



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

MARCELA DE ARAUJO SOBRAL

PIRIMIDINAS INÉDITAS: obtenção e estudo do potencial biológico

Recife

2021

MARCELA DE ARAUJO SOBRAL

PIRIMIDINAS INÉDITAS: obtenção e estudo do potencial biológico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Química para a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião José de Melo

Coorientadora: Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Sobral, Marcela de Araujo
Pirimidinas inéditas: obtenção e estudo do potencial biológico /
Marcela de Araujo Sobral - 2021.
111 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Sebastião José de Melo
Coorientadora: Gláucia Manoella de Souza Lima
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Recife, 2021.

Inclui referências e apêndice.

1. Potencial farmacológico 2. Biofilme 3. Sinergismo
I. Melo, Sebastião José de (Orientador) II. Lima, Gláucia Manoella de
Souza (Coorientadora) III. Título

615.4 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-011

MARCELA DE ARAUJO SOBRAL

PIRIMIDINAS INÉDITAS: obtenção e estudo do potencial biológico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Área de Concentração Biologia Química para a Saúde, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em:20/01/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Sebastião José de Melo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Zenaide Severina do Monte
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Allana Lemos Andrade Gouveia
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, Maria José e Mario, ao meu esposo Eugenio Moura, meus amados filhos Alice e Daniel e minha irmã Karina. Por todo apoio, incentivo, amor, compreensão e por ser meu suporte nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nos ampara em todos os momentos em seu infinito amor e Nossa Senhora, grandiosa mãe que nos acolhe em seu coração sempre. Sou muito grata por tudo que me foi proporcionado em toda minha vida especialmente no que se refere aos últimos quatro anos.

Aos meus pais Maria José e Mario sempre presentes me auxiliando e sendo meu suporte e incentivo seja na companhia diária a UFPE ou em casa cuidando de minhas preciosidades. Mãe, serei eternamente agradecida, por tudo.

Ao meu Esposo, Eugenio Moura, por estar sempre presente em minha vida (mesmo agora com a distância física) por todo cuidado e amor e por ter me auxiliado e aconselhado sempre que precisei, muito obrigada!

Aos meus filhos queridos, Alice e Daniel por todo amor, carinho, preocupação. Ter vocês me minha vida torna tudo menos difícil e mais feliz. Filha suas orações na janela junto com a vovó são inesquecíveis! Obrigada sempre!

A minha irmã Karina por todo incentivo e cuidado, meus sinceros agradecimentos.

A meus avós maternos e paternos, onde quer que estejam sei que estão vendo! Vó Sebastiana agora serei doutora (como a senhora me chamava), saudades!

A minha cunhada Ana Carolina por sua amizade e conversas, momentos de diversão com as crianças e conselhos partilhados nos últimos anos. Meu muito obrigada!

Ao meu Orientador o Prof^o. Dr^o. Sebastião José de Melo, pela confiança, disponibilidade para orientação, por estar disponível para qualquer esclarecimento e pelo conhecimento fornecido meus agradecimentos!

A minha mais que Co-orientadora, Prof^a Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima, tornou-se minha amiga o longo de todos os anos de UFPE, sempre esteve presente, me ensinando, orientando e me ouvindo com toda atenção em todos os sentidos que necessitei sejam acadêmicos ou não. Professora Gláucia, serei eternamente grata por tudo!

A Prof^a. Dr^a. Janete Magali de Araújo, agradeço de todo coração tudo que a senhora fez por mim, seja ainda na graduação até os dias atuais. Tenho muita admiração e carinho pela senhora!

A Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão, Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento e Prof^a. Kêsia Xisto Fonseca Ribeiro de Sena professoras queridas, sou muito grata a cada uma por todos

os conselhos, ensinamentos, pelo carinho e cuidado que sempre existiu desde o início da minha vivência do Departamento de Antibióticos.

A Prof. Dr^a. Zenaide Severina do Monte por toda sua ajuda, indispensável para realização deste trabalho e por toda dedicação dispensada, mesmo em momentos difíceis, meus sinceros agradecimentos!

A Fátima Regina, minha amiga querida e companheira de Laboratório, já lhe disse muitas vezes o quanto sou agradecida por tudo e reafirmo, ter você por perto com esse coração de mãe me deixa extremamente feliz e tranquila. Muito Obrigada!

Aos alunos que fazem o LABGEM (Laboratório de Genética de Microrganismos) cada um de vocês sejam dos mais antigos aos mais novos, agradeço pela oportunidade de convivência diária e pela troca de conhecimento. Obrigada meninos!

Aos amigos Allana, Luiz Carlos e Amanda Silva por toda ajuda, incentivo e parceria na Microbiologia. Meus sinceros agradecimentos!

A todos os funcionários, técnicos e professores, que fazem e fizeram parte do Departamento de Antibióticos meus agradecimentos pela solicitude nos momentos que precisei e pelos ensinamentos, obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e a Secretária Adenilda Eugenia de Lima por toda atenção sempre que precisei.

As bibliotecárias e servidores da Biblioteca Setorial do Centro de Biociências e da Biblioteca Central que foram muito solícitos e atenciosos, muito obrigada!

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Pirimidinas são compostos presentes naturalmente em diversos alimentos, são constituintes dos ácidos nucleicos e apresentam variadas atividades biológicas. Este trabalho apresenta a síntese de quatro compostos pirimidínicos inéditos (**3a-d**). As reações de síntese, realizadas entre intermediários de Michael e arilamidinas, apresentaram rendimentos variando de 75-96% sendo identificados por técnicas de Ressonância magnética nuclear (RMN) de Carbono e Hidrogênio e Infravermelho. Inicialmente nos ensaios de atividade biológica foi determinado a Concentração Mínima Inibitória, CMI ($\mu\text{g/mL}$) e o perfil de resistência das cepas originárias de isolados clínicos frente a antibióticos comerciais. A CMI revelou que *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 e *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025B apresentaram resultados de concentrações mais baixas variando de 125 $\mu\text{g/mL}$ a 250 $\mu\text{g/mL}$. O perfil de resistência mostrou que *A. baumannii* UFPEDA 1025B e *P. aeruginosa* UFPEDA 64 foram classificados como resistentes para Ampicilina-Sulbactam e Meropenem respectivamente. Foram realizados também testes de atividade anti-biofilme, cinética de morte, sinergismo além de atividade leishmanicida, tripanocida e atividade citotóxica. Atividade anti-biofilme e cinética de morte realizados frente a *S. aureus* UFPEDA 02, *E. coli* UFPEDA 224, *P. aeruginosa* UFPEDA 416 e *A. baumannii* UFPEDA 1025B, nas concentrações (2xCMI, o CMI e 1/2xCMI) evidenciou que os compostos pirimidínicos **3a-c** apresentaram ação anti-biofilme e a análise da cinética de morte mostrou que estes foram antagonísticos ao crescimento microbiano. No ensaio de sinergismo os compostos **3a-c** combinados a Ampicilina-Sulbactam, frente a *A. baumannii* UFPEDA1025B, promoveram efeito sinérgico destacando-se o **3c** que reduziu na concentração inicial, em 32 vezes a Ampicilina-Sulbactam. Para atividade leishmanicida, frente a *Leishmania amazonenses* o composto **3c** apresentou resultado moderado quando comparado ao controle Miltefosina. A atividade tripanocida, o composto **3b** apresentou inibição parasitária, comparado ao controle Benzonidazol com baixa citotoxicidade em células RAW 264.7. O estudo de **3a-d**, por *Docking* molecular frente a *T. cruzi*, mostrou que os compostos foram capazes de uma interação energeticamente favorável com a cruzaina. Desse modo, os resultados apontam que os compostos pirimidínicos sintetizados (**3a-d**) são promissores para o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: potencial farmacológico; biofilme; sinergismo; *docking* molecular.

ABSTRACT

Pyrimidines are compounds naturally present in various foods, are constituents of nucleic acids and have varied biological activities. This work presents the synthesis of four new pyrimidine compounds (**3a-d**). The synthesis reactions, carried out between Michael intermediates and arylamidines, showed yields ranging from 75-96%, being identified by carbon and hydrogen and infrared nuclear magnetic resonance (NMR) techniques. Initially in the biological activity assays, the Minimum Inhibitory Concentration, IMC ($\mu\text{g} / \text{mL}$) and the resistance profile of the strains originating from clinical isolates against commercial antibiotics were determined. The IMC revealed that *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 and *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025B showed results of lower concentrations ranging from 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The resistance profile showed that *A. baumannii* UFPEDA 1025B and *P. aeruginosa* UFPEDA 64 were classified as resistant to Ampicillin-Sulbactam and Meropenem respectively. Tests of anti-biofilm activity, kinetics of death, synergism, in addition to leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activity were also carried out. Anti-biofilm activity and death kinetics performed against *S. aureus* UFPEDA 02, *E. coli* UFPEDA 224, *P. aeruginosa* UFPEDA 416 and *A. baumannii* UFPEDA 1025B, in concentrations (2xCMI, CMI and 1 / 2xCMI) showed that pyrimidinic compounds **3a-c** showed anti-biofilm action and the analysis of death kinetics showed that they were antagonistic to microbial growth. In the synergism test, compounds **3a-c** combined with Ampicillin-Sulbactam, compared to *A. baumannii* UFPEDA1025B, promoted a synergistic effect, highlighting the **3c** which reduced the initial concentration, 32 times Ampicillin-Sulbactam. For leishmanicidal activity, against *Leishmania amazonenses*, compound **3c** showed moderate results when compared to the control Miltefosine. The trypanocidal activity, compound **3b** showed parasitic inhibition, compared to the control Benzonidazole with low cytotoxicity in RAW 264.7 cells. The **3a-d** study, by molecular Docking against *T. cruzi*, showed that the compounds were capable of an energetically favorable interaction with cruzaine. Thus, the results indicate that the synthesized pyrimidine compounds (**3a-d**) are promising for the development of new drugs.

Keywords: pharmacological potential; biofilm; synergism; molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura - 1	Anel da Pirimidina.....	20
Figura - 2	Reação da síntese utilizando irradiação com UV de 2,6-dimetil-4-amino-pirimidina-5carbonitrila.....	22
Figura - 3	Reação de obtenção de 4,6-diaminopirimidina.....	22
Figura - 4	Reação de obtenção de 5,7-dimeteil-[1,2,4] triazolo [1,5 ^a]pirimidina.....	22
Figura - 5	Reação da Síntese de 4-amino-2-aryl-5-ciano-6{3 e 4(N-ftalimidofenil)}pirimidina.....	23
Figura - 6	Reação de obtenção de dicloroaminopirimidina.....	23
Figura - 7	Reação da Síntese de Pirazolopirimidinas I.....	24
Figura - 8	Reação da Síntese de Pirazolopirimidinas II.....	24
Figura - 9	Reação de Síntese de derivados de triazolo[4,3- <i>a</i>]pirimidina.....	25
Figura - 10	Reação de síntese de 3,4-dihidro-5-(5-mercapto-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-yl)-6-metil-4-fenilpirimidin-2(1 <i>H</i>).....	25
Figura - 11	Síntese dos análogos de pirimidina.....	42

ARTIGO 1

Figura - 1	Síntese das novas pirimidinas 3a-c	57
Figura - 2	Curva tempo de morte – <i>Time Kill</i> do <i>A. baumannii</i> UFPEDA 1025B, <i>Escherichia coli</i> UFPEDA 224, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416 e <i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02 frente ao composto 3a(A) , composto 3b(B) e composto 3c (C) nas concentrações de 2XCMI, CMI e 1/2XCMI nos tempos 0,3,6,9,12 e 24horas.....	67

ARTIGO 2

Esquema - 1	Síntese dos composto 4-Amino-5-ciano-2-(m-metoxifenil)-6-fenil-pirimidina (3d).....	84
Figura - 1	Cluster dos derivados pirimidínicos 3a-d acoplados ao sítio de ligação da cruzaina.....	87
Figura - 2	Interações entre o WRR-483 e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.....	89
Figura - 3	Interações entre os derivados pirimidínicos e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.....	90
Figura - 4	Interações de hidrogênio entre o benzonidazol e a cruzaina.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1	Lista de Microrganismos teste. Bactérias Gram-positivas e Bactérias Gram-negativas.....	43
Tabela - 2	Valores de referência para classificação quanto a formação de biofilme.....	46

ARTIGO 1

Tabela - 1	Concentração mínima inibitória (CMI/ $\mu\text{g/mL}$), concentração mínima bactericida (CMB/ $\mu\text{g/mL}$) dos diferentes compostos pirimidínicos frente aos microrganismos testes e perfil de resistência de cepas frente aos antibióticos comerciais.....	61
Tabela - 2	Atividade sinérgica dos compostos pirimidínicos (3a-c) combinados a Ampicilina-Sulbactam frente a <i>Acinetobacter baumannii</i> UFPEDA 1025B.....	64
Tabela - 3	Classificação dos microrganismos quanto a formação de biofilme e ação anti-biofilme dos compostos 3a , 3b e 3c nas concentrações de 2xCMI, CMI e 1/2xCMI frente a culturas bacterianas.....	70

ARTIGO 2

Tabela - 1	Atividades tripanocida e leishmanicida dos derivados pirimidínico 3a-d	86
Tabela - 2	Ranking das energias de ligação dos derivados pirimidínicos 3a-d e compostos padrão.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMR -	Resistência antimicrobiana
CC 50% -	Concentração Citotóxica em 50%
CCD -	Cromatografia camada delgada
CIF -	Concentração Inibitória Fracionada
CLSI -	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB -	Concentração Mínima Bactericida
CMI -	Concentração Mínima Inibitória
CO ₂ -	Dióxido de Carbono
DMSO -	Dimetil Sufóxido Deuterado
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DO -	Densidade Óptica
DO _c -	Densidade Óptica amostra controle
DTNS -	Doenças tropicais negligenciadas
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
LC -	Leishmaniose Cutânea
LM -	Leishmaniose Mucosa
LSPQN -	Laboratório de Sínteses e Química de Produtos Naturais
LTA -	Leishmaniose Tegumentar Americana

LV -	Leishmaniose Visceral
MH -	Meio de Cultura Mueller-Hinton
MTT -	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
μM -	Micromolar
OMS -	Organização Mundial da Saúde
pH -	Potencial hidrogeniônico
PPM -	Medida em partes por milhão
SFB -	Soro Fetal Bovino
UV -	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	ASPECTOS GERAIS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DA PIRIMIDINA.....	20
2.2	SÍNTESES DE DERIVADOS DA PIRIMIDINA.....	21
2.3	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	26
2.4	SINERGISMO ENTRE COMPOSTOS.....	28
2.4.1	Técnica de <i>Checkerboard</i> “tabuleiro de xadrez”	29
2.5	CURVA DE MORTE – <i>Time Kill</i>	30
2.6	BIOFILMES MICROBIANOS.....	31
2.6.1	Processo de Formação do Biofilme.....	32
2.6.2	Infecções associadas a biofilmes e Controle.....	35
2.7	DOENÇAS NEGLIGENCIADAS – LEISHMANIOSE E TRIPANOSSOMÍASE.....	36
2.7.1	Leishmaniose.....	36
2.7.2	Tripanossomíase.....	39
2.8	<i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	40

3	METODOLOGIA.....	42
3.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	42
3.2	LINHAGENS PADRÃO PARA REALIZAÇÃO DOS TESTES	43
3.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA- CMI.....	43
3.3.1	Leitura da Microplaca.....	44
3.4	DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS.....	44
3.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO.....	45
3.5.1	Técnica de <i>Checkerboard</i>.....	45
3.6	ESTUDO DA CURVA DE MORTE – <i>Time Kill</i>	45
3.7	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	46
3.8	ENSAIO DE ATIVIDADE ANTI-BIOFILME.....	47
3.9	CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS.....	47
3.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	48
3.10.1	Ensaio forma Promastigota.....	48
3.10.2	Ensaio forma Amastigota.....	48
3.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA	48
3.11.1	Ensaio forma Tripomastigota.....	48
3.12	ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) – ATIVIDADES PARASITICIDAS.....	49
3.13	<i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	49

4	ARTIGO 1 – SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, AÇÃO ANTIBIOFILME E POTENCIAL SINÉRGICO DE COMPOSTOS PIRIMIDÍNICOS	51
5	ARTIGO 2 – ATIVIDADES DUAL PARASITICIDAS ANTILEISHMANIA E ANTICHAGÁSICA DE ANÁLOGOS DA PIRIMIDINA COM O ESTUDO DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR	78
6	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE - PATENTE PIRIMIDINAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AÇÃO ANTIMICROBIANA E POTENCIAL SINÉRGICO COM ANTIMICROBIANO DE USO CLÍNICO	

1 INTRODUÇÃO

Os compostos heterocíclicos têm sido um objeto de estudo especial na química orgânica devido sua abundante presença em produtos naturais e suas diversas propriedades biológicas, o que torna incessante a descoberta e o desenvolvimento de novas substâncias bioativas. A grande maioria dos fármacos apresentam pelo menos um heterocíclico em sua estrutura (KATRITZKY & RACHWAL, 2011; DUA et al., 2011; SAINI et al., 2013).

Heterocíclicos são amplamente utilizados na química medicinal pois pequenas modificações estruturais, como por exemplo, a inserção de novos grupos funcionais, permite alterações nas suas propriedades químicas, físicas e biológicas, podendo vir a potencializar suas atividades farmacológicas (DO MONTE et al., 2016). Diante disso as indústrias química e farmacêutica, investem na obtenção de derivados heterocíclicos, que podem ser encontrados em corantes, agroquímicos, polímeros e principalmente em fármacos (KATRITZKY, 2004; CASARIN et al., 2008; KATRITZKY & RACHWAL, 2011).

Nas últimas décadas a área de síntese orgânica evoluiu muito em pesquisas que proporcionaram aumento no número e complexidade dos novos compostos sintetizados. Atualmente, a síntese de compostos orgânicos tem fundamental importância no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos cuja finalidade é promover a melhoria da saúde em pacientes de todo o mundo. (SANGI, 2016).

A pirimidina é um composto orgânico heterocíclico-aromático semelhante ao benzeno e à piridina, contendo dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3 do anel de seis membros (VYAS et al., 2017). Pirimidina e seus derivados demonstram uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas, incluindo propriedades anticonvulsivantes, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatória, antibacteriana além de apresentarem atividades antiparasitária, ansiolíticos e anti-inflamatórios (SAINI et al., 2013).

A quimioterapia com fármacos antimicrobianos fez avanços notáveis, resultando na visão excessivamente otimista de que doenças seriam vencidas em um futuro próximo. No entanto a administração destes compostos antimicrobianos no tratamento e prevenção de doenças infecciosas provocou uma resposta progressiva e constante aos microrganismos que passaram a produzir resistência a estes fármacos (SAGA & YAMAGUCHI, 2009). Sendo assim, infecções por

organismos resistentes a drogas continuam sendo um problema importante na prática clínica de difícil resolução (GOULD& BAL, 2013).

Têm-se como exemplo amplamente difundido na evolução da resistência aos antibióticos a penicilina que durante a 2ª Guerra Mundial era eficaz contra uma ampla gama de doenças bacterianas, hoje, pouco mais de 70 anos depois, existe um número crescente de patógenos que não são apenas resistentes a penicilina e seus derivados, mas também a todos os outros antibióticos disponíveis (SENGUPTA et al., 2013; VENTOLA, 2015).

Uma outra preocupação da saúde pública, além da resistência bacteriana a antibióticos, refere-se a doenças tropicais negligenciadas. Tomados em conjunto a tripanossomíase humana africana (HAT), Doença de Chagas e Leishmaniose afetam a vida de 226 milhões de pessoas no mundo todo, principalmente em países subdesenvolvidos (SCARIM et al., 2018). Causados pelos parasitas protozoários *Trypanosoma brucei*, *T rypanosoma cruzi* e *Leishmania spp.*, respectivamente, essas doenças são disseminadas por insetos vetores na América Latina, África e partes do sul da Ásia. (SIMARRO et al., 2012; WHO,2015).

Tendo em vista a necessidade de novas alternativas de tratamento seja para infecções bacterianas ou parasitárias e tendo conhecimento das propriedades farmacológicas associadas às pirimidinas, suscitou-se a ideia de sintetizarmos uma nova série de compostos pirimidínicos **3a-d**, caracterizarmos essas estruturas por métodos espectroscópicos usuais (1-H, 13-C RMN e Infravermelho), posteriormente realizarmos o estudo das atividades farmacológicas e *docking* molecular determinando se os resultados encontrados foram superior ou similar aos análogos desses compostos já descritos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar novos derivados pirimidínicos e avaliar potenciais propriedades farmacológicas dos mesmos.

1.1.2 Objetivos Específicos

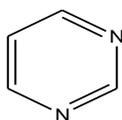
- a) Obter uma nova série de análogos pirimidínicos;
- b) Determinar as estruturas dos novos produtos obtidos através dos métodos espectroscópicos;
- c) Determinar a concentração mínima inibitória frente a diferentes cepas padrão de microrganismos Gram-positivos e Gram negativos bem como linhagens de isolados clínicos;
- d) Avaliar o potencial sinérgico por *checkerboard* ;
- e) Realizar estudo da Curva de Morte - *Time Kill*;
- f) Avaliar a formação de biofilme por diferentes cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e ação anti-biofilme;
- g) Avaliar a atividade citotóxica frente a células de macrófagos e a ação leishmanicida e tripanocida;
- h) Realizar estudo de modelagem, *Docking* molecular, dos compostos com ação parasiticida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DA PIRIMIDINA

As pirimidinas fazem parte da classe de composto orgânicos que contêm um anel de seis membros, sendo constituída por 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 E HAUPTMANN, 2003).

Figura 1- Anel da Pirimidina



A nomenclatura sistemática segue a mesma regra dos demais heterocíclicos, ou seja, os nitrogênios recebem as menores numerações. Assim, a pirimidina recebe o nome de 1,3-diazina ou metadiazina, ou 1,3-diazobenzeno (SOLOMONS & FRYHLE, 2009).

A pirimidina é pouco susceptível ao ataque eletrofílico pelo fato de ser uma estrutura π deficiente, uma vez que a eletronegatividade do nitrogênio um aceptor de elétrons, confere a pirimidina as propriedades de uma base fraca (CAREY & SUNDBERG, 1990).

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. A adição de substituintes aumenta este efeito, enquanto que os eletrodadores o diminuem (BROWN, 1984).

O núcleo da pirimidina ocorre abundantemente na natureza nomeadamente em substâncias como vitaminas a exemplo de tiamina, riboflavina (encontrada no leite, ovo e fígado), ácido fólico, ácido, barbitúrico (2,4,6-trihidroxipirimidina), ácido úrico e alcalóides obtidos de chá, café, cacau (GUPTA et al., 2010; ASIF, 2017). Destacam-se como uma das duas famílias biológicas de moléculas de maior importância contendo nitrogênio, as chamadas bases nitrogenadas. O núcleo da pirimidina é encontrado como o esqueleto interno nos componentes do ácido nucleico com a

uracila, timina e citosina. As pirimidinas são conhecidas desde seus primeiros dias como componentes essenciais do ácido nucléico (JAIN et al., 2006; ASIF, 2017).

O anel heterocíclico de pirimidina está associado a muitos compostos ativos. Várias moléculas que apresentam uma fração de pirimidina em sua estrutura são conhecidas por possuírem significativa atividade anticâncer, anti-HIV, antimalárico e também a propriedade de inibidor da proteína quinase antifúngica (RANI et al., 2015; SUN et al., 2016; BAI et al., 2017)

Outras atividades desempenhadas pelas pirimidinas são ação analgésica, antiinflamatória, antimicrobiana, tripanocida, anticonvulsivante, apresenta atividade antiplaquetária e atua em atividades no sistema nervoso central (SAYED et al.,2002; DOGRUER et al., 2003; OKCELIK et al., 2003; EL-GAZZAR et al., 2008; VYAS et al.,2017).

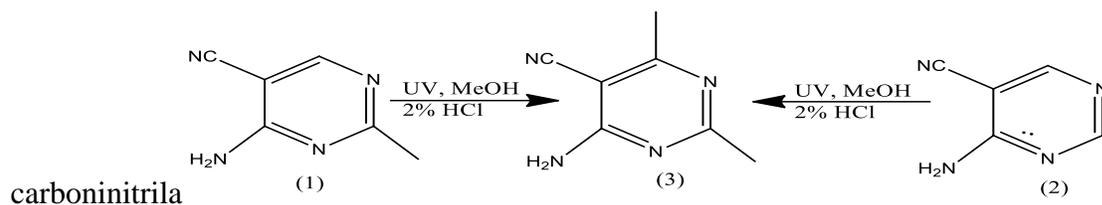
2.2 SÍNTESES DE DERIVADOS DA PIRIMIDINA

As primeiras pirimidinas podem ter sido originadas a partir de reações catalíticas da formamida e o HCN sob condições de temperaturas moderadas (SALADINO, 2002).

Compostos heterocíclicos como as pirimidinas, podem ser obtidos através de reações de condensação entre malonitrila ou seus derivados. Grande parte da síntese de pirimidinas ocorre entre reagentes com grupos contendo N-C-N e C-C-C. Estas reações de síntese podem acontecer em várias etapas ou em processos mais rápidos de obtenção, envolvendo poucas etapas de síntese (TAYLOR & MCKILLOP, 1970; GILCHRIST, 1992).

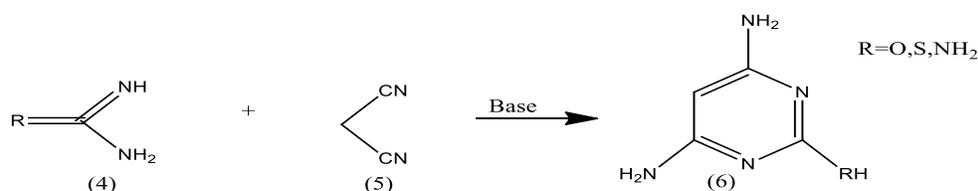
O composto 2,6-dimetil-4-amino-pirimidina-5-carbonitrila (3), contendo grupos metílicos nas posições 2 e 6 foi obtido através da irradiação de 2-metil-4-amino-5-ciano pirimidina (1) e de 4-amino-pirimidina-5-carbonitrila (2), respectivamente, por UV em presença de metanol e HCl (2%) (Figura 2) (OCHIAI & MORITA 1967).

Figura 2 - Reação da síntese utilizando irradiação com UV de 2,6-dimetil-4-amino-pirimidina-5-carbonitrila



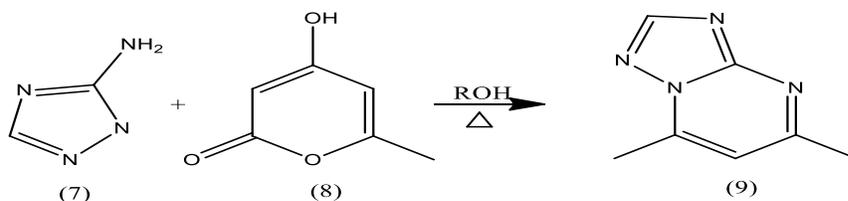
A reação de condensação catalisada por uma base, guanidina, ureia ou tiourea com malonitrila produziu a 4,6-diaminopirimidina (Figura 3), levando-se a prever que a condensação de amidinas (4) com malonitrila (5) produziu análogos (6) (BROWN EMASON, 1962).

Figura 3-Reação de obtenção de 4,6-diaminopirimidina



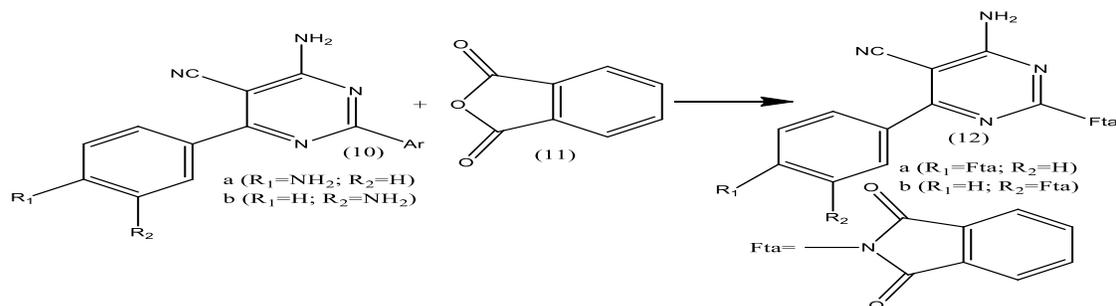
O 5,7-dimeteil-[1,2,4]-triazolo [1,5a] pirimidina (9) foi obtido entre a reação de 3-amino-1,2,4-triazolo (7) com 4 -hidroxi-6-metelpiran-2ona (8) (ELOTMANI *et al.*, 2002) (Figura 4).

Figura 4-Reação de obtenção de 5,7-dimeteil-[1,2,4]-triazolo [1,5a] pirimidina



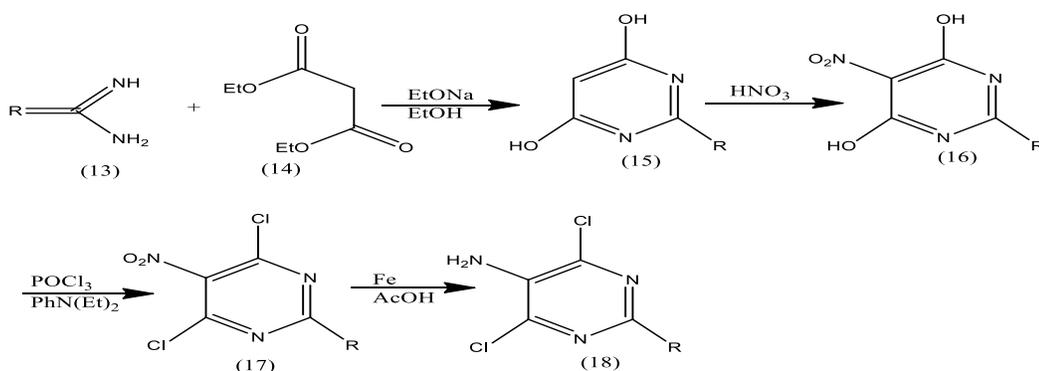
Uma série de cinco 4-amino-pirimidinas-5-carbonitrilas (12), contendo o resíduo da ftalimida foram produzidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese e Química de Produtos Naturais (LSQPN) através da reação de 6-(amino-aril) pirimidinas (11) com anidrido ftálico (10) (FALCÃO *et al.*, 2003) (Figura 5).

Figura 5-Reação da Síntese de 4-amino-2-aryl-5-ciano-6{3 e 4(N-ftalimidofenil)} pirimidina

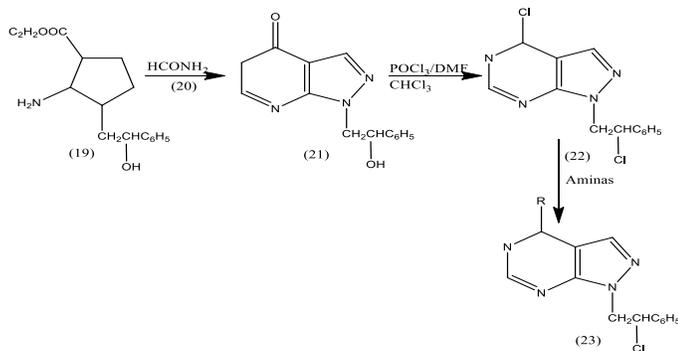


A pirimidina-4,6-diol (4) foi obtida pela condensação da amidina substituída (13) com malonato de etila (14) em presença de etóxido de sódio. A nitração controlada do composto (15) fornece o análogo 5-nitro-pirimidina-4,6-diol (16). A cloração resulta na completa conversão de 5-nitro-pirimidina-4,6-diol (16) em seu correspondente diclonitropirimidina (17), enquanto que a redução promove a formação da dicloaminopirimidina (18) (Figura 6) (BAINDUR et al., 2003).

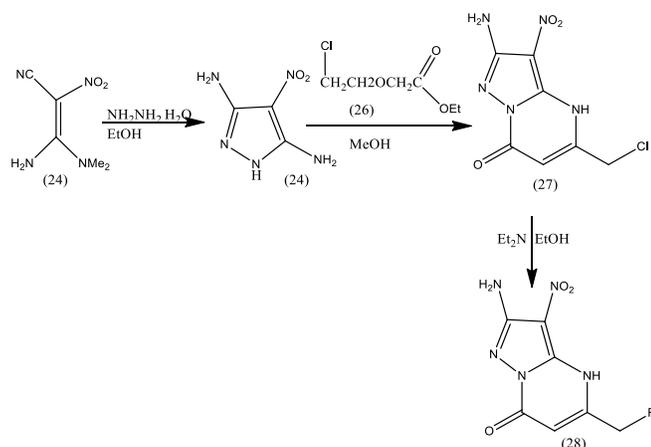
Figura 6- Reação de obtenção de dicloroaminopirimidina



O pirazolo[3,4-*d*]-pirimidinona (21) foi obtido pela reação de 5-amino-1-(2-hidroxi-2-feniletil)1-*H*-pirazol(19) com formamida(20), que por cloração com complexo Vilsmeier (POCl_3 :DMF/1:1) produz o derivado di-halogenado (22) direcionando o átomo de cloro para a posição 4 do anel pirimidínico e para o N em posição 1 da cadeia lateral do anel pirazólico. A substituição região seletiva do cloro em C4 do composto (22) com excesso de várias aminas primárias e secundárias, em tolueno, dá origem ao produto desejado 1-*H*-pirazolo[3,4-*d*] pirimidina (23) com bons rendimentos (Figura 7) (SCHENONE et al., 2004).

Figura 7-Reação da Síntese de Pirazolopirimidinas I

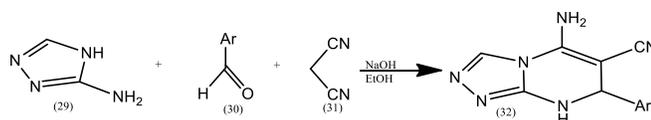
A síntese de pirazolopirimidinas(28) ocorre por duas etapas de condensações. A primeira foi obtida a partir da condensação entre 1-dimetilamino-2-nitroenamina (24) com hidrazina dando origem ao pirazol (25), este por sua vez na segunda etapa reagiu com 4-cloro-3-oxo-butanoato (26) formando 3,5-diamino-nitropirazol (27). Diferentes reações foram obtidas entre (27) com diferentes agentes nucleofílicos em presença de trietilamina no produto (28) (Figura 8) (MAKAROV, et al., 2005).

Figura 8- Reação da Síntese de Pirazolopirimidinas II

O 5-amino-7-aryl-7,8-dihidro-[1,2,3]-triazolo[4,3-a]pirimidina-6-carbonitrilas (32) foi obtido por via de três componentes, 3-amino-1,2,4-triazolo (29), por aldeído aromático (30) e

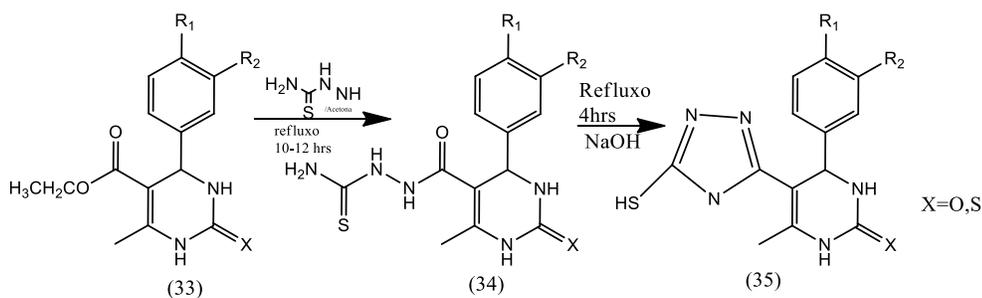
malonitrila (31) em meio básico (NaOH) por irradiação no ultrassom a temperatura ambiente (Figura 9) (ABLAJAN, et al., 2012).

Figura 9- Reação de Síntese de derivados de triazolo[4,3-*a*] pirimidina



O 3,4-dihidro-5-(5-mercaptop-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)-6-metil-4-fenilpirimidin-2(1*H*)-one (35) foi obtido pela reação da carbotioamida (5-(Carbotioamida)-3,4-dihidro-6-metil-4-fenilpirimidin-2(1*H*)-one(34) com NaOH. A pirimidina éster etílico (33) foi preparada a partir do benzaldeído etila cetoacetato com a ureia tiourea em presença de um ácido mineral pela reação de Biginelli (Figura 10) (ANDREWS E MANSUR, 2014).

Figura 10- Reação de síntese de 3,4-dihidro-5-(5-mercaptop-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)-6-metil-4-fenilpirimidin-2(1*H*)



O grupo do LSPQN (Laboratório de Sínteses e Química de Produtos Naturais) descreveu 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* nas formas epimastigota e tripomastigota. Nove compostos apresentaram maior atividade que o benzonidazol (BZN) para tripomastigotas. Também foi realizado um estudo de modelagem molecular usando o programa GOLD 5.2 onde foram obtidas informações sobre os locais de interações hidrofílicas e hidrofóbicas da pirimidina com a enzima cruzaina (DE MELO et al., 2018).

2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana (AMR) é uma grande preocupação sendo considerada um dos maiores riscos para a saúde no século XXI. Muitas cepas de bactérias tornaram-se multirresistentes e infecções previamente tratáveis tornaram-se potencialmente fatais (PARISH, 2018).

O uso excessivo e inadequado de agentes antimicrobianos continua sendo um dos fatores mais importantes que afetam os padrões de resistência aos antibióticos. O comportamento socioeconômico (incluindo vendas inadequadas nos balcões de farmácia, tomada de decisão inadequada na clínica médica humana e tratamento em massa na criação de animais) propiciam o uso em excesso de antibióticos levando ao aumento nas taxas de resistência entre patógenos causadores de doenças (LAXMINARAYAN, 2013).

O aumento nesse número de patógenos resistentes a compostos antimicrobianos estão cada vez mais relacionados as doenças nosocomiais que por sua vez tem impactado significativamente os sistemas de saúde envolvendo custos econômicos globais importantes. Estes efeitos estão relacionados a altas taxas de mortalidade e morbidade, aumento dos custos com tratamento, incertezas em diagnósticos e falta de confiança nos medicamentos tradicionais (SANTAJIT, 2016).

A *Infectious Disease Society of America* (IDSA) refere-se a um grupo de patógenos nosocomiais registrados com frequência como “patógenos ESKAPE”. ESKAPE abrange espécies Gram-positivas e Gram-negativas sendo constituído por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e Espécies de *Enterobacter* (RICE, 2008; BUSH, 2010).

Esses microrganismos em ambientes hospitalares acometem principalmente idosos, causando quadros de pneumonia, infecções urinárias, surgindo em feridas cirúrgicas, queimaduras, causando septicemia e infeções associadas a cateteres, inclusive sendo relatado uma das principais causas de morte nos EUA e apresentando altas taxas de mortalidade em países em desenvolvimento (OKEKE et al., 2005; LIPSKY et al., 2007).

Apesar da propagação das bactérias resistentes a antibióticos representarem uma ameaça substancial à morbidade e mortalidade em todo o mundo, a pesquisa e o desenvolvimento da indústria farmacêutica não conseguiram atender à necessidade clínica de novos antibióticos (WHO,

2017). A grande problemática no desenvolvimento de novos antimicrobianos tem sido a supressão das grandes empresas farmacêuticas deste segmento, no âmbito econômico a falta de retorno do investimento em antibióticos e as dificuldades na aprovação regulatória (PARISH,2018).

Diante disto a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu uma lista de prioridades visando patógenos multiresistentes para ajudar a focar recursos e atenção principalmente no que se refere ao desenvolvimento de novos antibióticos nos quais destacam-se como prioridade o *Mycobacterium tuberculosis*, e os carbapenem resistente como, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e representantes do gênero *Enterobacteriaceae* (TACCONELLI et al., 2017; WHO, 2017).

A última classe de antibióticos com ação contra bactérias Gram-negativas, as fluoroquinolonas sintéticas, foi introduzida há meio século. Ao longo dos últimos anos, a descoberta de novos antibióticos tem sido amplamente limitada a compostos de curto espectro de ação (IMAI et al., 2019).

No que se refere a resistência parasitária, para leishmaniose, também se tem demonstrado urgência e reavaliação das diretrizes de tratamento uma vez que este tem apresentado falhas de forma crescente principalmente devido a resistência a medicamentos. Desde a primeira metade do século 20 o tratamento da leishmaniose vem utilizando antimoniais pentavalentes de forma eficaz mas nos últimos 20 anos tem-se evidenciado aumento da resistência clínica (PONTE-SUCRE, 2017).

A falha terapêutica do benzonidazol (BZ), utilizada no tratamento da doença de Chagas, tem sido amplamente registrada e atribui-se a este fato a variações na suscetibilidade às cepas de *Trypanosoma cruzi*. Muitos desafios estão envolvidos na epidemiologia da doença de Chagas, principalmente no que se refere as limitações na quimioterapia específica disponível e a cobertura insuficiente do tratamento para os indivíduos atualmente infectados (MORENO et al., 2010).

Nesse contexto, pesquisas sobre novas substâncias antimicrobianas devem ser continuadas, bem como, têm sido pesquisadas novas estratégias de terapias antimicrobianas associando novos produtos sintéticos a fármacos já disponíveis comercialmente (SILVA, 2019).

2.4 SINERGISMO ENTRE COMPOSTOS

Na última década houve uma diminuição significativa na quantidade de novos candidatos a medicamentos que se apresentem como agentes terapêuticos clínicos eficazes (VITALI et al., 2013).

O desenvolvimento de procedimentos terapêuticos para infecções bacterianas tem de forma tradicional se baseado na triagem empírica para substâncias individuais que inibem o crescimento dos microrganismos. No entanto esse modelo tem se tornado menos favorável e as empresas farmacêuticas começaram a aderir a campanhas de triagem de alto rendimento com base em alvos, já que a tradicional se mostrava um processo demorado, com rendimentos e lucros insustentáveis (PAYNE, 2007).

Uma alternativa economicamente aplicável seria identificar novos usos para medicamentos existentes ("reaproveitamento") sozinho ou em terapias combinadas (CHONG et al, 2007; BOGUSKI et al, 2009).

Por muitos anos, a combinação de dois ou mais antibióticos foram reconhecidos como um método importante para, pelo menos, atrasar o desenvolvimento do patógeno e agir na emergência de resistência bacteriana (CHAMBERS, 2006).

O termo sinergia é derivado do grego syn-ergos, "trabalhando juntos". As sinergias tem descrição e aplicação em diversas situações como sistemas técnicos, na mecânica, na vida social humana entre outros. Em todas as situações, a sinergia descreve o fato de que um sistema, ou seja, a combinação e interação de dois ou mais agentes ou forças é tão satisfatório que o efeito combinado é maior do que a soma de seus efeitos individuais (BREITINGER, 2012).

Existem três formas possíveis de interação de agentes, quando as forças poderiam se somar (não afetando umas às outras), quando sua combinação pode produzir um resultado maior do que o esperado ou a combinação pode levar a um resultado inferior à soma dos efeitos individuais (BREITINGER, 2012).

De acordo com Wagner & Ulrich Merzenich (2009), interações aditivas ocorrem quando o efeito da mistura de duas ou mais substâncias é igual ao simples somatório do efeito destas, isoladamente. As interações sinérgicas, por sua vez, são observadas quando o efeito produzido por

uma combinação de substâncias é superior ao que se poderia esperar com base na contribuição individual de seus componentes.

A combinação de substâncias com efeito sinérgico pode aumentar a biodisponibilidade de substâncias ativas e/ou reduzir as doses destas. Conseqüentemente, a toxidez e efeitos adversos diminuem, contribuindo dessa forma para o aumento da eficácia terapêutica. A sinergia pode resultar de dois mecanismos principais: (a) efeitos farmacocinéticos, observados quando uma substância influencia a solubilidade, absorção ou metabolismo de outra, e (b) efeitos farmacodinâmicos, relacionados à atuação simultânea sobre diferentes alvos terapêuticos inter-relacionados (CASANOVA, 2017).

2.4.1 Técnica de *Checkerboard* "tabuleiro de xadrez"

Entre as técnicas mais empregadas na avaliação da combinação de dois antimicrobianos exibindo sinergismo está a técnica de *checkerboard* conhecida também como tabuleiro de xadrez. O método *checkerboard* é uma técnica que frequentemente tem sido utilizada para avaliação de combinações de compostos antimicrobianos *in vitro*. É uma técnica de fácil compreensão, a matemática utilizada para calcular e interpretar os resultados ser simples e poder ser executado em laboratórios de microbiologia usando equipamentos que normalmente estão disponíveis (LORIAN, 2005).

Lorian (2005), define o termo "tabuleiro de xadrez" a superfície (tubos ou poços de microtitulação ou placas de ágar) formado por variadas diluições dos dois compostos antimicrobianos sendo testados, em concentrações iguais, superior e inferior de suas concentrações mínima inibitória (CMIs) frente aos organismos que estão sendo testados.

Nesta técnica a concentração inibitória fracional (CIF) emprega uma metodologia similar a utilizada para a determinação da concentração inibitória mínima (CMI). A combinação é dita tendo efeito sinérgico se houver uma redução de 4 vezes na CMI de cada agente antimicrobiano testado sozinho. O método do *checkerboard* é um método mais fácil de realizar, no entanto é apenas um indicador da atividade inibitória (IBEZIN, 2006.; MEDEIROS,2012).

Para execução da técnica do tabuleiro de xadrez grandes quantidades de compostos antimicrobianos e meios de cultura seriam necessários para realizá-lo em tubos de ensaio por isso

muitos trabalhadores preferem usar placas de microtitulação porque requer menores quantidades de antibióticos e meio de cultura. Assim, o tabuleiro de xadrez consiste em colunas nas quais cada poço da microplaca contém a mesma quantidade da droga (droga A) sendo diluída ao longo do eixo x e linhas em que cada poço da microplaca contém a mesma quantidade do medicamento (medicamento B) sendo diluído no eixo y. O resultado é que cada quadrado no tabuleiro de xadrez (que representa o poço) contém uma combinação única dos dois medicamentos testados (LORIAN, 2005).

Embora a técnica apresente algumas limitações, estes problemas podem ser solucionados permitindo a execução da mesma com resultados confiáveis. Uma problemática abordada é a evaporação, já que em cada poço de microtitulação são trabalhados pequenos volumes (100 a 200 μL), este erro poderia ser evitado usando tampas adesivas de plástico disponíveis nos fabricantes dessas placas. Um outro problema é a anaerobiose, mas pesquisas sugerem que tampas de plástico (mencionadas anteriormente) não inibe o crescimento de aeróbios estritos. A eletricidade estática de superfície da placa pode ser outra problemática já que pode se acumular sob certas condições e pode interferir na diluição efetiva do antimicrobianos. Limpar o fundo da placa com um pano úmido geralmente é suficiente para resolver esse problema (KROHN, 2019).

2.5 CURVA DE MORTE - *Time Kill*

Ao ser desenvolvido estudos de novos antimicrobianos, é importante avaliar o risco de desenvolvimento de tolerância e / ou resistência (RAPACKA-ZDONCZYK et al, 2019). As curvas de morte podem avaliar a eliminação /crescimento microbiano em função do tempo e concentração do antimicrobiano objetivando ainda otimizar regimes de dosagem com base em uma abordagem racional e científica (MUELLER et al, 2004).

As curvas de letalidade podem ainda ser utilizadas para observar o sinergismo / antagonismo ou mesmo efeito aditivo quando a combinação de duas ou mais substâncias são administradas em conjunto (SOPIRALA et al, 2010). No entanto com a técnica do *time-kill* é observada uma ação dinâmica antimicrobiana e o tempo de interação, diferente do *checkerboard*, que fornece apenas dados das CMI's dos antibióticos e a leitura é realizada apenas no final do período de teste determinado, usualmente 24h (MEDEIROS, 2012).

A técnica da curva de morte monitora o crescimento bacteriano e sua morte em uma ampla gama de concentrações antimicrobianas e têm sido frequentemente utilizados para avaliar o efeito de antimicrobianos ao longo do tempo. A técnica tem sido usada tanto *in vitro* como para estudos em modelos animais (FOERSTER et al, 2016).

A técnica pode ser aplicada no modelo *in vitro* com concentrações constantes de antibióticos, que estuda o efeito de uma concentração constante de droga frente a bactéria em função do tempo e aqueles com concentrações de antibióticos variáveis, em que as concentrações de antibióticos flutuam por diluição ou difusão (MUELLER et al, 2004).

Este é um método que é realizado em meio de cultura líquido em tubos ou placas multipoços, onde a taxa de mortalidade de um inóculo fixo é determinada pela amostra de controle (microrganismo sem agente antibacteriano) e agentes antimicrobianos contidos em tubos, que são semeados e monitorados em diferentes tempos geralmente 0,4,8,10,12 e 24 horas de incubação (LORIAN, 1996)

As curvas de morte resultantes podem ser subsequentemente analisadas como modelos farmacocinéticos-farmacodinâmicos apropriados e esses modelos ajudam a otimizar regimes de dosagem com base em uma abordagem racional e científica (MUELLER et al., 2004).

2.6 BIOFILMES MICROBIANOS

Um dos processos mais comuns que as bactérias realizam de forma cooperativa é o desenvolvimento de biofilme. Uma diversidade de microrganismos se reúne em grandes comunidades, secretando proteínas e outros componentes moleculares para formar um biofilme o que lhes possibilita manter um ambiente controlado para crescimento e proliferação. Um pré-requisito da formação de biofilme é que as bactérias cheguem perto o suficiente de uma superfície, sendo essa de origem abiótica ou biótica. Conforme as bactérias se aproximam da superfície, várias forças, tanto atrativas quanto repulsivas participam do processo (SOLANO et al., 2014; RABIN et al., 2015; AMDREASEN et al., 2019; LIANOU et al., 2020).

Dentro do biofilme, bactérias crescem protegidas de estresses ambientais, como dessecação, ataque do sistema imunológico, ingestão de protozoários e antimicrobianos. É relatado que as bactérias sésseis são entre 500 e 5000 vezes mais tolerante a antibióticos em comparação a sua

forma planctônica. Prevê-se que a prevalência de infecções bacterianas intratáveis aumente a uma taxa alarmante devido a um aumento no número de cepas de bactérias resistentes a antibióticos (VERGIDIS & PATEL, 2012; OPPENHEIMER-SHAANAN et al., 2013).

Sendo bastante heterogêneo o biofilme apresenta composição em cerca de 85% de matriz polimérica extracelular e 15% de diversas células microbianas que por sua vez apresentam morfologias variadas (SOLANO et al., 2014; PHILLIPS, 2016).

A substância polimérica extracelular (EPS) pode representar 50% a 90% do carbono orgânico total de biofilmes e pode ser considerado o material matricial primário do biofilme. EPS pode variar em propriedades químicas e físicas, mas é composto principalmente de polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. O comportamento dos microrganismos em biofilme exibe um estado metabólico distinto ao do crescimento planctônico correspondente, especialmente com respeito à transcrição e interações entre as células (LINDSAY & HOLY, 2008, ANDREASEN, 2019).

Muitos microrganismos, têm a capacidade de formar biofilme em quase todos os tipos de superfícies e desempenham um papel importante nas infecções associadas à saúde (SEKHAR et al., 2009).

2.6.1 Processo de Formação do Biofilme

A formação do biofilme é um processo de alta complexidade no qual as células do microrganismo se modificam passando do modo planctônico para o modo sésil de crescimento (OKADA et al., 2005). Também foi sugerido que a formação de biofilme é dependente da expressão de genes específicos que orientam o estabelecimento de biofilme (OKADA et al., 2005; SAUER, 2004). Estudos genéticos reportam uma sinalização, conhecido como *quorum sensing*, entre as células do microrganismo que facilitam o processo de formação do biofilme (DONLAN, 2002).

A formação compreende uma série de processos físicos, biológicos e químicos, ocorrendo mudanças ao longo do desenvolvimento do biofilme e estas dependem das condições ambientais e hidrodinâmicas que prevalecem (BRYERS, 2000).

No biofilme existem canais que separam os microrganismos das micro-colônias e a estabilidade mecânica do biofilme é atribuída às características viscoelásticas da matriz de exopolissacarídeos. A formação de biofilme é complexa, mas, ocorre em poucas etapas: fixação inicial do microrganismo a uma superfície ou a outro, formação de microcolônias, maturação do biofilme, e finalmente a dispersão do biofilme (DONLAN, 2002; FERDELE & BASSLER, 2003, TOLKER-NIELSEN, 2015).

Os biofilmes foram muito estudados nos últimos anos, e muito se sabe sobre o processo de fixação microbiana e de sua formação inicial. É necessário examinar estreitamente as propriedades do substrato e da superfície celular uma vez que as características do substrato podem ter um efeito significativo sobre a taxa e extensão da fixação dos microrganismos (DONLAN, 2001).

A célula bacteriana chega tão próximo a uma superfície que tem sua motilidade retardada e faz uma conexão a esta superfície ou ao outro microrganismo já aderido previamente. Nesse processo de formação a interface sólido-líquido entre uma superfície e um meio aquoso que pode ser por exemplo a água ou mesmo o sangue torna o ambiente ideal para a fixação e conseqüente crescimento do microrganismo (ANSARI et al., 2012; JAMAL et al., 2015).

Grande parte dos pesquisadores descobriram que os microrganismos se ligam mais rapidamente a superfícies hidrofóbicas não polares, como o Teflon e outros plásticos além de materiais hidrofílicos, como vidro ou metais (DONLAN, 2002). Características do meio aquoso, como níveis de pH, nutrientes, força iônica e temperatura podem desempenhar um papel na taxa de fixação microbiana a um substrato. Ofek e Doyle (1994) observaram que a energia de superfície do meio de suspensão pode afetar as interações hidrodinâmicas das células microbianas com as superfícies, alterando as características do substrato já que as células se comportam como partículas em um líquido, e a taxa de sedimentação e associação com uma superfície submersa dependerá em grande parte das características de velocidade do líquido. Quando estão submetidas a velocidades lineares muito baixas, as células devem atravessar a camada limite hidrodinâmica considerável, e a associação com a superfície dependerá em grande parte do tamanho da célula e a motilidade celular.

As células microbianas devido a presença de estruturas locomotoras (pili e o flagelo) se fixam à superfície também podem ser favoravelmente anexadas através da presença de

polissacarídeos ou proteínas associados à superfície além de outras forças físicas como as interações eletrostáticas e forças de Vander Waal etc. (DONLAN, 2002; MARIC, 2007; GARRET, 2008).

Após a fixação da célula microbiana, estas começam a se multiplicar e nesse processo emitem sinais químicos, *quorum sensing*, que sinalizam geneticamente a produção de exopolissacarídeos e desta forma elas continuam sua multiplicação dentro da matriz de exopolissacarídeos dando origem a formação da microcolônia que é unidade estrutural básica do biofilme (ANSARI et al., 2012).

A proximidade das células dentro da microcolônia (ou entre as microcolônias) fornece um ambiente ideal para criação de gradientes de nutrientes, troca de genes e *quorum sensing* (DONLAN, 2002). As colônias bacterianas em um biofilme geralmente consistem em muitos tipos de micro-comunidades. Essas micro-comunidades se coordenam entre si em múltiplos aspectos. Esta coordenação desempenha um papel crucial na troca de substrato, na distribuição de importantes produtos metabólicos e na excreção de produtos finais metabólicos (MCKENNEY et al, 1998; COSTERTON et al, 1999; JAMAL et al., 2015).

Na fase de maturação e arquitetura do biofilme as células microbianas comunicam-se umas com as outras por meio de sinais químicos (VASUDEVAN, 2014; DAVIES et al., 1998). Essa comunicação é um processo de grande importância já que nesse momento é alcançada a densidade celular microbiana necessária e neste estágio de maturação, certos produtos gênicos são expressos, considerados importantes para a formação da matriz de exopolissacarídeos. A formação da matriz também constitui a formação de canais cheios de água, funcionando em equilíbrio dinâmico, usado para distribuir nutrientes importantes e remover os resíduos das comunidades de micro-colônias do bioma (JAMAL et al., 2015; PRAKASH et al., 2005; ANSARI, 2012).

Após a formação do biofilme, os pesquisadores notaram que é comum as bactérias deixarem o próprio biofilme regularmente o que leva a bactéria sofrer rápida multiplicação e dispersão. Essa dispersão, das camadas mais externas, pode ter razão puramente mecânicas, ou ser devido a algumas bactérias pararem de produzir EPS, por diminuição dos níveis de nutrientes, *quorum sensing* ou cisalhamento de agregados de biofilme devido aos efeitos de fluxo, devido a uma ação enzimática que causa a digestão do alginato, um dos principais componentes da matriz. As células

dispersas do biofilme têm a capacidade de reter certas propriedades do biofilme, como a insensibilidade aos antibióticos. Uma vez dispersas, as células retornam rapidamente ao seu fenótipo planctônico normal (SREY, 2013, JAMAL et al, 2015).

2.6.2 Infecções associadas a biofilmes e Controle

Infecções de repetição são um grande desafio mundial ocorrendo a perda de milhões de vidas anualmente e exigindo enormes recursos médicos e sociais. Nessas infecções o hospedeiro tenta eliminar um patógeno enquanto o patógeno tenta sobreviver no hospedeiro. A forma estratégica para sobreviver encontrada pelos microrganismos patogênicos é a formação do biofilme que vai lhe conferir resistência aos antibióticos e driblar o sistema imune do hospedeiro (CHEN et al., 2011).

Em humanos, os biofilmes são responsáveis por até 80% do número total de infecções microbianas de acordo com o National Institute of Health incluindo endocardite, fibrose cística, periodontite, rinossinusite, osteomielite, feridas crônicas, meningite, infecções renais e infecções relacionadas a próteses e desvios implantáveis (KHATOON et al., 2018; JOO et al., 2012). Os principais desafios no tratamento de biofilmes são o seu diagnóstico difícil e a falta de biomarcadores adequados e, na clínica, os biofilmes também podem ser difíceis para erradicar devido a uma alta tolerância aos antibióticos (PAHARIK et al., 2016).

Nos últimos anos, surgiu o interesse no estudo da formação de biofilme por um grupo de bactérias clinicamente relevantes, que causam alta mortalidade, e pertencem ao grupo ESKAPE que são frequentemente associados a infecções em biofilme (RABIN et al, 2015; SOLIS-VELAZQUEZ et al., 2020).

Chen e colaboradores (2011) relata a presença de formação de biofilme por *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* em sistemas de cateter. Estima-se que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* causem cerca de 40-50% das infecções de próteses valvares cardíacas, 50-70% das infecções do biofilme do cateter e 87% das infecções da corrente sanguínea (CHEN et al., 2013).

Pesquisadores ainda debatem quais mecanismos de resistência do biofilme frente aos antibióticos e sugeriram como possibilidades a falha na penetração de antibióticos, crescimento

bacteriano alterado dentro biofilme, resistência por meio do transferência gênica horizontal, bombas de efluxo de múltiplas drogas e em biofilmes polimicrobianos interações entre bactérias e fungos também foram consideradas relevantes em uma vez que aumentou a resistência antimicrobiana (DRAGO et al., 2017; HALL & MAH, 2017).

O conhecimento do processo de formação relacionado ao suporte de desenvolvimento de biofilme é de importância fundamental para abordar qualquer prevenção ou estratégia de controle. Entre as possíveis estratégias de estão: a inibição da adesão microbiana à superfície de colonização, a interferência no sinal de modulação no desenvolvimento do biofilme e desagregação da matriz de biofilme (FRANCOLINI, 2010).

Em biofilmes de *Streptococcus mutans*, que causam a cárie dentária, são exploradas estratégias de múltiplas drogas que combinam agentes antimicrobianos com mecanismos sinérgicos de ação contra um ou mais mecanismos de resistência antimicrobiana. Alvos sinérgicos para aumentar os efeitos dos agentes antimicrobianos incluem fatores de virulência, como produção de ácido e respostas adaptativas ao estresse ácido bem como o EPS. Como selecionar os melhores antibióticos para tratar condições associadas à biofilme é um desafio clínico crítico (CHEN & WEN, 2011; PRIYADARSINI et al., 2017; SIMS JR et al., 2020).

2.7 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS - LEISHMANIOSE E TRIPANOSSOMÍASE

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) consiste em um diverso grupo de infecções identificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doenças que infectam principalmente populações de baixa renda em países tropicais, levando a casos de morbidade e mortalidade (RUTTE et al, 2018). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial.

2.7.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas segundo a OMS e atualmente endêmica em 102 países/áreas ao redor do mundo tendo-se observado aumento no número de casos nessas áreas nos últimos anos (GALGAMUWA et al., 2018 TEMEL et al, 2019).

A transmissão da doença é causada por protozoários parasitas de mais de 50 espécies de *Leishmania*. No Brasil já foram isoladas 8 espécies em pacientes doentes sendo estas: *Leishmania (V)braziliensis*, *Leishmania(V)guyanensis*, *Leishmania(V)lainsoni*, *Leishmania (L)amazonenses*, *Le.(V) shawi*, *Le. (V) naiffi* e *Le. (V) lindenbergi*, sendo essas sete causadoras da forma tegumentar e *Leishmania (L) infantum*, da forma visceral (SANTOS, 2019). Os hospedeiros vertebrados, abrange uma variedade de mamíferos como caninos, roedores, marsupiais, mangustos, morcegos, hiracoides, primatas e humanos (PISCOPO & AZZOPARDI 2007).

Os vetores são as fêmeas dos insetos chamados flebotomíneos pertencentes aos ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Cerca de 30 espécies são vetores já comprovados de leishmaniose e mais de 40 espécies são vetores suspeitos. Os insetos apresentam-se normalmente tamanho pequeno com cerca 2–3 mm de comprimento (ANVERSA et al, 2018, OPAS, 2018).

Leishmania, o agente etiológico da leishmaniose, possui um ciclo de vida heteroxeno, oscilando entre forma promastigota flagelada e forma amastigota aflagelada ocorrendo respectivamente em invertebrados (intestino de mosquito) e vertebrado (macrófagos) (JAMAL, 2020).

A forma amastigota é parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, são imóveis (não possuem flagelo aparente), esféricas ou ovais e medem cerca de 2,5-5,0 µm de diâmetro. Se alojam nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos, onde se multiplicam por divisão assexuada até o rompimento celular, disseminando-se por via hematogênica e linfática, sendo então fagocitadas por outros macrófagos (BAILEY et al, 2017; ESPIAU et al, 2017; ANVERSA et al, 2018)

No trato digestivo do inseto, os amastigotas se diferenciam em promastigotas, que são alongados, flagelados, formas móveis com cerca de 5-15 µm de comprimento e com cinetoplastos localizados entre o núcleo e a extremidade anterior. Ainda no trato digestivo do vetor, as formas promastigotas passam por vários estágios tornando-se promastigotas metacíclicos, que são infecciosos para o hospedeiro vertebrado (ANVERSA et al, 2018).

As infecções por *Leishmania* têm três principais formas clínicas, definidas pela localização do parasita nos tecidos infectados a leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM). A LV é geralmente causada por parasitas do complexo *Leishmania donovani* (incluindo *L. donovani* e *L. infantum*). A LV é classicamente caracterizada por febre, definhamento, pancitopenia, hepatoesplenomegalia (especialmente esplenomegalia) e hipergamaglobulinemia (ARONSON & MAGILL, 2020).

A LC no Novo Mundo é causada principalmente pelas espécies de *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis* e o complexo *L. enrietti*. A apresentação clínica típica da LC é localizada, muitas vezes com lesão (ões) ulcerativa (s) da pele. Formas apresentadas de LC menos comuns incluem formas nodulares, psoriasiformes e verrucosas. Também no Novo Mundo, LM é mais frequentemente associado a *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* e caracterizado por uma lesão cutânea primária podendo acontecer meses ou anos mais tarde o surgimento de lesões destrutivas nasofaríngeas (“Espundia”) (ARONSON & MAGILL, 2020).

Nas Américas de 2001 a 2019, foram notificados a OPAS 1.028.054 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) em 17 países endêmicos, apresentando em média de 54.108 casos por ano. Em 2019, os países com maior número de casos notificados foram Brasil (15.484), Colômbia (5.907), Peru (5.349), Nicarágua (3.321) e Bolívia (Estado Plurinacional da) (2.052), que juntos representam 77% dos casos na Região (OPAS, 2020).

A leishmaniose visceral (LV) endêmica em 13 países das Américas, 65.934 casos novos foram registrados de 2001 a 2019, com uma média de 3.470 casos por ano. Em 2019, do total de casos, 97% (2.529) foram notificados no Brasil, e os demais casos na Argentina, Bolívia (Estado Plurinacional da), Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela (República Bolivariana da) e Uruguai (OPAS, 2020).

No Brasil, o Ministério da Saúde oferece através do Sistema Único de Saúde – SUS tratamento para *Leishmania*. A droga de primeira escolha é o antimoniato pentavalente (de meglumina), com exceção dos pacientes coinfectados com HIV e gestantes. Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimoniato pentavalente, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e o isotionato de pentamidina (BRASIL,2017).

2.7.2 Tripanossomíase

Reconhecido pela OMS como uma das doenças tropicais negligenciadas do mundo, a saúde pública no Brasil e de outros Países latino-americanos mesmo após 111 anos de sua descoberta sofrem os impactos da doença de Chagas (RASSI JUNIOR et al, 2010; SOUZA & MESQUITA, 2020).

Endêmica em 21 países continentais da América Latina, a doença de Chagas é causada pelo protozoário parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com *T. cruzi* sendo transmitida principalmente quando humanos entram em contato com fezes e / ou urina de triatomíneos infectados (transmissão vetorial) (VEGA-ROYERO & SIBONA, 2019; WHO, 2020).

O parasita *T. cruzi* pode também ser transmitido por transfusão sanguínea, da mãe para o feto, pela placenta, no transplante de órgãos e por infecção acidental em laboratório (RAIMUNDO; MASSAD; YANG, 2010; RASSI JUNIOR et al, 2010).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* envolve dois hospedeiros intermediários: o vetor invertebrado (insetos triatomíneos) e o hospedeiro vertebrado (humanos) e tem três estágios de desenvolvimento a forma tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas. Esses estágios de desenvolvimento se alternam entre as formas infecciosa e não infecciosa. Amastigota e epimastigota são estágios não infecciosos, mas replicativos dentro do hospedeiro mamífero (vertebrado) e no intestino do inseto vetor (invertebrado), respectivamente. Os tripomastigotas da corrente sanguínea encontrados no sangue do hospedeiro vertebrado e os tripomastigotas metacíclicos encontrados no reto do vetor do inseto invertebrado são considerados os dois diferentes estágios de desenvolvimento infecciosos, mas não replicativos dos tripomastigotas (ONYEKWELU, 2019).

Depois que a infecção é transmitida, em sua fase aguda a maioria dos casos são assintomáticos/ausentes ou são leves e inespecíficos. Em pessoas picadas por um inseto triatomíneo, os primeiros sinais visíveis de infecção são uma lesão na pele ou um inchaço púrpuro das pálpebras de um dos olhos (o chamado sinal Romana). Em qualquer via de transmissão, os

pacientes podem apresentar febre, cefaleia, aumento dos gânglios linfáticos, palidez, dores musculares, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica (WHO, 2020).

Na fase crônica cerca de 30% dos pacientes sofrem de doenças cardíacas e até 10% apresentam distúrbios digestivos, neurológicos ou mistos. Nos anos seguintes a infecção pode levar à morte súbita principalmente devido a arritmia cardíaca ou insuficiência cardíaca causada pela destruição do músculo cardíaco e de seu sistema nervoso (WHO, 2020).

Para o tratamento da doença de Chagas, o Ministério da Saúde oferece através do SUS dois medicamentos antiparasitários: benzonidazol e nifurtimox. Embora os medicamentos tenham elevada eficácia de cura da doença se administrados logo após a infecção, incluindo os casos de transmissão congênita, esta diminui quanto mais tempo a pessoa está infectada, fase crônica, e as reações adversas são mais frequentes em pacientes mais idosos (BRASIL, 2017).

As Drogas nitroheterocíclicas, nifurtimox e benzonidazol, tem sido utilizadas na terapia contra a Doença de Chagas há muitas décadas, permanecendo na atualidade como únicas disponíveis para o tratamento da doença. No entanto, seu uso apresenta algumas complexidades. Eles podem causar efeitos colaterais, algumas cepas não são suscetíveis a ação do tratamento, apresentam toxicidade celular e os regimes de tratamento são longos. Tratamentos com nifurtimox precisam ser administrados em 10 mg por kg de peso corporal em três ou quatro doses por dia em um período de 60 a período de 120 dias. Diante disto o curso do tratamento muitas vezes não é concluído, podendo ocorrer o desenvolvimento de resistência do parasito frente a droga em questão. Diferentes estratégias têm sido utilizadas para descobrir novas moléculas ativas para o tratamento da doença de Chagas (WILKINSON et al.,2008; MAZZETI et al., 2021).

2.8 DOCKING MOLECULAR

Docking molecular é um método computacional utilizado para prever a interação de duas moléculas gerando um modelo de ligação. Esta técnica é muito aplicada em descoberta de novas drogas cuja abordagem pode ser feita no encaixe entre uma pequena molécula e um macromolécula, por exemplo, *docking* proteína-ligante (PRIETO-MARTÍNEZ et al, 2018).

Os primeiros métodos de *docking* foram baseados no modelo de chave-fechadura, proposto por Fisher (1894) no qual o ligante se encaixa no receptor como uma chave e fechadura, mas tanto

o ligante quanto receptor foram tratados como corpos rígidos em conformidade. No entanto, posteriormente uma outra teoria foi proposta por Koshland a do "ajuste induzido" onde o ligante e o receptor deveriam ser tratados como flexível durante o encaixe e dessa forma, esse mecanismo poderia descrever os eventos de ligação com mais precisão do que o tratamento rígido (MENG, et al, 2012; PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017).

A abordagem de *docking* molecular pode ser usada para modelar a interação entre uma pequena molécula e uma proteína em nível atômico, permitindo caracterizar o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação das proteínas alvo, assim como permite elucidar os fundamentos de processos bioquímicos (MCCONKEY et al, 2002). O processo de encaixe envolve duas etapas básicas que seria a previsão de conformação do ligante, bem como sua posição e orientação dentro desses locais (geralmente referido como pose) e avaliação da afinidade de ligação. É importante no estudo de *docking* saber a localização do local de ligação antes dos processos de encaixe uma vez que esse conhecimento prévio aumenta significativamente a eficiência de encaixe. Pode-se obter informações sobre os sítios de ligação por comparação da proteína alvo com uma família de proteínas que compartilham uma função semelhante ou com proteínas co-cristalizadas com outros ligantes. *Docking* sem qualquer suposição sobre o local de ligação é chamado de encaixe cego (MENG, et al, 2012).

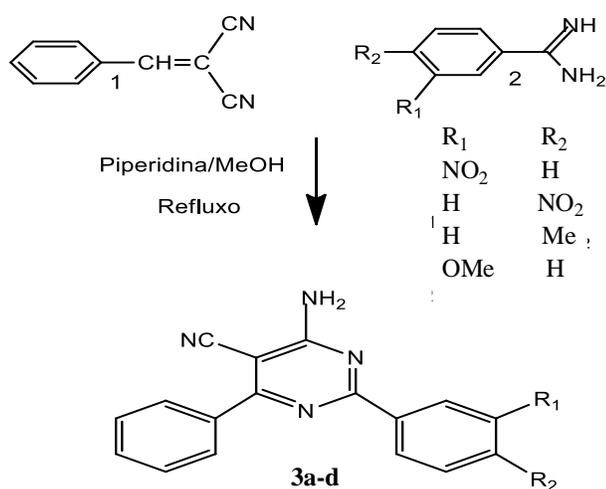
Os resultados obtidos com o teste de *docking* expressos em termos da energia de ligação indica qual foi a energia necessária para que a provável molécula bioativa se ligasse ao sítio ativo do alvo molecular selecionado. Dessa forma, a molécula que apresentar menor quantidade de energia necessária para se ligar ao sítio ativo, será aquela que, teoricamente, apresentará melhor resultado de atividade biológica (BARROS, 2015).

3 METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Para realizar a síntese de quatro compostos inéditos seguiu-se os procedimentos referenciados na literatura e outros desenvolvidos pelo grupo LSPQN (Laboratório de Sínteses e Química de Produtos Naturais) (FALCÃO et al., 2006), (figura 11).

Figura 11- Síntese dos análogos de pirimidina



Inicialmente, aldeídos aromáticos e malonitrila foram dissolvidos em metanol e mantidos sob agitação à temperatura ambiente por 4 horas, a fim de se obter os intermediários de Michael (1). Enquanto as arilamidinas substituídas em meta e para (2) foram obtidas por meio de duas etapas reacionais: a primeira sendo a reação entre as correspondentes nitrilas e etanol anidro, utilizando ácido clorídrico gasoso, formando assim os iminoéteres. Estes, submetidos a ação de amoníaco, formam os cloridratos de amidinas, sendo a segunda etapa reacional.

As 5-carbonitrilas-pirimidinas **3a-d** são obtidas por reação entre intermediários de Michael (1) e arilamidinas (2). Os reagentes são mantidos sob agitação, em refluxo, durante 6 horas, seguindo protocolo experimental (MELO et al., 2002).

Para realização dos ensaios biológicos, descritos posteriormente, os compostos pirimidínicos sintetizadas **3a-d** foram solubilizados em etanol a quente (60°C) visto que dessa forma ocorria uma melhor solubilização das mesmas.

3.2 LINHAGENS PADRÃO PARA REALIZAÇÃO DOS TESTES

Para avaliar atividade antimicrobiana, sinergismo, curva de morte e desenvolvimento do biofilme foram utilizadas linhagens da Coleção UFPEDA do Departamento de Antibióticos-UFPE, conforme tabela 1.

Tabela 1. Lista de Microrganismos teste. Bactérias Gram-positivas e Bactérias Gram-negativas.

Microrganismos teste		Procedência/ Sítio de isolamento - Isolado clínico*
Bactérias Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02	Cepa padrão
	* <i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 709	Secreção de ferida operatória
	<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138	Cepa padrão
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> UFPEDA 224	Cepa padrão
	* <i>Escherichia coli</i> UFPEDA 1020B	Amostra clínica
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> UFPEDA 396	Cepa padrão
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416	Cepa padrão
	* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 39	Amostra clínica
	* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 64	Secreção
	* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 261	Secreção ferida operatória
	* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 262	Secreção de úlcera
* <i>Acinetobacter baumannii</i> UFPEDA 1025B	Amostra Clínica	

3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA- CMI

A CMI foi realizada através da técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços, conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015; 2017). Foram distribuídos 160 µL de meio de cultura líquido (MH) nos poços, e em seguida, adicionados 40 µL de cada amostra **3a-c** nos poços da coluna 1 e realizada a microdiluição sucessivamente até a coluna 10, obtendo-se concentrações decrescentes (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9; 1,8 µg/mL). Após diluição, cada poço foi inoculado com 10 µL do inóculo microbiano padronizado ($1,5 \times 10^6$

UFC/mL), sendo a coluna 10 o controle positivo do inóculo. Os poços da coluna 11 não receberam o inóculo, sendo assim, o controle do meio de cultura. A coluna 12 foi utilizada com o controle do antibiótico.

3.3.1 Leitura da Microplaca

Após o cultivo, as microplacas foram reveladas com 20 µL de resazurina a 0,01% (previamente preparada e esterilizada) e incubadas por 1-3 horas para observar a mudança de coloração nos poços. A resazurina é um corante indicador de óxido-redução, onde a permanência da cor azul é interpretada como inibição/morte do crescimento microbiano, enquanto a presença da cor rosa indica presença de células viáveis, ou seja, ocorreu crescimento microbiano. A CMI é definida como a menor concentração do antibiótico que inibe o crescimento do microrganismo teste. Enquanto a CMB é definida como a menor concentração do antibiótico que mata 99,9% o microrganismo utilizado no teste, dentro do período de tempo estipulado (CLSI, 2015). Foi realizado um subcultivo dos poços azuis/rosa em placa de Petri contendo o meio MH sólido, incubada a 37°C, por 24 horas como uma confirmação da revelação da microplaca e determinação da CMI/CMB. Cada amostra foi testada em duplicata.

3.4 DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS

A determinação do perfil de resistência microbiano foi realizada por meio da técnica de microdiluição em placas multipoços, conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). Foram distribuídos 180 µL de meio de cultura líquido (MH) nos poços e em seguida, adicionados 20 µL do antibiótico comercial onde para cada microrganismo foi utilizado um ou mais antibiótico.

Para determinação do perfil dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*, foram utilizados os antibióticos Ceftazidima e Meropenem ,para os isolados de *A. baumannii*, foram utilizados os antibióticos Ceftriaxona e Ampicilina-Sulbactam, para os isolados de *S. aureus*, foram utilizados os antibióticos Oxacilina e Cefoxitina e para *E. coli* foram utilizados os antibióticos Ampicilina-Sulbactam e o Piperacilina-Tozobactam.

Nos poços da coluna 1 foi realizada a microdiluição sucessivamente até a coluna 10, obtendo-se concentrações decrescentes. Após diluição, cada poço foi inoculado com 10 µL do inóculo microbiano padronizado ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) sendo a coluna 11 o controle positivo do inóculo. Os poços da coluna 12 não receberam o inóculo, sendo assim, o controle do meio de cultura. A leitura da microplaca foi realizada conforme o item 2.3.1.

3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO

Para realização da avaliação do potencial sinérgico foram utilizadas as bactérias que apresentaram menor valor em concentração no ensaio de CMI.

3.5.1 Técnica de *Checkerboard*

Após a determinação do perfil de CMI dos microrganismos frente as moléculas de estudo, os microrganismos que apresentaram um perfil de resistência aos antibióticos comerciais foram selecionados para ensaio de sinergismo, realizada de acordo com a metodologia do tabuleiro de xadrez (LORIAN, 2005).

Para interpretação dos resultados é realizado o cálculo do ICIF (Índice de Concentração inibitória das frações).

Onde, $ICIF < 0,5 =$ **Efeito sinérgico**; $0,5 \leq ICIF \leq 0,75 =$ **Efeito parcialmente sinérgico**; $0,75 < ICIF < 2 =$ **Efeito Aditivo**; $2 \leq ICIF \leq 4 =$ **Efeito Indiferente** e $ICIF > 4 =$ **Efeito Antagônico**

3.6 ESTUDO DA CURVA DE MORTE - *Time Kill*

O ensaio de curva de morte foi realizado de forma adaptada de acordo com as normas padronizadas do CLSI (2015;2017) e Tiwari (2015). Em microplacas (Kasvi) de 96 poços foi inoculado em cada poço, as suspensões microbianas previamente padronizadas por espectroscopia e diluída para $1,5 \times 10^6$ UFC/mL juntamente com a combinação dos compostos pirimidínicos **3 a-c** em concentrações pré-determinados (2xCMI, CMI, 1/2xCMI) e incubados a 37°C por 24 horas.

O tempo de morte foi realizado pela redução da viabilidade celular nos intervalos de 0,3,6,9,12 e 24 horas e comparado ao tempo 0h. A leitura de absorbância foi realizada Leitora de

Microplacas Elisa num comprimento de onda de 625nm. Como controle foram inoculados em colunas distintas apenas meio de cultura, meio de cultura adicionado dos compostos **3 a-c** nas concentrações de 2xCMI, CMI, 1/2xCMI e apenas meio de cultura adicionado ao microrganismo.

3.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilme foi baseada no método adaptado descrito por Stepanovic, 2007. No estudo foram utilizadas microplacas (Kasvi) de 96 poços para culturas de células. Os isolados foram cultivados em caldo BHI sob agitação de 150rpm por 24 horas e uma suspensão no próprio meio de cultura foi ajustada em espectrofotômetro numa densidade equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente foi realizada uma diluição de 1:100, obtendo-se uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, e uma alíquota de 200 μ L da suspensão de cada microrganismo foi adicionado em cada poço de uma coluna da placa, obtendo-se uma octuplicata por microrganismo deixando a última coluna apenas com meio de cultura que foi utilizado como controle. A placa foi incubada por 24h na temperatura de 37 °C. Após esse período foi removido e descartado os 200 μ L de meio/células livres e a placa foi lavada com água destilada por três vezes. Foi adicionado em cada poço 200 μ L de etanol PA e incubado por 15 minutos. Após esse período o etanol foi removido e a placa foi seca em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 200 μ L de Cristal Violeta e a placa foi novamente incubada por 15 minutos. Após o período o Cristal violeta foi removido e a placa foi lavada com água destilada, procedimento repetido por três vezes. A placa foi seca em temperatura ambiente e então foi adicionado 200 μ L de etanol e incubada para ressolubilização por 30 minutos. Após esta etapa a placa foi lida em leitor de Elisa num comprimento de onda de 630nm.

Para interpretação dos resultados são utilizados os parâmetros descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Valores de referência para classificação quanto a formação de biofilme.

Média OD630nm	Formação de biofilme
$DO \leq DOc$	Não formador
$DOc < DO \leq 2 \times DOc$	Fraco formador
$2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$	Moderado formador
$4 \times DOc < DO$	Forte formador

Nota: DO: densidade óptica do microrganismo teste; DOc: densidade óptica do controle negativo (meio de cultura).

3.8 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTI-BIOFILME

Foi utilizado um protocolo adaptado de Antunes et al (2010) e Stepanovik, (2007) onde, em microplacas(Kasvi) de 96 poços para culturas de células foi adicionada 80 µL da suspensão bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, 80 µL da suspensão alcoólica dos compostos pirimidínicos **3a-c** nas concentrações variadas de 2xCMI, CMI e 1/2xCMI e 40 µL de caldo de BHI. A 11ª e 12ª coluna foi utilizada com o controle positivo e controle negativo respectivamente. A placa foi incubada 37°C por 24h. Após esse período o conteúdo dos poços removido e os poços foram lavados três vezes com solução salina estéril. Após a secagem da placa foi adicionado em cada poço 200 µL de etanol PA e incubado por 15 minutos. Após esse período o etanol foi removido e a placa foi seca em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de cristal violeta e a placa foi novamente incubada por 15 minutos. Após o período o cristal violeta foi removido e a placa foi lavada com água destilada, procedimento repetido por três vezes. A placa foi seca em temperatura ambiente e então adicionado 200 µL de etanol e incubada para ressolubilização por 30 minutos, seguindo-se da leitura da placa em leitor de Elisa num comprimento de onda de 630nm.

A interpretação dos resultados é realizada da mesma forma que para o ensaio de formação de biofilme.

3.9 CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS

Macrófagos RAW 264.7 foram usados para avaliar a citotoxicidade celular pelo ensaio MTT. As células (1×10^5 células/poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 24h (37°C, 5% CO₂) para que ocorresse a adesão celular. Os compostos foram adicionados, em seis concentrações variando de 6,2 a 200µg / mL e a placa foi incubada por 48 h. Foram utilizados DMSO e miltefosina como controle negativo e positivo, respectivamente. Após este período de incubação foi adicionado em cada poço o MTT (5 mg / mL, em PBS) e novamente incubado por um período de duas horas. Posteriormente o meio de cultura foi removido e 100 µL de DMSO foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570

nm. A concentração citotóxica para 50% da cultura de células (CC₅₀) foi calculada por análise de regressão usando o software GraphPad Prism 5.012. Os ensaios foram feitos em triplicata (MONTE et al. 2020).

3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

3.10.1 Ensaio forma Promastigota

Promastigotas de *L. amazonensis* (1x10⁶ células/mL em meio de Schneider com 10% de soro fetal bovino) foram incubadas em placa de 96 poços com compostos em oito concentrações diferentes (1,5 a 200 µg / mL) por 72h a 26°C. A miltefosina foi usada como medicamento de referência. As células sem tratamento foram utilizadas como controles negativos. O crescimento celular foi avaliado e IC₅₀/72h foi determinado por análises de regressão linear. Os ensaios foram realizados em triplicata (DA SILVA et al. 2017).

3.10.2 Ensaio forma Amastigota

Para a obtenção de amastigotas, macrófagos RAW 264,7 foram semeados (3 x 10⁵ células / mL em RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino) em uma placa de 24 poços com lamínula de vidro de 13 mm e deixados aderir por 24h, a 37°C em 5% de CO₂. Macrófagos aderidos foram então infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento usando uma proporção de 1:15 a 37°C por 6 h. Posteriormente, os parasitas não interiorizados foram removidos por lavagem e as culturas infectadas foram incubadas com os compostos em concentrações de 6,25 a 200 µg / mL por 24h. Apenas o meio RPMI 1640 foi usado como controle negativo. As lamínulas foram coletadas e coradas com o kit de coloração Panótico (Loreclin, PR, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de 100 células e seus amastigotas intracelulares, ensaio realizado em triplicata. A atividade leishmania foi avaliada pela diminuição de macrófagos infectados e amastigotas intracelulares nas culturas tratadas (T) e não tratadas (NT), descritas pela fórmula: % amastigotas = T x NT / 100. IC₅₀ foi determinado por análises de regressão (DA SILVA et al. 2017).

3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA

3.11.1 Ensaio forma Tripomastigota

A forma tripomastigota (cepa Y) foi obtida a partir da infecção *in vitro* de 10^7 parasitas em linhagem celular Vero, após obter confluência em cultivo. Para determinar o efeito antiproliferativo das formas tripomastigotas da cepa Y, 4×10^6 parasitas/ml foi mantido em meio RPMI + 1% antibiótico + 5% SFB, foram semeados em placas de 96 poços a 37°C juntamente com diferentes concentrações dos compostos (0,19 , 1,56, 6,25, 25, 100 µg/ml) por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas viáveis foi contado em câmara de Neubauer. Os poços que não receberam os compostos foram considerados como 100% do número de parasitas viáveis. O medicamento de referência, benzonidazol, foi usado como controle positivo. Cada composto foi testado em duplicata. As curvas de dose-resposta foram determinadas e a concentração de inibição de 50% do crescimento do parasita (IC₅₀) foi calculada por regressão linear (GraphPad Prism, versão 5.0).

3.12 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) – ATIVIDADES PARASITICIDAS

Para verificar o quanto os compostos foram seletivos para parasitas, foi calculado o índice de seletividade (IS) para as formas amastigota e promastigota de *Leishmania* e tripomastigota para *T. cruzi*. IS consiste na razão entre CC₅₀ / IC₅₀. Valores mais altos de IS indicam maior especificidade para o parasita. Para a obtenção do IS, foram considerados os valores micromolares. Valores de IS menores que 1 foram considerados como não indicativos de seletividade parasitária (DE MELO et al. 2018).

3.13 DOCKING MOLECULAR

As estruturas dos derivados pirimidínicos foram desenhadas e suas energias minimizadas utilizando o software BIOVIA Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). Os compostos padrão, miltefosina e benzonidazol, tiveram suas estruturas obtidas no PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), e todas as estruturas foram salvas. O receptor investigado foi a cruzaina, alvo validado como de extrema importância no controle da doença de chagas. A enzima foi obtida a partir do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) com ID PDB: 3LXS. O *docking* molecular entre os ligantes e a enzima foi realizado utilizando o Molegro Virtual Docker, v. 6.0.1 (MVD). O processo de *docking* foi realizado utilizando um GRID de 10Å de raio e 0,30 de resolução de modo a englobar todo o sítio de ligação da enzima. A proteína, juntamente com as estruturas dos ligantes,

foram submetidas a um conjunto de parâmetros padrão do software como: função de pontuação MolDock score [GRID]; ES interno, HBond interno, torções Sp2-Sp2, todos verificados. Foi realizada a análise dos resultados obtidos para cada conformação dos complexos ligante-enzima e estabeleceu-se um ranking dos valores de energia de afinidade (KJ / mol) para as melhores poses.

Artigo a ser submetido a Revista: Anais da Academia Brasileira de Ciências

ARTIGO 1 - SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, AÇÃO ANTIBIOFILME E POTENCIAL SINÉRGICO DE COMPOSTOS PIRIMIDÍNICOS

Marcela de Araújo Sobral^{a,c}, Zenaide S. Monte^b,
Gláucia Manoella de Souza Lima^{a,c}, Sebastião José de Melo* ^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, 50740-560 Recife- PE, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, 50740-560 Recife- PE, Brasil

^cDepartamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, 50740-560 Recife- PE, Brasil

RESUMO

Pirimidinas são compostos que apresentam boas atividades biológicas, entre elas antimicrobiana. Apresentamos a síntese e caracterização de três novos compostos pirimidínicos **3a-c** e algumas atividades biológicas. A determinação da Concentração Mínima Inibitória CMI ($\mu\text{g/mL}$) dos compostos, revelou que *Staphylococcus aureus* UFPEDA02, *Escherichia coli* UFPEDA224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416 e *Acinetobacter baumannii* UFPEDA1025B obtiveram resultados de atividade antimicrobiana com concentrações variando de 125-250 $\mu\text{g/mL}$. Destes, *A. baumannii* (UFPEDA1025B) mostrou-se resistente com concentração $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ para Ampicilina-Sulbactan direcionando-o para o ensaio de sinergismo por *Checkerboard*. Este ensaio demonstrou sinergia dos compostos **3a-c** com destaque para o **3c** quando reduziu em 32 vezes na concentração inicial da Ampicilina-Sulbactan alterando de 4 $\mu\text{g/mL}$ para 0,125 $\mu\text{g/mL}$. Nos ensaios realizados de cinética de morte durante 24h foi identificado que os compostos **3a-c** mostraram-se efetivos nas concentrações mínimas inibitórias e subinibitórias agindo de forma antagonista ao crescimento microbiano de *A. baumannii* UFPEDA 1025B, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 e *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02. Quanto a ação da atividade anti-biofilme, os microrganismos estudados mostraram-se suscetíveis aos compostos **3a-c**, mudando a classificação inicial de formação para uma classificação inferior com notável inibição na formação do biofilme de *Escherichia coli* UFPEDA 224 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416.

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

INTRODUÇÃO

Bactérias multirresistentes aos antimicrobianos representam uma ameaça preocupante para a saúde pública e para economia (Carlet et al. 2014, D'Souza, 2019).

A Organização Mundial da Saúde ressaltando o problema de saúde pública da resistência antimicrobiana (AMR) identificou a necessidade de um melhor e coordenado esforço global para sua contenção (Prestinaci et al. 2015). Microrganismos multirresistentes são frequentemente associados a doenças nosocomiais sendo principalmente relatados em infecções do trato urinário associadas a cateter, pneumonias adquiridas em hospitais, infecções da corrente sanguínea e infecções de sítio cirúrgico (Khan et al. 2017).

Entre as bactérias com perfil de multirresistência são frequentemente relatadas as que pertencem ao grupo ESKAPE, englobando espécies Gram-positivas e Gram-negativas, com *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*. Essas bactérias normalmente colocam em risco a vida de pacientes graves e indivíduos imunocomprometidos e a letalidade desses patógenos está além de outros fatores associado ao desenvolvimento de resistência contra vários antibióticos empregados para atingir esses agentes infecciosos (Rice 2010, Vadivoo, & Usha, 2018).

O gênero *Acinetobacter* cujo representante mais importante é o *Acinetobacter baumannii*, patógeno humano oportunista, Gram-negativo, há alguns anos mostrava-se suscetível ao tratamento a antibióticos, mas emergiu como um dos patógenos mais problemáticos para instituições de saúde em todo o mundo devido à sua propensão a adquirir fenótipos de resistência a múltiplas drogas (Peleg et al. 2008, Rolain et al. 2013, Giammanco et al. 2018).

A. baumannii também é formador de biofilme, comunidade microbiana cujos produtos extracelulares (proteínas e polissacarídeos) estão irreversivelmente ligados a superfícies bióticas (por exemplo, dentro da ferida e em curativos oclusivos) ou abióticas (equipamentos associados a cuidados de saúde, como tubos endotraqueais, tanto de policarbonato como aço inoxidável) (Ballal & Vinitha 2009, Thompson et al. 2014, Greene et al. 2016).

Compostos heterocíclicos a exemplo das pirimidinas, constitui umas das maiores áreas de pesquisa em química orgânica e tem sido alvo de estudo por mais de um século (Sahi & Paul 2016). Pirimidinas são constituintes principal de muitas moléculas biologicamente ativas e de produtos naturais e assim como seus derivados demonstram uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas, incluindo propriedades anticonvulsivantes (Severina et al. 2019), antifúngicas (Maddila et al. 2016) antivirais (Bai et al. 2018), antiinflamatório (Thirumurugan et al. 2018),

antibacteriano (Goffin et al. 2020) entre outras (Breitinger 2012, Saini et al. 2013). Dessa forma pirimidinas atuam com papel proeminente na química orgânica e medicinal (Yerragunta et al. 2013, Sharma et al. 2014).

Quando a antibioticoterapia individual não alcança resultados satisfatórios com diminuição e eliminação da carga microbiana a terapia combinada pode tornar-se interessante quando essa combinação oferece um efeito sinérgico. A sinergia ocorre quando a combinação das substâncias pode produzir um resultado maior do que o esperado nos efeitos individuais (Breitinger 2012).

Diante disto uma nova série de pirimidinas foi sintetizada para análise de seu potencial antimicrobiano frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas incluindo alguns membros do grupo ESKAPE, ação anti-biofilme, ensaio de curva de morte e o efeito sinérgico (utilizando *checkerboard*) dos compostos quando combinados ao antibiótico comercial ampicilina-sulbactam frente a cepa com perfil de resistência de *A. baumannii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese e Caracterização dos Compostos Pirimidínicos 3a-c

Todos os materiais de partida, reagentes e solventes foram adquiridos (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis) e usados sem purificação adicional. O monitoramento das reações químicas foi realizado por cromatografia analítica em camada delgada (CCD), em sílica gel 60 F254 embalada em folhas de alumínio, adquiridas na (Merck, New Jersey) e foram visualizadas em lâmpada UV (254 nm). A cromatografia em coluna foi conduzida em sílica 60 (35-70 microns) gradiente de eluente (n-hexano-acetato de etila, 7:3). Os rendimentos e pontos de fusão foram determinados no equipamento BUCHI B-540. Para elucidação estrutural a Espectroscopia de Infravermelho utilizou-se o Perkin Elmer Spectrum 400 e IFS66 com transformada de Fourier, sendo as amostras preparadas com filmes finos ou pastilhas de KBr. Os espectros de ¹H-NMR foram registrados em espectrômetro VARIAN VNMR5400 operando a 400 MHz e 100 MHz para núcleos ¹H e ¹³C, respectivamente, em escala δ (ppm), usando DMSO como solvente e TMS como padrão interno.

Os derivados pirimidínicos (**3a-c**) foram obtidos pela reação entre os intermediários de Knoevenagel e as arilamidinas substituídas em quantidades equimolares. A reação foi catalisada por piperidina através da metodologia descrita por Monte e colaboradores (2016). As arilamidinas foram obtidas através da metodologia descrita por Melo e colaboradores (2002).

Atividade Antimicrobiana

Para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) cada composto pirimidínico sintetizado **3a-c** foi solubilizado em etanol a quente (60°C) visto que dessa forma ocorria uma melhor solubilização das mesmas. O meio de cultura utilizado foi o Caldo Mueller-Hinton (MH) (Himedia). Foram selecionadas as seguintes cepas teste: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 709, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Escherichia coli* UFPEDA 1020B, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 64, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 261, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 262 e *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025B todas provenientes da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos-UFPEDA da Universidade Federal de Pernambuco e todas foram mantidas em Ágar Mueller-Hinton contendo 25% de óleo mineral em temperatura ambiente.

Para determinação da CMI foi utilizada a técnica de microdiluição em placas multipoços, conforme procedimento descrito no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2017).

Após crescimento em meio ágar Müeller-Hinton foram preparadas suspensões bacterianas, em solução salina, seguido de leitura em espectrofotômetro, 625nm, a fim de se obter uma densidade óptica entre 0,08 a 0,13 (aproximadamente 10^8 UFC/mL). Os compostos pirimidínicos foram testados nas concentrações de 500 µg/mL a 0,975 µg/mL. Foram distribuídos da 1ª -10ª coluna 160 µL de meio de cultura líquido (MH) nos poços, este volume foi reduzido para receber a adição de 40 µL da suspensão alcoólica de **3a-c** (volume que solubilizou cada composto), que posteriormente sofreu uma diluição seriada. Após diluição, cada poço foi inoculado com 10 µL do inóculo microbiano padronizado ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL). Como controle positivo utilizou-se, o meio de cultura junto a suspensão bacteriana 1ª coluna e como controle de esterilidade do meio foi utilizado apenas o caldo MH 12ª coluna. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, foi adicionado a cada poço 20 µL de solução de rezasurina a 0,001% e novamente incubado pelo intervalo de 1-3 horas. A rezasurina atua como indicador de crescimento celular, quando não existe célula viável é observado uma coloração azul, quando existe crescimento a coloração torna-se vermelha. Os poços que não apresentaram crescimento bacteriano foram semeados em meio Ágar Müeller-Hinton, para determinar a concentração mínima bactericida (CMB) dos compostos frente às cepas testadas.

Determinação do Perfil de Resistência a Antimicrobianos Comerciais

A determinação do perfil de resistência microbiana, para as cepas provenientes de isolados clínicos, foi realizada por meio da técnica de microdiluição em placas multipoços, conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2017, 2019). Foram distribuídos 180 µL de meio de cultura líquido (MH) nos poços e em seguida, adicionados 20 µL do antibiótico comercial onde para cada microrganismo foi utilizado dois antibióticos. Para determinação do perfil dos isolados de *S. aureus* foram utilizados os antibióticos Cefoxitina numa concentração que variou de 32-0,0625µg/mL e Oxacilina numa concentração que variou de 16-0,03125µg/mL. Para os isolados de *E. coli* foram utilizados os antibióticos Ampicilina-Sulbactam numa concentração que variou de 8-0,0156 µg/mL e Piperacilina-Tozobactam numa concentração que variou de 256-0,5 µg/mL. Para os isolados de *P. aeruginosa*, foram utilizados os antibióticos Ceftazidima numa concentração que variou de 128-0,25 µg/mL e Meropenem numa concentração que variou de 32-0,0625 µg/mL e para o isolado de *A. baumannii*, foram utilizados os antibióticos Ceftriaxona numa concentração que variou de 256-0,125 µg/mL e Ampicilina-Sulbactam numa concentração que variou de 32-0,0625µg/mL. Nos poços da coluna 1 foi realizada a microdiluição sucessivamente até a coluna 10, obtendo-se concentrações decrescentes. Após a diluição, cada poço foi inoculado com 10 µL do inóculo microbiano padronizado ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) sendo a coluna 11 o controle positivo do inóculo. Os poços da coluna 12 não receberam o inóculo, sendo assim, o controle do meio de cultura. A leitura da microplaca foi realizada conforme descrito anteriormente para determinação de CMI.

Atividade Sinérgica - Técnica de Checkerboard

Para determinação da atividade sinérgica dos análogos pirimidínicos sintetizados **3a-c** foi usada a técnica de *checkerboard*, metodologia do tabuleiro de xadrez, (Lorian, 2005) e selecionada a cultura de *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025B e o antibiótico comercial Ampicilina-sulbactam.

Ensaio de Curva de Morte- Time Kill

Tendo como referência os resultados de CMI, este teste foi realizado de forma adaptada de acordo com as normas padronizadas do CLSI (2015;2017) e Tiwari (2015). Em microplacas (Kasvi) de 96 poços foi inoculado em cada poço, a suspensão microbiana das cepas de *P. aeruginosa* UFPEDA 416, *E. coli* UFPEDA 224, *A. baumannii* UFPEDA 1025B e *S. aureus* UFPEDA 02 previamente padronizadas por espectroscopia e diluída para $1,5 \times 10^6$ UFC/mL juntamente com a combinação dos compostos pirimidínicos **3 a-c** pré-determinados (2xCMI, CMI, 1/2xCMI) e incubados a 37°C por 24 horas.

O tempo de morte foi realizado pela redução da viabilidade celular nos intervalos de 0,3,6,9,12 e 24 horas e comparado ao tempo 0h. A leitura de absorvância foi realizada Leitora de Microplacas Elisa num comprimento de onda de 625nm. Como controle foram inoculados em colunas distintas apenas meio de cultura, meio de cultura adicionado dos compostos **3 a-c** nas concentrações de 2xCMI, CMI, 1/2xCMI e apenas meio de cultura adicionado ao microrganismo

Ensaio de Formação de Biofilme

A formação de biofilme foi realizada conforme método adaptado descrito por Stepanovic, 2007. Foram selecionadas as cepas *S. aureus* UFPEDA 02, *P. aeruginosa* UFPEDA 416, *A. baumannii* UFPEDA 1025B e *E. coli* UFPEDA 224. Os isolados foram cultivados em caldo BHI Himedia sob agitação 150rpm por 24 horas e uma suspensão no próprio meio de cultura foi ajustada em espectrofotômetro,625nm, numa densidade equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente foi realizada diluição para se obter a concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, e uma alíquota de 200 μ L da suspensão de cada microrganismo foi adicionado em cada poço das colunas da microplaca para cultura de célula (Kasvi) obtendo-se uma octuplicata por microrganismo deixando a última coluna apenas com meio de cultura que foi utilizado como controle. A placa foi incubada por 24h na temperatura de 37 °C. Após esse período foi realizado tratamento (lavagem e fixação) conforme o protocolo, seguindo-se leitura em leitor de Elisa em comprimento de onda de 630nm. Os resultados foram interpretados da seguinte forma $OD \leq OD_c$ (**Não formador**), $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ (**Fraco formador**) $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ (**Moderado formador**) e $4 \times OD_c < OD$ (**Forte formador**). OD: densidade óptica do microrganismo teste; OD_c : densidade óptica do controle negativo (meio de cultura) (Stepanovic, 2007).

Ensaio de Atividade Anti-Biofilme

Para este ensaio foram selecionadas as cepas de *P. aeruginosa* UFPEDA 416, *E. coli* UFPEDA 224, *A. baumannii* UFPEDA 1025B e *S. aureus* UFPEDA 02 uma vez que as mesmas apresentaram maior sensibilidade aos compostos pirimidínicos **3a-c**.

Foi utilizado um protocolo adaptado de Antunes et al (2010) e Stepanovik, (2007). Em microplacas para culturas de células (Kasvi) de 96 poços foi adicionado 40 μ L de caldo BHI e 80 μ L da suspensão bacteriana ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), 80 μ L da suspensão alcoólica dos compostos pirimidínicos **3a-c** (concentrações variadas de 2xCMI, CMI e 1/2xCMI). O controle positivo, foi constituído de meio de cultura com suspensão de microrganismo e controle negativo, apenas o meio de cultura. A

placa foi incubada 37°C por 24h. Após esse período o conteúdo dos poços removido e estes foram lavados três vezes com solução salina estéril. Após a secagem da placa foi adicionado a cada poço 200 µL de etanol PA e incubado por 15 minutos. Após esse período o etanol foi removido e a placa foi seca em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de Cristal Violeta e a placa foi novamente incubada por 15 minutos, seguido da remoção e lavagem da mesma por três vezes. A placa foi seca em temperatura ambiente e então foi adicionado 200 µL de etanol e incubada para ressolubilização por 30 minutos seguida da leitura em leitor de Elisa em comprimento de onda de 630nm. A interpretação do resultado se deu da mesma forma descrita no ensaio de formação de biofilme.

Análise Estatística

Os dados foram expressos como a média ou a média percentual \pm desvio padrão (DP) utilizando o Microsoft Office Excel Professional Plus 2016.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Química

Uma rota conveniente para a síntese de novas bases nitrogenadas, pirimídicas derivatizadas **3a-c**, foi obtida através da reação de ciclização entre o aduto de Knoevenagel **1** com as arilamidinas *meta*-substituída e *para*-substituídas **2a-c**, na presença de quantidades catalíticas de piperidina, usada como base (Figura 1).

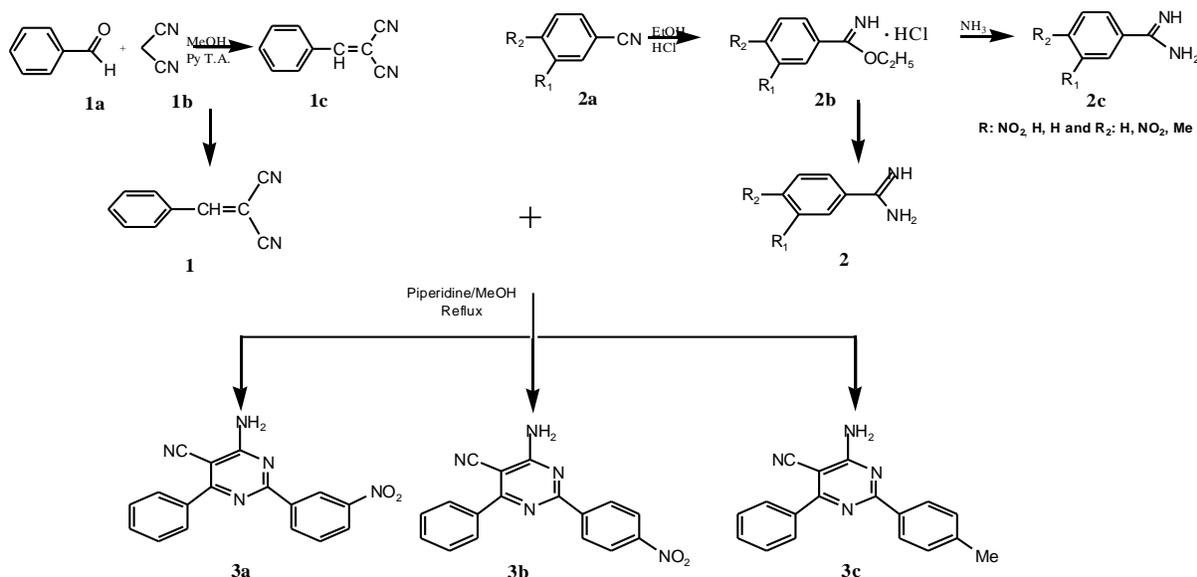


Figura 1. Síntese das novas pirimidinas **3a-c**

Os reagentes usados nas sínteses dos compostos **1c** e as benzamidas *meta*-substituída e *para*-substituídas **2c** (Figura 1) considerados materiais de partidas foram obtidos da seguinte forma, para a síntese de 2-benzilideno-malononitrila **1c**, descrito por Knoevenagel (1898), procedeu-se uma modificação da reação de condensação aldólica entre os reagentes de partidas benzaldeído **1a** e malononitrila **1b**, na presença de piridina, uma base fraca. Já os compostos **2c** foram obtidas através do método descrito por Patai (1960) com adaptações de Melo e colaboradores (2002). As reações de obtenção dos compostos **2c** ocorreram através da substituição nucleofílica entre os compostos imino éter substituídos **2b**, um produto instável e reativo, com o gás amoníaco. Já a síntese dos compostos **2b**, ocorreu entre os materiais de partidas a benzonitrilas substituídas **2a**, com o etanol grau HPLC, usando um ácido de Lewis, ácido clorídrico gasoso, através do método similar ao descrito por Garigipati (1990).

As estruturas de todos os novos compostos pirimidínicos **3a-c** foram comprovadas por espectroscopia ¹H-RMN, ¹³C-RMN, e infravermelho.

Dados dos espectros do composto: **4-Amino-5-ciano-2-(m-nitrofenil)-6-fenil-pirimidina(3a)**

Este composto foi cristalizado em MeOH, 91% de rendimento, p.f. 221-222°C, R_f = 0.31; n-hexanoacetato de etila, 7:3); IV, KBr, μ cm-1: 3494 (NH₂asim.), 3388 (NH₂sim.), 2214 (CN), 1621 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ: 8.75 (s, 1H, H₂'); 8.56 (d, 2H, H₄' e H₆' , J 9.0 Hz); 8.36 (d, 2H, H₂'' e H₆'', J 9.0 e H₅''); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ: 166.2 (1C, C₅'); 164.4 (1C, C₂); 164.3 (1C, C₁''); 149.2 (1C, C₆); 147.5 (1C, C₄'); 142.0 (1C, C₆'); 137.6 (1C, C₄''); 135.0 (1C, C₁'); 130.3 (1C, C₂'); 129.6 (2C, C₂'' e C₆'); 125.6 (1C, C₃'); 123.8 (2C, C₃'' e C₅'); 123.4 (1C, C₁'); 115.6 (1C, C₄) e 86.1 (1C, C₅).

Dados dos espectros do composto: **4-Amino-5-ciano-2-(p-nitrofenil)-6-fenil-pirimidina (3b)**

Este composto foi cristalizado em MeOH, 96% de rendimento, p.f. 220-221, R_f = 0.42; (n-hexanoacetato de etila, 7:3); IV, KBr μcm-1 : 3336 (NH₂asymm.), 3226 (NH₂sim.), 2217 (CN), 1647 (C=N); ¹H-NMR δ: (DMSO-d₆ 400 MHz), δ: 8.46-8.34 (d, 4H, H₂'' e H₆'', H₂' e H₆'); 8.77 (, 2H, C₂-NH₂); 7.92-7.87 (m, 3H, H₃' e H₅') 7.90 (t, 1H, H₄'' J 0.9 Hz); e 7.58-7.50 (m, 2H, H₃'' e H₅''); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ: 165.9 (1C, C₂); 164.4 (1C, C₁''); 164.2 (1C, C₆) 147.8 (1C, C₄'); 138.0 (2C, C₂' e C₆'); 136.2 (2C, C₃' e C₅'); 135.0 (2C, C₂'' e C₆'); 130.3 (1C, C₁'); 128.6 (2C, C₃'' e C₅'); 125.5 (1C, C₁'); 123.3 (1C, C₄'); 116.0 (1C, C₄) ; 85.0 (1C, C₅).

Dados dos espectros do composto: **4-Amino-5-ciano-2-(p-metilfenil)-6-fenil-pirimidina (3c)**

Este composto foi cristalizado em MeOH, 75% de rendimento, p.f. 220-221, R_f = 0.35; (n-hexano-acetato de etila, 7:3); IV, KBr, μcm^{-1} : 3436 (NH₂asim.), 3326 (NH₂sim.), 2227 (CN), 1647 (C=N); ¹H-NMR δ : (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.47 (d, 2H, J 1.8 e 11.2 Hz, H₂' e H₆') ; 8.59 (s, 2H, C2-NH₂); 8.05 (d, J 11.2 Hz H₂'' e H₆''); 7.58 (d, 2H, J 11.2 Hz, H₃'' e H₅'') e 7.50 -7.40 (m, 3H, H₃', H₄' e H₅') e 2.11 (s, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 165.8 (1C, C₂); 164.3 (1C, C₁''); 164.2 (1C, C₆), 141.8 (1C, C₄'); 138.0 (1C, C₄''); 135.0 (2C, C₂'' e C₆''); 133.5 (1C, C₄'); 130.3 (2C, C₃' e C₅'); 129.2 (2C, C₂'' e C₆''); 128.5 (1C, C₁''); 125.4 (2C, C₃'' e C₅''); 1223.0 (1C, C₁''); 116.0 (1C, C₄) ; 84.6 (1C, C₅) e 22.1(1C, C₁'').

ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Atividade Antimicrobiana (CMI/CMB) e Determinação do Perfil de Resistência a Antimicrobianos Comerciais

No ensaio de CMI os compostos pirimidínicos testados **3a-c** apresentaram atividade antibacteriana com resultados mais significativos para os microrganismos Gram-negativos *P. aeruginosa* UFPEDA 416, *E. coli* UFPEDA 224, *A. baumannii* UFPEDA 1025 e Gram-positivo *S. aureus* UFPEDA 02 cujas menores concentrações inibitórias variaram de 125-250 $\mu\text{g/mL}$, resultados expressos na tabela I. Os compostos **3a** e **3b** foram mais efetivos visto que os valores de CMI para os referidos microrganismos foi de 125 $\mu\text{g/mL}$.

Os compostos **3a** e **3b** apresentam o grupo nitro ligado ao anel fenil da pirimidina que contribui para a boa atividade antimicrobiana fato descrito também por Kanagarajan et al. 2009 que ao sintetizar uma série morfilino pirimidinas e avaliar a atividade antimicrobiana frente a fungos e bactérias percebeu que o composto que tem grupos funcionais cloro, flúor, bromo e nitro de remoção de elétrons na posição para / meta dos anéis de fenil apresentaram atividades antibacterianas e antifúngicas excelentes

Mallikarjunaswamy e colaboradores (2012) realizaram estudo de CMI da série derivatizada de 2-(5-bromo-2-cloro-pirimidina-4-ilsulfanil)-4-metoxifenilamina. Foram testados 11 compostos frente as bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* MTCC 121 e *S. aureus* MTCC 7443) e Gram-negativas (*Xanthomonas campestris* MTCC 7908 e *E. coli* MTCC 7410) e apenas um dos compostos da série apresentou boa atividade antibacteriana com halos de inibição variando de 29–33 mm (Gram positivas) e 32–33 mm (Gram negativas).

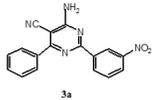
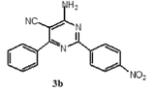
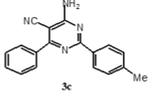
Nagender e colaboradores (2014) sintetizaram uma nova série de pirimidinas 1,2,3 triazol derivatizadas totalizando oito compostos e também encontraram boa atividade frente a *Micrococcus*

luteus MTCC 2470, *S. aureus* MTCC 96, *S. aureus* MLS-16 MTCC 2940, *B. subtilis* MTCC 121, *E. coli* MTCC 739, *P. aeruginosa* MTCC 2453 e *Klebsiella planticola* MTCC 530 porém as concentrações de CMI determinadas foram em sua maioria superiores a 250µg/mL.

Esses estudos realizados, corroboram com os resultados obtidos neste trabalho evidenciando que compostos pirimidínicos são efetivos tanto frente a Gram-positivos quanto a Gram-negativos.

Dos microrganismos selecionados para avaliar o perfil de resistência mais de 50% mostraram-se resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados segundo valores de referência estabelecidos pela CLSI, 2019 como indicado na tabela I. Dentre as cepas com perfil de resistência e que apresentou maior sensibilidade a ação dos compostos sintetizados **3a-c** cuja CMI foi de 125µg/mL foi o *A. baumannii* UFPEDA 1025 levando-o dessa forma, a ser a cepa escolhida para determinação da atividade sinérgica bem como o antibiótico Ampicilina-Sulbactam a droga comercial escolhida para ser combinada aos compostos pirimidínicos sintetizados. A possibilidade de modificar o perfil do microrganismo saindo do caráter de resistência para sensibilidade ao combinar-se compostos é obter o efeito sinérgico, resultado bastante satisfatório para antibioticoterapia.

Tabela I Atividade antimicrobiana dos diferentes compostos pirimidínicos frente aos microrganismos testes e perfil de resistência de cepas frente aos antibióticos comerciais.

	Compostos pirimidínicos			Antibióticos Comerciais						
	3 ^a 	3 ^b 	3 ^c 	APS	CAZ	CRO	CFO	MPM	OXA	PIT
Cepas	CMI/CMB (µg/mL)	CMI/CMB (µg/mL)	CMI/CMB (µg/mL)							
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02	125/250	125/250	125/125	-	-	-	-	-	-	-
* <i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 709	500/500	500/500	500/500	-	-	-	R	-	R	-
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138	500/500	500/500	125/125	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	125/125	125/250	125/250	-	-	-	-	-	-	-

UFPEDA 224										
* <i>Escherichia coli</i> UFPEDA1020B	>500/>500	>500/>500	>500/>500	R	-	-	-	-	-	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i> UFPEDA 396	500/500	250/250	250/250	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416	125/125	125/125	250/250	-	-	-	-	-	-	-
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 39	>500/>500	>500/>500	>500/>500	-	S	-	-	S	-	-
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 64	>500/>500	>500/>500	>500/>500	-	S	-	-	R	-	-
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 261	>500/>500	>500/>500	>500/>500	-	S	-	-	S	-	-
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 262	>500/>500	>500/>500	>500/>500	-	S	-	-	S	-	-
* <i>Acinetobacter baumannii</i> UFPEDA1025B	125/125	125/125	125/125	R	-	S	-	-	-	-

Nota 1:Concentração mínima inibitória - CMI ($\mu\text{g/mL}$)

Nota 2:Concentração mínima bactericida - CMB ($\mu\text{g/mL}$)

Nota 3: Antibióticos comerciais Ampicilina/ Sulbactam: APS; Ceftazidima: CAZ; Ceftriaxona: CRO; Cefoxitina: CFO; Meropenem:MPM; Oxacilina:OXA e PiperacilinaTozobactam:PIT

Nota 4: Valores de referência, segundo a CLSI (2019) para *P. aeruginosa* – Ceftazidima (sensível $\leq 8 \mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 32 \mu\text{g/mL}$); Meropenem (sensível $\leq 2 \mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 8 \mu\text{g/mL}$); *A. baumannii* - Ceftriaxona (sensível $\leq 8 \mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 64 \mu\text{g/mL}$); Ampicilina-Sulbactam (sensível $\leq 8/4 \mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 32/16 \mu\text{g/mL}$); *Staphylococcus aureus* -Oxacilina(sensível $\leq 2 \mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 4 \mu\text{g/mL}$); Cefoxitina(sensível $\leq 4 \mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 8 \mu\text{g/mL}$); *Escherichia coli* Ampicilina-Sulbactam (sensível $\leq 8/4 \mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 32/16 \mu\text{g/mL}$); Piperacilina-Tozobactam (sensível $\leq 4 \mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 64 \mu\text{g/mL}$); Resistente (R) e Sensível (S).

Nota 5: * Microrganismos isolados de amostras clínicas

Nota 6: (-) Ensaio não realizado

Atividade Sinérgica - Técnica de Checkerboard

O presente estudo mostrou que ocorreu efeito sinérgico entre os compostos **3a-c** combinados com o antibiótico Ampicilina-Sulbactam frente a *A. baumannii* (UFPEDA1025B). A CMI inicial de 4 μ g/mL, Ampicilina-Sulbactam, sofreu redução diante da combinação com os três compostos testados (Tabela II).

Tabela II Atividade sinérgica dos compostos pirimidínicos (**3a-c**) combinados a Ampicilina-Sulbactam frente a *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025B.

Microrganismo	Compostos Pirimidínicos / Droga comercial	CMI (μ g/mL)		CIF	ICIF	Resultado
		Sozinho	Combinado			
<i>A. baumannii</i> UFPEDA1025B	3a	125	7,81	0,062	0,187	Sinérgico
	Amp+Sulb	4	0,5	0,125		
	3b	125	15,62	0,125	0,187	Sinérgico
	Amp+Sulb	4	0,25	0,0625		
	3c	125	31,25	0,25	0,281	Sinérgico
	Amp+Sulb	4	0,125	0,031		

Nota 1 CMI: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

Nota 2: Amp+Sulb: Ampicilina-Sulbactam

A sinergia entre os compostos possivelmente ocorreu pelo fato de as drogas atuarem em alvos diferentes. O mecanismo de ação de ampicilina (β -lactâmico) em associação ao sulbactam (inibidor de β -lactamase) ocorre devido à ligação irreversível do inibidor as β -lactamases produzidas pelas bactérias, que ao formar um complexo inativo, permite a ação do β -lactâmico que atua na inibição da síntese da parede celular (Peechakara & Gupta, 2020). Em contrapartida, compostos que apresentam em sua estrutura o grupo

nitro, característica observada nos compostos **3a-b**, atua como receptor de elétrons e leva a liberação de compostos tóxicos e radicais livres que atuam no DNA inativando-o e impedindo a síntese enzimática das bactérias (Olender, 2018).

Quando combinada com o composto **3a** a CMI do antibiótico foi reduzida para 0,5µg/mL e paralelamente houve uma redução do derivado pirimidínico **3a** que possuía sozinho uma CMI de 125µg/mL e teve a concentração reduzida para 7,81µg/mL que representa uma diminuição em aproximadamente 8 vezes da concentração inicial do antibiótico e 16 vezes para o composto, obtendo um ICIF de 0,187 caracterizando efeito sinérgico.

Para o composto **3b** a CMI inicial do antibiótico foi reduzida para 0,25µg/mL e o composto reduziu a concentração de 125µg/mL para 15,62 µg/mL que representa uma diminuição em 16 vezes para o antibiótico e 8 vezes para o composto, com um ICIF de 0,186 obtendo-se também nesta interação dos compostos efeito sinérgico.

Quando associado ao composto **3c** ocorreu uma redução da Ampicilina-Sulbactan para 0,125 µg/mL e do composto **3c** de 125µg/mL para 31,25 µg/mL, representando uma redução em 32 e 4 vezes respectivamente, com um CIF de 0,312. Embora a redução da concentração do antibiótico tenha sido mais expressiva em **3c** ainda assim os compostos **3a** e **3b** mostraram-se mais eficazes quando os valores de ICIF foram mais baixos.

O problema da resistência bacteriana está crescendo e as perspectivas para o uso de novos antibacterianos no futuro ainda são incertas, embora a indústria farmacêutica tenha produzido nas últimas décadas novos antibióticos. Pesquisar a sinergia de compostos aumenta as chances de projetar novos agentes antibacterianos para o tratamento de infecções (Stefanović, 2017).

Sharma e colaboradores (2014) destacaram que medicamentos sulfa contendo pirimidina apresentam efeito sinérgico e que as sulfa drogas são conhecidas por possuir boa atividade antibacteriana. Wróbel e colaboradores (2020) verificou que Trimetoprim [2,4-diamino-5- (3,4,5-trimetoxibenzil pirimidina)], combinado com sulfonamida mostra-se eficaz no tratamento da gonorreia, no entanto são necessárias altas doses no tratamento.

Sharma e colaboradores (2016) sintetizaram uma série de 2-Metilimidazo[1,2-a]pirimidil calcogenetos e verificou que dois compostos apresentaram atividade sinérgica sendo um deles contra fungos para cepa *C. albicans*, e o outro mostrou atividade sinérgica moderada

frente cepas bacterianas de *E. coli*, *E. faecalis* e a cepa fúngica *C. keyfer* quando testados em combinação a droga rifampicina e droga antifúngica anfotericina B.

Vários pesquisadores realizaram ensaios combinando antibióticos pois a possibilidade de um patógeno desenvolver resistência contra uma combinação de dois medicamentos é inferior a detectada contra um único medicamento. Da mesma forma, o efeito sinérgico dos antibióticos combinados é maior do que o do antibiótico individual. Uma combinação de medicamentos também aumenta o espectro de cobertura (Vazquez-grande & Kumar, 2015).

Ensaio de Curva de Morte - *Time Kill*

Analisados por 24h, os compostos **3a-c**, frente as cepas de *A. baumannii* UFPEDA 1025, *E. coli* UFPEDA 224, *P. aeruginosa* UFPEDA 416 e *S. aureus* UFPEDA 02 em todas as concentrações testadas (2XCMI, CMI e 1/2XCMI) mostraram-se efetivas para reduzir/frear o crescimento dos microrganismos (Figura 2).

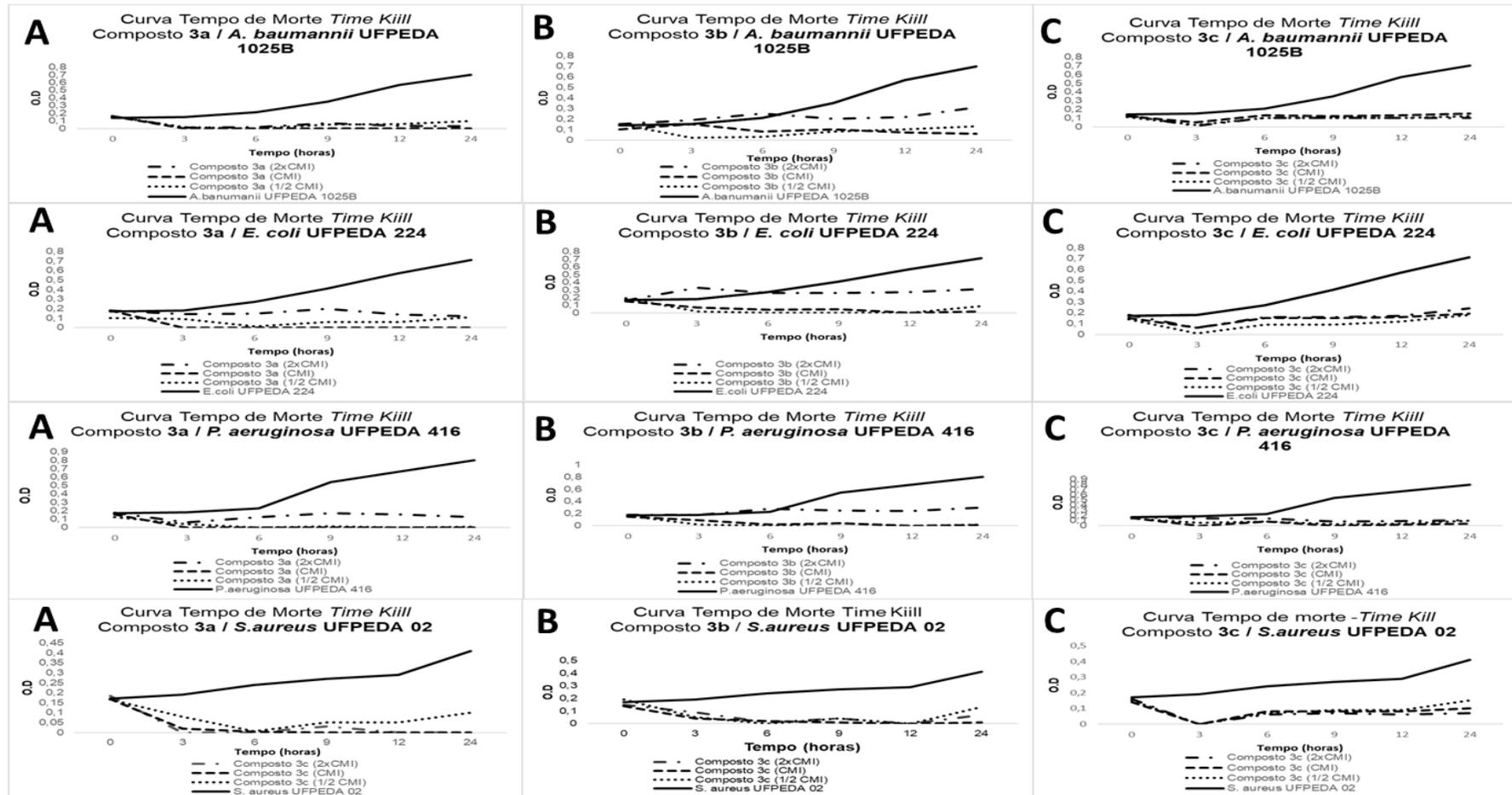


Figura 2. Curva tempo de morte - *Time Kill* do *A. baumannii* UFPEDA 1025B, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 e *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 frente ao composto 3a(A), composto 3b(B) e composto 3c (C) nas concentrações de 2XCMI, CMI e 1/2XCMI nos tempos 0,3,6,9,12 e 24horas.

Ao analisar a ação dos compostos **3a-c** frente ao *A. baumannii* UFPEDA1025B e comparado a sua curva de crescimento, percebe-se que todos, ao final das 24h, foram capazes de reduzir significativamente o crescimento microbiano inclusive quando foi aplicada a concentração subinibitória. No entanto o composto **3a** mostrou-se o mais efetivo pois utilizando as concentrações de 2xCMI/CMI seu efeito antagônico foi observado comprometendo o desenvolvimento do microrganismo desde as horas iniciais permanecendo da mesma forma no decorrer das 24h estudadas, embora, foi observado também que os compostos **3b** e **3c** no tempo final de 24h foram capazes de reduzir o crescimento microbiano em aproximadamente 85% na concentração de 1/2CMI quando comparado a curva do crescimento de *A. baumannii* UFPEDA1025B.

Resultado semelhante foi obtido para *E. coli* UFPEDA 224, quando os compostos **3a-b** frearam o crescimento da bactéria na concentração do CMI e o composto **3c** mesmo apresentando resultado pouco inferior aos demais conseguiu reduzir em aproximadamente 70% o crescimento microbiano nas três concentrações testadas.

A ação dos compostos **3a-c** frente a *P. aeruginosa* UFPEDA 416 reduziu em até 100% o crescimento microbiano quando utilizada a concentração do CMI com destaque para os compostos **3a-b** que obteve o mesmo êxito quando se utilizou a concentração subinibitória (1/2CMI).

Frente ao *S. aureus* UFPEDA 02, os compostos **3a-b** mostraram inibição do crescimento microbiano quando aplicada a concentração do CMI, reduzindo em até 100% o crescimento da bactéria. Foi possível verificar ao fim das 24h, que ao ser empregado o composto **3c**, nas três concentrações testadas, o *S. aureus* apresentou uma tendência de crescimento e não uma fase estacionária como é observada em **3a-b** na concentração de 125µg/mL (valor do CMI). Dessa forma a administração dos compostos **3a-b** é mais eficaz no controle do *S. aureus* UFPEDA 02.

Em todos os ensaios realizados pode-se perceber que concentrações de CMI e 1/2CMI foram bastante satisfatórias e que em algumas situações as duas apresentaram resultados semelhantes o que é de grande importância principalmente quando se pensa numa aplicação clínica futura.

Os antimicrobianos normalmente atuam durante o desenvolvimento bacteriano em seu processo de replicação, seja inviabilizando a síntese proteica, síntese de ácidos nucléicos e o processo de formação de parede celular (Tretin et al. 2013). Estudar a curva de morte é monitorar o crescimento

bacteriano e sua morte em uma ampla gama de concentrações e têm sido frequentemente usados para avaliar o efeito dos antimicrobianos ao longo do tempo. Esses dados podem ser analisados usando modelos matemáticos e muitas vezes são a primeira etapa em estudos de modelagem para farmacocinética/farmacodinâmica (Foerster et al. 2016).

De altas a baixas concentrações, os antibióticos agem como toxinas, indutores de estresse ou como estímulos / coerções, respectivamente. Entre as interações mediadas por antibióticos em concentrações subinibitórias, as bactérias receptoras podem induzir mecanismos que levam à resistência ou tolerância aos antibióticos (Bernier & Surette, 2013).

Estudos sugeriram que a morte celular induzida por antibióticos estava associada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais hidroxila, superóxido e peróxido de hidrogênio para antibióticos bactericidas pertencentes às famílias das quinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos (Kohanski et al. 2010).

Formação de Biofilme e Atividade Anti-Biofilme

Para executar a atividade anti-biofilme se faz necessário verificar se as cepas a serem estudadas tinham capacidade de formar biofilme. Um microrganismo pode ser classificado em quatro categorias distintas, como não formador, fracamente formador, moderadamente formador ou fortemente formador de biofilme. Desta forma após execução do ensaio de formação foi evidenciado que os microrganismos apresentaram perfil de moderadamente formador (*Acinetobacter baumannii* UFPEDA1025B e *Escherichia coli* UFPEDA 224) e fortemente formador de biofilme (*Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416) conforme Tabela III.

Tabela III. Classificação dos microrganismos quanto a formação de biofilme e ação anti-biofilme dos compostos **3a**, **3b** e **3c** nas concentrações de 2xCMI, CMI e 1/2xCMI frente a culturas bacterianas.

Microrganismos	Classificação da formação de Biofilme	[]	Composto		
			3a	3b	3c
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02	+++	2xCMI	+	+	+
		CMI	+	+	++
		1/2xCMI	+	++	++
<i>Escherichia coli</i> UFPEDA 224	++	2xCMI	-	-	-
		CMI	-	-	-
		1/2xCMI	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416	+++	2xCMI	-	-	-
		CMI	-	-	-
		1/2xCMI	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> UFPEDA1025B	++	2xCMI	+	+	+
		CMI	+	+	+
		1/2xCMI	+	+	+

Nota: Classificação quanto a formação de biofilme: +++ Fortemente formador; ++ Moderadamente formador; + Fracamente formador, - Não formador.

Os microrganismos que foram mais suscetíveis a ação dos compostos pirimidínicos sintetizados resultado evidenciado em CMI, foram selecionados para o ensaio de atividade anti-biofilme e testados nas concentrações de 2xCMI, CMI e 1/2xCMI dos compostos **3a-c**.

Os resultados de ação anti-biofilme dos três compostos pirimidínicos **3a**, **3b** e **3c** revelaram que os mesmos apresentaram ação antagônica na formação do biofilme, com destaque frente aos microrganismos *E. coli* UFPEDA 244 e *P. aeruginosa* UFPEDA cujo desenvolvimento de formação foi totalmente impedido e os mesmos que se apresentavam respectivamente como moderadamente formador e fortemente formador passaram a categoria de não formador de biofilme. Os compostos **3a-c** mesmo na menor concentração testada foi capaz de impedir ou reduzir a intensidade da formação de biofilme para todos os microrganismos testados como pode ser observado na tabela II.

Os compostos **3a** e **3b** que demonstraram uma excelente atividade e como apresentado contém em sua estrutura o grupo nitro ligado ao anel aromático, importante característica físico-química, de acceptor de elétrons além de existir o fenômeno de ressonância entre o nitrogênio e os átomos de carbono. Essa característica, desencadeia a atividade biológica que além de atuar pelo mecanismo de redução pode também ocorrer pela biorredução enzimática resultando na formação de radicais livres com toxicidade para células bacterianas e parasitárias (Paulai et al. 2009).

O composto **3c** diferentemente **3a** e **3b** apresenta um ligante metil ligado ao anel aromático cuja propriedade é a doação de elétrons, mas esta característica provavelmente é também quem atua contribuindo para a atividade antibacteriana, uma vez que o composto também apresentou atividade antimicrobiana, porém quando foram utilizadas concentrações mais elevadas.

Biofilmes são comunidades de microrganismos que estão ligados a uma superfície e desempenham um papel significativo na persistência de infecções bacterianas. As bactérias inseridas em biofilme são muito mais resistentes aos antibióticos, em comparação às células de vida livre, na forma planctônica (Rabin et al. 2015).

Um biofilme bacteriano é geralmente incorporado em uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS) (Flemming & Wingender, 2010) e sua produção é influenciada por fatores ambientais, como temperatura, pH, composição do meio entre outros fatores (Mohite et al. 2017). Estruturas bacterianas externas, como flagelos, fímbrias e cápsulas, também são fatores importantes para a formação de biofilmes (Murphy et al. 2013, Ribeiro et al. 2016).

Suresh e colaboradores (2016) sintetizaram 14 compostos da série derivada de tiocromeno [3,4-d] pirimidina, mas selecionaram apenas dois para estudar a atividade anti-biofilme. As cepas escolhidas foram *S. aureus* MTCC 96, *S. aureus* MLS16 MTCC 2940 e *B. subtilis* MTCC 121. Eles perceberam que os compostos mostraram-se ativos quando foi utilizada a concentração do CMI, mas quando aplicada a concentração subinibitória ao CMI não existiu redução significativa em relação ao valor das células não tratadas.

Nagender e colaboradores (2014) testando a nova série de pirimidinas 1,2,3 triazol derivatizadas observou em seu ensaio anti-biofilme que os melhores resultados obtidos foram para as cepas *M. luteus* MTCC 2470, *S. aureus* MTCC 96, *S. aureus* MLS-16 MTCC 2940, *P. aeruginosa* MTCC 2453 e *K. planticola* MTCC5 tendo apresentado atividade apenas três dos 16 compostos sintetizados da série.

O potencial de ação de um anti-biofilme visa ao controle direto do biofilme, agindo principalmente na matriz EPS, mais especificamente na estabilidade estrutural, formada de pontes iônicas de íons de cálcio e de magnésio, e no enovelamento de cadeias vizinhas de polissacarídeos, inibindo desde seu estágio inicial de formação até à destruição de um biofilme já consolidado (Wingender e al. 1999).

CONCLUSÃO

A busca incessante por novos antimicrobianos se faz necessária principalmente diante da incidência no número de bactérias multirresistentes. As Pirimidinas destacam-se por ser um importante composto heterocíclico e já possuir representantes no mercado sendo comercializados. Em conclusão, três compostos pirimidínicos inéditos foram sintetizados, caracterizados quimicamente e demonstraram atividades biológicas promissoras contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas demonstrando seu amplo espectro seja em sua forma de vida livre, planctônica como também de forma sésil, em biofilme. A realização deste trabalho ainda ressaltou o efeito sinérgico dos compostos **3a-c** quando associados ao medicamento comercial ampicilina-sulbactam. Dessa forma os compostos podem ser desenvolvidos como um potente e novo antibiótico, além de apresentar possibilidade de eficácia frente a outras atividades biológicas ainda não exploradas.

REFERENCIAS

ANTUNES, A. L. S. et al. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. **APMIS**, v. 118, n.11, p. 873–877, 2010

BAI, S. et al. Asymmetric synthesis and antiviral activity of novel chiral amino-pyrimidine derivatives. **Tetrahedron Letters** v.59, n.2018, p. 3179–3183.

BALLAL, M.; VINITHA, M. Activity of proteinase, phospholipase and biofilm as virulence markers in *Candida* species isolated from haematogenous samples. **Journal of Hospital Infection**, v.73, n.1, p.94-95, 2009.

BERNIER, S. P., SURETTE, M. G. Concentration-dependent activity in natural environments. **Frontiers in Microbiology**, v.4, n.20, 2013.

BREITINGER, H.G. **Drug synergy – mechanisms and methods of analysis**. In Toxicity and Drug Testing, ed B. Acree (Rijeka: InTech), p. 143–166, 2012.

CARLET, JEAN.; RAMBAUD, C.; PULCINI, C.; Save Antibiotics: a call for action of the World Alliance Against Antibiotic Resistance (WAAAR). **Infectious Diseases**, 2014.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

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

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.

D'SOUZA, A. W. et al. Spatiotemporal dynamics of multidrug resistant bacteria on intensive care unit surfaces. **Nature Communications**, v.10, n. 4569, 2019.

DO MONTE Z.S, MONTEIRO M.R.L, BORBA C.B.A, DE GUSMÃO N.B, FALCÃO E.P, SILVA R.O, SRIVASTAVA R.M, DE MELO S.J. Synthesis of 4-amino-2,6-diaryl-5-cyanopyrimidines as antimicrobial agents. **Synth. Commun.**, v.46, n.11, p. 983-991, 2016.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.9, p.623–633, 2010.

FOERSTER, S. et al. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*, **BMC Microbiology**, v.2016, p. 216.

GARIGIPATI, R.S. An efficient conversion of nitriles to amidines. **Tetrahedron Letters**. v.31,n.14, p.1969-1972,1990.

GIAMMANCO, A. Global Assessment of the Activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens between 2004 and 2014 as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. **Clinical Science and Epidemiology**,v.2, n.1, 2017.

GOFFIN, E. et al. Synthesis of ticagrelor analogues belonging to 1,2,3-triazolo[4,5-d] pyrimidines and study of their antiplatelet and antibacterial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry** v.208, 2020.

GREENE, C. et al. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. **Lett Appl Microbiol**, v.63, n.4, p.233-9, 2016.

KANAGARAJAN, V.; THANUSU J.; GOPALAKRISHNAN, M. A Green Chemical Approach towards the ‘One-Pot’ Synthesis, Spectral Characterization and in Vitro Antibacterial and Antifungal Activities of Morpholino Pyrimidines. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 53,n.6, 2009.

KHAN HA, BAIG FK, MEHBOOB R. Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pac J Trop Biomed**. v.7,n.5, p.478–482,2017.

KOHANSKI, M. A., DWYER, D. J., & COLLINS, J. J.. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.6, p 423–435, 2010.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**, 5nd ed., Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 889, 2005.

MADDILA, S. et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of novel benzothiazole pyrimidine derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**,v.9, n.2016,681-687,2016

MALLIKARJUNASWAMY, C. et al. Studies on synthesis of pyrimidine derivatives and their antimicrobial activity. **Arabian Journal of Chemistry**,v.10, n.2017, 2012.

MELO, S. J. DE; SANTOS, L.C.; FALCÃO, E.P.S.; SRIVASTAVA, R. M. AND LUU DUC, C. Synthesis of new 4-amino-5-ciano-2,6-diarylpyrimidines. **Journal Chemistry Research**, v.5, p.216-217, 2002

MOHITE, B.V; KOLI, S.H; NARKHEDE, C.P; PATIL, S.N; PATIL, S.V;. Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v.183, p.582–600, 2017.

MURPHY, C. N.; MORTENSEN, M. S.; KROGFELT, K. A.; CLEGG, S.; Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. **Infect. Immun.** v.81, p.3009–3017, 2013.

NAGENDER, P. Synthesis, cytotoxicity, antimicrobial and anti-biofilm activities of novel pyrazolo[3,4-b]pyridine and pyrimidine functionalized 1,2,3-triazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.24, n. 13, p. 2905-2908, 2014.

OLENDER, D.; ZWAWIAK, J.; ZAPRUTKO, L. Multidirectional Efficacy of Biologically Active Nitro Compounds Included. **Medicines.Pharmaceuticals** , v.11, n.54, 2018.

PATAI, S.J.I **Journal of chemical society.** p.2020-2024, 1960.

PAULAI, F.R.; SERRANO, S.H.P.; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quimica Nova*, v.32, n.4, p.1013-1020, 2009

PEECHAKARA B.V.; GUPTA, M. **Ampicillin/Sulbactam.** In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.

PELEG, A Y.; SEIFERT, H; PATERSON, D L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008.

PRESTINACI, F. PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathog Glob Health.** v.109, n.7, p.309–318, 2015

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agentes. **Future Med. Chem.** V. 7, n. 4 , p. 493–512, 2015.

RIBEIRO, S. M., FELICIO, M. R., BOAS, E. V., GONÇALVES, S., COSTA, F. F., SAMY, R. P., et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacol. Ther.** v.160, p.133–144,2016.

RICE L. B. Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 31,(supplement 1):S7–S10, 2010

ROLAIN J.M. et al. Real-time sequencing to decipher the molecular mechanism of resistance of a clinical pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from Marseille, France. **Antimicrob Agents Chemother** v.57, p.592–596, 2013

SAHI, S., PAUL, S. Synthesis and biological evaluation of quinolines, thiazolo[3,2-a]pyrimidines, thiadiazolo[3,2-a]pyrimidines and triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazepines as antimicrobial agents. **Med Chem Res** v.25, p.951–969, 2016.

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.

SEVERINA, H. I. et al. Synthesis and anticonvulsant activity of 6-methyl-2-((2-oxo-2-arylethyl)thio) pyrimidin-4(3H)-one derivatives and products of their cyclization. **Pharmacia**, v. 66, n.3, p:141–146, 2019

SHARMA, N.; KUMAR, S.; MAURYA, I. K.; BHASIN, K. K.; VERMA, A.; WANGOO, N.; SHARMA, R. K. 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, P. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**, v.56, p. 156-175, 2014.

STEFANOVIĆ, O. D.; Synergistic Activity of Antibiotics and Bioactive Plant Extracts: A Study Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control**, 2018.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n.8, p. 891–899, 2007.

SURESH, L., POORNACHANDRA, Y., KANAKARAJU, S., GANESH KUMAR, C., & CHANDRAMOULI, G. V. P. One-pot three-component domino protocol for the synthesis of novel pyrano[2,3-d]pyrimidines as antimicrobial and anti-biofilm agents. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.13, n.26, p.7294–7306, 2015.

THIRUMURUGAN, K. et al. Design, synthesis and anti-inflammatory activity of pyrimidine scaffold benzamide derivatives as epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. **Journal of Molecular Structure** v.1171, n.2018, p. 541-550, 2018.

THOMPSON, M.G. Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. **Antimicrob Agents Chemother**.v. 58, n.3, p. 1332-42

TIWARI, K. et al. In vitro activity of bioactive extracts from rare actinomycetes against multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, p.1306-1314, 2015

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VADIVOO, N. S.; USHA, B.; ESKAPE pathogens: Trends in antibiotic resistance pattern. **MedPulse International Journal of Microbiology**. v.7, n.3, p.26-32.

VAZQUEZ-GRANDE, G.; KUMAR, A. Optimizing antimicrobial therapy of sepsis and septic shock : focus on antibiotic combination therapy. **Semin Respir Crit Care Med.** v.1, p.154–166, 2015.

WINGENDER, J., NEU, T. AND FLEMMING, H.-C.; What are Bacterial extracellular polymer substances? **Microbial Extracellular Polymeric Substances**; p. 1–19,1999.

WRÓBEL, A. et al; Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. **The Journal of Antibiotics**, v.73, p. 5–27, 2020

YERRAGUNTA, V. et al. Pyrazole and Its Biological Activity. **PharmaTutor Magazine**, v. 2, n. 1, 2013

Artigo a ser submetido a Revista: Anais da Academia Brasileira de Ciências

ARTIGO 2 - ATIVIDADES DUAL PARASITICIDAS ANTILEISHMANIA E ANTICHAGÁSICA DE ANÁLOGOS DA PIRIMIDINA COM O ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR.

Marcela de Araújo Sobral^{a,c}, Zenaide S. Monte^b, Erick Caique S. Costa^a, Aline C. S. Santos^d, Valéria R. A. Pereira^d, Gláucia Manoella de Souza Lima^{a,c}, Marcus T. Scotti^e, Luciana Scotti^e, Sebastião José de Melo* ^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, 50740-560 Recife- PE, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, 50740-560 Recife- PE, Brasil

^cDepartamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, 50740-560 Recife- PE, Brasil

^dCentro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 50670-420 Recife-PE, Brasil

^ePrograma de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brasil

RESUMO

Pirimidinas têm sido usadas como tipos de plataforma para a obtenção de agentes leshimanicidas e anti-*Trypanosoma cruzi*. Apresentamos a síntese de 4 pirimidinas **3a-d** e suas atividades leshimanicida e tripanocida, além da citotoxicidade frente a linhagens celulares de mamíferos. 4-Amino-5-ciano-2-(m-metoxifenil)-6-fenil-pirimidina (**3d**) é um composto inédito. O composto **3b** apresentou inibição potente do *T. cruzi* na forma tripomastigota (cepa Y) em baixas concentrações de citotoxicidade de células RAW 264.7, com (IC₅₀ = 1,73 e CC₅₀ =

48,85) e foi mais ativo que o fármaco controle Benzonidazol ($IC_{50} = 14,60$ e $CC_{50} = 129,54$) μM . A atividade leishmanicida frente promastigotas ($IC_{50} = 48,47$ e $CC_{50} = 56,72$) μM e amastigota ($IC_{50} = 39,32$ e $CC_{50} = 56,72$) μM de *L. amazonenses* apresentaram melhor resultado para **3c**. Os resultados de *Docking* molecular dos compostos **3a-d** apresentaram baixas energias de ligações e foram notavelmente mais favoráveis energeticamente em relação ao composto padrão benzonidazol. Os compostos **3b,c** possuem sistema *para* substituídos no fenil da posição do C2 do núcleo pirimidínico e obtiveram maior interação química com os resíduos da cruzaina em comparação ao controle podendo ainda justificar o melhor resultado da ação contra *T. cruzi* ser oito vezes e meio mais ativo para **3b** que o padrão utilizado.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Docking* molecular, Pirimidinas

INTRODUÇÃO

A população de regiões tropicais e subtropicais tem sido fonte de preocupação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) em decorrência das doenças que afetam essas regiões. Dentre as doenças estão a leishmaniose e a tripanossomíase americana também conhecida por doença de Chagas (WHO, 2019). Essas doenças parasitárias continuam sendo o problema de saúde pública mais grave em países localizados na América Latina (Monte et al, 2020; De Melo et al, 2018).

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença é causada por mais de 20 espécies de *Leishmania*, cuja transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos fêmeas (Méndez-Arriaga et al., 2018). A leishmaniose afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e estima-se que 2 milhões de pessoas desenvolvam doenças sintomáticas anualmente (WHO, 2019).

Em países em desenvolvimento é uma doença grave que, se não tratada, pode chegar a 90% de mortalidade (Maia-Elkhoury et al. 2008, Cavalcante & Vale 2014, WHO 2019). A leishmaniose é

classificada em duas formas clínicas principais: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose tegumentar (LT).

Os tratamentos atuais são caros e causam efeitos colaterais graves e resistência emergente aos medicamentos (Mohapatra, 2014). A maioria dos medicamentos de primeira linha, como estibogluconato de sódio, antimoniato de meglumina, pentamidina, anfotericina B e miltefosina, causam efeitos colaterais graves e toxicidade (Pimentel et al. 2011). A resistência é bem descrita para antimoniais, enquanto a resistência à anfotericina B e miltefosina está em risco, e apenas a última pode ser administrada por via oral (Ponte-Sucre et al. 2017)

O tratamento para a doença de chagas está baseado na administração de duas drogas: Nifurtimox e Benzonidazol. Embora possuam atividade significativa na fase aguda da doença, na fase crônica sua eficácia é muito limitada (Tolozza et al. 2016, De Melo et al. 2018). De modo semelhante, o tratamento para todas as formas de leishmaniose está baseado na administração de agentes à base de antimônio, que são utilizados desde a década de 1940 (Guimarães et al. 1968). Estima-se que, mundialmente, 7 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas por esse parasita (Hidron et al. 2010, WHO, 2017, De Melo et al. 2018).

Portanto ocorre uma grande necessidade de opções de drogas mais eficazes e menos tóxicas. Para isso, são necessários ao desenvolvimento de novas substâncias químicas com efeitos tripanocida e leishmanicida.

Os derivados da pirimidina têm desempenhado um papel importante na química medicinal por possuírem um amplo espectro de atividades biológicas (Do Monte et al. 2016). Existem vários relatos na literatura de interessantes atividades biológicas para derivados que contém o núcleo das pirimidinas em suas estruturas, como atividade antimicrobiana, antitumoral, antichagásica, anti-leishmaniose, entre outras (Da Silva et al. 2008, Hashimoto et al. 2012, Monte et al. 2020).

Diante disso, o presente estudo utilizou-se de ferramentas da quimioinformática para entender melhor quais as interações intermoleculares entre os compostos pirimidínicos e a cruzaina podem ser fundamentais para que ocorra uma resposta inibitória. Estudos mostram que o uso de *docking* molecular pode acarretar em uma maior taxa de acertos por possibilitar a análise das conformações do ligante no local sítio ativo (Silva-Júnior, 2018).

Portanto, os resultados apontam que os compostos planejados são promissores para as atividades biológicas testadas e justifica a ampliação da pesquisa por novos fármacos que sejam mais eficazes e seguros no tratamento dos pacientes acometidos por uma dessas doenças.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os materiais de partida, reagentes e solventes foram adquiridos (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis) e usados sem purificação adicional. O monitoramento das reações químicas foi realizado por cromatografia analítica em camada delgada (CCD), em sílica gel 60 F254 embalada em folhas de alumínio, adquiridas na (Merck, New Jersey) e foram visualizadas em lâmpada UV (254 nm). A cromatografia em coluna foi conduzida em sílica 60 (35-70 microns) gradiente de eluente *n*-hexano-acetato de etila, 7:3). Os pontos de fusão foram determinados no equipamento BUCHI B-540. Os espectros de ¹H-NMR foram registrados em um espectrômetro VARIAN VNMRS400 espectrômetro VARIAN VNMRS400 operando a 400 MHz e 100 MHz para núcleos ¹H e ¹³C, respectivamente, em escala δ (ppm), usando DMSO como solvente e TMS como padrão interno.

Síntese e caracterização das pirimidinas 3a-d

Os derivados pirimidínicos **3a-d** foram obtidos pela reação entre os intermediários de Michael **1a-d** e as arilamidinas derivadas **2a-d** em quantidades equimolares. A reação foi catalisada por piperidina através da metodologia descrita por Do Monte e colaboradores (2016). As arilamidinas **2a-d** foram obtidas através da metodologia descrita por Melo e colaboradores (2002).

Avaliação da atividade Tripanocida

Forma tripomastigotas

A forma tripomastigota (cepa Y) foi obtida a partir da infecção *in vitro* de 10^7 parasitas em linhagem celular Vero após obter confluência em cultivo. Para determinar o efeito antiproliferativo das formas tripomastigotas da cepa Y, 4×10^6 parasitas/ml foi mantido em meio RPMI + 1% antibiótico + 5% SFB, foram semeados em placas de 96 poços a 37°C juntamente com diferentes concentrações dos compostos (0,19, 1,56, 6,25, 25, 100 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas viáveis

foi contado em câmara de Neubauer. Os poços que não receberam os compostos foram considerados como 100% do número de parasitas viáveis. O medicamento de referência, benzonidazol, foi usado como controle positivo. Cada composto foi testado em duplicata. As curvas de dose-resposta foram determinadas e a concentração de inibição de 50% da proliferação do parasita (IC_{50}) foi calculada por regressão linear (GraphPad Prism, versão 5.0)

Avaliação da atividade Leishmanicida

Ensaio Promastigota

Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 células/mL em meio de Schneider com 10% de soro fetal bovino) foram incubadas em placa de 96 poços com compostos em oito concentrações diferentes (1,5 a 200 μ g / mL) por 72h a 26°C. A miltefosina foi usada como medicamento de referência. As células sem tratamento foram utilizadas como controles negativos. O crescimento celular foi avaliado e $IC_{50/72h}$ foi determinado por análises de regressão. Os ensaios foram realizados em triplicata (Da Silva et al. 2017).

Ensaio Amastigota

Para a obtenção de amastigotas, macrófagos RAW 264,7 foram semeados (3×10^5 células / mL em RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e antibiótico) em uma placa de 24 poços com lamínula de vidro de 13 mm e deixados aderir por 24h, a 37°C em 5% de CO_2 . Quando os macrófagos estavam aderidos foram então infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento usando uma proporção de 1:15 a 37°C por 6 h. Posteriormente, os parasitas não interiorizados foram removidos por lavagem e as culturas infectadas foram incubadas com os compostos em concentrações de 6,25 a 200 μ g / mL por 24h. Apenas o meio RPMI 1640 foi usado como controle negativo. As lamínulas foram coletadas e coradas com o kit de coloração Panótico (Laborclin, PR, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de 100 células e seus amastigotas intracelulares, os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade leishmanicida foi avaliada pela diminuição de macrófagos infectados e amastigotas intracelulares nas culturas tratadas (T) e não tratadas (NT), descritas pela fórmula: % amastigotas = $T \times NT / 100$. IC_{50} foi determinado por análises de regressão (Da Silva et al. 2017).

Citotoxicidade em macrófagos

Macrófagos RAW 264.7 foram usados para avaliar a citotoxicidade celular pelo ensaio MTT. As células (1×10^5 células/poço) foram semeadas 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 200 µg / mL) e incubados por 48 h.

Foram utilizados DMSO e miltefosina como controle negativo e positivo, respectivamente. Após a incubação com os compostos, foi adicionado MTT (5 mg / mL, em PBS). Duas horas depois, o meio de cultura de células e o excesso de MTT não reduzido foram aspirados e 100 µL de DMSO foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC.

A concentração citotóxica para 50% da cultura de células (CC₅₀) foi calculada por análise de regressão usando o software GraphPad Prism 5.012. Os ensaios foram feitos em triplicata (Monte et al. 2020).

Índice de seletividade

Para verificar o quanto os compostos foram seletivos para parasitas, foi calculado o índice de seletividade (IS) para as formas tripomastigota, amastigota e promastigota. IS consiste na razão entre CC₅₀ / IC₅₀. Valores mais altos de IS indicam maior especificidade para o parasita. Para a obtenção do IS, foram considerados os valores micromolares. Valores de IS menores que 1 foram considerados como não indicativos de seletividade parasitária (De Melo et al. 2018).

Análise estatística

As análises de regressão linear para obter os valores de CC₅₀ e IC₅₀ foram feitas no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, EUA).

***Docking* molecular**

As estruturas dos derivados pirimidínicos foram desenhadas e suas energias minimizadas utilizando o software BIOVIA Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). Os compostos padrão, miltefosina e benzonidazol, tiveram suas estruturas

fornecidas pelo PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), e todas as estruturas foram salvas no formato .sdf. O receptor investigado foi a cruzaina, alvo validado como de extrema importância no controle da doença de chagas. A enzima foi baixada do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) com ID PDB: 3LXS. O *docking* molecular entre os ligantes e a enzima foi realizado utilizando o Molegro Virtual Docker, v. 6.0.1 (MVD). A enzima cruzaina consiste em uma cisteína protease com funções essenciais em todo o ciclo de vida do parasita *T. cruzi* como, imunoevasão, obtenção de nutrientes e diferenciação do parasita (Chen et al. 2010). O processo de *docking* foi realizado utilizando um GRID de 10Å de raio e 0,30 de resolução de modo a englobar todo o sítio de ligação da enzima. A proteína, juntamente com as estruturas dos ligantes, foram submetidas a um conjunto de parâmetros padrão do software como: função de pontuação MolDock score [GRID]; ES interno, HBond interno, torções Sp2-Sp2, todos verificados. Foi realizada a análise dos resultados obtidos para cada conformação dos complexos ligante-enzima e estabeleceu-se um ranking dos valores de energia de afinidade (KJ / mol) para as melhores poses.

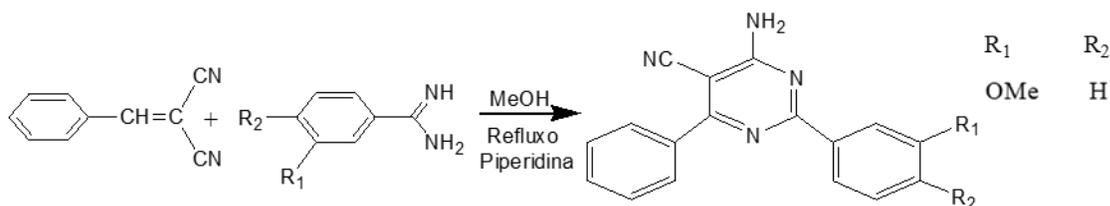
RESULTADO E DISCUSSÃO

Síntese

Uma rota para a síntese de analogos da pirimidina **3a-d** é alcançada por condensação entre a benzamidina com o benzilideno Malononitrila *m,p*-substituídos apropriados catalisada por base, a piperidina foi convenientemente obtida.

Dentre esses analogos está um novo composto o 4-Amino-5-ciano-2-(*m*-metoxifenil)-6-fenil-pirimidina (**3d**), um heterociclo pirimidínico 2,4,5,6-substituído, que contém três anéis aromáticos (**Esquema 1**). O composto **3d** foi obtido com um excelente rendimento de 90,6%.

Os compostos **3a-c** já foram reportados na literatura por Sobral e colaboradores (2022).



Esquema 1: Síntese do composto 4-Amino-5-ciano-2-(*m*-metoxifenil)-6-fenil-pirimidina (**3d**)

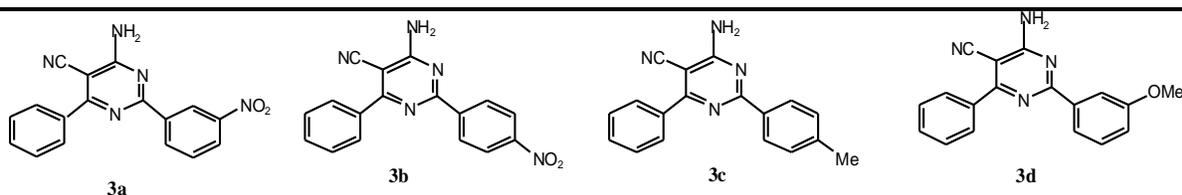
O composto 4-Amino-5-ciano-2-(*m*-metoxifenil)-6-fenil-pirimidina (**3d**) foi cristalizado em metanol, o ponto de fusão foi entre 226-228 °C, e o fator de retenção foi de 0,32 em (n-hexano-acetato de etila, 7:3).

A estrutura química do composto **3d** foi elucidado por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogenia e Carbono 13 (RMN de ¹H e ¹³C).

Os dados do espectro do composto **3d** foram ¹H-NMR δ: (DMSO-d₆ 400 MHz), δ: 8.75 (s, 1H, H2'); 8.43 (t, 2H, H4' e H6', J 5.7 Hz); 8.36 (d, 2H, H2'' e H6'', J 8.7 Hz); 7.95-8.55 (b, 2H, C2-NH₂); 7.89 (t, 1H, H5'); 7,08 (d, J 8.7 Hz, 2H, H3'', e H5'') e 3.84 (s, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ: 165.8 (1C, C3'); 164.3(1C, C2); 163.9 (1C, C1'''); 162.3 (1C, C6); 147.8 (1C, C3') 138,1 (1C,C2'); 134.9 (1C,C5'); 130.4 (1C, C6'); 130.3 (2C, C2'' e C6''); 128.6 (1C, C4'); 125.4 (1C, C1'); 123.3 (1C, C4''); 116.1 (1C, C4); 113.9 (2C, C3'' e C5''); 84.1 (1C, C5) e 55.4 (1C,C1'''). O Infravermelho (IV), KBr μcm⁻¹ : 3567 (NH₂asymm.), 3278 (NH₂sim.), 2268 (CN), 1665 (C=N).

Citotoxicidade e Atividade Tripanocida

A atividade tripanocida e citotoxicidade dos compostos sintetizados foi avaliada seguindo o método previamente relatado por De Moraes Gomes e colaboradores (2016). A atividade tripanocida estão resumidas na Tabela I. O composto **3a** apresentou concentração de inibição para 50% da cultura (IC₅₀) igual a 72,82 μM, atividade moderada, com aproximadamente 5 vezes o valor da concentração do farmaco Benzonidazol (BZD) que foi de 14,60 μM. Os compostos **3c,d** apresentaram resultados bons quando comparados ao fármaco BZD, já o **3b** apresentou excelente resultado quando comparado ao BZD. Os compostos **3c,d,a** apresentaram as IC₅₀ de 21,42 μM; 17,83 μM; 1,73 μM, respectivamente, isso significa que os compostos **3c,d** foi tão ativo quanto o BZD, com concentração similar, e o composto **3b** foi mais ativo que o farmaco BZD por aproximadamente nona parte da concentração do BZD. A citotoxicidade (CC₅₀) em Macrófagos RAW 264.7 (MTT) obtidas para os compostos **3a,d** foram relativamente maiores que do fármaco de referência BZD, sendo os compostos **3a,c,d** que apresentaram os melhores resultados para CC₅₀ quando comparados ao fármaco Miltefosina (Tabela I).

Tabela I Atividades tripanocida e leishmanicida dos derivados pirimidínico **3a-d**

Derivados Pirimidinas	<i>T. Cruzi</i>		Leishmania				Citotoxicidade RAW 264.7 (MTT) CC ₅₀ [μ M]
	Trypomastigota		Promastigotas		Amastigotas		
	IC ₅₀ [μ M]		IC ₅₀ [μ M]		IC ₅₀ [μ M]		
	Cepa Y	IS	<i>L. amazonensis</i>	IS	<i>L. amazonensis</i>	IS	
3a	72,82	2,85	> 662	0,31	>662	0,31	207,89
3b	1,73	28,24	> 662	0,74	>662	0,07	48,85
3c	21,42	2,75	48,47	1,17	39,32	1,44	56,72
3d	17,83	7,24	111,81	1,15	120,58	1,07	129,02
Miltefosina			15,82	3,58	7,06	8,03	56,68
Benzonidazol	14,60	8,46					123,54

Nota: IS: índice seletividade (IC₅₀[μ M]); Miltefosina e Benzonidazol fármacos de referência para o tratamento da leishmaniose e Doença de Chagas, respectivamente, utilizados como controles positivos.

Atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida e citotoxicidade dos compostos sintetizados foi avaliada seguindo o método previamente relatado por Da Silva e colaboradores (2017). A atividade leishmanicida foi determinada frente as formas promastigota e amastigota intracelular de *L. amazonensis*.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela I, os compostos **3a-d** mostraram atividade contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*.

O composto **3c** apresentou resultados moderados quando comparados com farmaco de referência, miltefosina. Observara-se que o valor da IC_{50} do composto **3c** para a forma promastigotas foi aproximadamente 3 vezes o valor do IC_{50} do farmaco de referência, e na forma amastigotas foi de aproximadamente 5,5 vezes o valor do IC_{50} do farmaco de referência para *L. amazonensis*.

Diante dos resultados obtidos nos ensaios parasiticidas realizados, optou-se por executar o *docking* molecular apenas dos compostos testados contra *T. cruzi*, a fim de analisar a relação estrutura-atividade.

Docking molecular

Estudos de ancoragem molecular consistem em uma ferramenta extremamente útil para o desenvolvimento e aprimoramento de fármacos, por meio da atribuição de funções de score que são de fundamental importância para esse processo (Silva-Júnior, 2018).

A capacidade dos derivados pirimidínicos **3a-d** de se ligar a cruzaina, principal cisteína protease do *Trypanosoma cruzi*, cuja funções são essenciais para o ciclo de vida do parasita, foi avaliada utilizando modelos de ancoragem molecular.

Conforme demonstrado na Figura 1, todos os derivados pirimidínicos estudados possuem capacidade de acoplamento ao sítio ativo da enzima cruzaina.

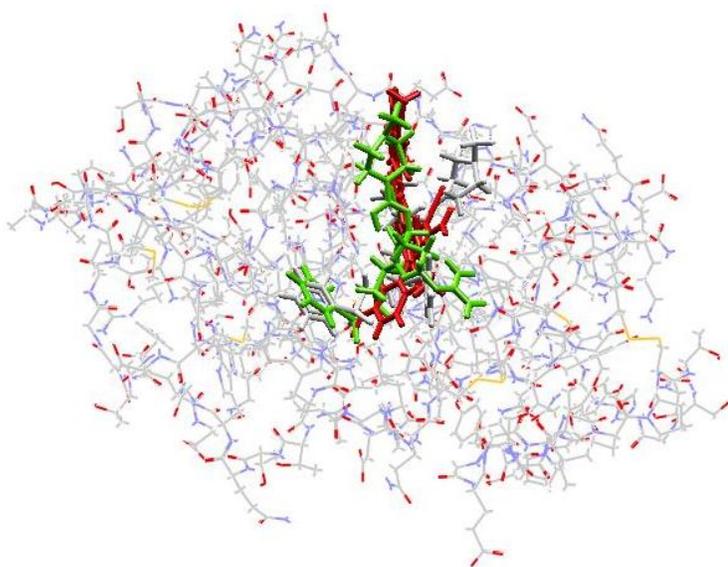


Figura 1 Cluster dos derivados pirimidínicos **3a-d** acoplados ao sítio de ligação da cruzaina.

Deste modo, o ranking das energias de ligação para as melhores poses de acoplamento obtidas na investigação das interações entre os compostos **3a-d** e a cruzaina (id PDB: 3LXS) encontra-se apresentado na Tabela II.

Tabela II: Ranking das energias de ligação dos derivados pirimidínicos **3a-d** e compostos padrão

Composto	Energia de ligação (KJ.mol ⁻¹)
WRR-483	- 96.6215
3d	- 93.3557
3a	- 93.2348
3b	- 90.7428
3c	- 90.4719
Benzonidazol	- 80.1203

As funções de *score* geradas a partir dos cálculos de acoplamento entre os ligantes e a enzima, permitem estabelecer um ranking entre as melhores poses das moléculas **3a-d** e os compostos utilizados como padrão, baseando-se na energia de ligação.

Os resultados apresentados na tabela 2 que incluem, além dos derivados pirimidínicos, o composto utilizado como padrão (benzonidazol) e o ligante co-cristalizado (WRR-483), e mostram que o WRR-483 possui a menor energia de ligação (- 96.6215 KJ.mol⁻¹), o que corrobora com sua potente ação tripanocida (IC₅₀= 8 nM em pH 8.0) (Chen et al. 2010).

Entretanto, por se tratar de moléculas menores que o WRR-483, o que diminui a área de superfície total que pode interagir com os resíduos de aminoácidos da cruzaina, os derivados pirimidínicos demonstraram excelentes energias de ligação, inclusive, com diferenças notáveis em relação ao benzonidazol. Os compostos **3d e 3a** apresentaram as menores energias de ligação entre os derivados pirimidínicos, - 93.3557 e - 93.2348 KJ.mol⁻¹, respectivamente. Os derivados **3b e 3c**, apesar de terem apresentado energias de ligação maiores entre as pirimidinas estudadas (- 90.7428 e - 90.4719 KJ.mol⁻¹, respectivamente), ainda foram notavelmente mais favoráveis energeticamente em relação ao composto padrão benzonidazol (- 80.1203 KJ.mol⁻¹).

Embora os compostos tenham sido ranqueados em uma determinada sequência com base nos resultados de energia de ligação, os resultados experimentais de IC₅₀ classificam os compostos em

ordem diferente quanto à atividade tripanocida, conforme demonstrado na tabela 1. Deste modo, o objetivo dessa etapa foi analisar as possíveis interações envolvidas para cada complexo ligante-enzima relevantes para atividade inibitória.

A figura 2 demonstra as interações obtidas no processo de re-docking do WRR-483.

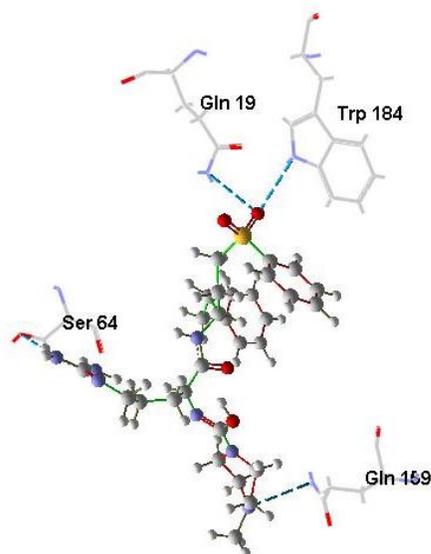


Figura 2: Interações entre o WRR-483 e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.

De acordo com os resultados de re-docking, ocorrem quatro interações do tipo ligação de hidrogênio entre o WRR-483 e o sítio de ligação da cruzaina (Figura 2), sendo elas com os resíduos de aminoácidos Glutamina (Gln) 19, Serina (Ser) 64, Gln 159 e Triptofano (Trp) 184. Dados da literatura provenientes de cristalografia de raio-x apresentam interações semelhantes com as obtidas no re-docking, diferindo apenas nos resíduos Ser 64 e Gln 159, que não estão presentes na cristalografia e Cisteína (Cys) 25 e Ácido glutâmico (Glu) 205, que estão presentes. O resíduo Cys 25, juntamente com Gln 159 e Asparagina (Asn) 175, fazem parte da tríade catalítica da cruzaina.

Todos os derivados pirimidínicos **3a-d** foram capazes de interagir energeticamente favorável com os resíduos do sítio ativo da cruzaina, inclusive, com alguns da tríade catalítica (Figura 3).

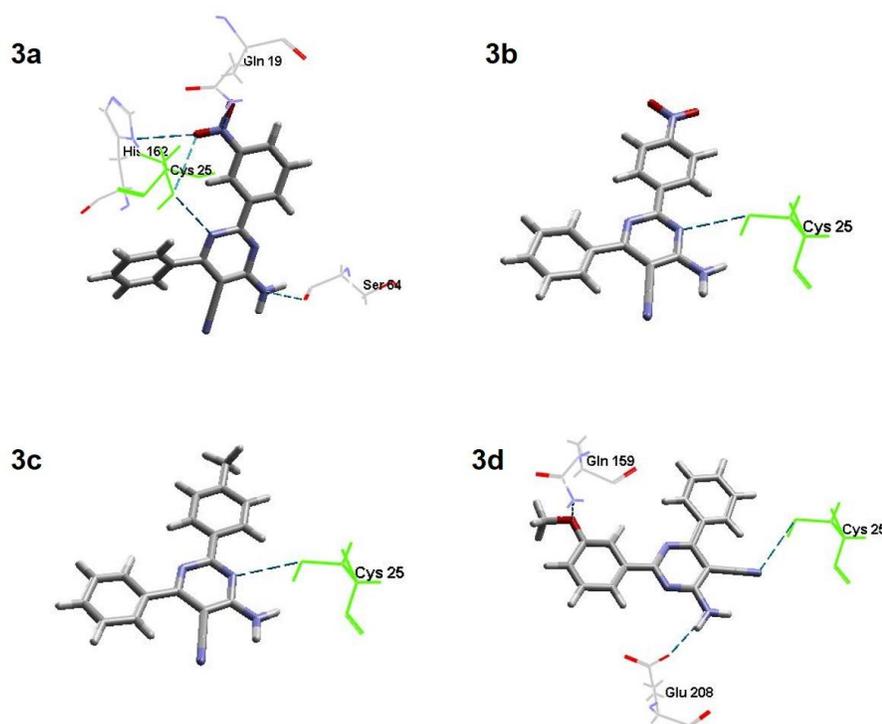


Figura 3: Interações entre os derivados pirimidínicos e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.

O composto **3a**, que demonstrou atividade inibitória moderada, apresentou interações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Cys 25, His 162 e Gln 19 (Figura 3).

Os compostos **3b** e **3d**, que obtiveram excelente atividade contra *T. cruzi*, com IC_{50} 1,73 e 17,83 μ M, respectivamente, apresentaram ligações de hidrogênio com Cys 25 (**3b**) e Cys 25, Gln 159 e Glu 208 (**3d**) (Figura 3).

Já o composto **3c** apresentou a mesma interação que o composto **3b**, contudo, com energia de ligação ligeiramente menos favorável.

Apesar do composto **3b** ter tido a segunda maior energia entre os derivados pirimidínicos e interagir apenas com a Cys 25, toda a energia envolvida no seu processo de ancoragem ($-90.7428 \text{ KJ.mol}^{-1}$) está concentrada nessa interação, o que pode ter relações com sua melhor inibição. Além disso, a inibição do composto **3b** foi bastante superior e provavelmente está relacionada a fatores eletrônicos e estéricos. Aparentemente, os grupos retiradores de elétrons na posição *para*- do fenil

ligado ao C2 do anel pirimidínico melhoram a atividade inibitória contra *T. cruzi*, enquanto que grupos doadores diminuem.

O benzonidazol interagiu energeticamente favorável com o resíduo Cys 25 (Figura 4), porém, com uma energia bem maior que os demais compostos ($- 80.1203 \text{ KJ.mol}^{-1}$). Embora a energia de acoplamento observada para o BZD seja maior entre todos os compostos, sua inibição da *T. cruzi* foi relativamente melhor que a dos compostos **3a,c,d** e pode estar relacionada à uma série de fatores como, metabolização, solubilidade, pH, volume e área molecular, efeitos estéricos, dentre outros.

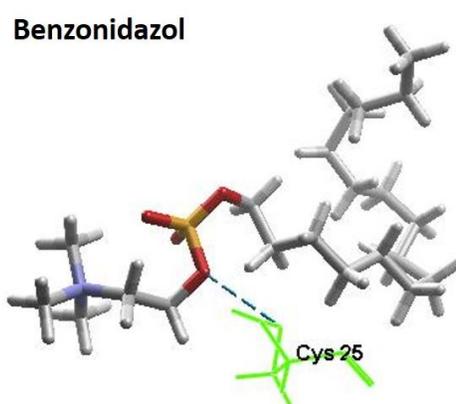


Figura 4: Interações de hidrogênio entre o benzonidazol e a cruzaina.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os quatro compostos pirimidínicos estudados **3a-d** tiveram suas estruturas verificadas empregando as técnicas espectroscópicas (dados de IV, RMN H1 e C13). Todos os compostos **3a-d** foram avaliados para verificar sua ação tripanocida, leishmanicida, potencial citotóxico além da realização da modelagem molecular usando a abordagem *Docking* contra *T. cruzi*. Os compostos **3a,c,d** mostraram-se menos citotóxicos que o fármaco controle além dos quatro compostos **3a-d** na abordagem do *Docking* serem capazes de interagir favoravelmente energeticamente com destaque ao **3b** e **3d** com IC_{50} de 1,73 e 17,83 μM , respetivamente.

REFERÊNCIAS

CAVALCANTE, L.J., VALE, M.R.. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period 2007 to 2011. **Ver Bras Epidemiol.** v.17, p.911–924, 2014

CHEN, Y. T.; BRINEN, L. S.; KERR, L. D.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ROUSH, W. R. In Vitro and In Vivo Studies of the Trypanocidal Properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4,n.9, 2010

DA SILVA, E. B. et al. Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European journal of medicinal chemistry**, v. 130, p. 39-50, 2017.

DA SILVA, J.B.P.; RAMOS, M.N.; DE BARROS, N.B.; DE MELO, S.J.; FALCAO, E.P. S.; CATANHO, M.T.J.A. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) of 4-amino-2,6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles with anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v.19, n.2, p.337-343, 2008

DE MELO, S.J., DO MONTE, Z.S., DA SILVA SANTOS, A.C. et al. Synthesis, antitrypanosomal activity and molecular docking studies of pyrimidine derivatives. **Med Chem Res** v 27, p. 2512–2522, 2018.

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

DO MONTE Z.S, MONTEIRO M.R.L, BORBA C.B.A, DE GUSMÃO N.B, FALCÃO E.P, SILVA R.O, SRIVASTAVA R.M, DE MELO S.J. Synthesis of 4-amino-2,6-diaryl-5-cyanopyrimidines as antimicrobial agentes. **Synth. Commun.**, v.46, n.11, p. 983-991, 2016.

GUIMARÃES FN, DA SILVA NN, CLAUSELL DT, DE MELLO AL, RAPONE T, SNEL T, N RODRIGUES "Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutonia (Estrêla – Rio Grande Do Sul)". Hospital (Rio de Janeiro)(in Portuguese) v.73, n.6, p.1767–804,1968.

HASHIMOTO M, MORALES J, FUKAI Y, SUZUKI S, TAKAMIYA A, TSUBOUCHI S, INOUE, INOUE M, KITA K, HARADA S, TANAKA A, AOKI T, NARA T. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. **Biochem. Biophys. Res. Commun** v.417, p.1002-1006,2012

HIDRON AI, GILMAN RH, JUSTINIANO J, BLACKSTOCK AJ, LAFUENTE C, SELUM W, CALDERON M, VERASTEGUI M, FERRUFINO L, VALENCIA E.; TORNHEIM JA, O'NEAL S, COMER R, GALDOS-CARDENAS G, BERN C, Chagas Disease Working Group in Peru and Bolivia. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. **In PLoS Neglected Tropical Diseases** v.5, n.4, 2010.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S., ALVES, W..A, SOUSA-GOMES, M.L., LUNA, E.A., Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública** v.24, p.2941-2947, 2008.

MÉNDEZ-ARRIAGA, J.M., OYARZABAL, I., ESCOLANO, G., RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A., Sánchez-Moreno, M., Salas, J.M., In vitro leishmanicidal and trypanocidal evaluation and magnetic properties of 7-amino-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine Cu(II) complexes. **J Inorg Biochem.** v.180, p.26-32, 2018.

MOHAPATRA, S., Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Trop Parasitol** v.4, p.4-9, 2014.

MONTE Z.S., SOUZA S.M., COSTA N.T.C., SANTOS A.C.S., MILITÃO G.C.G., HERNANDES M.Z., PEREIRA V.R.A., SILVA R.O., FALCÃO E.P.S., MELO S.J. In Silico Studies on the Antileishmania, Cytotoxicity and Anticancer Activities of Pyrimidine Analogs . **Lat. Am. J. Pharm.** v.39, n.6, p.1061-1272, 2020.

PIMENTEL, M.I.F., BAPTISTA, C., RUBIN, E.F., VASCONCELLOS, E.C.F., LYRA, M.R., SALGUEIRO M.M. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.44, p.254–256, 2011.

PONTE-SUCRE, A., GAMARRO, F., DUJARDIN, J.C., BARRETT, M.P., LÓPEZ-VÉLEZ, R., GARCÍA-HERNÁNDEZ, R., POUNTAIN, A.W., MWENECHANYA, R., PAPADOPOULOU, B., Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.14, 2017.

SILVA-JUNIOR, E.F; FRANCA, P. H. B.; RIBEIRO, F. F.; MENDONCA-JUNIOR, F. J. B.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; AQUINO, T. M.; ARAUJO-JUNIOR, J. X. Molecular Docking Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors. **Current Computer-Aided Drug Design**, v.14, p.68-78, 2018

TOLOZA GR, ABELLO P, FERREIRA A Is the antitumor property of *Trypanosoma cruzi* infection mediated by its calreticulin? **Front. Immunol.** v.7 n.268,2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease** (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization. Available in: (accessed 28 Set. 2017)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Leishmaniasis**. Available from: <<https://www.afro.who.int/health-topics/Leishmaniasis>>. (accessed 28 Set. 2019)

6 CONCLUSÃO

Os compostos análogos da pirimidina **3a-d** foram obtidos com êxito, a partir da aplicação de uma metodologia já relatada pelo próprio grupo de trabalho, com excelentes rendimentos sendo a caracterização química elucidada por dados espectrofotométricos.

Os compostos **3a-c** tem ação antimicrobiana para cepas de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

Os compostos sintetizados **3a-c** apresentaram uma importante atividade sinérgica com perspectivas para outros ensaios. Expressivo potencial de ação anti-biofilme também foi observado quando empregados estes compostos pirimidínicos.

Além do bom desempenho apresentado frente a bactérias, quando investigados para ação parasiticida, **3a-d**, demonstraram atividade moderada para as parasitoses tripanossomíase e leishmaniose e apresentaram ação menos citotóxica que o fármaco comercialmente utilizado no tratamento da tripanossomíase (**3a,c,d**). Os compostos **3b** e **3d** são capazes de interagir favoravelmente com a enzima cruzaina que tem grande importância no ciclo de vida do parasita *T. cruzi*

Observou-se que todos os compostos pirimidínicos interagem energeticamente favorável com a cruzaina e aparentemente a Cys 25 (resíduo catalítico) é fundamental para sua ancoragem.

Assim, os quatro compostos pirimidínicos sintetizados **3a-d**, apresentam-se como promissores fármacos podendo ainda demonstrar bons resultados de ação em atividades biológicas ainda não exploradas.

REFERÊNCIAS

ABLAJAN, K.; KAMIL, W.; TUOHETI, A.; WAN-FU, S. An Efficient Three Component One-Pot Synthesis of 5-Amino-7-aryl-7,8-dihydro-[1,2,4] triazolo[4,3-a]-pyrimidine-6-carbonitriles. **Molecules**. v.17, p.1860, 2012.

ANDREASEN, M. Physical Determinants of Amyloid Assembly in Biofilm Formation, **mBio**, v. 10, n. 1, 2019.

ANDREWS B.; MANSUR, AHMED. Synthesis and characterization of pyrimidine bearing 1,2,4-triazole derivatives and their potential antibacterial action. **Der Pharma Chemica**, v.6, n.1, p.162-169, 2014.

ANSARI M., SCHIWON K., MALIK A., GROHMANN E. **Biofilm Formation by Environmental Bacteria**. In: Malik A., Grohmann E. (eds) Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. Strategies for Sustainability. Springer, Dordrecht, 2012.

ANTUNES, A. L. S. et al. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. **APMIS**, v. 118, n.11, p. 873–877, 2010

ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.

ARONSON, N. E., MAGILL, A. J., **Leishmaniasis : General Principles**. In: RYAN, E. T., HILL, D. R., SOLOMON, T., et al. (Org.), Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition), 10nd. ed. p. 776–798, 2020.

ASIF, M.; Chemistry and Biological Potential of Pyrimidine Derivatives: Study of Nucleosides with Pyrimidines. **Organic & Medicinal Chem IJ**, v.2,n.5,2017.

BAI, S. et al. Asymmetric synthesis and antiviral activity of novel chiral amino-pyrimidine derivatives. **Tetrahedron Letters** v.59, n.2018, p. 3179–3183.

BAILEY F, et al. A new perspective on cutaneous leishmaniasis Implications for global prevalence and burden of disease estimates. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n.8, 2017.

BAINDUR, N.; CHADHA, N.; PLAYER, M.R. Solution-phase synthesis of a library of 3,5,7-trisubstituted 3H[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidines. **Journal of combinatorial chemistry**, v.5, p.653-659, 2003.

BALLAL, M.; VINITHA, M. Activity of proteinase, phospholipase and biofilm as virulence markers in *Candida* species isolated from haematogenous samples. **Journal of Hospital Infection**, v.73, n.1, p.94-95, 2009.

- BARROS, M. E. S. B. Estudos de Docking Molecular, síntese e atividade biológica de análogos da (-)- massoialactona e da combretastatina A-4 / Maria Ester de Sá Barreto Barros. – 2015. 128 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2015.
- BERNIER, S. P., SURETTE, M. G. Concentration-dependent activity in natural environments. **Frontiers in Microbiology**, v.4, n.20, 2013.
- BOGUSKI M.; VIKAS, P. S. Drug Discovery. Repurposing with a Difference. *Science*, v.324,n.5933, p.1394-1395, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde, 189 p., 2017. Disponível em: .
- BREITINGER, H.-G. **Drug synergy – mechanisms and methods of analysis**. In Toxicity and Drug Testing, ed B. Acree (Rijeka: InTech),p. 143–166, 2012.
- BRENNAN-KROHN, T.; KIRBYA, J. E. Antimicrobial synergy testing by inkjet printer-assisted automated checkerboard array and manual time-kill methods **J. Vis. Exp.** v.146, 2019.
- BROWN, D.J. KATRITZKY C.W., REES, ED. Pyrimidines and their benzo derivatives. *Comprehensive heterocyclic chemistry, the structure, reactions, synthesis and uses of heterocyclic compounds*. **Pergamon Press**, Oxford, 3^o ed, p. 57-155, 1984.
- BROWN, D.J.; MASON, S.F. 1962. **The pyrimidines**. Interscience Publishers, New York:115p.
- BRYERS, J. D. Medical Biofilms. **Biotechnol Bioeng.** v.100, n.1, p. 1–18, 2008.
- BUSH, K. & JACOBY, G. A., Updated functional classification of β -lactamases, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.
- CAREY, F.A .; SUNDBERG, R.J. 1990.**Advance Organic Chemistry. Structure and mechanism**, Plenum Publishing, 3rd ed.
- CARLET, JEAN.; RAMBAUD, C.; PULCINI, C.; Save Antibiotics: a call for action of the World Alliance Against Antibiotic Resistance (WAAAR). **Infectious Diseases**, 2014.
- CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Rev. Virtual Quim.**, v. 9, n.2, p. 575-595, 2017.
- CASARIN, M.; FORRER, D.; GARAU, F.; PANDOLFO, L.; PETTINARI, C.; VITTADINI, A.J. **Phys. Chem. A.** v.112, p. 6723-6731, 2008.
- CAVALCANTE, L.J., VALE, M.R.. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period 2007 to 2011. **Ver Bras Epidemiol.** v.17, p.911–924, 2014

CHAMBERS HF. 2006. **General principles of antimicrobial therapy**. In: Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, Bruton Nworu & Esimone, Trop J Pharm Res, McGraw Hill: USA, p.1102- 1104.

CHEN, L.; YU-MEI, W. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **Int J Oral Sci**, v.3, p.66-73, 2011.

CHEN, M.; QINGSONG Y.; HONGMIN, S. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. **Int J Mol Sci**. v. 14, n.9, p. 18488-18501, 2013.

CHEN, Y. T.; BRINEN, L. S.; KERR, L. D.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ROUSH, W. R. In Vitro and In Vivo Studies of the Trypanocidal Properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*, , v.4,n.9, 2010

CHONG CR, SULLIVAN DJ Jr. New uses for old drugs. **Nature**, v.448, p.45-6, 2007.

CLSI. Performace 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.

CLSI. Performace Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.

CORDEU L, CUBEDO E, BANDRÉS E, REBOLLO A, SAENZ X, CHOZAS H, DOMÍNGUEZ M V, ECHEVERRÍA M, MENDIVIL B, SANMARTIN C, PALOP J A, FONT M AND FONCILLAS J, Biological profile of new apoptotic agents based on 2,4-pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives **Bioorg. Med.Chem.**, v. 15, p. 1659-1699, 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent **Infections Science**. v. 284, n.5418, p. 1318-22, 1999.

D'SOUZA, A. W. et al. Spatiotemporal dynamics of multidrug resistant bacteria on intensive care unit surfaces. **Nature Communications**, v.10, n. 4569, 2019.

DA SILVA, E. B et al. Desing and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European journal of medicinal chemistry**, v. 130, p. 39-50, 2017.

DA SILVA, J.B.P.; RAMOS, M.N.; DE BARROS, N.B.; DE MELO, S.J.; FALCAO, E.P. S.; CATANHO, M.T.J.A. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) of 4-amino-2,6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles with anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v.19, n.2, p.337-343, 2008

DAVIES, D.G., et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. v. 280, p.295–298, 1998.

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., DO MONTE, Z.S., DA SILVA SANTOS, A.C. et al. Synthesis, antitrypanosomal activity and molecular docking studies of pyrimidine derivatives. **Med Chem Res** v 27, p. 2512–2522, 2018.

DO MONTE Z.S, MONTEIRO M.R.L, BORBA C.B.A, DE GUSMÃO N.B, FALCÃO E.P, SILVA R.O, SRIVASTAVA R.M, DE MELO S.J. Synthesis of 4-amino-2,6-diaryl-5-cyanopyrimidines as antimicrobial agentes. **Synth. Commun.**, v.46, n.11, p. 983-991, 2016.

DOGRUER, D.S.; SAHIN, M.F.; KÜPELI, E.; YEŞİLADA, E. Synthesis and analgesic and anti-inflammatory activity of new pyridazinones. **Turk. J. Chem.**, v.27, p.727-738, 2003.

DONLAN RM, Biofilms : microbial life on surfaces . **Emerg Infect Dis**, v.8, p.881-890, 2002.

DONLAN RM. Biofilms and device-associated infections. **Emerg Infect Dis**; v.7, p.277–81, 2001.

DRAGO, L.; TOSCANO, M.; Biofilm formation and the biological response Management of Periprosthetic. **Joint InfectionS**, 2017

DUA, R.; S. SHRIVASTAVA, S. SONWANE, S. SRIVASTAVA, Pharmacological significance of synthetic heterocycles scaffold: a review. **Adv. Biol. Res.**, v.5, p.120-144, 2011.

EICHER, I. & HAUPTMANN, S. 2003. **The chemistry of heterocycles structure, reactions, syntesys and applications**, Wiley-UCH, 2nd ed.

EL-GAZZAR, ABDEL-RAHMAN B. A.; HUSSEIN,H. A. R.; HAFE,H. N.; Synthesis and biological evaluation of thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives for anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenic activity , **Acta Pharmaceutica** v.57, n.4, p.395-411, 2008.

ELOTMANI, B.; EL MANI, M.; ESSASSI, E. Synthese de nouvelles 7(5)-[benzimidazol-aryl]methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]([4,3-a])pyrimidines. **C. R. Chimie**, v.5, p.517-523,2002.

ESPIAU, B. Phenotypic diversity and selection maintain *Leishmania amazonensis* infectivity in BALB/c mouse model, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n.1, p. 44-52, 2017.

FALCÃO, E.P.S. **Novas pirimidinas: Síntese e avaliação de suas propriedades farmacológicas**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2003.

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.

FERDELE MJ, BASSLER BL. Interspecies communication in bactéria . **J. Clin Invest**; v. 112, p.1291-1299, 2003.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.9, p.623–633, 2010.

FOERSTER, S. et al. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*, **BMC Microbiology**, v.2016, p. 216.

FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 59, p. 227–238, 2010.

GALGAMUWA, L. S. Leishmaniasis in Sri Lanka: spatial distribution and seasonal variations from 2009 to 2016. **Parasites & Vectors**, p.11:60, 2018

GARIGIPATI, R.S. An efficient conversion of nitriles to amidines. **Tetrahedron Letters**. v.31,n.14, p.1969-1972,1990.

GARRETT, T. R.; MANMOHAN, B.; ZHIBING, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v.18, p. 1049–1056, 2008.

GIAMMANCO, A. Global Assessment of the Activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens between 2004 and 2014 as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. **Clinical Science and Epidemiology**, v.2, n.1, 2017.

GILCHRIST, T. L., **Heterocyclic Chemistry**. Longman Scientific & Technical, 2nd ed, v.7, p 249-276,1992.

GOFFIN, E. et al. Synthesis of ticagrelor analogues belonging to 1,2,3-triazolo[4,5-d] pyrimidines and study of their antiplatelet and antibacterial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry** v.208, 2020.

GOULD, I.M & BAL, A.M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. **Virulence** v.4, n.2, p. 185–191, 2013.

GREENE, C. et al. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. **Lett Appl Microbiol**, v.63, n.4, p.233-9, 2016.

GUIMARÃES FN, DA SILVA NN, CLAUSELL DT, DE MELLO AL, RAPONE T, SNEL T, N RODRIGUES "Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutonia (Estrêla – Rio Grande Do Sul)". Hospital (Rio de Janeiro)(in Portuguese) v.73, n.6, p.1767–804,1968.

GUPTA, J.K., CHAUDHARY, A., DUDHE, R., VARUNA, K. SHARMA, P.K. AND VERMA, P.K.. A review on the synthesis and therapeutic potential of pyrimidine derivatives. **Int. J. Pharma. Sci. Res.**, v.1, p.34-49, 2010.

HALL, C. W.; MAH, THIEN-FAH. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, 2017.

HASHIMOTO M, MORALES J, FUKAI Y, SUZUKI S, TAKAMIYA A, TSUBOUCHI S, INOUE, INOUE M, KITA K, HARADA S, TANAKA A, AOKI T, NARA T. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. **Biochem. Biophys. Res. Commun** v.417, p.1002-1006,2012

HIDRON AI, GILMAN RH, JUSTINIANO J, BLACKSTOCK AJ, LAFUENTE C, SELUM W, CALDERON M, VERASTEGUI M, FERRUFINO L, VALENCIA E,; TORNHEIM JA, O'NEAL S, COMER R, GALDOS-CARDENAS G, BERN C, Chagas Disease Working Group in Peru and Bolivia. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. **In PLoS Neglected Tropical Diseases** v.5, n.4, 2010.

IBEZIM, E. C. et al. A study of the in vitro interaction of cotrimoxazole and ampicillin using the checkerboard method. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n.13, p. 1284-1288, 2006.

IMAI, Y. ; MEYER, K. J. ; LEWIS, K. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. **Nature** v. 576, p.459–464, 2019.

JAIN K. S.; CHITRE, T. S.; MINIYAR, P. B.; KATHIRAVAN M. K.; BENDRE V. S.; VEE, V. S.; SHAHANE, S. R. AND SHISHOO C. J. Biological and medicinal significance of pyrimidines . **Current Science**, v. 90, n. 6,2006.

JAMAL, F. et al Leishmania-Specific Promiscuous Membrane Protein Tubulin Folding Cofactor D Divulges Th1/Th2 Polarization in the Host via ERK-1/2 and p38 MAPK Signaling Cascade. **Front. Immunol**, 2020.

JAMAL, M. at al, Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.4, n.3, 2015

JOO, HWANG-SOO.; OTTO, M.; Molecular Basis of In Vivo Biofilm Formation by Bacterial Pathogens. **Chemistry & Biology** v.19, n. 12, p. 1503-1513, 2012.

JOULE, J.A.; MILLES, K.; SMITH, G.F. 2000. **Heterocyclic chemistry**, 4nd ed., Blackwell Publishing.

KANAGARAJAN, V.; THANUSU J.; GOPALAKRISHNAN, M. A Green Chemical Approach towards the 'One-Pot' Synthesis, Spectral Characterization and in Vitro Antibacterial and Antifungal Activities of Morpholino Pyrimidines. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 53,n.6, 2009.

KATRITZKY, A. R. & RACHWAL, S. Synthesis of Heterocycles Mediated by Benzotriazole 2 Bicyclic Systems. **American Chemical Society**, v. 111, p. 7063–7120, 2011.

KATRITZKY, A. R. **Chemical Reviews**. v. 104, n. 5, p. 2125-2812, 2004.

KHAN HA, BAIG FK, MEHBOOB R. Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pac J Trop Biomed**. v.7,n.5, p.478–482,2017.

- KHATOON, Z. et al. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. **Heliyon**, v.4, n. 12, 2018 .
- KOHANSKI, M. A., DWYER, D. J., & COLLINS, J. J.. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.6, p 423–435, 2010.
- LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **Lancet Infect Dis**. v. 13, n.12, p. 1057-98, 2013.
- LIANOVA, A. ; NYCHAS, GEORGE-JOHN E.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability in biofilm formation: A food safety and quality perspective. **Food Research International**, v.137, 2020.
- LINDSAY D, VON-HOLY A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **Journal Hospital Infection**, v. 64, p. 313-325, 2008.
- LIPSKY BA, WEIGELT JA, GUPTA V, KILLIAN A, PENG MM. Skin, Soft tissue, Bone, and Joint Infections in Hospitalized Patients: Epidemiology and Microbiological, Clinical, and Economic Outcomes. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol**, v. 28, p.1290-1298, 2007.
- LORIAN, V. **Antimicrobial combinations**. In Lorian V 3 Ed. " Antibiotics in Laboratory Medicine" (Williams and Wilkins, MD, USA), p. 339, 1996.
- LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**, 5nd ed., Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 889, 2005.
- MADDILA, S. et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of novel benzothiazole pyrimidine derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**,v.9, n.2016,681-687,2016
- MAIA-ELKHOURY, A.N.S., ALVES, W..A, SOUSA-GOMES, M.L., LUNA, E.A.,. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública** v.24, p.2941-2947, 2008.
- MAKAROV, V.A.; RIABOVA, O.; GRAMIK, V.G.;DAHSE, H.;STELZNER, A.; WUTZLER, P.; SCHMIDTKE, M. Anti-coxsackoevirus B3 activity of 2-amino-3-nitropyrazolo[1,5- α]pyrimidines and their analogs. **Biorganic & medicinal Chemistry Letters**, v.15, p. 37-39, 2005.
- MALLIKARJUNASWAMY, C. et al. Studies on synthesis of pyrimidine derivatives and their antimicrobial activity. **Arabian Journal of Chemistry**,v.10, n.2017, 2012.
- MARIC, S.; VRANE, J. Characteristics and significance of microbial biofilm formation , *Period biol*, v. 109, n.2, 2007.
- MAZZETI,A.L., CAPELARI-OLIVEIRA,P., BAHIA,M.T., MOSQUEIRA, V.C.F., Review on Experimental Treatment Strategies Against *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Pharmacol*, v.13, p. 409–432, 2021.

MCCONKEY, B. J. , Sobolev, V.; Edelman, M. The performance of current methods in ligand–protein docking. **Current science**, v. 83, n. 7, 2002

MCKENNEY D, et al. The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/ adhesin. *Infect Immunity*, v. 66, p. 4711-4720, 1998.

MEDEIROS, M., Avaliação *in vivo* e *in vitro* dos efeitos sinérgicos de Antibacterianos para o tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii* multirresistentes produtoras de Carbapenases tipo OXA endêmicas no Brasil. Dissertação, 2012

MELO, S. J. DE; SANTOS, L.C.; FALCÃO, E.P.S.; SRIVASTAVA, R. M. AND LUU DUC, C. Synthesis of new 4-amino-5-ciano-2,6-diarylpyrimidines. **Journal Chemistry Research**, v.5, p.216-217, 2002

MÉNDEZ-ARRIAGA, J.M., OYARZABAL, I., ESCOLANO, G., RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A., Sánchez-Moreno, M., Salas, J.M., In vitro leishmanicidal and trypanocidal evaluation and magnetic properties of 7-amino-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine Cu(II) complexes. **J Inorg Biochem**. v.180, p.26-32, 2018.

MENDIVIL B, SANMARTIN C, PALOP J A, FONT M AND FONCILLAS J, MENG, XUAN-YU et al.Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des**. V.7, n.2, p. 146–157, 2011.

MOHAPATRA, S., Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Trop Parasitol** v.4, p.4-9, 2014.

MOHITE, B.V; KOLI, S.H; NARKHEDE, C.P; PATIL, S.N; PATIL, S.V;. Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v.183, p.582–600, 2017.

MONTE Z.S, SOUZA S.M, COSTA N.T.C, SANTOS A.C.S, MILITÃO G.C.G, HERNANDES M.Z, PEREIRA V.R.A, SILVA R.O, FALCÃO E.P.S & MELO S.J. 2020. In Silico Studies on the Antileishmania, Cytotoxicity and Anticancer Activities of Pyrimidine Analogs . **Lat. Am. J. Pharm**. v .39, n.6, p. 1061-1272.

MORENO, M., D'ÁVILA, D. A., SILVA, M. N., GALVÃO, L. M., MACEDO, A. M., CHIARI, E., ... ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi benzimidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.7, p.918–924, 2010..

MUELLER, M.; PEÑA, A.; DERENDORF, H. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC, Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 48, n. 2, p. 369–377, 2004.

MURPHY, C. N.; MORTENSEN, M. S.; KROGFELT, K. A.; CLEGG, S.; Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. **Infect. Immun**. v.81, p.3009–3017, 2013.

NAGENDER, P. Synthesis, cytotoxicity, antimicrobial and anti-biofilm activities of novel pyrazolo[3,4-b]pyridine and pyrimidine functionalized 1,2,3-triazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.24, n. 13, p. 2905-2908, 2014.

OCHIAI, M. & MORITA, K. **Tetrahedron Letters**, v.25, 2349p. 1967.

OFEK, I.; DOYLE R.J. **Bacterial adhesion to cells and tissues**. In: Ofek I, Doyle RJ, editors. New York: Chapman & Hall; 1994.

OKADA, M. et al. Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX". **Nat Chem Biol.**, v.1, p. 23-24,2005.

OKCELİK B, UNLU S, BANOĞLU E, KUPELİ E, YESİLADA E, SAHİN MF. Investigations of new pyridazinone derivatives for the synthesis of potent analgesic and anti-inflammatory compounds with cyclooxygenase inhibitory activity. **Arch Pharm (Weinheim)**. v.336. p.406-12, 2003.

OKEKE IN, LAXMINARAYAN R, BHUTTA ZA, DUSE AG, JENKINS P, O'BRIEN TF, PABLOS-MENDEZ A, KLUGMAN KP. Antimicrobial Resistance in Developing Countries. Part I: Recent Trends and Current Status. **Lancet. Infect. Dis.** v.5, p.481-493,2005.

OLENDER, D.; ZWAWIAK, J.; ZAPRUTKO, L. Multidirectional Efficacy of Biologically Active Nitro Compounds Included. **Medicines.Pharmaceuticals** , v.11, n.54, 2018.

ONYEKWELU, K. C. Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts. *Biology of Trypanosoma Cruzi*, 2019.

OPPENHEIMER-SHAANAN, Y. et al. Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms , **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 11, 2013.

ORDEU L, et al. Software for molecular docking: a review **Biophys Rev.** v.9, p. 91–102, 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICADA DA SAÚDE (OPAS). Chagas Disease in the Americas: A Review of the Current Public Health Situation and a Vision for the Future, 2018. Site:WHO. Acesso: <https://www.who.int/publications/i/item/Chagas-Disease-in-the-Americas-conclusions-recommendations-2018>

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICADA DA SAÚDE (OPAS). Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. n. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: OPAS; 2020

PAGADALA, N. S., SYED, K., & TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v.9,n.2, p.91–102, 2017.

PAHARIK, A.; HORSWILL, A. R. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response, 2016

PARISH, T. Steps to address anti-microbial drug resistance in today's drug Discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v.14, p. 91-94. 2018.

PATAI, S.J.I **Journal of chemical society**. p.2020-2024, 1960.

PAULAI, F.R.; SERRANO, S.H.P.; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quimica Nova*, v.32, n.4, p.1013-1020, 2009

PAYNE, D. J., GWYNN, M. N., HOLMES, D. J., . POMPLIANO D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.** V.6, p.29–40, 2007.

PEECHAKARA B.V.; GUPTA, M. **Ampicillin/Sulbactam**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.

PELEG, A Y.; SEIFERT, H; PATERSON, D L. Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008.

PHILLIPS, C. A. Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n.8, p.1731-1743, 2016.

PIMENTEL, M.I.F., BAPTISTA, C., RUBIN, E.F., VASCONCELLOS, E.C.F., LYRA, M.R., SALGUEIRO M.M. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.44, p.254–256, 2011.

PISCOPO T.V.; AZZOPARDI, M. C. Leishmaniasis. **Postgrad Med J**. v. 83, n. 976, p. 649-57,2007.

PONTE-SUCRE, A., GAMARRO, F., DUJARDIN, J.-C., BARRETT, M. P., LÓPEZ-VÉLEZ, R., GARCÍA-HERNÁNDEZ, R., ... PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.11, n.12, 2017.

PRAKASH B, KRISHNAPPA G, MUNIYAPPA L, REDDY M.K. In vitro phase variation studies of *Salmonella Gallinarum* in biofilm formation. **Curr Sci** v. 89, n.4, p. 657–659, 2005.

PRESTINACI, F. PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathog Glob Health**. v.109, n.7, p.309–318, 2015

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; ARCINIEGA, M.; MEDINA-FRANCO, J. L. Molecular docking: current advances and challenges. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v.21, n. 1, p. 1-23, 2018.

PRIYADARSINI, S.; MUKHERJEE, S.; MISHRA, M. Nanoparticles used in dentistry: A review **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v.8, p. 58–67, 2018.

- RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agentes. **Future Med. Chem.** V. 7, n. 4 , p. 493–512, 2015.
- RAIMUNDO, S. M.; MASSAD, E.; YANG, H. M.. Modelling congenital transmission of Chagas' disease, **BioSystems**, v. 99, p.215–222, 2010.
- RANI, J., KUMAR, S., SAINI, M., MUNDLIA, J., & VERMA, P. K. Biological potential of pyrimidine derivatives in a new era. **Research on Chemical Intermediates**, v.42,n.9, p.6777–6804, 2016.
- RAPACKA-ZDONCZYK, A. et al. Development of Staphylococcus aureus tolerance to antimicrobial photodynamic inactivation and antimicrobial blue light upon sublethal treatment. **Scientific Reports**, v.9, n.9423, 2019.
- RASSI, A., RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v.375, n.9723, p. 1388–1402, 2010.
- RIBEIRO, S. M., FELICIO, M. R., BOAS, E. V., GONÇALVES, S., COSTA, F. F., SAMY, R. P., et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacol. Ther.** v.160, p.133–144,2016.
- RICE L. B. Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 31,(supplement 1):S7–S10, 2010
- RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE, **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 2008.
- ROLAIN J.M. et al. Real-time sequencing to decipher the molecular mechanism of resistance of a clinical pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from Marseille, France. **Antimicrob Agents Chemother** v.57, p.592–596, 2013
- RUTTE, E. A. L. Policy Recommendations From Transmission Modeling for the Elimination of Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent. **Clinical Infectious Diseases**, v.66, n.4, p. 301–308, 2018.
- SAGA, T. & YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria, **JMAJ-Japan Medical Association Journal**, v.52 n.2 p.103-108, 2009.
- SAHI, S., PAUL, S. Synthesis and biological evaluation of quinolines, thiazolo[3,2-a]pyrimidines, thiadiazolo[3,2-a]pyrimidines and triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazepines as antimicrobial agents. **Med Chem Res** v.25, p.951–969, 2016.
- 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.

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.

SANGI, D. P. Synthetic strategies in drug discovery: employng diversity-oriented synthesis. *Química Nova*,2016.

SANTAJIT, S. ; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**. v. 2016, p.8, 2016.

SANTOS, E. F. M. Bionomia de Mignonemyia migonei (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em condições experimentais. /. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno- Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**, v.4, n.219, 2003.

SAYED G.H., SAYED M.A., MAHMOUD M.R., SHAABAN S.S. Synthesis and Reactions of New Pyridazinone Derivatives of Expected Antimicrobial Activities. **Egypt. J. Chem**, v. 45, p.767–776, 2002.

SCARIM, C. B.; JORNADA, D.H.; CHELUCCI, R.C.; Almeida,L.; SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. Current advances in drug discovery for Chagas disease, **Eur. J. Med. Chem**. v.155, .824–838, 2018.

SCHENONE, S. et al. Antiproliferative activity of new 1-aryl-4amino-1H-pyrazolo [3,4-d]pyrimidine derivatives toward the human epidermoid carcinoma A431 cell line. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.39, p.939-946,2004.

SEKHAR S., KUMAR R., CHAKRABORTI A., “Role of biofilm formation in the persistent colonization of Haemophilus influenzae in children from northern India”. **J Med Microbiol**, v. 58, p. 428-1432, 2009.

SENGUPTA ,S. CHATTOPADHYAY, M. K & GROSSART, HANS-PETER. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Front Microbiol** v.12, p. 4-47, 2013.

SEVERINA, H. I. et al. Synthesis and anticonvulsant activity of 6-methyl-2-((2-oxo-2-arylethyl)thio) pyrimidin-4(3H)-one derivatives and products of their cyclization. **Pharmacia**, v. 66, n.3, p:141–146, 2019

SHARMA, N.; KUMAR, S.; MAURYA, I. K.; BHASIN, K. K.; VERMA, A.;WANGOO, N.; SHARMA, R. K. 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,. P. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**,v.56, p. 156-175, 2014.

SILVA, W. J. L. **Pirimidinas: síntese de novos derivados e avaliação das atividades biológicas**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Recife. p.94. 2019.

SILVA-JUNIOR, E.F; FRANCA, P. H. B.; RIBEIRO, F. F.; MENDONCA-JUNIOR, F. J. B.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; AQUINO, T. M.; ARAUJO-JUNIOR, J. X. Molecular Docking Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors. **Current Computer-Aided Drug Design**, v.14, p.68-78, 2018

SIMARRO, P. P.; CECCHI, G.; FRANCO, J. R.; PAONE, M.; DIARRA, A.; RUIZ-POSTIGO, J. A.; FE`VRE, E. M.; MATTIOLI, R. C.; JANNIN, J. G.; Estimating and Mapping the Population at Risk of Sleeping Sickness. **Plos Neglectec Tropical Diseases**, 2012.

SIMS JR,K. R. et al. Dual antibacterial drug-loaded nanoparticles synergistically improve treatment of Streptococcus mutans biofilms .**Acta Biomaterialia** IN PRESS, 2020.

SINGH, A.K. Analytical reactions of substituted pyrimidines. **Talanta**, v.29, p.95-102, 1982.
SOLANO, C.; ECHEVERZ,M.; Lasa, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v.18, p.96–104, 2014.

SOLIS-VELAZQUEZ O.A et al., Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: Different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, IN PRESS,2020.

SOLOMONS, T.W.G & FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v. 1 e 2. LTC, 9 ed., 2009.

SOPIRALA, M. M. et al. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, p. 4678–4683, 2010.

SOUZA, A. L. A. A. G.; MESQUITA, C. T. Chagas Disease - Past and Future. **International Journal of Cardiovascular Sciences**. v.33, n.6, p.601-603, 2020.

SREY, S.; JAHID,I.K.; HÁ, SANG-DO. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control** v. 31, n.2 , p.572-585, 2013.

STEFANOVIĆ, O. D.; Synergistic Activity of Antibiotics and Bioactive Plant Extracts: A Study Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control**,2018.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n.8,p. 891–899, 2007.

SUN, S., YANG, F., TAN, G., COSTANZO, M., OUGHTRED, R., HIRSCHMAN, J., ..ROTH, F. P. An extended set of yeast-based functional assays accurately identifies human disease mutations. **Genome Research**, v.26,n.5,p.670–680, 2016.

SURESH, L., POORNACHANDRA, Y., KANAKARAJU, S., GANESH KUMAR, C., & CHANDRAMOULI, G. V. P. One-pot three-component domino protocol for the synthesis of novel pyrano[2,3-d]pyrimidines as antimicrobial and anti-biofilm agents. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.13, n.26, p.7294–7306, 2015.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect Dis.**, v. 18, n.3, p318-327, 2018.

TAYLOR, E.C.; McKILLOP, A. **The Chemistry of Cyclic Enaminonitriles and Aminonitriles**. In: *Advances in Organic Chemistry: Methods and Results*. New York. John Wiley & Sons. v.7.p103-126.

TEMEL, A. Bilgic; MURRELL, D. F.; UZUN, S. Cutaneous Leishmaniasis: A Neglected Disfiguring Disease for Women. **International Journal of Women's Dermatology**, 2019.

THIRUMURUGAN, K. et al. Design, synthesis and anti-inflammatory activity of pyrimidine scaffold benzamide derivatives as epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. **Journal of Molecular Structure** v.1171, n.2018, p. 541-550, 2018.

THOMPSON, M.G. Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. **Antimicrob Agents Chemother**.v. 58, n.3, p. 1332-42

TIWARI, K. et al. In vitro activity of bioactive extracts from rare actinomycetes against multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, p.1306-1314, 2015

TIWARI, K. et al. In vitro activity of bioactive extracts from rare actinomycetes against multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, p.1306-1314, 2015

TOLKER-NIELSEN, T. 2015. **Biofilm development**. *Microbiol Spectrum*, v. 3, n.2, 2014.

TOLOZA GR, ABELLO P, FERREIRA A Is the antitumor property of *Trypanosoma cruzi* infection mediated by its calreticulin? **Front. Immunol.** v.7 n.268,2016

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**,v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VADIVOO, N. S.; USHA, B.; ESKAPE pathogens: Trends in antibiotic resistance pattern. **MedPulse International Journal of Microbiology**. v.7, n.3, p.26-32.

VASUDEVAN R. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. **J Microbiol Experimentation**, v.1, p. 1-16, 2014.

VAZQUEZ-GRANDE, G.; KUMAR, A. Optimizing antimicrobial therapy of sepsis and septic shock : focus on antibiotic combination therapy. **Semin Respir Crit Care Med**. v.1, p.154–166, 2015.

VEGA-ROYERO, S. P.; SIBONA, G. J. Mathematical Modeling of the Immune Response to the Chagasic Trypanosomiasis. **Ciencia en Desarrollo**, v.10, n.2, pp.177-184, 2019.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**. v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

VERGIDIS, P.; PATEL, R.; Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention and Treatment of Medical Device-Associated Infections. **Infect Dis Clin North Am.**, v.6, n.1, p.173–186, 2012

VITALI, F. et al. Network-based target ranking for polypharmacological therapies. **Journal of Biomedical Informatics** , v.46, p.876–881, 2013

VYAS, V.; VAISHNAV, P.; JAT, S.; KHERODIYA, B. & HUSSAIN, N. Pharmacological activity and synthesis of Pyrimidine and their Derivatives : A Review. **RNT Journal of Current Discovery in Chemistry**. v. 2, n.1, p. 8 -14,2017.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G.; Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine** v.16, p. 97–110, 2009.

WILKINSON,S. R., TAYLOR, M. C., HORN, D., KELLY, IAN, J. M.,CHEESEMAN,I., A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.105,n.13,p. 5022–5027, 2008.

WINGENDER, J., NEU, T. AND FLEMMING, H.-C.; What are Bacterial extracellular polymer substances? **Microbial Extracellular Polymeric Substances**; p. 1–19,1999.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)(2020, 01 de dezembro).Chagas disease (American trypanosomiasis). Retirado de https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_2

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,. v. 3, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of the Twelfth Meeting of the WHO Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases**, Geneva. 29-30 April 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease** (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization. Available in: (accessed 28 Set. 2017)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Leishmaniasis**. Available from: <<https://www.afro.who.int/health-topics/Leishmaniasis>>. (accessed 28 Set. 2019)

WRÓBEL, A. et al; Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. **The Journal of Antibiotics**, v.73, p. 5–27, 2YERRAGUNTA, V. et al. Pyrazole and Its Biological Activity. **PharmaTutor Magazine**, v. 2, n. 1, 2013

APÊNDICE- PATENTE

PIRIMIDINAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AÇÃO ANTIMICROBIANA
EPOTENCIAL SINÉRGICO COM ANTIMICROBIANO DE USO CLÍNICO



15/04/2019 870190036042

17:18



29409161811244512

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 007644 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959
Email:

patentes_dine.propesq@ufpe.br