomastigotas. Também fizemos um estudo de modelagem molecular usando o programa GOLD 5.2 forneceram informações sobre os locais de interações hidrofílicas e hidrofóbicas da pirimidina com a enzima cruzaina (DE MELO et al., 2018).

Diante da importância das pirimidinas para a vida, os estudos relatados se mostram animadores para pesquisas futuras desses heterocíclis e suas aplicações biológicas.

2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA ÀS DROGAS COMERCIAIS

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming foi um marco no século XX. Tal acontecimento proporcionou o combate e erradicação de doenças causadas por bactérias patogênicas, que costumavam levar enfermos a óbito (YILMAZ; ÖZCENGİZ, 2017).

Contudo, no início dos anos 1970, mesmo com a variedade de agentes antimicrobianos, surgiram novas infecções bacterianas que na época possuíam medicamentos apropriados. Os patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis* passaram a ser resistentes a vários antibióticos. (DAVE et al., 2018; ELISHA et al., 2017), provavelmente o uso não racional e por vezes indiscriminado de antimicrobianos, a exemplo do uso extensivo como agentes promotores do crescimento na alimentação animal e, com o aumento do acesso ao as vias de deslocamento geográfico resultou na resistência de bactérias a antimicrobianos

atravessarem barreiras geográficas, existe correlação direta entre o uso de antimicrobianos e a extensão da resistência antimicrobiana (ELISHA et al., 2017).

A Organização Mundial da Saúde apontou como um problema de saúde pública o isolamento de bactérias multirresistentes a antibióticos, portanto, ao longo dos anos esse assunto se tornou amplamente estudado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Em países em desenvolvimento as causas para a resistência a drogas são bastante complexas e podem estar relacionadas à educação inadequada dos pacientes, a prescrição errônea de medicamentos, bem como, a venda não autorizada de antibióticos (AYUKEKBONG; NTEMGWA; ATABE, 2017). Esses micro-organismos são frequentemente associados a infecções hospitalares, principalmente em idosos, causando quadros de pneumonia, infecções urinárias, feridas cirúrgicas, queimaduras, septicemia e infecções associadas a cateteres, inclusive uma das principais causas de morte nos EUA antes do advento dos antibióticos e ainda possuem altas taxas em países em desenvolvimento (AYUKEKBONG; NTEMGWA; ATABE, 2017).

A incidência de surtos bacterianos associada a taxas crescentes do isolamento de bactérias multirresistentes a antibióticos, têm preocupado as autoridades da saúde, representando gastos econômicos, isso motivou a The Infectious Disease Society of America (IDSA) a lançar um programa que visa desenvolver 10 novos antibióticos de uso sistêmico até 2020 (GOULD et al., 2012).

A resistência bacteriana é um desafio difícil de ser superado, portanto a ciência vem desenvolvendo estratégias para minimizar a resistência de drogas. Uma das formas de proteger antimicrobianos, que tendem a cair em desuso decorrente da crescente multirresistência, é associá-los com adjuvantes, que são compostos com nenhuma ou baixa ação antimicrobiana, porém possuem a capacidade de potencializar drogas (WRIGHT, 2016).

Nesse contexto, pesquisas sobre novas substâncias antimicrobianas devem ser continuadas, bem como, têm sido pesquisadas novas estratégias de terapias antimicrobianas já existentes associadas a novas drogas.

2.4 LEISHMANIOSES, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por aproximadamente 20 espécies e subespécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo e são transmitidas aos humanos e a outros mamíferos a partir da picada da fêmea de flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. São consideradas doenças endêmicas que atingem principalmente populações de baixa renda em países subdesenvolvidos, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais (ORYAN; AKBARI, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são predominantes em quatro continentes: América, África, Ásia e Europa, isso significa que por ano aproximadamente 1,3 milhão de novos casos. No Brasil, os casos de leishmaniose aumentaram de 2.971 em 2003 para 3.118 em 2012 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

As manifestações clínicas das leishmanioses podem ser divididas em duas grandes classes: leishmaniose tegumentar americana (LTA) subdivida em cutânea, cutânea difusa e mucocutânea, e leishmaniose visceral (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Leishmaniose cutânea (LC): causada geralmente pelos gêneros *L. mexicana*, *L. tropica*, *L. major* e *L. braziliensis*, é a forma mais comum da doença, conhecida popularmente como úlcera de Bauru ou ferida brava em áreas expostas do corpo, tais como, face, braços e pernas, sendo tratável dentro de alguns meses, porém causa dor por um longo período de tempo e deixa cicatrizes na maioria dos casos (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Leishmaniose mucocutânea: causada geralmente pelo gênero *L. braziliensis*, provoca lesões que podem destruir parcial ou totalmente as membranas mucosas como nariz, boca e garganta; podem provocar congestão nasal persistente, hemorragias e sintomas faríngeos, tais como rouquidão, que posteriormente progride para ulceração (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Leishmaniose cutânea difusa: este tipo de manifestação é uma forma rara da

doença, caracterizada por pápulas ou nódulos cutâneos, sendo uma forma mais grave da leishmaniose cutânea, causando lesões queloidianas e pode ser causada geralmente pelos gêneros *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* e *L. pifanoi*, (REVEIZ et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Leishmaniose visceral (LV): também conhecida como Calazar é transmitida principalmente pelos gêneros *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, é caracterizada por surtos de febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e anemia Trata-se da forma mais grave das leishmanioses (ORYAN; AKBARI, 2017; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

3 MÉTODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DOS ANÁLOGOS PIRIMIDÍNICOS

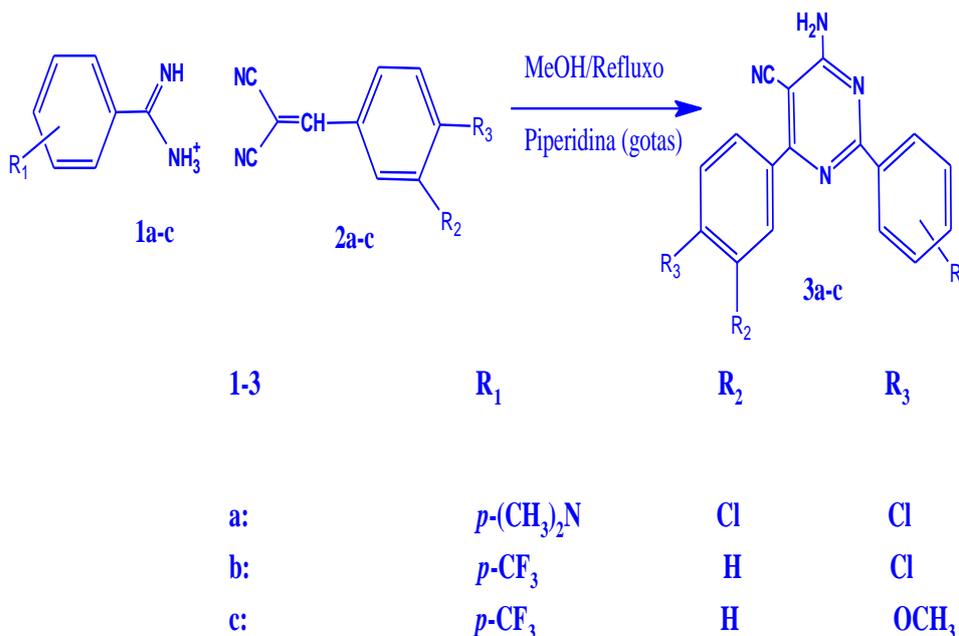
3.1.1 Síntese das amidinas

Inicialmente sintetizou-se as amidinas (**1a-c**), utilizando-se método descrito por Pinner (1892). Este método necessita duas etapas, a primeira sendo a síntese do iminoéter por reação de nitrilas, de etanol e de ácido clorídrico gasoso. Os iminoéteres não são sempre isolados. O mais frequente, eles são submetidos diretamente à ação do amoníaco: segunda etapa.

3.1.2 Síntese de 4-amino-pirimidina-5-carbonitrila (**3a-c**)

A reação entre as amidinas com o aldeído aromático adequado e malonitrila, sob agitação e em refluxo por 07 horas (DE MELO et al, 2002) promoveu a formação dos 4-amino-2-aril-5-ciano-6-arilpirimidinas (**3a-c**).

Figura 5. Esquema reacional para síntese dos análogos pirimidínicos **3a-c**.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antagônica foi determinada de acordo com a norma M 100-S25 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). As cepas usadas neste estudo, *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 731) *Acinetobacter baumannii* (UFPEDA 1024b), *Acinetobacter baumannii* (UFPEDA 1025b), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), foram gentilmente cedidas pela Coleção de culturas do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).

Para determinar da concentração mínima inibitória (CMI), os micro-organismos foram previamente semeados em tubo inclinado contendo ágar Muller Hinton e incubados por 24 h a 37 °C. Após esse período foram preparadas suspensões bacterianas e na sequência as amostras foram analisadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 625 nm, até obter uma densidade ótica entre 0,08 a 0,13 (aproximadamente 10⁸ UFC/mL). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 180µL de caldo Müeller Hinton (MH) e, em seguida, foram feitas diluições seriadas dos análogos pirimidínicos nas concentrações de 1000 µg/mL a 1,95 µg/mL, posteriormente foram pipetadas 10µL da suspensão bacteriana em concentração final padronizada de 10⁵ UFC/mL. Como controle positivo utilizou-se, o meio de cultura com a suspensão bacteriana sem os compostos e como controle negativo foi utilizado apenas o caldo MH. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 20 µL de solução de rezasurina a 0,001% e reincubados por duas horas, para observar se houve crescimento bacteriano nos poços. Os poços que não apresentaram crescimento bacteriano foram semeados em placas de petri, com o meio Ágar Mueller Hinton, para determinar a concentração mínima bactericida (CMB) dos compostos frente as cepas testadas.

3.3 ATIVIDADE SINÉRGICA

A atividade sinérgica dos análogos pirimidínicos foi realizada de acordo com a metodologia do tabuleiro de xadrez (LORIAN, 2005), com o antibiótico Ampicilina com Sulbactam, para as duas cepas de *A. baumannii*.

Os efeitos sinérgicos foram expressos como inibidores fracionados das concentrações de (CIF) e (ICIF). No qual o CIF A (CMI da menor associação do agente antimicrobiano com o composto/ CMI do antimicrobiano isolado) é somado ao CIF B (CMI do composto associado com o agente antimicrobiano/ CMI do composto isolado). Valores de $ICIF \leq 0,5$ foram interpretados como sinérgicos; $0,5 \leq ICIF \leq 0,75$ parcialmente sinérgico. $0,75 < ICIF < 2$ efeito aditivo; $2 \leq ICIF \leq 4$ efeito indiferente; > 4 é considerado efeito antagônico (LORIAN, 2005).

3.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA BACTERIANA PELA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para determinar os efeitos do antimicrobiano, do derivado pirimidínico (**3-a**), bem como o sinergismo entre eles, na morfologia da bactéria *A. baumannii* (1024b). Foram feitos ensaios semelhantes ao CMI, porém em concentrações sub inibitórias, da cepa bacteriana frente ao antibiótico Ampicilina com sulbactam, o composto pirimidínico (**3-a**) e a combinação sinérgica.

A análise morfológica em MEV, foi realizada de acordo com a metodologia de Veras (2014). As culturas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas, para posterior fixação em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 2,5% (Sigma Aldrich). A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1% (Sigma Aldrich).

Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol de 30% a 100% (Sigma50 Aldrich). Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem do material seco em suportes metálicos. Em seguida, foi realizada a metalização com cobertura do material por uma fina camada de ouro, para visualização da superfície

dos isolados bacterianos no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOLJSM-5600 LV do NPT do CPqAM/FIOCRUZ.

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 A atividade antioxidante DPPH

A capacidade de sequestro de radicais livres dos compostos pirimidínicos foi medida usando o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilil estável (DPPH), como descrito por Blois, (1958), com modificações. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 40µL de diferentes concentrações dos análogos pirimidínicos (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL), em seguida foram pipetados 260 µL da solução de DPPH em etanol em 1 mM. Após o tempo de incubação (25 min) à temperatura ambiente, protegido da luz, as absorvâncias foram medidas a 517 nm em leitor de microplacas (Hewlett-Packard, modelo 8453). Utilizou-se como controle a solução de DPPH adicionada ao metanol, o branco foi metanol. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. O sequestro de radicais DPPH foi calculado pela fórmula: efeito de limpeza (%) = $[(Ac-As) / (Ac)] \times 100$. Ac = controle de absorvância; As = absorvância da amostra.

3.5.2 Atividade de eliminação de radicais cátions de ABTS

A atividade de eliminação de radicais cations de ABTS foi realizada utilizando o método relatado por Jiang et al. (2018), com ligeiras modificações. Resumidamente, uma solução estoque de ABTS (7 mM) em etanol e um persulfato de potássio solução (140 mM) foi preparada. O radical ABTS foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL do solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 16 h. Posteriormente, 1 mL desta mistura foi diluído em álcool etílico até uma absorvância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453). Usando 40 µl de diferentes concentrações dos análogos pirimidínicos (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL), 260 µL de solução ABTS após 5 min da mistura inicial. Foi usado como amostra de controle a solução ABTS adicionada ao etanol. O branco foi etanol. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula: efeito de eliminação

(%) = $[(Ac - As) / (Ac)] \times 100$. Ac = Absorbância da solução ABTS sem amostra, como = amostra Absorbância.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

3.6.1 Atividade forma promastigota

A formas promastigotas de *L. amazonenses* (cepa WHOM/00 LTB-0016) foram incubados (1×10^6 células / mL, meio de Schneider com 10% de soro bovino fetal) em uma placa de 96 poços com compostos em oito diferentes concentrações (1,5 a 200 µg / mL) por 72h a 26°C. A miltefosina foi utilizada como medicamento de referência e o DMSO como controle negativo. Células sem tratamento foram usadas como controles negativos. O crescimento celular foi avaliado e o IC 50% / 72h foi determinado por análises de regressão. Os ensaios foram realizados em triplicata (DOS SANTOS ALIANÇA et al., 2017).

3.6.2 Atividade forma amastigota

Para a obtenção de amastigotas, os macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados (3×10^5 células / mL) em uma placa de 24 poços com lamínula de vidro de 13 mm e deixados aderir por 24h, a 37 ° C em CO₂ a 5%. Os macrófagos aderidos foram então infectados com amastigotas de *L. amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB-0016) na fase estacionária de crescimento usando uma razão 1:15 a 37 ° C por 6 h. Em seguida, os parasitas não-interiorizados foram removidos por lavagem e a cultura infectada foi incubada durante 24 horas em meio RPMI completo 1640 (controle negativo) e tratada com compostos (6,25 a 200 µg / mL). As lamínulas foram coletadas e coradas pelo kit de coloração Panótico (Laborclin, PR, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de 100 células e seus amastigotas intracelulares, em triplicata. A atividade de Leishmanicida foi avaliada pela diminuição de macrófagos infectados e amastigotas intracelulares em culturas tratadas (T) e não

tratadas (NT), descritas pela fórmula: % amastigotas = $T \times NT / 100$. O IC 50% foi determinado por análises de regressão (DOS SANTOS ALIANÇA et al., 2017).

3.7 CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS

Os macrófagos RAW 264.7 foram utilizados para avaliar a citotoxicidade celular pelo ensaio brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). Células (1×10^5 células / poço) foram colocados em placas de 96 poços e incubadas por 24h (37°C, 5% CO₂) para adesão. Os compostos foram adicionados, em seis concentrações (6,2 a 200µg / mL) e incubados por 48 h. Foram utilizados DMSO e miltefosine como controle. Após incubação com os compostos, adicionou-se MTT a 5 mg / mL em PBS. Duas horas depois, o meio de cultura de células foi aspirado e 100 µL de DMSO foram adicionados para solubilização de cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570 nm. Concentração citotóxica para 50% de inibição da viabilidade (CC 50%) foi calculada por análise de regressão usando o software Prism GraphPad. Os ensaios foram realizados em triplicata (DOS SANTOS ALIANÇA et al., 2017).

4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ANÁLOGOS PIRIMIDÍNICOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO E SINÉRGICO

Silva, W.J.L¹; Monte, Z.S¹; Brayner, F. A²; Feitosa, A. P. S²; Alves, L. C²; Lima, G.M.S¹; Melo, S.J¹.

¹ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av Arthur de Sá, S/N – Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil

² Setor de Microscopia Eletrônica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil

Autor correspondente: Sebastião José de Melo; melosebastiao@yahoo.com.br

RESUMO

O surgimento rápido de bactérias resistentes tem causado preocupações nos sistemas de saúde em todo o mundo, devido a falta de antibióticos potentes o suficiente para combatê-las. Espécies de *Acinetobacter baumannii* são conhecidas na literatura por causarem morbidades no ambiente hospitalar, bem como, sua resistência pela maioria de antibióticos comercializados. O presente estudo testou diferentes análogos pirimidínicos frente a cepas de bactérias gram-positivas negativas. Esses compostos desempenham um papel importante no campo da Química Medicinal como analgésico, anti-inflamatório, antitumoral, antimicrobiano, entre outros. Em seguida, foram realizadas atividades sinérgicas entre os análogos pirimidínicos com o antibiótico Ampicilina com Sulbactam, com o intuito de averiguar a possível potencialização do referido antibiótico, frente a cepas de clínicas de *A. baumannii*. Os compostos testados apresentaram CMI nas concentrações 62,5 µg /mL a 250 µg /mL. Maior destaque para o composto **(3-a)** com atividade para *A. baumannii* UFPEDA 1025b na concentração de 62,5 µg /mL. No estudo da ação sinérgica foi

evidenciada uma redução da CMI em 16 vezes para o antibiótico e 4 vezes para o composto **(3-a)**. **(3-c)** conseguiu reduzir a CMI da droga testada em 64 vezes, após a combinação do antimicrobiano com **(3-c)**, houve uma redução do derivado pirimidínico de 125 µg/mL a 62,5 µg/mL, possuindo um efeito parcialmente sinérgico. Não foram evidenciadas redução de **(3-b)** para a CMI combinado, permanecendo assim o mesmo valor de quando sozinho, demonstrando, possuir um efeito aditivo para com o antibiótico. As imagens geradas na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) corroboraram com os resultados da determinação da CMI, bem como, os resultados da ação sinérgica entre os análogos pirimidínicos com o antibiótico. No presente estudo também foram avaliados o potencial antioxidante dos compostos, apresentando atividade antioxidante baixa à moderada para radicais de DPPH e ABTS. Os resultados obtidos no presente estudo são de grande valia, visto que há poucos trabalhos com análogos de pirimidinas que investiguem a ação sinérgica desses compostos com antimicrobianos já sensibilizados frente a bactérias de interesse clínico. Além do fato de não termos encontrado na literatura estudos que mostram o efeito de compostos pirimidínicos na morfologia bacteriana em nível de microscopia eletrônica de varredura.

Palavras-chaves: Pirimidinas. *Acinetobacter baumannii*. Sinergismo.

1 INTRODUÇÃO

O rápido surgimento de bactérias multirresistentes, se tornou um problema para os sistemas de saúde de todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a resistência aos antibióticos ocorre naturalmente por alterações genéticas, porém é acelerada pelo uso indiscriminado de medicamentos em pessoas e animais [1].

O ambiente hospitalar é o meio mais propício para o aumento e disseminação de bactérias resistentes, dependendo assim, de vários fatores, entre eles, o uso excessivo e inadequado de antibióticos, procedimentos invasivos, higiene precária das mãos dos profissionais de saúde, corroborando com a disseminação de patógenos [2].

Acinetobacter baumannii é uma bactéria Gram-negativa multirresistente, comumente associada a infecções hospitalares [3], incluindo doenças de pele, infecções no trato urinário e meningite secundária. Contudo, causam doenças infecciosas com altas taxas de mortalidades, que são pneumonia por associação à ventilação mecânica e infecções na corrente sanguínea [4].

A alta patogenicidade e resistência a antibióticos de *A. baumannii* se deve principalmente ao seu elevado grau de plasticidade genética. Possui vários mecanismos de defesa frente a antibióticos, como a produção de β -lactamases, sistema de bomba de e fluxo altamente eficiente, além de sua membrana externa possuir baixa permeabilidade a antibióticos [5].

Atualmente, a terapia combinada na clínica com dois ou mais agentes, que geralmente supera a resistência a múltiplas drogas, é uma abordagem importante para melhorar a eficiência e a biodisponibilidade do tratamento, bem como para o tratamento de doenças mistas [6, 7]. Entretanto, mais esforços estão sendo feitos para desenvolver novos agentes antimicrobianos com estruturas novas que possivelmente usem mecanismos diferentes dos medicamentos clínicos tradicionais [7-14].

A pirimidina é o membro mais importante de todas as diazinas, pois o sistema de anéis ocorre amplamente nos organismos vivos. A síntese de análogos de pirimidina tem atraído grande atenção, uma vez que uma ampla gama desses compostos desempenhou um papel importante no campo da química medicinal como analgésico, anti-inflamatório, antitumoral, antimicrobiano, entre outros [15-36].

Muitos estudos demonstraram que pirimidinas, como análogos de purinas podem competir com purinas para prevenir eficientemente a síntese de ácidos nucléicos e proteínas, inibindo assim o crescimento de vários micro-organismos e matando-os [37-39].

Recentemente, demonstramos que a pirimidina é uma parte essencial da atividade antimicrobiana e também apresenta atividades antibacterianas e antifúngicas significativas sendo eficazes contra bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* [40]. Isso sugere que, de acordo com seus diferentes mecanismos, as pirimidinas possuem um grande potencial de ação para um novo tipo de agente antimicrobiano.

Uma nova série de análogos pirimidínicos, incluindo 5-cianopirimidinas tri-substituídas em 2,4,6 a partir de 2-cianomalonitrilas e arilamidinas comercialmente disponíveis, orto-, meta- e para-substituídas, foi preparada para análise. Estes novos compostos sintetizados foram avaliados quanto as suas propriedades antimicrobianas para bactérias Gram-positivas e negativas. Além disso, o efeito sinérgico dos análogos pirimidínicos com o antibiótico ampicilina com sulbactam frente às cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* foi avaliado.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Química

As elucidações estruturais foram realizadas por meio dos métodos físicos: espectroscopia do infravermelho (modelos Perkin Elmer Spectrum 400 e IFS66 com transformada de Fourier) sendo as amostras preparadas como filmes finos ou pastilhas de KBr e as leituras obtidas na faixa de 650 a 4000 cm^{-1} e de ressonância magnética nuclear (^1H -RMN e de ^{13}C -RMN), por meio do espectrofotômetro Varian VNMRS operando 300 MHz e 75 MHz, respectivamente.

Os deslocamentos químicos foram obtidos em partes por milhão (ppm), tendo como padrão interno tetrametilsilano (TMS) que tem como deslocamento químico, δ , valor igual a 0,00ppm; e tendo usado dimetil sulfóxido deuterado (DMSO) como solvente, que apresenta $\delta = 2,5$ ppm.

Todas as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e as multiplicidades expressas em sinal amplo (b), singleto (s), duplete (d), tripleto (t) e multiplete (m).

Os rendimentos e ponto de fusão (modelo do fusiômetro Buchi B-540) dos compostos foram determinados.

Para a obtenção dos derivados pirimidínicos são necessários dois intermediários, o aduto de Knoevenagel ou intermediário de Michael substituído e as amidinas substituídas.

Os derivados pirimidínicos **3-a-c** foram obtidos a partir da reação entre quantidades equimolares (5,63 mmol) dos derivados da arilamidina **1a-c** e do intermediário de Michael **2a-c** utilizando-se como solvente metanol (20mL) em um

balão de fundo redondo, mantido sob agitação e em refluxo, no qual foram sendo adicionadas lentamente 10 gotas de piperidina, sendo necessárias em torno de 6 horas para a reação ser concluída, conforme metodologias utilizadas anteriormente [41].

O meio reacional foi mantido à temperatura ambiente, sendo que em alguns casos, houve a formação de cristais, que foram separados por filtração a vácuo, nos outros casos o solvente de reação foi evaporado sob pressão reduzida e o sólido resultante foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando sílica-gel como adsorvente, e diferentes sistemas de elucidação, com a polaridade sendo aumentada gradualmente, e em alguns casos houve ainda a necessidade de cristalização para a purificação definitiva.

O acompanhamento das reações e a verificação da pureza dos produtos finais foram realizadas por cromatografia em camada delgada (sílica gel pré-revestida em placas de alumínio (60 mash, contendo indicador fluorescente F254, Merck) e a visualização das manchas foi realizada sob luz ultravioleta (UV) a 254 nm.

2.2 Atividade antibacteriana

A atividade antagônica foi determinada de acordo com a norma M 100-S25 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [42,43]. As cepas usadas neste estudo, *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 731) *Acinetobacter baumannii* (UFPEDA 1024b), *Acinetobacter baumannii* (UFPEDA 1025b), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), foram gentilmente cedidas pela Coleção de culturas do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).

Para determinar da concentração mínima inibitória (CMI), os micro-organismos foram previamente semeados em tubo inclinado contendo ágar Muller Hinton e incubados por 24 h a 37 °C. Após esse período foram preparadas suspensões bacterianas e na sequência as amostras foram analisadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 625 nm, até obter uma densidade ótica entre 0,08 a 0,13 (aproximadamente 10⁸ UFC/mL). Em microplacas de 96 poços foram adicionados

180µL de caldo Müller Hinton (MH) e, em seguida, foram feitas diluições seriadas dos análogos pirimidínicos nas concentrações de 1000 µg/mL a 1,95 µg/mL, posteriormente foram pipetadas 10µL da suspensão bacteriana em concentração final padronizada de 10^5 UFC/mL [42]. Como controle positivo utilizou-se, o meio de cultura com a suspensão bacteriana sem os compostos e como controle negativo foi utilizado apenas o caldo MH. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 20 µL de solução de rezasurina a 0,001% e reincubados por duas horas, para observar se houve crescimento bacteriano nos poços. Os poços que não apresentaram crescimento bacteriano foram semeados em placas de petri, com o meio Ágar Mueller Hinton, para determinar a concentração mínima bactericida (CMB) dos compostos frente as cepas testadas.

2.3 Atividade Sinérgica

A atividade sinérgica dos análogos pirimidínicos foi realizada de acordo com a metodologia do tabuleiro de xadrez com o antibiótico Ampicilina com Sulbactam, para as duas cepas de *A. baumannii* [44].

Os efeitos sinérgicos foram expressos como inibidores fracionados das concentrações de (CIF) e (ICIF). No qual o CIF A (CMI da menor associação do agente antimicrobiano com o composto/ CMI do antimicrobiano isolado) é somado ao CIF B (CMI do composto associado com o agente antimicrobiano/ CMI do composto isolado). Valores de $ICIF \leq 0,5$ foram interpretados como sinérgicos; $0,5 \leq ICIF \leq 0,75$ parcialmente sinérgico. $0,75 < ICIF < 2$ efeito aditivo; $2 \leq ICIF \leq 4$ efeito indiferente; > 4 é considerado efeito antagônico.

2.4 Análise da morfologia bacteriana pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para determinar os efeitos do antimicrobiano, do derivado pirimidínico (**3-a**), bem como o sinergismo entre eles, na morfologia da bactéria *A. baumannii* (1024b). Foram feitos ensaios semelhantes ao CMI, porém em concentrações sub inibitórias, da cepa bacteriana frente ao antibiótico ampicilina com sulbactam, o composto pirimidínico (**3-a**) e a combinação sinérgica.

A análise morfológica em MEV, foi realizada de acordo com a metodologia de Veras (2014) [45]. As culturas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas, para posterior fixação em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 2,5% (Sigma Aldrich). A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1% (Sigma Aldrich).

Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol de 30% a 100% (Sigma50 Aldrich). Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem do material seco em suportes metálicos. Em seguida, foi realizada a metalização com cobertura do material por uma fina camada de ouro, para visualização da superfície dos isolados bacterianos no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOLJSM-5600 LV do NPT do CPqAM/FIOCRUZ.

2.5 Atividade antioxidante

2.5.1 A atividade antioxidante DPPH

A capacidade de sequestro de radicais livres dos compostos pirimidínicos foi medida usando o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilil estável (DPPH), como descrito por Blois, (1958) [46], com modificações. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 40µL de diferentes concentrações dos análogos pirimidínicos (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL), em seguida foram pipetados 260 µL da solução de DPPH em etanol em 1 mM. Após o tempo de incubação (25 min) à temperatura ambiente, protegido da luz, as absorbâncias foram medidas a 517 nm em leitor de microplacas (Hewlett-Packard, modelo 8453). Utilizou-se como controle a solução de DPPH adicionada ao metanol, o branco foi metanol. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. O sequestro de

radicais DPPH foi calculado pela fórmula: efeito de limpeza (%) = $[(Ac-As) / (Ac)] \times 100$. Ac = controle de absorvância; As = absorvância da amostra.

2.5.2 Atividade de eliminação de radicais cations de ABTS

A atividade de eliminação de radicais cations de ABTS foi realizada utilizando o método relatado por Jiang et al. (2018) [47], com ligeiras modificações. Resumidamente, uma solução estoque de ABTS (7 mM) em etanol e um persulfato de potássio solução (140 mM) foi preparada. O radical ABTS foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL do solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 16 h. Posteriormente, 1 mL desta mistura foi diluído em álcool etílico até uma absorvância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453). Usando 40 µl de diferentes concentrações dos análogos pirimidínicos (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL), 260 µL de solução ABTS após 5 min da mistura inicial. Foi usado como amostra de controle a solução ABTS adicionada ao etanol. O branco foi etanol. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula: efeito de eliminação (%) = $[(Ac - As) / (Ac)] \times 100$. Ac =Absorvância da solução ABTS sem amostra, como = amostra Absorvância.

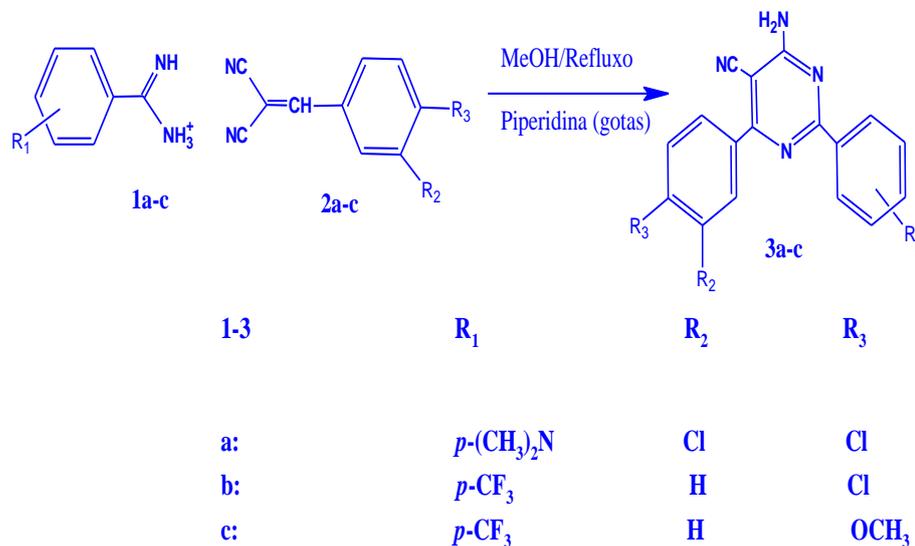
3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Química

Tendo em vista as propriedades biológicas e farmacológicas associadas às pirimidinas, suscitou-se a idéia de sintetizarmos uma nova série de compostos pirimidínicos **3a-c**(Esquema 1) com rendimentos de 52 a 59% com atividade antimicrobiana e leshimanicida, superior ou similar aos análogos desses compostos já descritos na literatura.

A síntese dos compostos **3a-c**ocorreram com a ciclização da arilamidinas substituídas**1a-c** e bisnitrilas substituídas**2a-c**em presença de piperidina, como base, a síntese ocorreu em aproximadamente 6 horas.

Figura 1. Esquema reacional para síntese dos análogos pirimidínicos **3a-c**.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os compostos foram caracterizados por métodos físicos ¹H RMN, ¹³C RMN, e infravermelho. Os espectros ¹H RMN demonstraram características de hidrogênios com sinais de singletos, dubletos multipletos para os prótons característicos de grupos de metileno, metoxi e dimetilamino e também de grupo de prótons de aromáticos. Os espectros ¹³C-RMN demonstraram sinais característicos hibridizações de carbonos sp, sp² e sp³ atribuídos para carbonos conectados a átomos de hidrogênios, oxigênio, cloro e nitrogênios.

Sendo assim, a seguir serão apresentadas as elucidações estruturais: RMN além de caracterizá-los por espectroscopia IV.

4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-diclorofenil)pirimidina **(3-a)**:
 Cristalizado em MeOH, 59% de rendimento, p.f. 271-272, R_f = 0.38; (n-hexanoacetato de etila, 7:3); IR, KBr, μmax cm⁻¹ : 3436 (NH₂asim.), 3326 (NH₂sim.), 2227 (CN), 1647(C=N) 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ: 8.76 (s, 1H, H^{2''}); 8.73 (d, 2H, J 8.4 Hz, H^{2'} e H^{6'}); 8.45-8.36 (m, 1H, H^{5''}); 7.92-7.85 (m, 1H, H^{6''}); 7.57-7.52 (b, 2H, C²-NH₂); 7.23 (d, 2H, J 8.4 Hz, H^{3'} e H^{5'}) e δ 3.10 (s, 6H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ: 166.9 (1C, C²) ; 164.5 (1C, C^{1''}); 164.0 (1C, C⁶) ; 158.7 (1C, C^{4'});

131.7 (1C, C5''); 131.5 (1C, C4''); 128.8 (1C,C16''); 128.6 (1C, C6''); 128.5 (1C, C3''); 128.4 (1C, C2''); 128.2 (2C, C2' e C6'); 128.2 (1C, C1'); 128.0 (2C, C3 e C5''); 128.4 (2C, C3' e C5'); 116.2 (1C, C4) ; 81.9 (1C, C5) ; e δ 43.51 (2C,C1''').

4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-clorofenil)-primidina (**3-b**): Cristalizado em MeOH, 52% de rendimento, m.p. 263-262, $R_f = 0.30$ (n-hexano-acetato de etila 7:3); IV, KBr, $\mu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3117 (NH₂asim.), 3039 (NH₂sim.), 2230 (CN), 1602 (C=N); 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ 8.55 (b, 2H, C2-NH₂); 8.27 (d, 2H, J = 9.3 Hz, H3' e H5'); 7.94 (d, 2H, J 11.4 Hz, H2'' e H6''); 7.71 (d, 2H, J = 11.4 Hz, H3'' e H5'') e 7.19 (d, 2H, J 9.9 Hz, H2' e H6'); 13C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 164.3 (1C, C2) ; 160.4 (1C, C1'''); 160.1 (1C, C6) ; 139.0 (1C, C1'); 133.3 (1C,C4''); 132.1 (2C, C2' e C6'); 130.0 (2C, C3' e C5'); 129.7 (1C, C4'); 128.1 (2C, C2'' e C6''); 124.1 (1C, C1''); 115.2 (2C,C1'''); 114.8 (1C, C4) ; 113.9 (2C, C3'' e C5'') e 82.2 (1C, C5).

4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-anisil)-pirimidina (**3-c**): Cristalizado em MeOH, 57% de rendimento, p.f. 239-238, $R_f = 0.35$ (n-hexano-acetato de etila 7:3); IV, KBr, $\mu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3217 (NH₂asim.), 3099 (NH₂sim.), 2230 (CN), 1602 (C=N); 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ 8.40 (b, 2H, C2-NH₂); 7.98 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H3' e H5'); 7.67 (d, 2H, J 9.3 Hz, H2'' e H6''); 7.19 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H3'' e H5'') e 6.68 (d, 2H, J 9.3 Hz, H2' e H6'); 13C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.1 (1C, C4''); 164.3 (1C, C2) ; 160.4 (1C, C1'''); 158.4 (1C, C6) ; 150.9 (1C, C1'); 143.1 (2C, C2'' e C6''); 140.1 (2C, C2' e C6'); 139.1 (2C, C3' e C5'); 133.3 (1C,C4'); 124.1 (1C, C1''); 118.4 (2C,C1'''); 114.8 (1C, C4) ; 113.0 (2C, C3'' e C5''); 76.8 (1C, C5) e 55.9 (1C,C1''').

3.2 Atividade antimicrobiana

Os compostos testados apresentaram uma atividade antimicrobiana com amplo espectro, demonstrando ação antagônica frente a bactérias Gram-positivas e negativas nas concentrações de 62,5 µg /mL a 250 µg /mL. Maior destaque para o composto **3-a** com atividade para *A. baumannii* UFPEDA 1025b na concentração de 62,5 µg /mL (Tabela 1).

Figueiredo et al. (2018) [48] sintetizaram uma série de barbitúricos, que são derivados de pirimidinonas, apenas três compostos substituídos em p-nitrofenil apresentaram atividade antagônica para *A. baumannii* significativas, com concentração inibitória entre 12,5 µM/mL a 25 µM/mL. As outras moléculas, que não possuíam o grupo nitrofenil na posição para, não apresentaram atividade antagônicas significativas frente ao mesmo micro-organismo, CMI > 200 µM/mL. O que mostra que a substituição adequada em análogos pirimidínicos pode favorecer suas atividades.

O análogo pirimidínico 3-a, sintetizado para o presente estudo, se mostrou mais potente que os demais, com CMI variando entre 62,5 µg/mL a 500 µg/mL, enquanto que os demais compostos apresentaram CMI entre 125 µg/mL a 1000 µg/mL. A halogenação melhora a atividade biológica de compostos heterocíclicos. Os efeitos eletrônicos indutivos (- I) e mesoméricos (+ M), exercidos pelos halogêneos, aumentam a interação dos compostos aromáticos com o receptor [49]. Presença de halogêneos em compostos heterociclos podem também aumentar a atividade por efeito estérico, causando impedimentos na rotação livre da molécula, o que melhora a interação fármaco-receptor [49].

Tal resultado é de grande importância, visto que, *A. baumannii* é uma espécie comumente associada a infecções hospitalares. Que acometem o trato respiratório de pacientes hospitalizados, assim como outras enfermidades, como a sepse e a meningite. Essa espécie se caracteriza, por possuir alta resistência a maioria dos antibióticos existentes. O que pode comprometer a terapêutica de pacientes acometidos por esse patógeno [50, 51].

Tabela 1. Concentração inibitória mínima [MIC (em $\mu\text{g mL}^{-1}$)] valores dos análogos pirimidínicos sintetizados, e agentes antimicrobianos padrão em ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

COMPOSTOS	CMI/CMB	<i>S. aureus</i> (UFPEDA 02)	<i>E. faecalis</i> (UFPEDA 138)	<i>E. coli</i> (UFPEDA224)	<i>K. pneumoniae</i> (UFPEDA 396)	<i>P. aeruginosa</i> (UFPEDA 416)	<i>A. baumannii</i> (UFPEDA 1024b)	<i>A. baumannii</i> (UFPEDA 1025b)
3-a	CMI	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	62,5 $\mu\text{g/mL}$
	CMB	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	62,5 $\mu\text{g/mL}$
3-b	CMI	125 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
	CMB	250 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
3-c	CMI	1000 $\mu\text{g/mL}$	> 1000 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
	CMB	1000 $\mu\text{g/mL}$	—	1000 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
Cefoxitina							> 256 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$
Ampicilina + sulbactam							16 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$
Gentamicina		0,25 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/MI}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$		

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3 Atividade Sinérgica

O sinergismo se caracteriza por ser um efeito mútuo em que a atividade de dois componentes ou mais é potencializada pela combinação em concentração inferior a CMI. Os efeitos sinérgicos dos compostos pirimidínicos foram investigados para as cepas da bactéria *A. baumannii* UFPEDA 1024b e UFPEDA 1025b, diante da sua importância clínica e por apresentarem perfil de sensibilidade resistente e intermediário, respectivamente, ao antibiótico Ampicilina + sulbactam.

O antimicrobiano Ampicilina + sulbactam apresentou uma CMI de 4 µg/mL para a *A. baumannii* UFPEDA 1025b, porém quando combinado com o composto **3-a** a CMI foi reduzida para 0,25 µg/mL. Concomitante a isso, o derivado pirimidínico **3-a**, que possuía uma CMI sozinho de 62,5 µg/mL, quando combinado com o antimicrobiano baixou para 15,62 µg/mL, obtendo com isso, um ICIF de 0,3124. Diante disso, observou-se que houve uma redução do CIM em 16 vezes para o antibiótico e 4 vezes para o composto (Tabela 2).

O composto **3-a** reduziu a CMI do antimicrobiano em 64 vezes para *A. baumannii* UFPEDA 1024b. O mesmo passou de 16 µg/mL para 0,25 µg/mL, após ser combinado com o derivado pirimidínico. Foi observado redução da CMI desse composto, com CMI de 62,5 µg/mL isoladamente e posteriormente na combinação apresentaram CMI de 15,62 µg/mL. Apresentando assim, um ICIF de 0,26 para o análogo pirimidínico **3-a**.

O composto **3-c** após a combinação com antibiótico apresentou uma redução do CMI para *A. baumannii* UFPEDA 1024b, houve redução do antimicrobiano, em 16 vezes, porém não foram evidenciadas redução de **3-b** para a CMI combinada, permanecendo assim o mesmo valor de quando sozinho, demonstrando, possuir um efeito aditivo para com o antibiótico. **3-c** conseguiu reduzir a CMI da droga testada em 64 vezes, após a combinação do antimicrobiano com **3-c**, houve uma redução do derivado pirimidínico de 125 µg/mL a 62,5 µg/mL. Possuindo um efeito parcialmente sinérgico, com um ICIF de 0,515.

Trabalhos que investiguem a atividade sinérgica de análogos pirimidínicos são escassos na literatura. Sharma et al. (2016) [52], obtiveram compostos que demonstraram reduzir a CMI da Rifampicina para cepas de *E. coli* de 4 a 5 vezes,

enquanto que a CMI dos compostos, quando combinado com a Rifampicina, foram reduzidos em 5 a 10 vezes, demonstrando assim, que derivados pirimidínicos possuem potencial sinérgico, o que corrobora com os resultados do presente artigo.

Tabela 2. Determinação da atividade antimicrobiana dos análogos pirimidínicos (3a-c) com o antibiótico padrão Ampicilina + Sulbactam (em combinação e associado) contra as cepas de *A. baumannii*.

Micro-organismo	Substância-teste	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		CIF	ICIF	Resultado
		Sozinho	Combinado			
<i>A. baumannii</i> (UFPEDA 1025b)	3-a	62,5 $\mu\text{g/mL}$	15,62 $\mu\text{g/mL}$	0,25	0,3124	Sinérgico
	Ampicilina + sulbactam	4 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,0625		
<i>A. baumannii</i> (UFPEDA 1024b)	3-a	125 $\mu\text{g/mL}$	31,25 $\mu\text{g/mL}$	0,25	0,26	Sinérgico
	Ampicilina + sulbactam	16 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,0156		
<i>A. baumannii</i> (UFPEDA 1024b)	3-b	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	1	1,0156	Efeito aditivo
	Ampicilina + sulbactam	16 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,0156		
<i>A. baumannii</i> (UFPEDA 1024b)	3-c	125 $\mu\text{g/mL}$	62,5 $\mu\text{g/mL}$	0,5	0,515	Parcialmente sinérgico
	Ampicilina + sulbactam	16 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,0156		

Legenda: CMI: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada.
Fonte: Elaborado pela autora.

3.4 Microscopia eletrônica

Para esclarecer se o composto **3-a** possui ação sinérgica com o antimicrobiano Ampicilina com sulbactam, imagens tridimensionais das células de *A. baumannii* (UFPEDA 1024b) foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Por meio das imagens geradas foi possível observar as alterações das células bacterianas frente ao antibiótico, ao análogo pirimidínico **3-a**, bem como, a ação sinérgica entre os mesmos (figura 2). A título de comparação com as substâncias mencionadas anteriormente, foram obtidas imagens tridimensionais de células bacterianas sem tratamento.

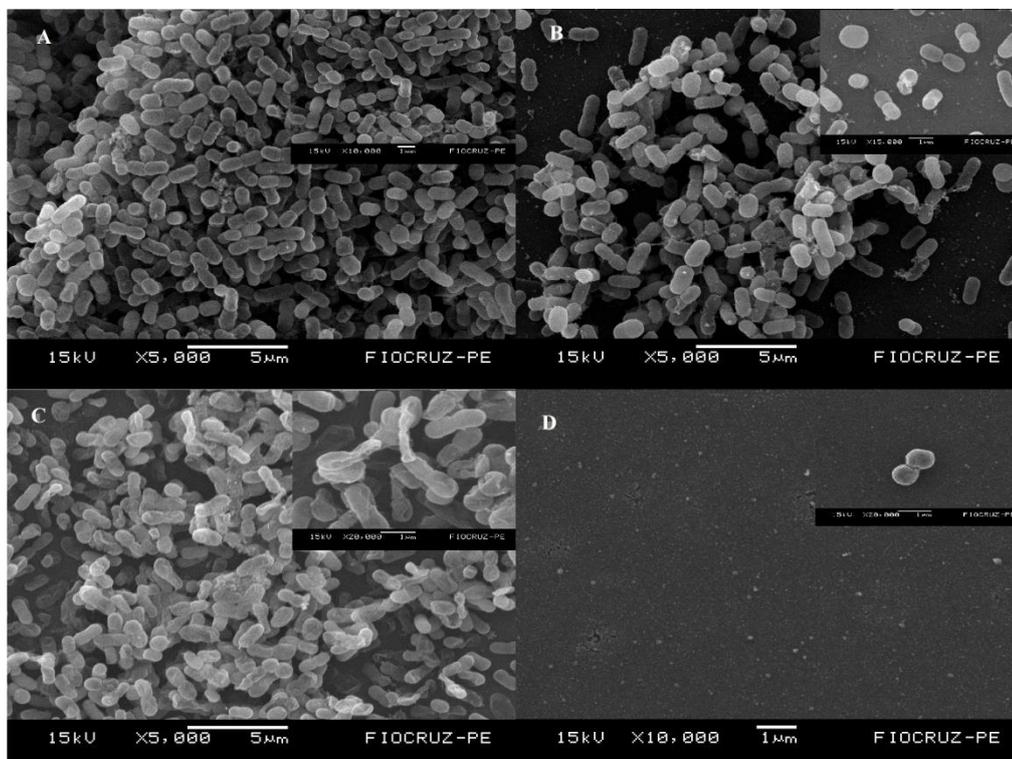
As imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) comprovam os resultados identificados por meio de testes quantitativos da Concentração Mínima Inibitória do composto **3-a**, o antibiótico e a ação sinérgica do análogo pirimidínico com o antimicrobiano. Todas as amostras analisadas foram realizadas com concentração sub inibitórias do antibiótico, bem como, do composto testado.

A análise das células do controle positivo da cepa de *A.baumannii* UFPEDA 1024b, por MEV, apresentaram numerosas células com morfologia bacteriana preservada na forma de cocobacilos, com comprimento de 5 μm (figura 2-A). Células que foram submetidas ao tratamento apenas com o antibiótico apresentaram morfologia bacteriana alongada, algumas células se mostraram morfológicamente disformes, com extravasamento de conteúdo intracelular (figura 2-B). De acordo com a MEV, as células tratadas com **3-a**, se mostraram, em grande maioria, disformes, rompidas, com extravasamento de conteúdo citoplasmático e número reduzido de células (figura 2-C). Por meio da MEV podemos evidenciar que as células que foram expostas a combinação sinérgica do antibiótico com **3-a**, apresentaram-se fragmentadas, com acentuado debri celular em toda a lâmina analisada, com raras células integras. Podemos evidenciar que as raras células integras encontradas apresentavam morfologia celular alterada, com comprimento de 1 μm (figura 2-D).

Estudos sinérgicos entre antibióticos e análogos pirimidínicos, que utilizam como recurso a microscopia eletrônica de varredura, não foram encontrados durante nossas pesquisas de referencial teórico, o que mostra o ineditismo do nosso trabalho

na investigação das propriedades combinadas de análogos pirimidínicos com antibióticos que já apresentem sensibilidades reduzidas a bactérias resistentes.

Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de células de *A. baumannii* UFPEDA 1024b.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Células controle positivo (A), células tratadas com o antibiótico (B), células tratadas com o composto **3-a** (C) e a ação sinérgica do antimicrobriano com o análogo pirimidínico (D).

3.5 Atividade antioxidante

Muitos efeitos nocivos ao organismo são causados por radicais livres, portanto a avaliação do potencial antioxidante de novos sequestradores de radicais livres é de fundamental importância.

Na análise de dados do potencial antioxidante, pelo método de descoloramento do DPPH (tabela 3), o composto **3-ase** apresentou mais ativo, com IC_{50%} de 374,91 µg/mL. O composto **3-c** apresentou IC_{50%} de 359,13 µg/mL. Enquanto que o composto **3-b** não apresentou IC_{50%} significativo.

Os compostos **3 a-c** também foram avaliados a suas capacidades de eliminação de radicais livres frente ao ABTS (Tabela 4). Assim como a avaliação da

atividade antioxidante pelo método DPPH, o derivado pirimidínico **3-a** apresentou melhor resultado, obtendo IC50% de 62,5 µg/mL. O composto pirimidínico **3-c** apresentou IC50% de 198,5 µg/mL. Porém o derivado pirimidínico **3-b** não mostrou atividade significativa para a eliminação de radicais livres pelo ABTS.

Nosso grupo LSPQN (Laboratório de Sínteses e Química de Produtos Naturais) de pesquisa, recentemente sintetizou e avaliou a capacidade antioxidante pelo método de descolorimento do radical DPPH, de análogos pirimidínicos. Apresentando moderada atividade antioxidante para dois compostos (**3-a** e **3-b**), com IC50% variando entre 17,09µg/mL e 18,05 µg/mL, respectivamente [53].

Tabela 3. Potencial antioxidante por DPPH – IC 50%.

Compostos	IC 50 % (µg/mL)
3-a	374,91
3-b	>1000
3-c	359,13

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4. Potencial antioxidante por ABTS – IC 50%.

Compostos	IC 50 % (µg/mL)
3-a	62,5
3-b	>1000
3-c	198,5

Fonte: Elaborado pela autora.

4 CONCLUSÃO

No presente estudo foram sintetizados uma série de 4-Amino-5-ciano-2-pirimidinas, em seguida esses compostos foram caracterizados por métodos físicos ^1H RMN, ^{13}C RMN, e infravermelho, comprovando assim, suas estruturas. Os análogos pirimidínicos apresentaram atividade moderada para cepas microbianas testadas, com destaque para o análogo pirimidínico **3-a**, que entre os compostos analisados, mostrou ser o mais ativo. Apresentando valores de CMI entre 62,5 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que os derivados pirimidínicos fluorados apresentaram valores de CMI entre 125 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$. O estudo sinérgico mostrou resultados promissores na busca de moléculas com potencial sinérgico para antimicrobianos com sensibilidade reduzida. O análogo pirimidínico **3-a** conseguiu reduzir o CMI do antibiótico, testado contra as cepas clínicas de *A. baumannii*, em até 64 vezes, demonstrando ser um composto promissor em estudos futuros, para pesquisa de adjuvantes farmacológicos derivados de pirimidinas. Além disso, as imagens observadas por microscopia eletrônica da cepa *A. baumannii* UFPEDA (1024-b) foram animadoras na constatação dos efeitos antimicrobianos do análogo pirimidínico **3-a** sozinho, bem como, sua ação combinada com o antibiótico ampicilina com sulbactam. Com relação ao potencial de eliminação de radicais livres, os compostos apresentaram atividade antioxidante baixa, **3-a** e **3-c**, ou irrelevante, **3-b**, para os testes com DPPH e ABTS.

REFERÊNCIAS

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva: World Health Organization, 2014.
- [2] MLADENOVIC-ANTIC, S. et al. Correlation between antimicrobial consumption and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting: a 10-year study. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 41, n. 5, p. 532-537, 2016.
- [3] LOOD, R. et al. Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 1983-1991, 2015.
- [4] ANTUNES, L. C.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathog Dis** 71: 292–301. 2014.
- [5] POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. **IUBMB life**, v. 63, n. 12, p. 1061-1067, 2011.
- [6] DEMCHOK, J.P. et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis of triple combinations of caspofungin and voriconazole or ravuconazole with subinhibitory concentrations of amphotericin B against *Aspergillus* spp. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 239-245, 2010.
- [7] ZHANG, L. et al. Comprehensive review in current developments of imidazole-based medicinal chemistry. **Medicinal research reviews**, v. 34, n. 2, p. 340-437, 2014.
- [8] CUI, S. F. et al. Recent advances in application of thiazole compounds. **Scientia Sinica Chimica**, v. 42, n. 8, p. 1105-1131, 2012.
- [9] ZHANG, H. Z. et al. Recent advances in syntheses of oxazole compounds. **Chin. J. Org. Chem**, v. 31, n. 12, p. 1963-1976, 2011.
- [10] ZHOU, C.H.; WANG, Y. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 2, p. 239-280, 2012.
- [11] WANG, Y.; ZHOU, C. Recent advances in the researches of triazole compounds as medicinal drugs. **Scientia Sinica Chimica**, v. 41, n. 9, p. 1429-1456, 2011.

[12] ZHANG, H. Z. et al. Current developments in the syntheses of 1, 2, 4-triazole compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 359-406, 2014.

[13] DAI L. L, CUI S. F, DAMU G. L. V, ZHOU CH. Recent advances in the synthesis and application of tetrazoles. **Chin J Org Chem**, v.33, p. 224-244, 2013.

[14] PENG, X. M.; CAI, G. X.; ZHOU, C. H. Recent developments in azole compounds as antibacterial and antifungal agents. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 16, p. 1963-2010, 2013.

[15] LI, X. L. et al. Molecular spectroscopy evidence of berberine binding to DNA: comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 3, p. 873-880, 2012.

[16] BROWN, D.J. Pyrimidines and their benzo derivatives. KATRITZKY A.R.; REES, C.W., Eds., *Comprehensive heterocyclic chemistry, the structure, reactions, synthesis and uses of heterocyclic compounds*. **Pergamon Press, Oxford**, 3^o ed, p. 57-155, 1984.

[17] ELDERFIELD, R.C. **Heterocyclic Compounds**. 1. ed. New York: John Wiley & SonsJnc, 1957. Vol. 6, p.232-319.

[18] RASHMI, P. et al. Synthesis of novel thienopyrimidines and evaluation for their anti-inflammatory activity. **J Chem Pharm Res**, v. 4, n. 6, p. 3100-3106, 2012.

[19] KOTA R. K.; KOMPELLY K. K.; SURAMPUDI R, KULAKARNI R. Synthesis and antiinflammatory activity of novel pyrazolo [3,4-d] pyrimidines. **J Chem Pharm Res**, v 3, n. 4, p. 848-53, 2011.

[20] KUMARESAN, S. et al. Synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of some novel pyrimidin-2-amines on carrageenan-induced paw edema in balb/c mice. **J. Chem. Pharm. Res**, v. 6, p. 593-606, 2014.

[21] VALARMATHY, J.; JOSHUA, L. S.; SENTHILKUMAR, K. L. Synthesis of 2-aminopyrimidine derivatives and evaluation for anti tubercular, anti-convulant and anti-inflammatory activity. **Univ. Int. J. Chem**, v. 2, p. 61-68, 2011.

[22] MOHANA, K. N.; KUMAR, B. N. P.; MALLESHA, L. Synthesis and biological activity of some pyrimidine derivatives. **Drug invention today**, v. 5, n. 3, p. 216-222, 2013.

[23] KAUR, N. et al. Synthesis and in vitro antimicrobial activity of pyrimidine derivatives. **Int J Pharm Sci Drug Res**, v. 4, n. 3, p. 199-204, 2012.

[24] GUPTA Y.K.; GUPTA V.; SINGH S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of pyrimidine based derivatives. **J Pharm Res**;7(6):491-5; 2013.

[25] SHARMA, O. P. et al. Synthesis & antimicrobial activity of some novel pyrimidine-2, 4 (1H, 3H)-diones. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 252-257, 2011.

[26] DAVID V. B.; BABU V. H.; REDDY V. M. Synthesis of novel 4,6-disubstituted- 2-amino pyrimidines as antibacterial agents. **Int J Pharm Chem Res**, v. 3, n. 1, p. 2278-8700, 2014.

[27] NEHAD, A. et al. Synthesis of some pyridine, pyrimidine and cyclohexenone derivatives as antibacterial agents. **Int. J. Innu. Res. Sci. Eng. Technol**, v. 3, p. 8517-8529, 2014.

[28] GULLAPPELLI K.; THUPURANI M.K.; BRAHMESHWARI Z. Synthesis and anti bacterial activity of 2-(4-aminophenyl) benzimidazole based pyrimidine derivatives. **Int J Pharm Bio Sci**;5(1):682-90, 2014.

[29] ISHAK, C. Y. In-vitro antimicrobial and antifungal activity of pyrimidine and pyrazolo-[1, 5-a] pyrimidine. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 2, n. 6, 2013.

[30] ANDREWS B.; MANSUR, A. Synthesis and characterization of pyrimidine bearing 1, 3, 4-oxadiazole derivatives and their potential antifungal action. **Int J Chem Stud**;1(4):32-9, 2013.

[31] SINGH, K. et al. 2-aminopyrimidine based 4-aminoquinoline anti-plasmodial agents. Synthesis, biological activity, structure–activity relationship and mode of action studies. **European journal of medicinal chemistry**, v. 52, p. 82-97, 2012.

[32] RAI, U. S. et al. Synthesis and in vitro biological evaluation of new pyrazole chalcones and heterocyclic diamides as potential anticancer agents. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 317-321, 2015.

[33] VERMA, A. K. et al. Synthesis characterization and anticancer activity of novel N-(sugar pyranosyl) thienopyrimidine 4-amine derivatives. **Int. Res. J. Pharm**, v. 5, n. 12, p. 922-925, 2014.

- [34] FATHALLA, O. A. et al. Synthesis, antibacterial and anticancer evaluation of some pyrimidine derivatives. **World J Chem** v. 4, n. 2, p. 127-32, 2009.
- [35] KANDEEL, M. M. et al. Synthesis of effective anticancer thieno [2, 3-d] pyrimidine-4-ones and thieno [3, 2-e] triazolo [4, 3-c] pyrimidines. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 4, n. 3, p. 438-448, 2012.
- [36] GOUDGAON, N. M.; REDDY, R. Y. Analgesic and anti-inflammatory activities of 2-(4-fluorobenzylthio)-n-(substituted phenyl) pyrimidine-4-amines. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences**, v. 4, n. 1, 2014.
- [37] AGARWAL, O. P. **Organic Chemistry. Reaction and Reagent**. New Delhi: Krishna Prakashan Media (P) Ltd., p. 735, 2006.
- [38] HEINMETS, F. Supercomputer analysis of purine and pyrimidine metabolism leading to DNA synthesis. **Cell biophysics**, v. 14, n. 3, p. 283-323, 1989.
- [39] CUI, S. F. et al. Synthesis and biological evaluation of a class of quinolone triazoles as potential antimicrobial agents and their interactions with calf thymus DNA. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 11, p. 3267-3272, 2013.
- [40] MONTE, Z. S. et al. Synthesis and evaluation of arylamidine derivatives for new antimicrobial and cytotoxic activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 1051-1059, 2017.
- [41] DE MELO, S. J. et al. Synthesis of new 4-amino-2, 6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles. **Journal of Chemical Research**, v. 2002, n. 5, p. 216-217, 2002.
- [42] CLSI. *Performace Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- [43] CLSI. *Performace Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- [44] LORIAN, V. (Ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. 5. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

- [45] VERAS, D. L. **Determinação da ação in vitro de antibióticos β -lactâmicos frente isolados multidroga-resistentes de *Klebsiella pneumoniae* portadores dos genes *bla_{kpc}*, *bla_{shv}*, *bla_{tem}* e *bla_{ctx-m}*.** 2014.191 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- [46] BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- [47] JIANG, B. et al. Structural elucidation and antioxidant activity of lignin isolated from rice straw and alkali-oxygen black liquor. **International journal of biological macromolecules**, v. 116, p. 513-519, 2018.
- [48] FIGUEIREDO, J. et al. Trisubstituted barbiturates and thiobarbiturates: synthesis and biological evaluation as xanthine oxidase inhibitors, antioxidants, antibacterial and anti-proliferative agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 143, p. 829-842, 2018.
- [49] KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A, 1982, p.3-83.
- [50] GREIG, S. L.; SCOTT, L. J. Intravenous minocycline: a review in *Acinetobacter* infections. **Drugs**, v. 76, n. 15, p. 1467-1476, 2016.
- [51] WEBER, B.S.; HARDING, C. M.; FELDMAN, M. F. Pathogenic *Acinetobacter*: from the cell surface to infinity and beyond. **Journal of bacteriology**, p. JB. 00906-15, 2015.
- [52] SHARMA, N. et al. Synthesis, structural analysis, antimicrobial evaluation and synergistic studies of imidazo [1, 2-a] pyrimidine chalcogenides. **RSC Advances**, v. 6, n. 115, p. 114224-114234, 2016.
- [53] DO MONTE, Z. S. et al. Synthesis of 4-amino-2, 6-diaryl-5-cyanopyrimidines as antimicrobial agents. **Synthetic Communications**, v. 46, n. 11, p. 983-991, 2016.

5 SÍNTESE DE ANÁLOGOS PIRIMIDÍNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Silva, W.J.L¹; Monte, Z.S¹; Pereira, V. R.A²; Lima,G.M.S¹; Melo,S.J¹.

¹ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), AvArthur de Sá, S/N – Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil

² Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, CEP, Recife, PE 50670-420, Brazil

Autor correspondente: Sebastião José de Melo; melosebastiao@yahoo.com.br

RESUMO

Três novos derivados pirimidínicos **3a-c** foram sintetizados fazendo reagir arilamidinas 1a-c e bisnitrila 2a-c na presença de piperidina, como base. Os compostos sintetizados foram confirmados por IV, RMN de 1H, RMN13C e avaliados quanto à atividade antileishmanial. Atividade antileishmanial foi realizada contra o parasita *Leishmania amazonensis*, foram utilizados DMSO e miltefosine como controle. Os compostos 4-Amino-5-ciano-2-(p-trifluorometilfenil)-6-(p-anisil)-pirimidina (**3b**) e 4-Amino-5-ciano-2-(p-trifluorometilfenil)-6-(p-clorofenil)-pirimidina (**3c**) apresentaram bons valores de atividade IC₅₀, isso pode indicar que esses compostos possam atuar como potenciais antagonistas frente a leishmaniose por serem menos tóxicos que o medicamento de referência.

Palavras-chaves: Análogos pirimidínicos, leishmania, citotoxicidade

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são um problema de saúde pública mundial, aproximadamente 1 bilhão da população são acometidas por alguma infecção de natureza bacteriana, viral, ou parasitária [1,2].

A Leishmaniose, doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica ao redor do mundo e que afeta mais de 12 milhões de pessoas tornado-se assim um grave problema de saúde pública, encontra-se entre as seis endemias com prioridade no mundo [1,3].

As leishmanioses provocam doenças que afetam o homem e outros mamíferos nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, pelo menos 20 tipos de parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*, e apresentam diversas e complexas manifestações clínicas[3]. A terapêutica convencional apresenta sérios efeitos colaterais e eficiência limitada [4,5]. O tratamento desta doença ainda é bastante complexo, visto que o medicamento deve ser administrado por profissionais da saúde e com o paciente hospitalizado [5].

No Brasil, é preconizado pelo Ministério da Saúde e baseia-se, principalmente, no antimonial pentavalente (Glucantime), entretanto todos os medicamentos utilizados na terapia possuem efeitos colaterais, entre eles astralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, epigastralgia, plenitude gástrica, pirose, dor local e febre, devidos à sua toxicidade [6]. Nos últimos 20 anos o aumento de casos de leishmaniose no Brasil, possivelmente essa incidência estão relacionados principalmente com o processo predatório de colonização [7]. Percebe-se que a cada ano que se passa o número de pessoas que são acometidas pela leishmaniose aumente em aproximadamente 50 % em relação ao ano anterior [8]. Pois, os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento etiológico desta doença apenas são eficazes no tratamento de casos agudos, além de causarem graves efeitos colaterais, isso tem provocado um grave problema de saúde pública.

Assim, o desenvolvimento de novos medicamentos contra esse agente etiológico ainda é necessário. Com esse intuito, desenvolvemos novos

compostos pirimidínicos bioativos capazes de atuarem como promissores fármacos, que sejam mais eficazes e eficientes no tratamento. Esses dados nos conduziram a planejar o estudo da atividade de Leishmanicida nos análogos da pirimidina nesta pesquisa realizada.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa com derivados análogos pirimidínicos [9], constatou-se que a inserção de diferentes substituintes nas posições C-2 e C-6 porção 1,3-diazobenzene permitiu modular a potência desses compostos quanto à atividade tripanocida. Nesse estudo, constatou-se que a melhor atividade leishmanicida com IC 50% significativa frente à forma promastigota de *L.amazonensis*, e estudos adicionais de relação estrutura-atividade indicaram a necessidade do grupo fenil nas posições C-2 e C-6 contribuíram eficientemente para a obtenção dessa atividade.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Química

As caracterizações químicas foram obtidas por meio dos métodos físicos: espectroscopia do infravermelho (modelos Perkin Elmer Spectrum 400 e IFS66 com transformada de Fourier) em pastilhas de KBr e as leituras obtidas na faixa de 650 a 4000 cm^{-1} e de ressonância magnética nuclear (^1H -RMN e de ^{13}C -RMN), por meio do espectrofotômetro Varian VNMRS operando 300 MHz e 75 MHz. Os deslocamentos químicos foram obtidos em partes por milhão (ppm), tendo como padrão interno tetrametilsilano (TMS) que tem como deslocamento químico, δ , valor igual a 0,00ppm; e tendo usado dimetil sulfóxido deuterado (DMSO) como solvente, que apresenta $\delta = 2,5$ ppm. As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e as multiplicidades expressas em sinal amplo (b), singlete (s), duplete (d), tripleto (t) e multiplete (m). Foram determinados para compostos os rendimentos e ponto de fusão (modelo do fusiômetro Buchi B-540).

Para a obtenção dos derivados pirimidínicos **3a-c** foram necessárias reações ciclização, obtidos após até 6 horas, em quantidades equimolares (5,63

mmol) das amidinas substituídas **1a-c** e dos aduto de Knoevenagel ou intermediários de Michael substituídos **2a-c**, utilizando-se como solvente metanol (20mL) em um balão de fundo redondo, mantido sob agitação e em refluxo, no qual foram sendo adicionadas lentamente 10 gotas de piperidina [10]. O acompanhamento das reações e a verificação da pureza dos produtos finais foram realizadas por cromatografia em camada delgada (sílica gel pré-revestida em placas).

2.2 Atividade forma promastigota

A formas promastigotas de *L. amazonensis*(cepa WHOM/00 LTB-0016) foram incubados (1×10^6 células / mL, meio de Schneider com 10% de soro bovino fetal) em uma placa de 96 poços com compostos em oito diferentes concentrações (1,5 a 200 μ g / mL) por 72h a 26°C. A miltefosina foi utilizada como medicamento de referência e o DMSO como controle negativo. Células sem tratamento foram usadas como controles negativos. O crescimento celular foi avaliado e o IC 50% / 72h foi determinado por análises de regressão. Os ensaios foram realizados em triplicata [11].

2.3 Atividade forma amastigota

Para a obtenção de amastigotas, os macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados (3×10^5 células / mL) em uma placa de 24 poços com lamínula de vidro de 13 mm e deixados aderir por 24h, a 37 ° C em CO₂ a 5%. Os macrófagos aderidos foram então infectados com amastigotas de *L. amazonensis*(cepa WHOM/00 LTB-0016) na fase estacionária de crescimento usando uma razão 1:15 a 37 ° C por 6 h. Em seguida, os parasitas não-interiorizados foram removidos por lavagem e a cultura infectada foi incubada durante 24 horas em meio RPMI completo 1640 (controle negativo) e tratada com compostos (6,25 a 200 μ g / mL). As lamínulas foram coletadas e coradas pelo kit de coloração Panótico (Laborclin, PR, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de 100 células e seus amastigotas intracelulares, em triplicata. A atividade de Leishmanicida foi avaliada pela diminuição de macrófagos

infectados e amastigotas intracelulares em culturas tratadas (T) e não tratadas (NT), descritas pela fórmula: % amastigotas = $T \times NT / 100$. O IC 50% foi determinado por análises de regressão [11].

2.4 Citotoxicidade em Macrófagos

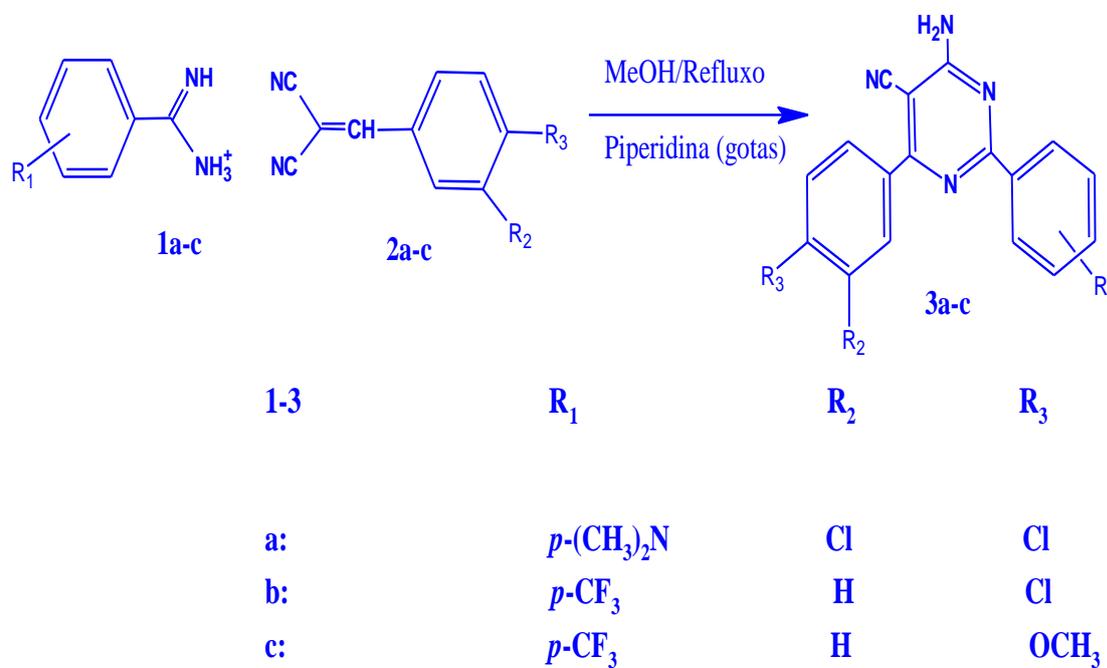
Os macrófagos RAW 264.7 foram utilizados para avaliar a citotoxicidade celular pelo ensaio 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). Células (1×10^5 células / poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h (37°C, 5% CO₂) para adesão. Os compostos foram adicionados, em seis concentrações (6,2 a 200µg / mL) e incubados por 48 h. Foram utilizados DMSO e miltefosine como controle. Após incubação com os compostos, adicionou-se MTT a 5 mg / mL em PBS. Duas horas depois, o meio de cultura de células foi aspirado e 100 µL de DMSO foram adicionados para solubilização de cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570 nm. Concentração citotóxica para 50% de inibição da viabilidade (CC 50%) foi calculada por análise de regressão usando o software Prism GraphPad. Os ensaios foram realizados em triplicata[11].

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Química

Os compostos **3a-c** (Esquema 1) foram caracterizados por métodos físicos ¹H RMN, ¹³C RMN, e infravermelho, a seguir serem apresentadas às elucidações estruturais: RMN além de caracteriza-los por espectroscopia IV. A seguir serão apresentados os dados espectroscópicos dos compostos.

Figura 1. Esquema reacional para síntese dos análogos pirimidínicos **3a-c**.



Fonte: Elaborado pela autora.

4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-diclorofenil)pirimidina (**3-a**):
 Cristalizado em MeOH, 59% de rendimento, p.f. 271-272, R_f = 0.38; (n-hexano-
 acetato de etila, 7:3); IR, KBr, μ_{\max} cm⁻¹ : 3436 (NH₂asim.), 3326 (NH₂sim.),
 2227 (CN), 1647(C=N) 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 8.76 (s, 1H, H₂''); 8.73
 (d, 2H, J 8.4 Hz, H₂' e H₆') ; 8.45-8.36 (m, 1H, H₅''); 7.92-7.85 (m, 1H, H₆'');
 7.57-7.52 (b, 2H, C₂-NH₂); 7.23 (d, 2H, J 8.4 Hz, H₃' e H₅' e δ 3.10 (s, 6H);
 13C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.9 (1C, C₂) ; 164.5 (1C, C₁''); 164.0 (1C,
 C₆) ; 158.7 (1C, C₄') ; 131.7 (1C, C₅''); 131.5 (1C, C₄''); 128.8 (1C, C₁₆''); 128.6
 (1C, C₆''); 128.5 (1C, C₃''); 128.4 (1C, C₂''); 128.2 (2C, C₂' e C₆') ; 128.2
 (1C, C₁') ; 128.0 (2C, C₃ e C₅''); 128.4 (2C, C₃' e C₅') ; 116.2 (1C, C₄) ; 81.9 (1C,
 C₅) ; e δ 43.51 (2C, C₁'').

4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-clorofenil)-primidina **(3-b)**: Cristalizado em MeOH, 52% de rendimento, m.p. 263-262, $R_f = 0.30$ (n-hexano-acetato de etila 7:3); IV, KBr, $\mu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3117 (NH_2 asim.), 3039 (NH_2 sim.), 2230 (CN), 1602 (C=N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 300 MHz), δ 8.55 (b, 2H, C2-NH₂); 8.27 (d, 2H, J = 9.3 Hz, H3' e H5'); 7.94 (d, 2H, J = 11.4 Hz, H2'' e H6''); 7.71 (d, 2H, J = 11.4 Hz, H3'' e H5'') e 7.19 (d, 2H, J = 9.9 Hz, H2' e H6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 164.3 (1C, C2); 160.4 (1C, C1'''); 160.1 (1C, C6); 139.0 (1C, C1'); 133.3 (1C, C4''); 132.1 (2C, C2' e C6'); 130.0 (2C, C3' e C5'); 129.7 (1C, C4'); 128.1 (2C, C2'' e C6''); 124.1 (1C, C1''); 115.2 (2C, C1'''); 114.8 (1C, C4); 113.9 (2C, C3'' e C5'') e 82.2 (1C, C5).

4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-anisil)-pirimidina **(3-c)**: Cristalizado em MeOH, 57% de rendimento, p.f. 239-238, $R_f = 0.35$ (n-hexano-acetato de etila 7:3); IV, KBr, $\mu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3217 (NH_2 asim.), 3099 (NH_2 sim.), 2230 (CN), 1602 (C=N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 300 MHz), δ 8.40 (b, 2H, C2-NH₂); 7.98 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H3' e H5'); 7.67 (d, 2H, J = 9.3 Hz, H2'' e H6''); 7.19 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H3'' e H5'') e 6.68 (d, 2H, J = 9.3 Hz, H2' e H6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 166.1 (1C, C4''); 164.3 (1C, C2); 160.4 (1C, C1'''); 158.4 (1C, C6); 150.9 (1C, C1'); 143.1 (2C, C2'' e C6''); 140.1 (2C, C2' e C6'); 139.1 (2C, C3' e C5'); 133.3 (1C, C4'); 124.1 (1C, C1''); 118.4 (2C, C1'''); 114.8 (1C, C4); 113.0 (2C, C3'' e C5''); 76.8 (1C, C5) e 55.9 (1C, C1''').

3.2 Atividade citotóxica e leishmanicida

Após as elucidações estruturais dos compostos de pirimidina, **3a-c** (tabela 1), determinara-se a atividade antiparasitária e a citotoxicidade da célula hospedeira.

Os compostos foram avaliados quanto à capacidade de inibir as formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonenses* (cepa WHOM/00 LTB-0016). Os resultados foram expressos em termos de IC 50% ($\mu\text{g/mL}$). A citotoxicidade foi determinada em macrófagos RAW 264.7 e os resultados são expressos como valores de CC 50%, o que significa a maior concentração não citotóxica (Tabela 1).

A atividade anti-promastigota dos compostos variou com um IC 50% de 13,06 µg/mL (3-b) para 73,52 µg/mL (3-c) e para a atividade anti-amastigota de 49,93 µg/mL (3-a) para 113 µg/mL (3-c). Os compostos provaram ser menos tóxicos que o medicamento de referência.

Observamos que o composto (3-c) apresentou um bom resultado CC 50% 97,51 µg/mL. O composto (3-b) apresentou um excelente resultado anti-promastigota IC 50% 13,06 µg/mL. Portanto, essas drogas podem atuar como um potencial antagonista frente a cepas de *Leishmania amazonensis*. É importante ressaltar aqui que o estudo *in silico* e *in vitro* são adequados em paralelo, já que possuímos o estudo *in vitro* estamos dando encaminhamento ao estudo *in silico*. Essas ideias podem ser provadas após a conclusão do estudo atual.

Tabela 1. Atividade leishmanicida e citotóxica dos derivados de pirimidina **3a-c**.

Análogos Pirimidínicos	<i>L. amazonensis</i>		Citotoxicidade CC 50% [$\mu\text{g/mL}$] ^c
	Promastigota IC 50% [[$\mu\text{g/mL}$] ^a	Amastigota IC 50% [[$\mu\text{g/mL}$] ^b	
3-a	28,77	49,93	48,06
3-b	13,06	51,04	43,84
3-c	73,52	113,0	97,51
Miltefosina	14,8	89,98	23,10

Legenda: **a:** Determinado 24 h após à incubação dos compostos, usando amastigotas. **b:** Determinado 3 dias após a incubação com compostos, utilizando promastigotas. **c:** Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 determinados 24 h após o tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora.

4 CONCLUSÃO

Após diversos anos sendo considerada uma doença de países em desenvolvimento e fortemente negligenciada, a leishmaniose vem sendo cada vez mais reportada em artigos científicos da área de química medicinal e afins, pois diversos países onde poucos casos por ano eram confirmados agora possuem uma taxa significativa de infectados. Pesquisas relacionadas a novos candidatos a fármacos eficazes como as terapias atualmente empregadas, mas com menor toxicidade para o hospedeiro, tem gerado diversos protótipos que no futuro poderão resultar em como opções terapêuticas melhores. Adicionalmente, o mecanismo de ação destas substâncias ainda precisa ser melhor estudado visando auxiliar nos avanços necessários. Os compostos **3a-c** foram satisfatoriamente sintetizados, com bons rendimentos, e caracterizados. Até o dado momento, dispomos dos resultados da avaliação da atividade leishmanicida dos compostos **3a-c**, entre os quais dois deles (**3a,b**) apresentaram bons valores de atividade IC 50%, esses compostos podem atuar como um potencial antagonista a leishmaniose por ser menos tóxicos que o medicamento de referência.

REFERÊNCIAS

- [1] DE PAULA, R. C. et al. In vitro antileishmanial activity of leaf and stem extracts of seven Brazilian plant species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 232, p. 155-164, 2019.
- [2] TAJUDDEEN, N. et al. The chemotherapeutic potential of chalcones against leishmaniasis: a review. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 3, p. 311-318, 2018.
- [3] DE SÁ, J. C. et al. Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot. **BMC Complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.
- [4] FOROUMADI, A. et al. Synthesis and Leishmanicidal Activity of 1-[5-(5-nitrofuranyl)-1, 3, 4-thiadiazole-2-yl]-4-benzoylpiperazines. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 16, n. 3, p. 904, 2017.
- [5] GARCIA, M. C. F. et al. The in vitro antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1219-1227, 2018.
- [6] DA SILVA, S. S. et al. Glucantime reduces mechanical hyperalgesia in cutaneous leishmaniasis and complete Freund's adjuvant models of chronic inflammatory pain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 768-777, 2018.
- [7] ENCISO, E. et al. Synthesis of new quinazolin-2, 4-diones as anti-*Leishmania mexicana* agents. **Molecular diversity**, v. 20, n. 4, p. 821-828, 2016.
- [8] DA SILVA, J. M. et al. The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* is mediated by mitochondrial dysfunction. **Experimental parasitology**, v. 159, p. 143-150, 2015.
- [9] DE MELO, S. J. et al. Synthesis, antitrypanosomal activity and molecular docking studies of pyrimidine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, 2018. Springer US. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00044-018-2253-2>>. Acesso em 26 de nov. 2018.
- [10] DE MELO, S. J. et al. Synthesis of new 4-amino-2, 6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles. **Journal of Chemical Research**, v. 2002, n. 5, p. 216-217, 2002.

[11] DOS SANTOS ALIANÇA, A. S. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 1-10, 2017.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos comprovar que os análogos pirimidínicos sintetizados possuem ação antimicrobiana de amplo espectro de ação. A capacidade sinérgica do composto **3-a** se mostrou promissora, devendo ser investigada em combinação com outros antibióticos e outros microorganismos. Os análogos pirimidínicos apresentaram resultados satisfatórios para atividade leishmanicida e citotoxicidade baixa, quando confrontados com o medicamento Miltefosina. Por tanto, os resultados obtidos apontam novas perspectivas para os presentes estudos, como estudos mais aprofundados de análogos pirimidínicos com potencial sinérgico, bem como, o auxílio da microscopia eletrônica para observar a morfologia de células de *Leishmania amazonensis*, anteriormente expostas aos compostos pirimidínicos.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, O. P. **Organic Chemistry. Reaction and Reagent.** New Delhi: Krishna Prakashan Media (P) Ltd.; p. 735, 2006.
- ANTUNES, L. C.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathog Dis** 71: 292–301. 2014.
- ALZHRANI, K. J. et al. Evaluation of the antiprotozoan properties of 5'-norcarbocyclic pyrimidine nucleosides *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 14, p. 3081-3086, 2017.
- ANDREWS B.; MANSUR, A. Synthesis and characterization of pyrimidine bearing 1, 3, 4-oxadiazole derivatives and their potential antifungal action. **Int J Chem Stud**;1(4):32-9, 2013.
- AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, Andrew N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 47, 2017.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BROWN, D.J. Pyrimidines and their benzo derivatives. KATRITZKY A.R.; REES, C.W., Eds., *Comprehensive heterocyclic chemistry, the structure, reactions, synthesis and uses of heterocyclic compounds*. **Pergamon Press, Oxford**, 3^o ed, p. 57-155, 1984.
- CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry: part A: structure and mechanisms**. Springer Science & Business Media, 2007.
- CASARIN, M.; FORRER, D.; GARAU, F.; PANDOLFO, L.; PETTINARI, C.; VITTADINI, A.J. **Phys. Chem. A.** (112) 6723-6731, 2008.
- CHANDRA, H. BISHNOI, P. YADAV, A. et al. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review. **Plants**, v. 6, n. 2, p. 16, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2223-7747/6/2/16>>. Acesso em 19 de dez. 2018.
- CHATURVEDI, R. N. et al. Synthesis, Biological Evaluation, Molecular Docking and DFT Study of Potent Antileishmanial Agents Based on the Thiazolo [3, 2-a] pyrimidine Chemical Scaffold. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 10, p. 2756-2762, 2018.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical

and Laboratory Standards Institute; 2015.

CLSI. *Performace Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

CUI, S. F. et al. Recent advances in application of thiazole compounds. **Scientia Sinica Chimica**, v. 42, n. 8, p. 1105-1131, 2012.

CUI, S. F. et al. Synthesis and biological evaluation of a class of quinolone triazoles as potential antimicrobial agents and their interactions with calf thymus DNA. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 11, p. 3267-3272, 2013.

DAI L. L, CUI S. F, DAMU G. L. V, ZHOU CH. Recent advances in the synthesis and application of tetrazoles. **Chin J Org Chem**, v.33, p. 224-244, 2013.

DANSENA, H.; DHONGADE, H. J.; CHANDRAKAR, K. Pharmacological potentials of pyrimidine derivative: a review. **Asian J. Pharm. Clin. Res**, v. 8, n. 4, p. 171-177, 2015.

DA SILVA, J. M. et al. The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* is mediated by mitochondrial dysfunction. **Experimental parasitology**, v. 159, p. 143-150, 2015.

DA SILVA, S. S. et al. Glucantime reduces mechanical hyperalgesia in cutaneous leishmaniasis and complete Freund's adjuvant models of chronic inflammatory pain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 768-777, 2018.

DAVE, P. et al. Antimicrobial Effect of Cow Urine and Goat Urine against common Dental Caries Pathogens: An in vitro Comparative Study. **Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research| Vol**, v. 6, n. 8, 2018.

DAVID V. B.; BABU V. H.; REDDY V. M. Synthesis of novel 4,6-disubstituted-2-amino pyrimidines as antibacterial agents. **Int J Pharm Chem Res**, v. 3, n. 1, p. 2278-8700, 2014.

DEMCHOK, J.P. et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis of triple combinations of caspofungin and voriconazole or ravuconazole with subinhibitory concentrations of amphotericin B against *Aspergillus* spp. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 239-245, 2010.

DE MELO, S. J. et al. Synthesis of new 4-amino-2, 6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles. **Journal of Chemical Research**, v. 2002, n. 5, p. 216-217, 2002.

DE MELO, S. J. et al. Synthesis, antitrypanosomal activity and molecular docking studies of pyrimidine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**,

2018. Springer US. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00044-018-2253-2>>. Acesso em 26 de nov. 2018.

DE PAULA, R. C. et al. In vitro antileishmanial activity of leaf and stem extracts of seven Brazilian plant species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 232, p. 155-164, 2019.

DE SÁ, J. C. et al. Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot. **BMC Complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.

DESAI, N. C.; MAKWANA, A. H.; SENTA, R. D. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some novel 4-(4-(arylamino)-6-(piperidin-1-yl)-1, 3, 5-triazine-2-ylamino)-N-(pyrimidin-2-yl) benzenesulfonamides. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 686-694, 2016.

DEVLIN, B.; DANIELS, M.; ROEDER, K. The heritability of IQ. **Nature**, v. 388, n. 6641, p. 468, 1997.

DO MONTE, Z. S. et al. Synthesis of 4-amino-2, 6-diaryl-5-cyanopyrimidines as antimicrobial agents. **Synthetic Communications**, v. 46, n. 11, p. 983-991, 2016.

DOMÍNGUEZ-BERNAL, G. et al. HisAK70: progress towards a vaccine against different forms of leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 629, 2015.

DOS SANTOS ALIANÇA, A. S. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 1-10, 2017.

EICHER, T.; HAUPTMANN, S.; SPEICHER, A. **The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions Synthesis and Applications**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

ELDERFIELD, R.C. **Heterocyclic Compounds**. 1. ed. New York: John Wiley & SonsJnc, 1957. Vol. 6, p.232-319.

ELISHA, I. L. et al. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 133, 2017.

ENCISO, E. et al. Synthesis of new quinazolin-2, 4-diones as anti-*Leishmania mexicana* agents. **Molecular diversity**, v. 20, n. 4, p. 821-828, 2016.

FALCÃO, E.P.S.; DE MELO, S.J.; SRIVASTAVA, R.M.; CATANHO, M.T.J.A.; DO NASCIMENTO, S.C. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. **Eur. J. Med. Chem.**, 41, 276–282, 2006.

FATHALLA, O. A. et al. Synthesis, antibacterial and anticancer evaluation of some pyrimidine derivatives. **World J Chem** v. 4, n. 2, p. 127-32, 2009.

FIGUEIREDO, J. et al. Trisubstituted barbiturates and thiobarbiturates: synthesis and biological evaluation as xanthine oxidase inhibitors, antioxidants, antibacterial and anti-proliferative agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 143, p. 829-842, 2018.

FOROUMADI, A. et al. Synthesis and Leishmanicidal Activity of 1-[5-(5-nitrofuran-2-yl)-1, 3, 4-thiadiazole-2-yl]-4-benzoylpiperazines. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 16, n. 3, p. 904, 2017.

FROMTLING, R. A. Overview of Medically Important Antifungal Azole Derivatives. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, n. 2, p. 187–217, 1988.

GARCIA, M. C. F. et al. The in vitro antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1219-1227, 2018.

GOULD, I. M. et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 39, n. 2, p. 96-104, 2012.

GOUDGAON, N. M.; REDDY, R. Y. Analgesic and anti-inflammatory activities of 2-(4-fluorobenzylthio)-n-(substituted phenyl) pyrimidine-4-amines. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences**, v. 4, n. 1, 2014.

GREIG, S. L.; SCOTT, L. J. Intravenous minocycline: a review in *Acinetobacter* infections. **Drugs**, v. 76, n. 15, p. 1467-1476, 2016.

GULLAPPELLI K.; THUPURANI M.K.; BRAHMESHWARI Z. Synthesis and antibacterial activity of 2-(4-aminophenyl) benzimidazole based pyrimidine derivatives. **Int J Pharm Bio Sci**;5(1):682-90, 2014.

GUPTA Y.K.; GUPTA V.; SINGH S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of pyrimidine based derivatives. **J Pharm Res**;7(6):491-5; 2013.

HAFEZ, H. N.; EL-GAZZAR, A. R. B. A.; AL-HUSSAIN, S. A. Novel pyrazole derivatives with oxa/thiadiazolyl, pyrazolyl moieties and pyrazolo [4, 3-d]-pyrimidine derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 10, p. 2428-2433, 2016.

HEINMETS, F. Supercomputer analysis of purine and pyrimidine metabolism leading to DNA synthesis. **Cell biophysics**, v. 14, n. 3, p. 283-323, 1989.

- ISHAK, C. Y. In-vitro antimicrobial and antifungal activity of pyrimidine and pyrazolo-[1, 5-a] pyrimidine. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 2, n. 6, 2013.
- JIANG, B. et al. Structural elucidation and antioxidant activity of lignin isolated from rice straw and alkali-oxygen black liquor. **International journal of biological macromolecules**, v. 116, p. 513-519, 2018.
- JOULE, J.A.; MILLES, K.; SMITH, G.F. **Heterocyclic chemistry**. 4. ed. Blackwell Publishing, 2000.
- KAHRIMAN, N. et al. Synthesis and biological evaluation of new 2, 4, 6-trisubstituted pyrimidines and their N-alkyl derivatives. **Bioorganic chemistry**, v. 83, p. 580-594, 2019.
- KANDEEL, M. M. et al. Synthesis of effective anticancer thieno [2, 3-d] pyrimidine-4-ones and thieno [3, 2-e] triazolo [4, 3-c] pyrimidines. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 4, n. 3, p. 438-448, 2012.
- KATRITZKY, A. R. **Chemical Reviews**. v. 104, n. 5, p. 812-2777. 2004.
- KATRITZKY, A. R.; RACHWAL, S. Synthesis of heterocycles mediated by benzotriazole. 2. Bicyclic systems. **Chemical reviews**, v. 111, n. 11, p. 7063-7120, 2011.
- KAUR, N. et al. Synthesis and in vitro antimicrobial activity of pyrimidine derivatives. **Int J Pharm Sci Drug Res**, v. 4, n. 3, p. 199-204, 2012.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections - A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A, 1982, p.3-83.
- KOTA R. K.; KOMPELLY K. K.; SURAMPUDI R, KULAKARNI R. Synthesis and antiinflammatory activity of novel pyrazolo [3,4-d] pyrimidines. **J Chem Pharm Res**, v 3, n. 4, p. 848-53, 2011.
- KUMARESAN, S. et al. Synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of some novel pyrimidin-2-amines on carrageenan-induced paw edema in balb/c mice. **J. Chem. Pharm. Res**, v. 6, p. 593-606, 2014.
- LI, X. L. et al. Molecular spectroscopy evidence of berberine binding to DNA: comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 3, p. 873-880, 2012.
- LOOD, R. et al. Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia

model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 1983-1991, 2015.

LORIAN, V. (Ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. 5. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

MAIA, C.; DANTAS-TORRES, F.; CAMPINO, L. Parasite Biology: The Reservoir Hosts. In: **The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases**. Springer, Cham, 2018. p. 79-106.

MEDINA, E.; PIEPER, D. H. Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. In: **How to Overcome the Antibiotic Crisis**. Springer, Cham, 2016. p. 3-33.

MLADENOVIC-ANTIC, S. et al. Correlation between antimicrobial consumption and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting: a 10-year study. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 41, n. 5, p. 532-537, 2016.

MOHANA, K. N.; KUMAR, B. N. P.; MALLESHA, L. Synthesis and biological activity of some pyrimidine derivatives. **Drug invention today**, v. 5, n. 3, p. 216-222, 2013.

MONTE, Z. S. et al. Synthesis and evaluation of arylamidine derivatives for new antimicrobial and cytotoxic activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 1051-1059, 2017.

NEHAD, A. et al. Synthesis of some pyridine, pyrimidine and cyclohexenone derivatives as antibacterial agents. **Int. J. Innu. Res. Sci. Eng. Technol**, v. 3, p. 8517-8529, 2014.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86-90, 2017.

PATIL, S. B. Biological and medicinal significance of pyrimidines: A Review. **Int. J. Pharm. Sci. Res**, v. 9, n. 1, p. 44-52, 2018.

PENG, X. M.; CAI, G. X.; ZHOU, C. H. Recent developments in azole compounds as antibacterial and antifungal agents. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 16, p. 1963-2010, 2013.

PINNER, A. **Em Die Iminoäther und ihre Derivative**, Oppenheim: Berlin, 1892.

RAI, U. S. et al. Synthesis and in vitro biological evaluation of new pyrazole chalcones and heterocyclic diamides as potential anticancer agents. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 317-321, 2015.

POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. **IUBMB life**, v. 63, n. 12, p. 1061-1067, 2011.

- RANI, J. et al. Biological potential of pyrimidine derivatives in a new era. **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 9, p. 6777-6804, 2016.
- RASHMI, P. et al. Synthesis of novel thienopyrimidines and evaluation for their anti-inflammatory activity. **J Chem Pharm Res**, v. 4, n. 6, p. 3100-3106, 2012.
- REVEIZ, L. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61843, 2013.
- SALADINO, R. et al. A new and eficiente synthesis of substituted 6-[(2'-dialkylamino)ethyl]pyrimidine and 4-N,N-dialkyl-6vinyl-cytosine derivatives and evaluation of their anti-rubella activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p.2143-2153,2002.
- SAINI, M. S. et al. A review: biological significances of heterocyclic compounds. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 4, n. 3, p. 66–77, 2013.
- SCHAENZER, A. J. et al. A screen for kinase inhibitors identifies antimicrobial imidazopyridine aminofurazans as specific inhibitors of the *Listeria monocytogenes* PASTA kinase PrkA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 41, p. 17037-17045, 2017.
- SHARMA, N. et al. Synthesis, structural analysis, antimicrobial evaluation and synergistic studies of imidazo [1, 2-a] pyrimidine chalcogenides. **RSC Advances**, v. 6, n. 115, p. 114224-114234, 2016.
- SHARMA, O. P. et al. Synthesis & antimicrobial activity of some novel pyrimidine-2, 4 (1H, 3H)-diones. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 252-257, 2011.
- SINGH, A. K. et al. Analytical reactions of substituted pyrimidines. **Talanta**, v. 29, n. 2, p. 95-102, 1982.
- SINGH, K. et al. 2-aminopyrimidine based 4-aminoquinoline anti-plasmodial agents. Synthesis, biological activity, structure–activity relationship and mode of action studies. **European journal of medicinal chemistry**, v. 52, p. 82-97, 2012.
- SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 139–149, 2004.
- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9. ed. vol 1 e 2. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

TAJUDDEEN, N. et al. The chemotherapeutic potential of chalcones against leishmaniasis: a review. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 3, p. 311-318, 2018.

TAYLOR, E. C.; MACKILLOP, A. **The chemistry of cyclic enamionitriles and o-aminonitriles [omikron-aminonitriles]**. 1. ed. vol 7. New York: John Wiley & Sons, 1970. p. 103-106.

TOMMA, J. H.; KHAZAAL, M. S.; AL-DUJAILI, A. H. Synthesis and characterization of novel Schiff bases containing pyrimidine unit. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 157-163, 2014.

VALARMATHY, J.; JOSHUA, L. S.; SENTHILKUMAR, K. L. Synthesis of 2-aminopyrimidine derivatives and evaluation for anti tubercular, anti-convulant and anti-inflammatory activity. **Univ. Int. J. Chem**, v. 2, p. 61-68, 2011.

VERAS, D. L. **Determinação da ação in vitro de antibióticos β -lactâmicos frente isolados multidroga-resistentes de *Klebsiella pneumoniae* portadores dos genes *bla_{kpc}*, *bla_{shv}*, *bla_{tem}* e *bla_{ctx-m}***. 2014.191 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

VERMA, A. K. et al. Synthesis characterization and anticancer activity of novel N-(sugar pyranosyl) thienopyrimidine 4-amine derivatives. **Int. Res. J. Pharm**, v. 5, n. 12, p. 922-925, 2014.

WANG, Y.; ZHOU, C. Recent advances in the researches of triazole compounds as medicinal drugs. **Scientia Sinica Chimica**, v. 41, n. 9, p. 1429-1456, 2011.

WEBER, B.S.; HARDING, C. M.; FELDMAN, M. F. Pathogenic Acinetobacter: from the cell surface to infinity and beyond. **Journal of bacteriology**, p. JB. 00906-15, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva: World Health Organization, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases 2015**. Geneva: World Health Organization, 2015. Vol. 3.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. Geneva: World Health Organization, 2017. WHO/EMP/ IAU/2017.12.

WRIGHT, Gerard D. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 11, p. 862-871, 2016.

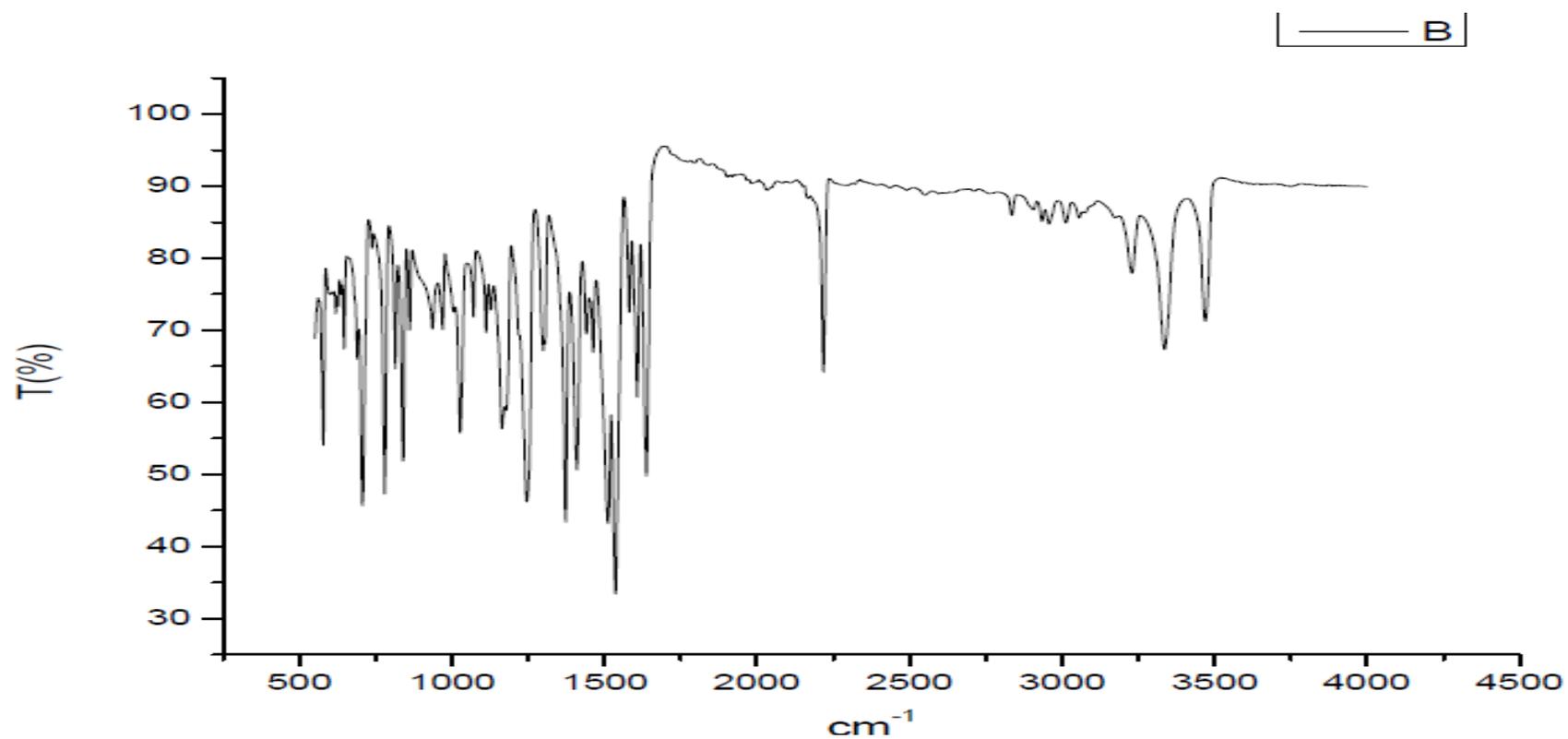
YILMAZ, Ç; ÖZCENGİZ, G. Antibiotics: pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 43-62, 2017.

ZHANG, L. et al. Comprehensive review in current developments of imidazole-based medicinal chemistry. **Medicinal research reviews**, v. 34, n. 2, p. 340-437, 2014.

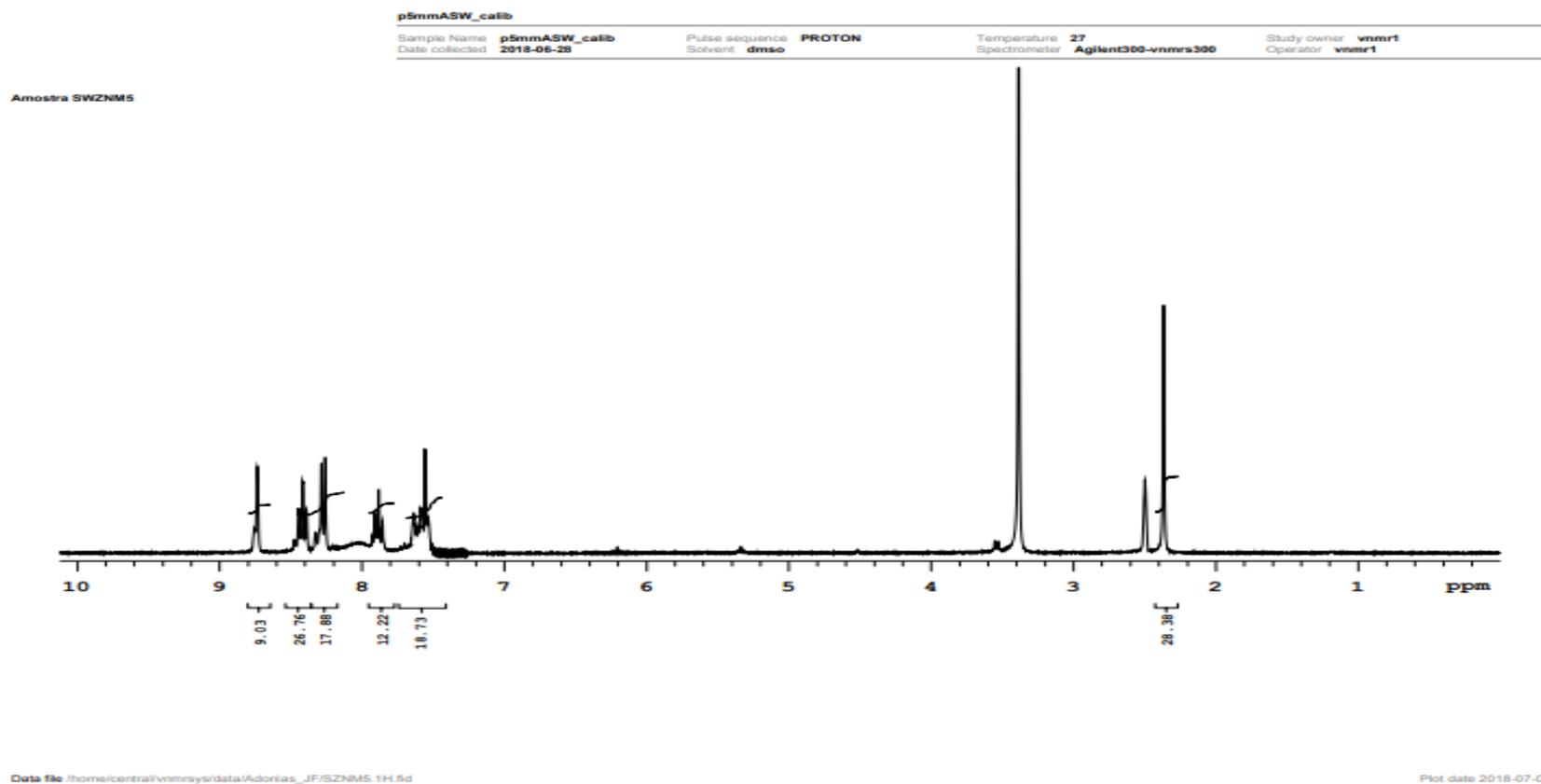
ZHANG, H. Z. et al. Recent advances in syntheses of oxazole compounds. **Chin. J. Org. Chem**, v. 31, n. 12, p. 1963-1976, 2011.

ZHANG, H. Z. et al. Current developments in the syntheses of 1, 2, 4-triazole compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 359-406, 2014.

ZHOU, C.H.; WANG, Y. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 2, p. 239-280, 2012.

ANEXO A - ESPETROS DE IV, 1H RMN, 13C RMN DOS COMPOSTOS**Figura 1.** Espectro IV, composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dietilaminofenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina (**3-a**).

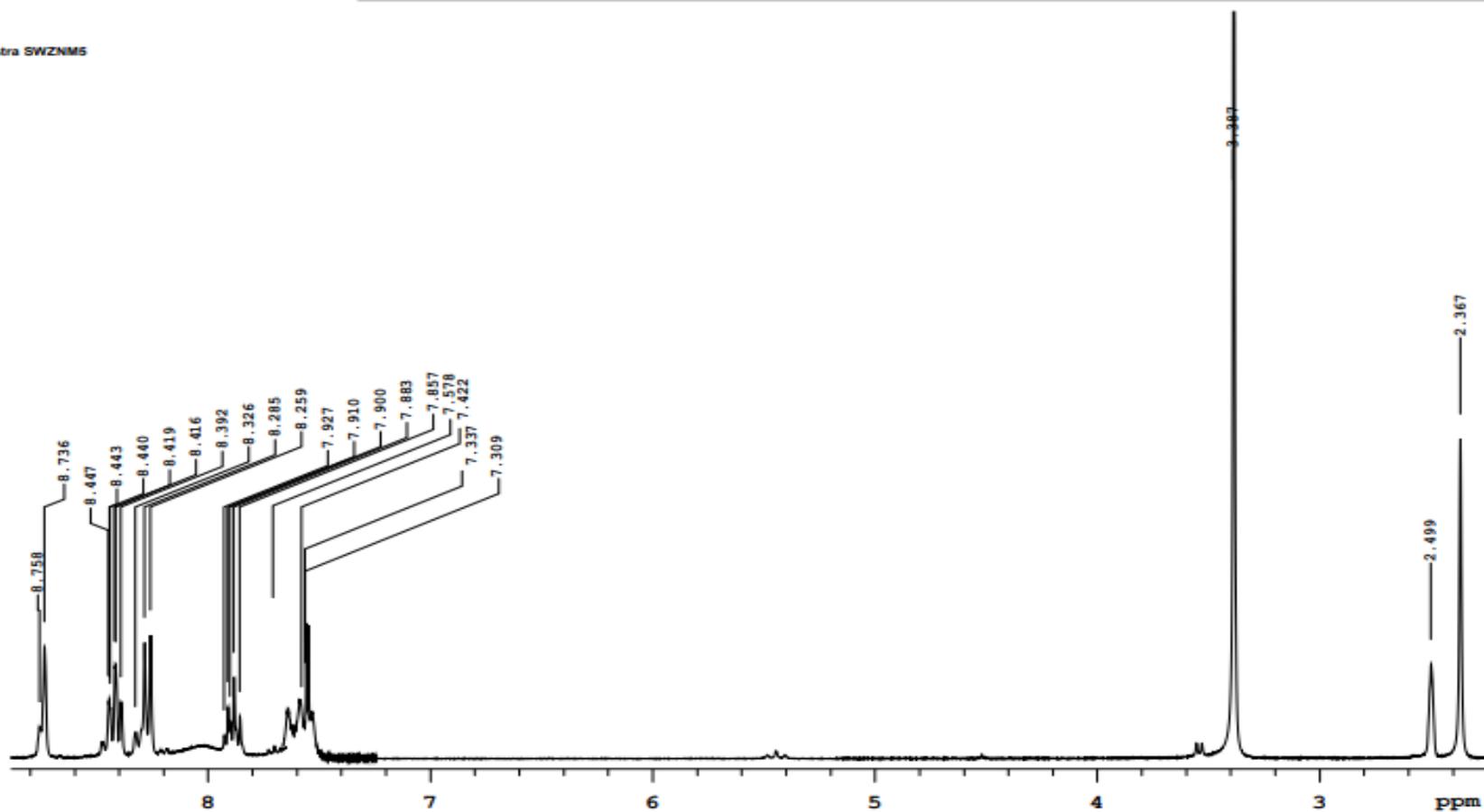
Figuras 2. Espectros do ^1H -NMR e ^{13}C -NMR, respectivamente, composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dietilaminofenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina (**3-a**).



p5mmASW_calib

Sample Name	p5mmASW_calib	Pulse sequence	PROTON	Temperature	27	Study owner	vnmr1
Date collected	2018-06-28	Solvent	dmsc	Spectrometer	Agilent300-vnmrs300	Operator	vnmr1

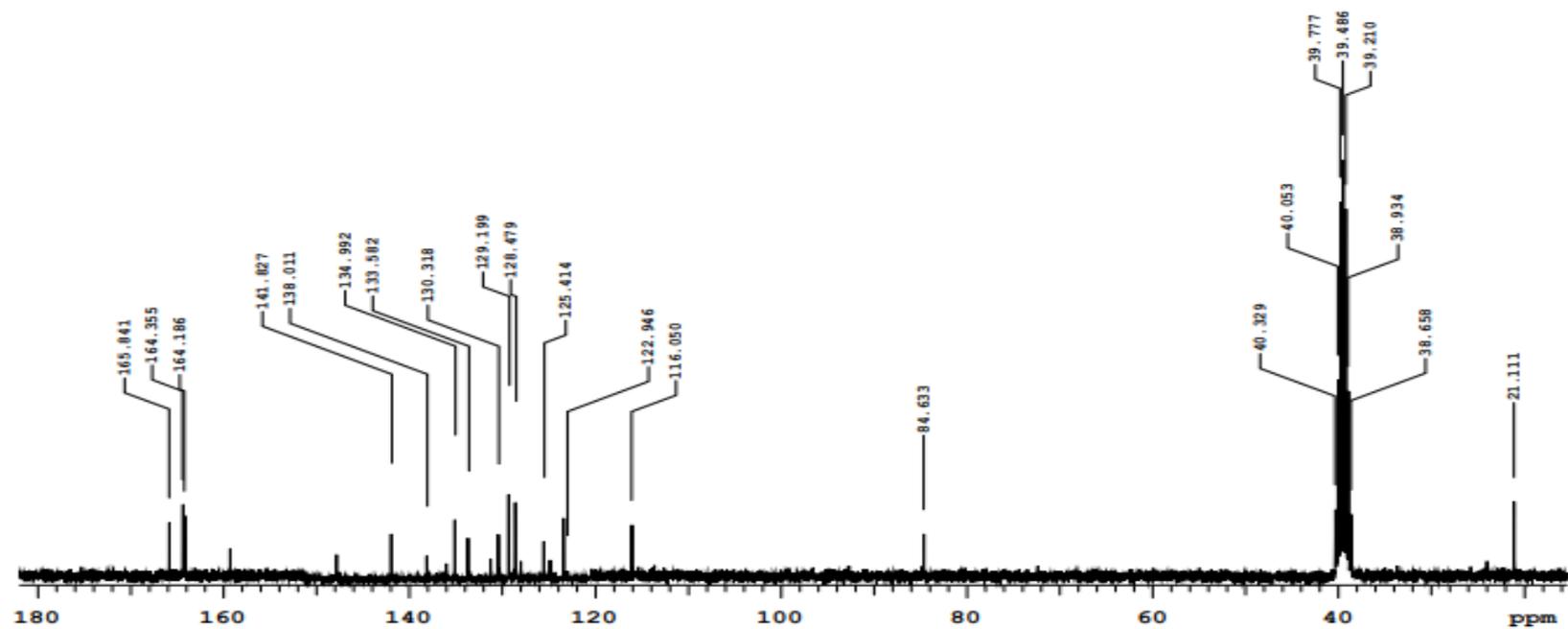
Amostra SWZNM5



p5mmASW_calib

Sample Name	p5mmASW_calib	Pulse sequence	CARBON	Temperature	27	Study owner	vnmr1
Date collected	2018-06-28	Solvent	dmsd	Spectrometer	Agilent300-vnmr300	Operator	vnmr1

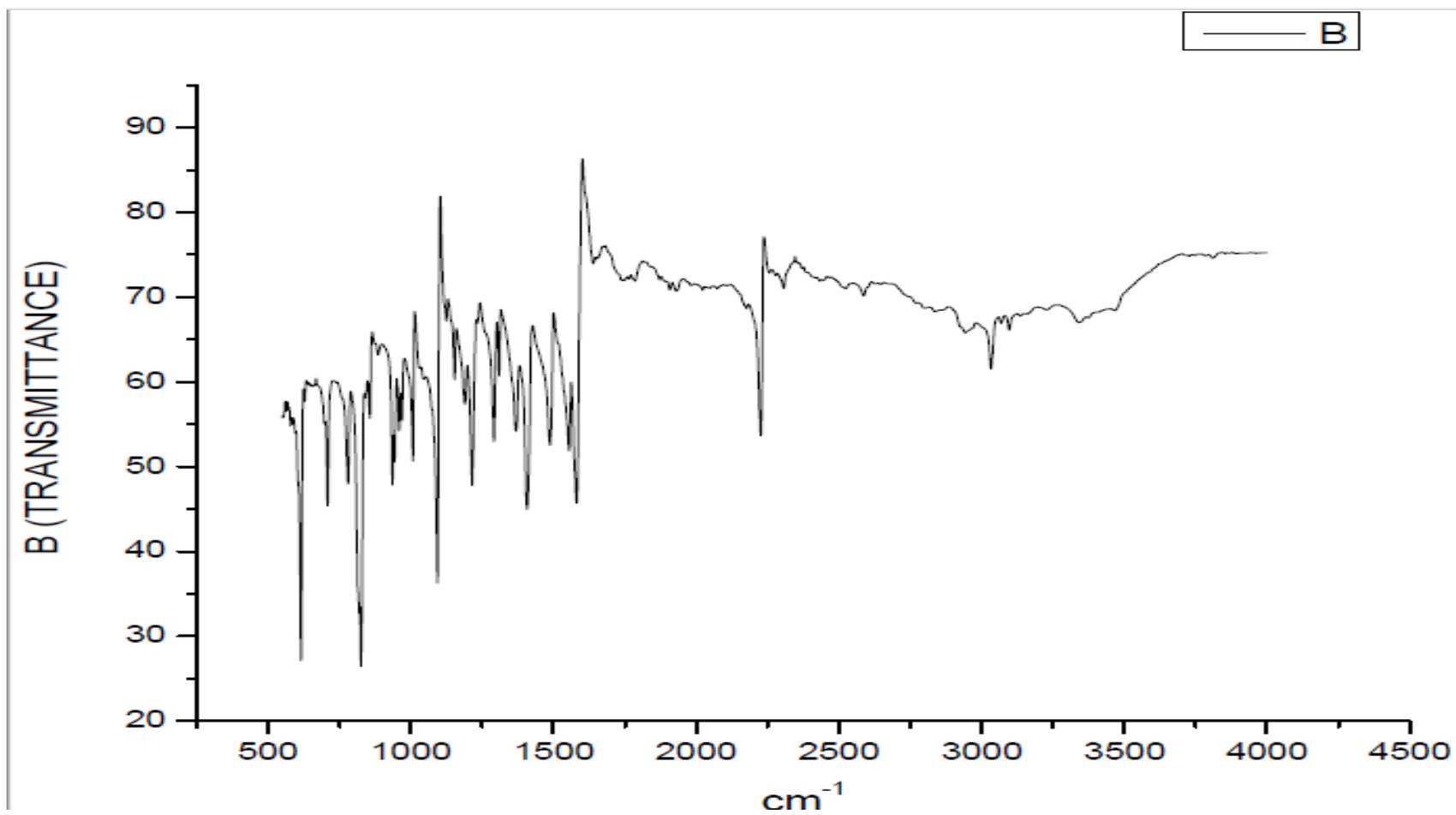
Amostra SWZNM5



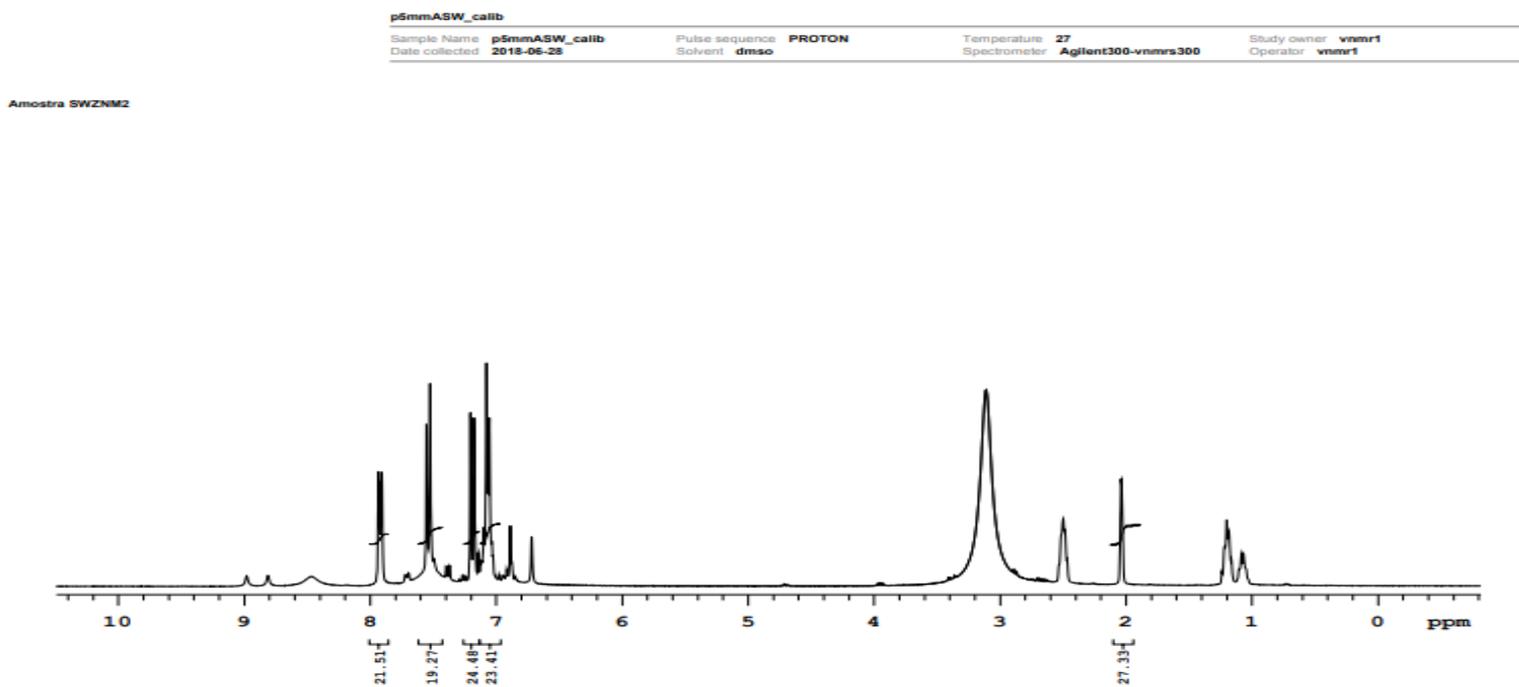
Data file /home/central/vnmr/sys/data/Adonias_JF/SZNM5.13C.fid

Plot date 2018-07-05

Figura 3. Espectro IV, composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-clorofenil)-primidina (**3-b**).



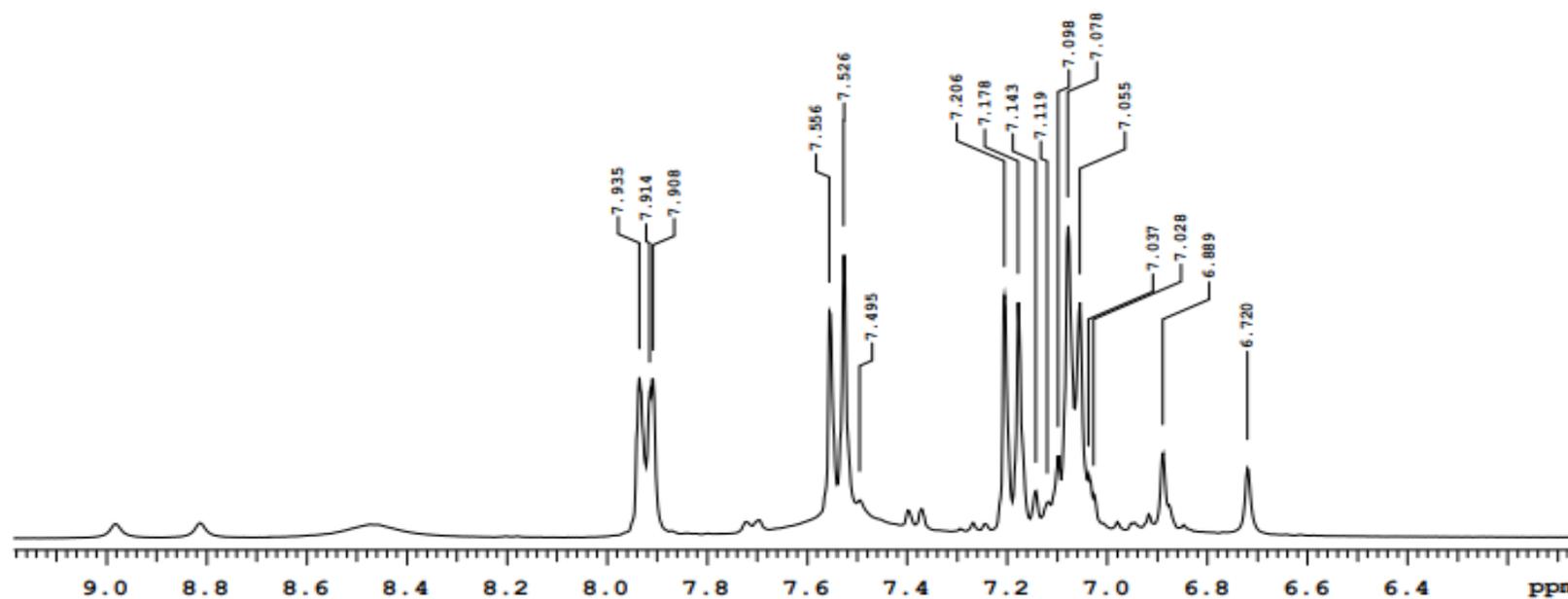
Figuras 4. Espectros do ^1H -NMR e ^{13}C -NMR, respectivamente, composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-clorofenil)-primidina (**3-b**).



p5mmASW_calib

Sample Name	p5mmASW_calib	Pulse sequence	PROTON	Temperature	27	Study owner	vnmr1
Date collected	2018-06-28	Solvent	dmsc	Spectrometer	Agilent300-vnmrs300	Operator	vnmr1

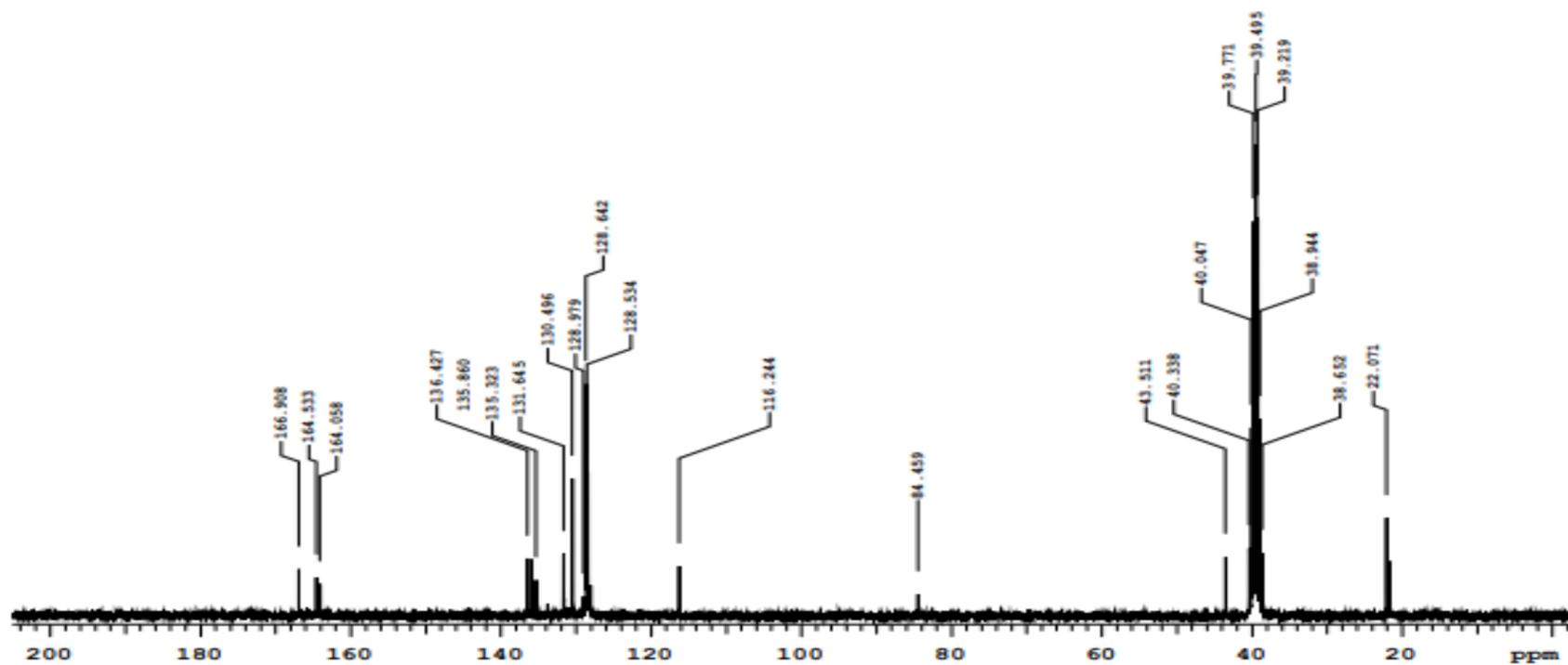
Adonias
Amostra SWZNM2



p5mmASW_calib

Sample Name	p5mmASW_calib	Pulse sequence	CARBON	Temperature	27	Study owner	vmmr1
Date collected	2018-06-28	Solvent	dmsc	Spectrometer	Agilent300-nmrs300	Operator	vmmr1

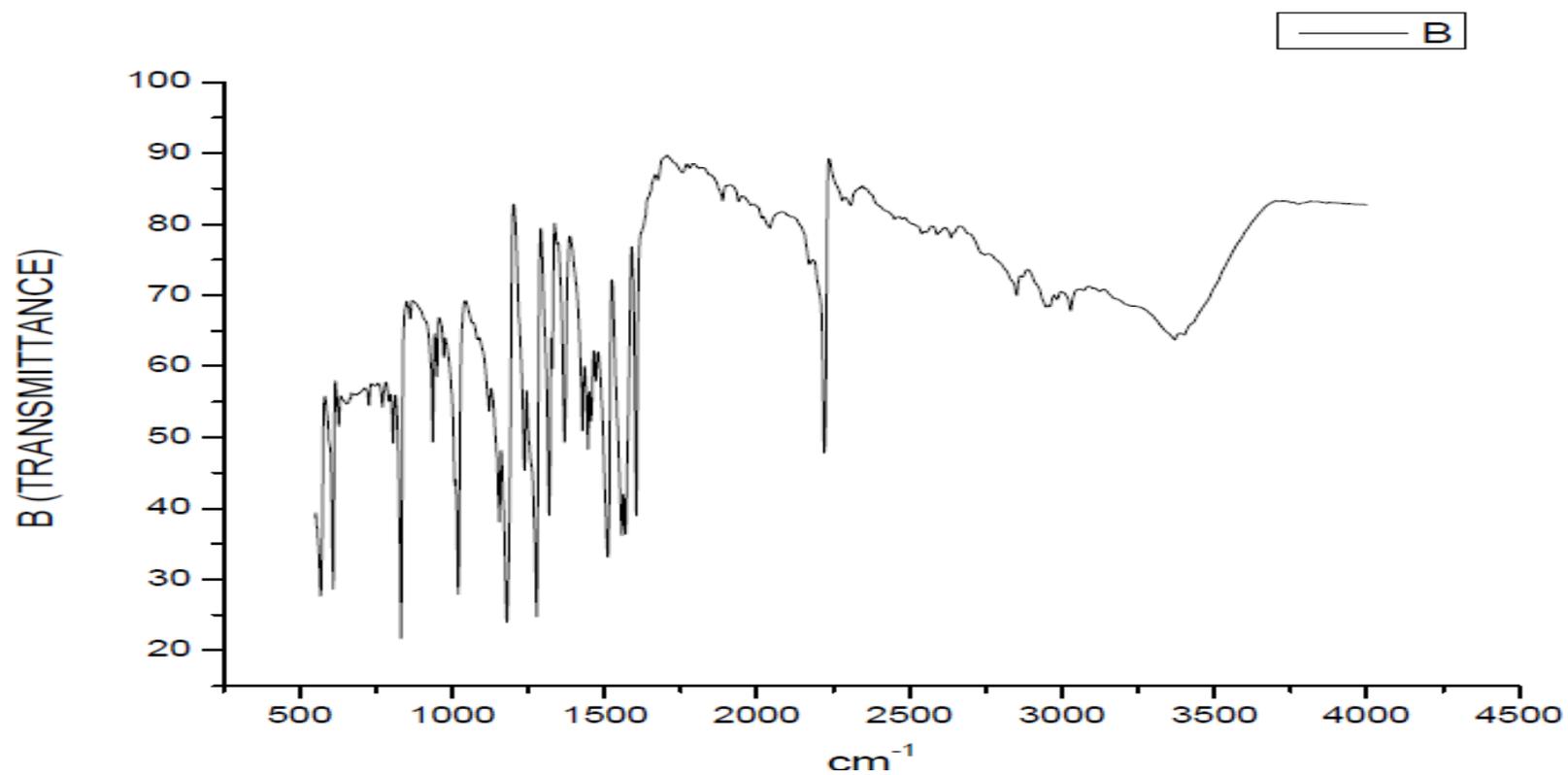
Amostra SWZNM2



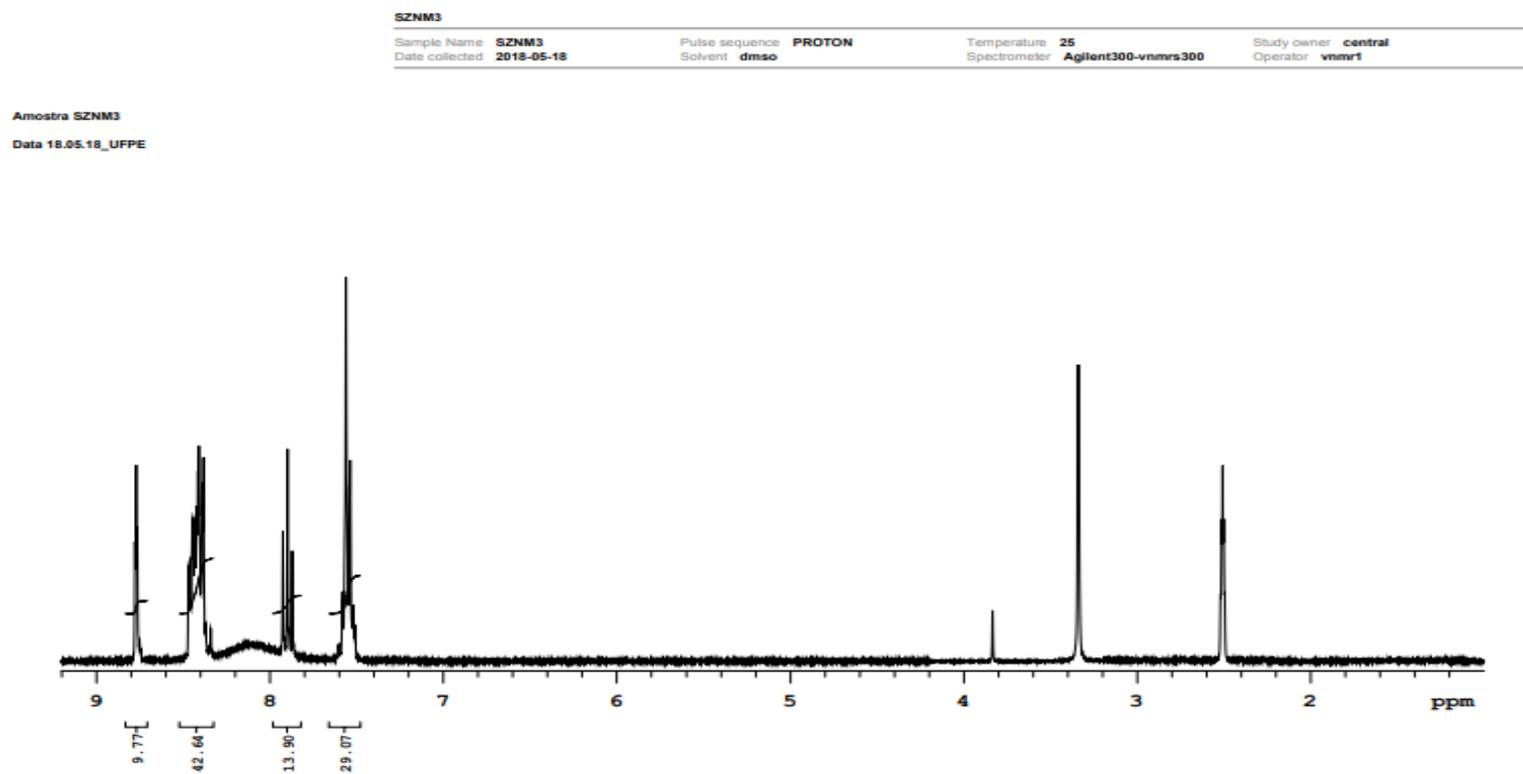
Data file /home/central/vmmr/sys/data/Adonias_JF/SZNM2.13C.fid

Plot date 2018-07-05

Figura 5. Espectro IV, composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-anisil)-pirimidina(3-c).



Figuras 6. Espectros do ^1H -NMR e ^{13}C -NMR, respectivamente, composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-anisil)-pirimidina(3-c).

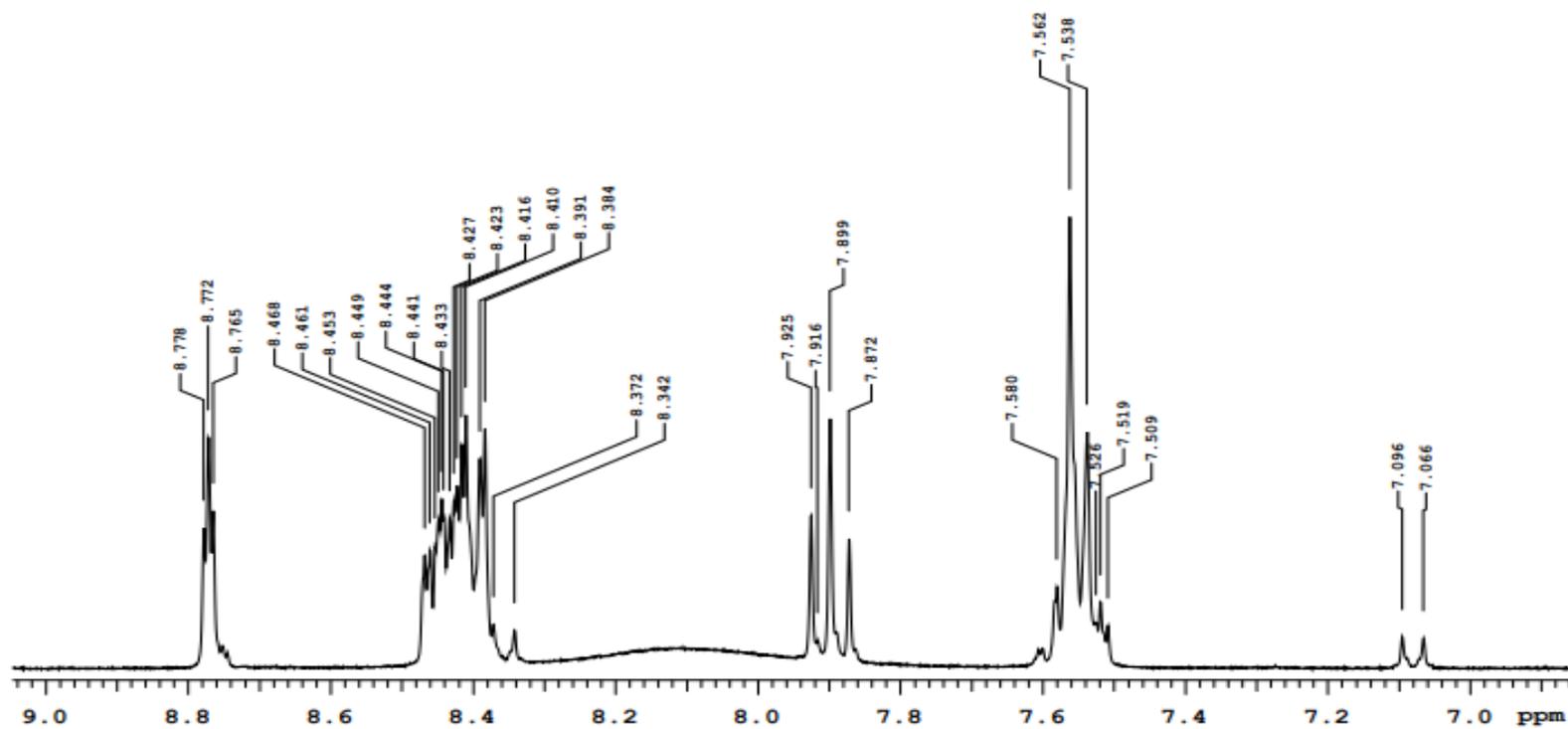


SZNM3

Sample Name	SZNM3	Pulse sequence	PROTON	Temperature	25	Study owner	central
Date collected	2018-05-18	Solvent	dmsd	Spectrometer	Agilent300-vnmrs300	Operator	vnmr1

Amostra SZNM3

Data 18.05.18_UFPE



SZNM3

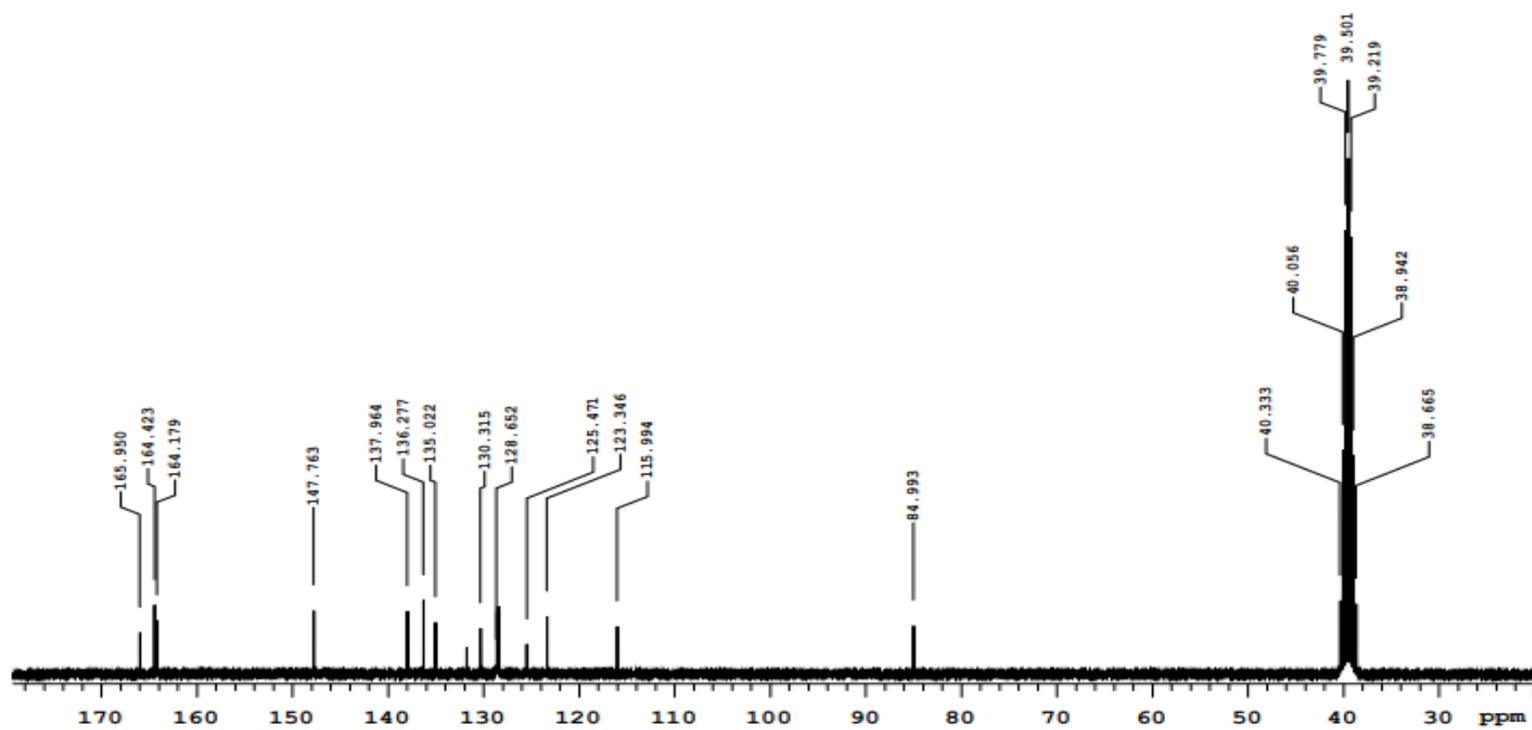
Sample Name **SZNM3**
Date collected **2018-05-18**

Pulse sequence **CARBON**
Solvent **dms**

Temperature **25**
Spectrometer **Agilent300-vnmrs300**

Study owner **central**
Operator **vnmr1**

SZNM3



ANEXO B - NORMAS DA REVISTA: EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise. Text, tables and figures must show minimal overlap, and must be internally consistent.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- ***Corresponding author.***

The manuscript must be submitted by the person who is in charge of correspondence at all stages of the editorial process, production, and post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area codes) are provided, in addition to the e-mail address (preferably an institutional e-mail address) and the complete postal address. Contact details of the other authors must be kept up to date by the corresponding author.

- ***Author names and affiliations.*** Where names may be ambiguous (e.g., a double name, or possible confusion about first/last names), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and the e-mail address (preferably an institutional email address) of each author.

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more, but should be readable on screen at a size of 200 × 500 pixels (at 96 dpi this corresponds to 5 × 13 cm). Bear in mind readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstractsforexamples>.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations are a hindrance for the reader. Use as few abbreviations as possible and write out names of compounds, receptors, etc., in full throughout the text of the manuscript, with the exceptions given below. Unnecessary and nonsense abbreviations are not allowed. Generic names should not be abbreviated. As an example, AMP, HAL, HIST, RAMH, TAM, SST, for amphetamine, haloperidol, histamine, (R)-&agr; -methylhistamine, tamoxifen, somatostatin, are not accepted. Abbreviations which have come to replace the full term (e.g., GABA, DOPA, PDGF, 5-HT, for &Ugr; -aminobutyric acid, 3,4-dihydroxyphenylalanine, PDGF, 5-hydroxytryptamine) may be used, provided the

term is spelled out in the abstract and in the body of the manuscript the first time the abbreviation is used. Unwieldy chemical names may be abbreviated. As an example, 8-OH-DPAT, DOI, DTG, BAPTA, for 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin, 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, 1,3-di(2-tolyl)-guanidine, 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, are acceptable; however, the full chemical name should be given once in the body of the manuscript and in the abstract, followed in both cases by the abbreviation. Code names may be used, but the full chemical name should be given in the text and in the abstract. *Authors not conforming to these demands may have their manuscripts returned for correction with delayed publication as a result.*