



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)

BRUNA KELLY DE OLIVEIRA SILVA

**SÍNTESE DE UM NOVO DERIVADO DE PIRIMIDINA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE LEISHMANICIDA, ANTICHAGÁSICA E ANTIMICROBIANA E SEU  
POTENCIAL SINÉRGICO FRENTE ÀS BACTÉRIAS *Acinetobacter baumannii* E  
*Staphylococcus aureus***

Recife  
2020

BRUNA KELLY DE OLIVEIRA SILVA

**SÍNTESE DE UM NOVO DERIVADO DE PIRIMIDINA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE LEISHMANICIDA, ANTICHAGÁSICA E ANTIMICROBIANA E SEU  
POTENCIAL SINÉRGICO FRENTE ÀS BACTÉRIAS *Acinetobacter baumannii* E  
*Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Área de Concentração:** Fármacos e Medicamentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Sebastião Melo

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Lima

Recife

2020

**Catálogo na Fonte**  
**Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010**

S586s Silva, Bruna Kelly de Oliveira.

Síntese de um novo derivado de pirimidina e avaliação da atividade leishmanicida, antichagásica e antimicrobiana e seu potencial sinérgico frente às bactérias *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* / Bruna Kelly de Oliveira Silva. – 2020.

53 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Sebastião José de Melo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020. Inclui referências.

1. Leishmaniose. 2. Tripanossomíase americana. 3. Bactérias. 4. Pirimidinas. I. Melo, Sebastião José de (Orientador). II. Título.

615.4 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS 2020-143)

BRUNA KELLY DE OLIVEIRA SILVA

**SÍNTESE DE UM NOVO DERIVADO DE PIRIMIDINA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE LEISHMANICIDA, ANTICHAGÁSICA E ANTIMICROBIANA E SEU  
POTENCIAL SINÉRGICO FRENTE ÀS BACTÉRIAS *Acinetobacter baumannii* E  
*Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 14/02/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Sebastião José de Melo (Presidente)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr.<sup>a</sup> Zenaide Severina do Monte (Examinadora Externa)

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco

---

Dr.<sup>a</sup> Allana Lemos Andrade Gouveia (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus. Porque por Ele, por meio dele e para Ele são todas as coisas.

Agradeço a minha mãe Leonor, ao meu marido Júnior, e em especial a minha irmã Marcela por todo apoio, compreensão e motivação dedicados a mim.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Sebastião Melo, por me motivar em todos os momentos. Agradeço a minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Lima por me acolher e me apoiar sempre.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Pereira, por toda ajuda em alguns dos testes essenciais para esta pesquisa.

Agradeço a Zenaide por estar sempre disposta a esclarecer minhas dúvidas. Agradeço também a Antônio por toda parceria prestada no laboratório.

Agradeço aos meus amigos e todos que compõem o Laboratório de Genética do Departamento de Antibióticos, por toda ajuda nos experimentos, todas as conversas e risadas. Vocês foram essenciais para mim!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, a Universidade Federal de Pernambuco e ao CNPq por me possibilitarem desempenhar esta pesquisa.

Muito Obrigada!

## RESUMO

Estudos demonstram que heterociclos como pirimidinas são eficientes no tratamento de uma série de infecções. Pensando em seu potencial farmacêutico e na busca por formas terapêuticas mais acessíveis esta pesquisa teve por objetivo sintetizar um derivado pirimidínico inédito e testar o seu potencial farmacêutico frente a bactérias resistentes e doenças negligenciadas, como: Leishmaniose e Chagas, consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como casos de saúde pública, com crescente número de novos casos. A molécula foi sintetizada a partir da obtenção do aduto de *Knoevenagel* que reagiu com p-metoxibenzamidina originando o composto 4-Amino-5-ciano-2-(p-metoxifenil)-6-(m,p-clorofenil)- pirimidina, sendo caracterizado por métodos espectroscópicos usuais. Para atividade antimicrobiana foi realizado o teste de Concentração Mínima Inibitória e Bactericida (CMI e CMB), e análise Checkerboard. A citotoxicidade foi avaliada por ensaios MTT em macrófagos RAW 264.7. Para doença de Chagas analisamos a capacidade do composto em inibir a proliferação de formas epimastigotas, amastigotas e promastigotas do parasita. No ensaio de atividade leishmanicida, foram utilizadas cepas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00LTB0016). O composto apresentou CMI de 62,5–250 µg/mL, CMI menor que os da oxacilina para *Staphylococcus aureus*. Na análise *Checkerboard*, o composto apresentou efeito sinérgico a parcialmente sinérgico. Quando combinado com o antibiótico padrão, reduziu em 64 vezes a CMI do antimicrobiano. A citotoxicidade apresentou uma CC 50% de 28,33 µg/mL. Para doença de Chagas foi verificado a capacidade do composto em inibir a proliferação do parasita em suas distintas formas. Na atividade leishmanicida, a atividade anti-amastigota, superou o fármaco Miltefosina. O composto provou possuir atividade frente a estas infecções, o que nos motiva a prosseguir com novos testes frente a outras doenças e outras formas de infecção.

**Palavras-chave:** Leishmaniose. Tripanossomíase americana. Bactérias. Pirimidinas.

## ABSTRACT

Studies have shown that heterocycles such as pyrimidines are effective in treating a range of infections. Thinking about its pharmaceutical potential and the search for more accessible therapeutic forms, this research aimed to synthesize an unprecedented pyrimidine derivative and test its pharmaceutical potential against resistant bacteria and neglected diseases, such as: Leishmaniasis and Chagas, considered by the World Health Organization (WHO) as public health cases, with an increasing number of new cases. The molecule was synthesized by obtaining the Knoevenagel adduct which reacted with p-methoxybenzamidine giving the compound 4-Amino-5-cyano-2-(p-methoxyphenyl)-6-(m, p-chlorophenyl)-pyrimidine, characterized by usual spectroscopic methods. For antimicrobial activity, the Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentration test (CMI and CMB), and Checkerboard analysis were performed. Cytotoxicity was assessed by MTT assays on RAW 264.7 macrophages. For Chagas' disease, we analyzed the compound's ability to inhibit the proliferation of epimastigote, amastigote and promastigote forms of the parasite. In the leishmanicidal activity assay, strains of *Leishmania amazonensis* (strain WHOM / 00LTB0016) were used. The compound had a CMI of 62.5–250 µg / mL, a lower CMI than that of oxacillin for *Staphylococcus aureus*. In the Checkerboard analysis, the compound showed a synergistic to partially synergistic effect. When combined with the standard antibiotic, it reduced the antimicrobial's IMC by 64 times. Cytotoxicity showed a 50% CC of 28.33 µg / mL. For Chagas' disease, the ability of the compound to inhibit the proliferation of the parasite in its different forms was verified. In leishmanicidal activity, the anti-amastigote activity, surpassed the drug Miltefosina. The compound proved to have activity against these infections, which motivates us to continue with new tests against other diseases and other forms of infection.

**Keywords:** Leishmaniasis. American trypanosomiasis. Bacteria. Pyrimidines.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Derivados de Pirimidinas presentes nos ácidos nucleicos.....	18
Figura 2-	Anel pirimidínico.....	19
Figura 3-	Distribuição de triatomíneos, vetores da Doença de Chagas no Brasil em 2016.....	19
Figura 4-	Casos notificados de Doença de Chagas aguda no Brasil em 2016.....	20
Figura 5-	Mapa da endemicidade da Leishmaniose Cutânea (LC) no mundo em 2018.....	22
Figura 6-	Mapa da endemicidade da Leishmaniose Visceral (LV) no mundo em 2018.....	22
Figura 7-	Casos de Leishmaniose Visceral por estado no Brasil no ano de 2017.....	23
Figura 8-	Casos de Leishmaniose Visceral por regiões no Brasil.....	24
Figura 9-	Ciclo de vida da Leishmaniose.....	25
Figura 10-	Esquema reacional de obtenção do aduto de <i>Knoevenagel</i> .....	29
Figura 11-	Esquema reacional de obtenção da <i>p</i> -metoxibenzamidina.....	30
Figura 12-	Esquema reacional da síntese do composto 4-Amino-5-ciano-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-6-( <i>m,p</i> -diclorofenil)-pirimidina.....	30

Figura 13-	Esquema do composto 4-Amino-5-ciano-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-6-( <i>m,p</i> -diclorofenil)-pirimidina.....	39
Figura 14-	Cópia do Espectro de 1-H RMN d do composto 4-Amino-5-ciano-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-6-( <i>m,p</i> -clorofenil)-pirimidina.....	40
Figura 15-	Cópia do Espectro de 13-C RMN do composto 4-Amino-5-ciano-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-6-( <i>m,p</i> -clorofenil)-pirimidina.....	41
Figura 16-	Cópia do Espectro de 13-C RMN do composto 4-Amino-5-ciano-2-( <i>p</i> -metoxifenil)-6-( <i>m,p</i> -clorofenil)-pirimidina.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Lista dos 5 objetivos estratégicos estipulados pelo Ministério da Saúde no Plano Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única.....	27
Tabela 2-	Resultados da atividade Leishmanicida e Antichagásica do composto (3a).....	43
Tabela 3-	Valores de CMI e CMB do composto e dos antibióticos padrões utilizados no experimento.....	45
Tabela 4-	Resultados obtidos por meio do ICIF comprovando a atividade sinérgica.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMR	<i>Antimicrobial resistance</i>
NA	Ágar Nutriente
Bdz	Benznidazol
CC 50%	Concentração Citotóxica para 50% das células
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CPRG	Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC 50%	Concentração que Inibe o Crescimento de 50%
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IV	Infra-vermelho
LIT	Liver Infusion Triptose
MH	Mueller Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
Nfx	Nifurtimox
OMS	Organização Mundial de Saúde

ONU	Organização das Nações Unidas
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	tampão fosfato-salino
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
SCC mec	cassete móvel de cromossomos
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPEDA	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
UTIE	Unidade de Terapia Intensiva de Emergência
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
	OBJETIVO GERAL.....	16
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
	PIRIMIDINAS .....	17
	DOENÇA DE CHAGAS .....	18
	LEISHMANIOSES .....	20
	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
	SÍNTESE .....	28
	SÍNTESE DO M,P-DICLOROBENZILIDENOMALONONITRILO.....	28
	SÍNTESE DA P-METOXIBENZAMIDINA.....	28
	SÍNTESES DO 4-AMINO-5-CIANO-2-(P-METOXIFENIL)-6-(M,P CLOROFENIL)- PIRIMIDINA .....	29
	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	30
	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	31
	<b>Formas Promastigostas.....</b>	<b>31</b>
	<b>Formas Amastigotas de Leishmania .....</b>	<b>31</b>
	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA .....	32
	<b>Avaliação da inibição da proliferação de formas Epimastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i>.....</b>	<b>32</b>

<b>Avaliação do efeito antiproliferativo de formas Promastigotas de <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>Formas Amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>33</b>
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
<b>Preparação do inóculo .....</b>	<b>33</b>
<b>Screening (Teste de difusão em poços) .....</b>	<b>34</b>
<b>Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....</b>	<b>34</b>
<b>Leitura da placa 96 poços e avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB).....</b>	<b>35</b>
<b>Atividade Sinérgica .....</b>	<b>35</b>
<b>5 RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO.....	37
CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTICHAGÁSICA E TRIPANOCIDA .....	43
SCREENING E AVALIAÇÃO DA CMI E CMB.....	44
ATIVIDADE SINÉRGICA.....	46
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Resistência bacteriana, Leishmaniose e Doença de Chagas são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como problemas de saúde pública. Por sua vez, Chagas e Leishmaniose tratam-se de doenças negligenciadas, que são aquelas doenças causadas por parasitas ou agentes infecciosos, endêmicas de regiões pobres (ONU, 2019). As doenças negligenciadas concentram-se principalmente nos países tropicais, como o Brasil, essas regiões apresentam condições favoráveis para a proliferação e desenvolvimento dessas enfermidades. Devido à globalização essas doenças tropicais chegaram também na Ásia e Europa (MSF, 2020).

Estima-se que a doença de Chagas acometa aproximadamente 7 milhões de pessoas em todo o mundo (SIQUEIRA et al., 2019). Dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) mostram que esta doença é responsável pela morte de aproximadamente 12 mil indivíduos por ano nos 21 países endêmicos da doença na América (BROSSAS, 2017; ONU, 2019).

Com crescente número de casos, as leishmanioses ameaçam a saúde de mais de 1 bilhão de pessoas em situação de risco, compreendendo 98 países. Sendo os 7 países mais infectados e que representam o maior número de casos o Brasil, Somália, Sudão, Sudão do Sul, Quênia, Etiópia e Índia (DNDi, 2020; MICHELETTI & BEATRIZ, 2012; PINHEIRO, 2012). Outro problema desafiador que vem gerando uma corrida contra o tempo é a resistência de algumas bactérias aos antibióticos comerciais. Estas bactérias vêm adquirindo a cada dia mais resistência, advindas de alterações genéticas ou uso indiscriminado de antimicrobianos. O que resulta em quadros clínicos de bacteremia, septicemia, infecções de próteses, além de surtos hospitalares (SILVA, 2019; RIBEIRO, 2016).

Em 2018, o Ministério da Saúde lançou o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única, que visa garantir o tratamento de doenças infecciosas de maneira segura e consciente, além de assegurar o fornecimento adequado e supervisionado a quem necessita fazer uso dos antimicrobianos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; ONU, 2019). Todavia, muitos países ainda negligenciam o uso aos antimicrobianos, então, em junho de 2019 a OMS lançou uma campanha que convoca os países a adotar

medidas a fim de estacionar estas infecções (ONU, 2019). Dentro destas medidas está o incentivo a pesquisas que buscam o desenvolvimento de novos fármacos.

Essas infecções ainda possuem terapêuticas ineficazes ou pouco acessíveis. Muitas delas retornam com o tempo, apresentando quadros clínicos ainda mais graves. Por isso inúmeras pesquisas buscam novas alternativas terapêuticas (SILVA, 2019). Nesse contexto, muitos pesquisadores apostam nos heterocíclicos que são amplamente utilizados na química medicinal, pois a inserção de novos grupos funcionais pode permitir alterações nas suas propriedades biológicas (MONTE, 2016). Na literatura quase a totalidade dos fármacos contém pelo menos um heterocíclicos em sua estrutura, (KATRITZKY et al., 2011; SAINI, 2013). Dentre essa vasta classe de heterocíclicos destaca-se o anel pirimidínico.

O anel pirimidínico faz parte da estrutura de fármacos com comprovada atividade antimicrobiana, tripanocida, leishmanicida e antirretrovirais (DO MONTE et al., 2018; DE MELO et al., 2018; JÚNIOR, 2017; CAMPOS, 2015). São compostos que compõem bases nitrogenadas da estrutura dos ácidos nucleicos: timina, citosina e uracila. Além disso, alguns derivados pirimidínicos possuem sítios de ação que aumentam a sua especificidade para se ligar a hormônios, enzimas e proteínas. O que torna esse anel tão atrativo na elaboração da síntese de novos fármacos (GRECO et al., 2019; MONTE, 2016). Tendo em vista as propriedades farmacológicas associadas às pirimidinas, suscitou-se a ideia de sintetizarmos um derivado pirimidínico inédito e utilizá-lo de maneira eficaz frente a estas infecções.

## 2 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Sintetizar um derivado pirimidínico inédito e avaliar o seu potencial farmacológico.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

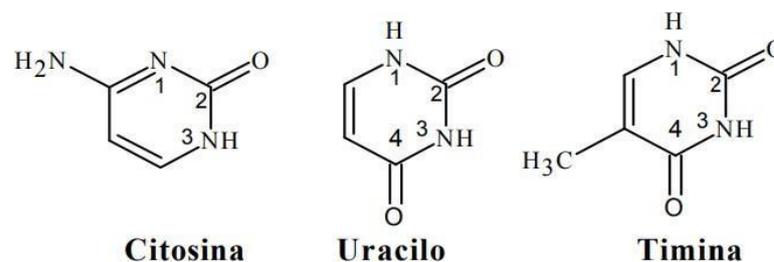
- Realizar a síntese de um derivado pirimidínico;
- Caracterizar o composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-diclorofenil)-pirimidina;
- Determinar a sua citotoxicidade;
- Determinar e avaliar a sua atividade leishmanicida;
- Determinar e avaliar a atividade anti-chagásica;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória frente a cepas padrões e resistentes de bactérias;
- Avaliar a atividade sinérgica do composto conjugado a antibióticos padrões.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### PIRIMIDINAS

Os heterociclos estão contidos em uma gama de princípios ativos que são encontrados em diversas áreas da terapêutica. As pirimidinas constituem apenas uma parte dos muitos heterociclos com potencialidade farmacêutica. São compostos que compõem bases nitrogenadas da estrutura dos ácidos nucleicos: timina, citosina e uracila (Figura 1). Além disso, alguns derivados pirimidínicos possuem sítios de ação que aumentam a sua especificidade para se ligar a hormônios, enzimas e proteínas. O que torna esse anel tão atrativo na elaboração da síntese de novos fármacos (GRECO et al, 2019; DO MONTE, 2016).

Figura 1- Derivados de pirimidinas presentes nos ácidos nucleicos

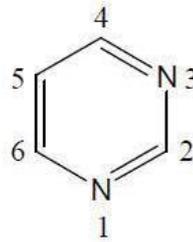


Fonte: MARTINS, 2016.

O anel pirimidínico faz parte da estrutura de fármacos com comprovada atividade antimicrobiana, tripanocida, leishmanicida e antirretrovirais (DO MONTE, 2018; MELO et al 2018; JÚNIOR, 2017; CAMPOS, 2015).

Pirimidinas são compostos heterocíclicos de base fraca. São semelhantes ao anel benzênico, porém, com átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3 da estrutura (Figura 2), as posições 2, 4 e 6 possuem deficiência eletrônica, o que facilita sua relação com nucleófilos. Já a posição 5 do anel pirimidínico é bem denso eletronicamente, facilitando suas reações quando há substituições eletrofílicas aromáticas. (GRECO et al, 2019; DO MONTE, 2016).

Figura 2- Anel Pirimidínico



Fonte: O Autor.

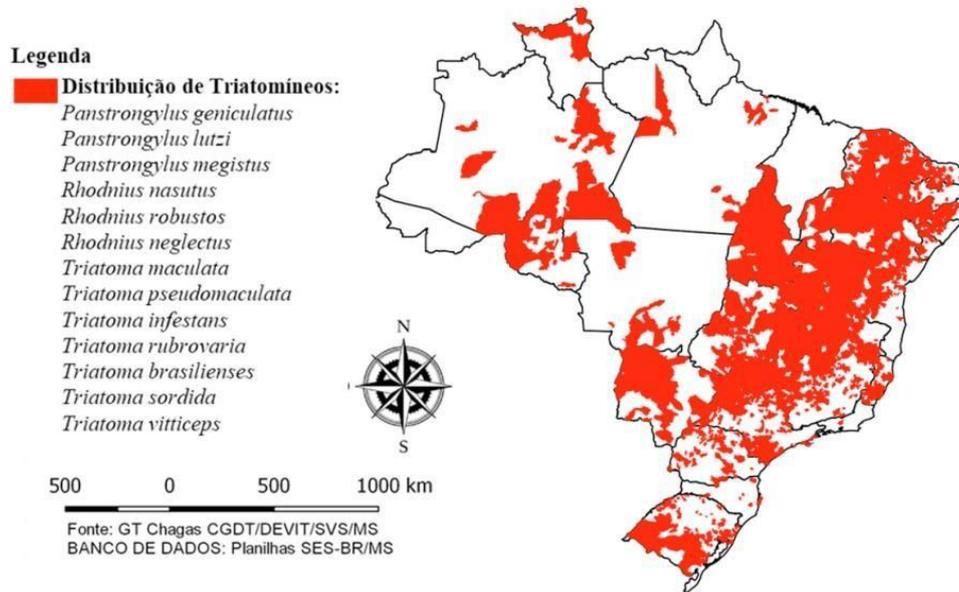
## DOENÇA DE CHAGAS

Estima-se que a doença de Chagas acomete aproximadamente 7 milhões de pessoas em todo o mundo (SIQUEIRA, 2019). A tripanossomíase americana é uma doença tropical que tem como seu agente etiológico o protozoário *Trypanossoma cruzi*. Esta infecção é transmitida ao homem através da picada do “barbeiro” que é um triatomíneo, inseto hematófito pertencente à família *Reduviidae* (Figura 3). Esta infecção apresenta duas fases, a fase aguda caracterizada por febre prolongada, inchaços, fraquezas e encefalite. E a fase crônica, geralmente assintomática na maior parte das pessoas infectadas (MELO et al, 2018).

Na última década, surgiram novos casos de Doença de Chagas no Brasil (Figura 4). De acordo com o Ministério da Saúde (SVS/MS, 2019), 95% dos casos notificados se concentraram no norte do país. Muitos destes casos, decorrentes de surtos alimentares associados ao consumo de caldo de cana, açaí e bacaba mal higienizados.

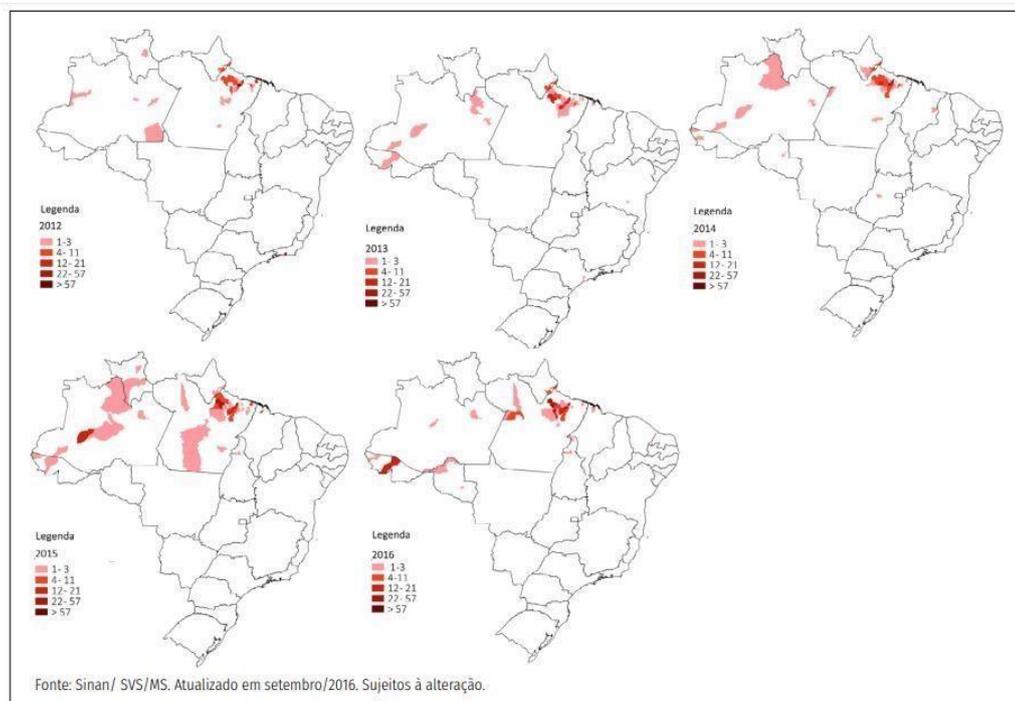
A transmissão se dá por via vetorial no homem, quando um inseto triatomíneo sugador de sangue se alimenta, ele deposita fezes na pele. Nas fezes está contido formas tripomastigotas metacíclicas do parasita, que vai parar na corrente sanguínea, causando a doença. O homem também pode infectar-se via transplante de órgãos, transfusão de sangue, ou de mãe para filho durante a gravidez. Dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) mostram que esta doença é responsável pela morte de aproximadamente 12 mil indivíduos por ano nos 21 países endêmicos da doença na América (BROSSAS, 2017; ONU, 2019).

Figura 3- Distribuição de Triatomíneos, vetores da Doença de Chagas no Brasil em 2016 (SVS/MS, 2019).



Fonte: SVS/MS, 2019.

Figura 4- Casos notificados de Doença de Chagas aguda no Brasil entre os anos de 2012 a 2016



Fonte: SVS/MS, 2019.

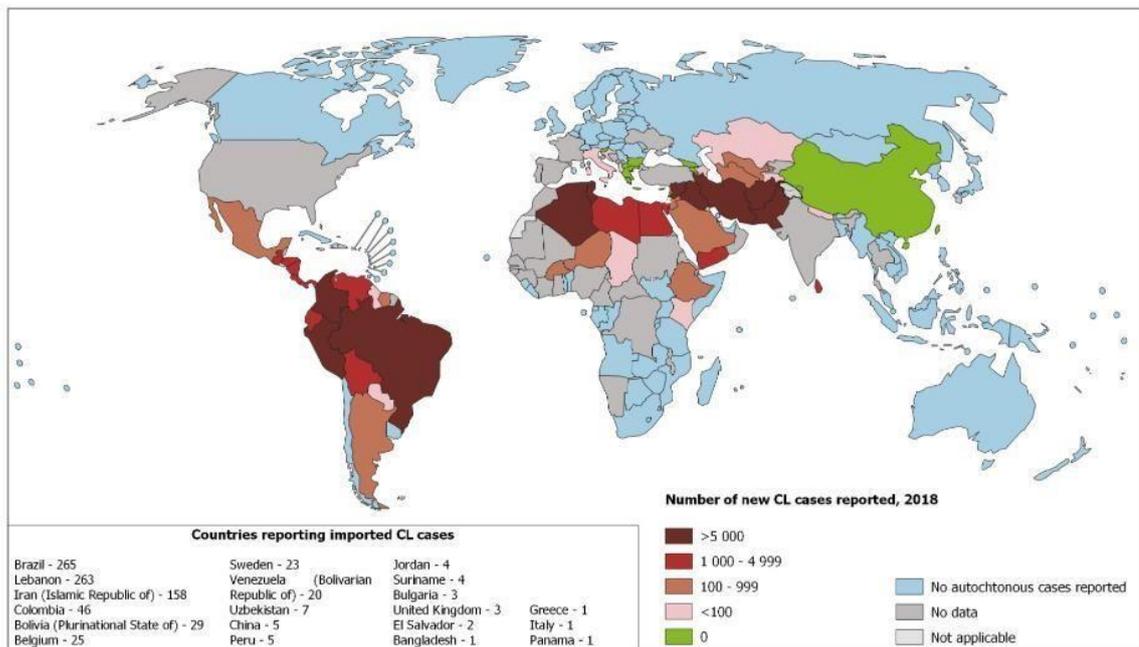
## LEISHMANIOSES

Assim como a doença de Chagas, a Leishmaniose é uma das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) mais preocupantes do mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) ela está entre as 6 doenças tropicais que mais mata no mundo. Tendo mais de 80 países como áreas endêmicas. No mundo ocorre anualmente o registro de 200 a 400 mil novos casos, tendo 200 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção. Cerca de 90% dos novos casos foram relatados por: Brasil, Bangladesh, Índia, Etiópia, Sudão e Sudão do Sul (SILVA, 2017; MSF, 2020; DNDi, 2020) (Figura 5 e 6).

De acordo com os dados epidemiológicos disponíveis na plataforma do World Health Organization (WHO) o Brasil é considerado como um dos países endêmico para Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Muco Cutânea (LMC) e Leishmaniose Visceral (LV). Registrando o maior número de casos de Leishmaniose cutânea da América do sul (WHO, 2020). Em 2018, o Sistema Nacional de Saúde do Brasil apurou 16.432 casos de LC e 3.460 casos de LV. Muitos dos casos diagnosticados estavam concentrados no Estado de Pernambuco (WHO, 2020; SILVA, 2019) (Figura 7 e 8).

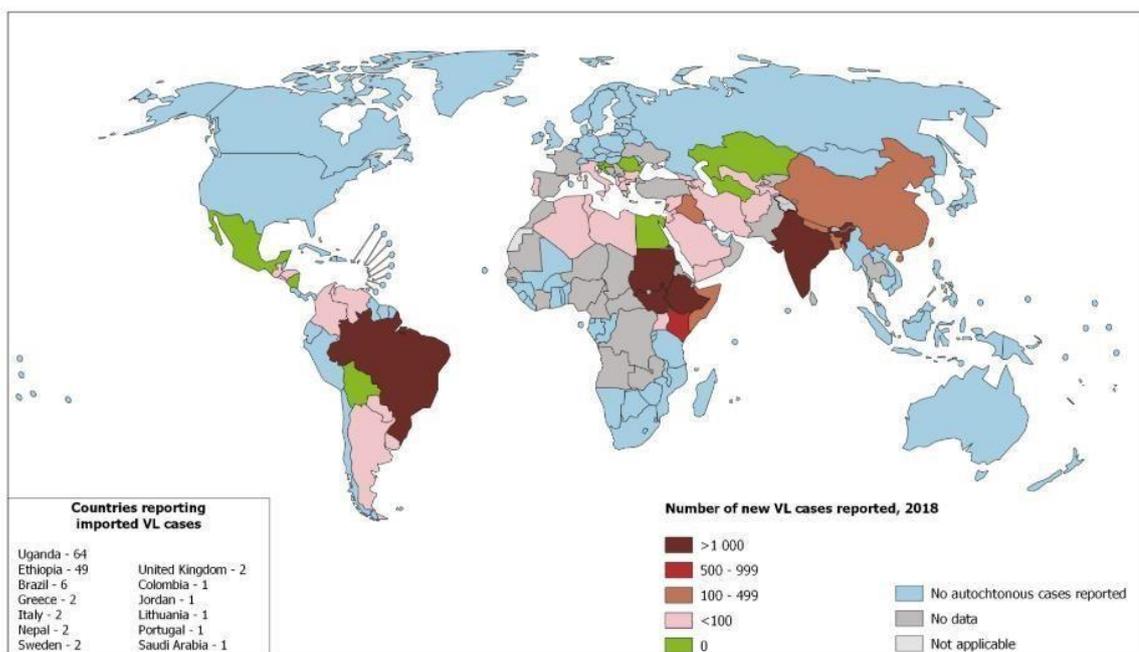
As leishmanioses são causadas por mais de 20 tipos de parasitas do gênero *Leishmania*. Esta enfermidade faz parte do grupo de doenças com maior incidência nas populações mais pobres e vulneráveis. Elas são conhecidas por atingirem principalmente as regiões tropicais do globo. Muitos casos ocorrem onde há fragmentos de Mata Atlântica e saneamento precário, estando associada a urbanização. Esta infecção parasitária pode ser transmitida ao homem por fêmeas do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomya*. Cerca de 30 espécies de mosquito palha (SILVA, 2019; DNDi, 2020; MSF, 2020).

Figura 5- Mapa da endemicidade da Leishmaniose cutânea no mundo em 2018



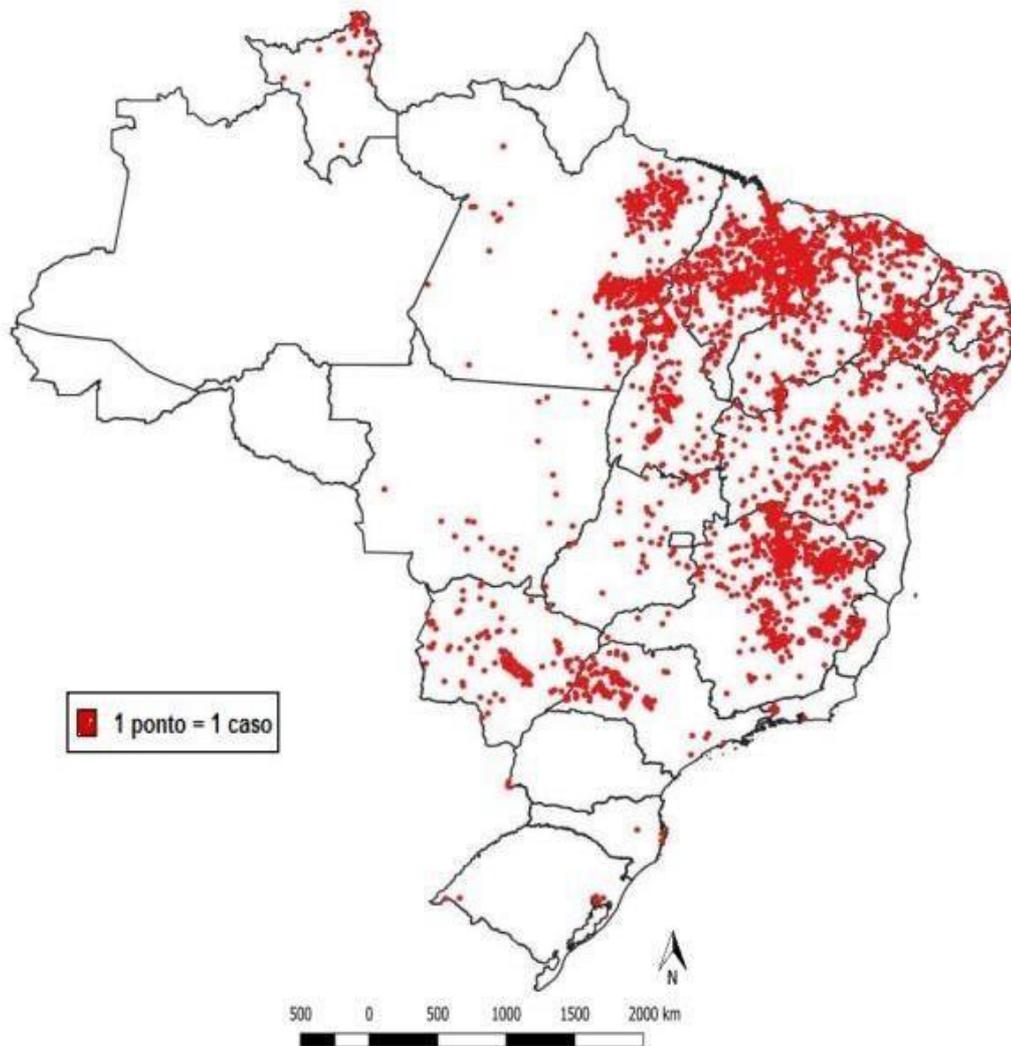
Fonte: WHO, 2020.

Figura 6- Mapa da endemicidade de Leishmaniose Visceral (LV) no mundo em 2018



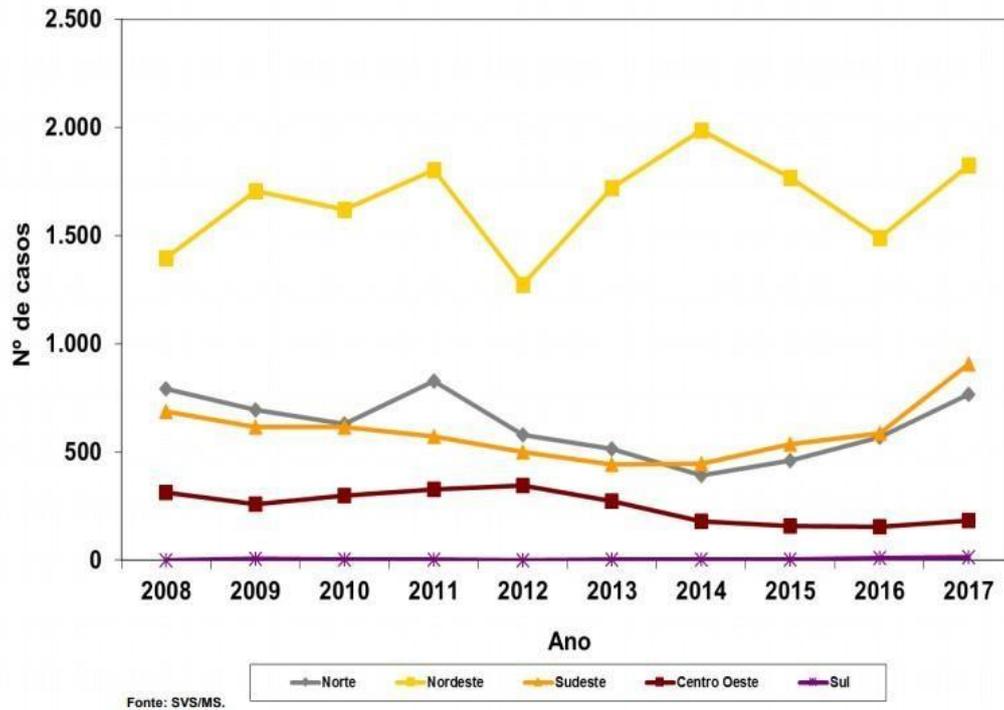
Fonte: WHO, 2020.

Figura 7- Casos de Leishmaniose Visceral por estado no Brasil no ano de 2017



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017.

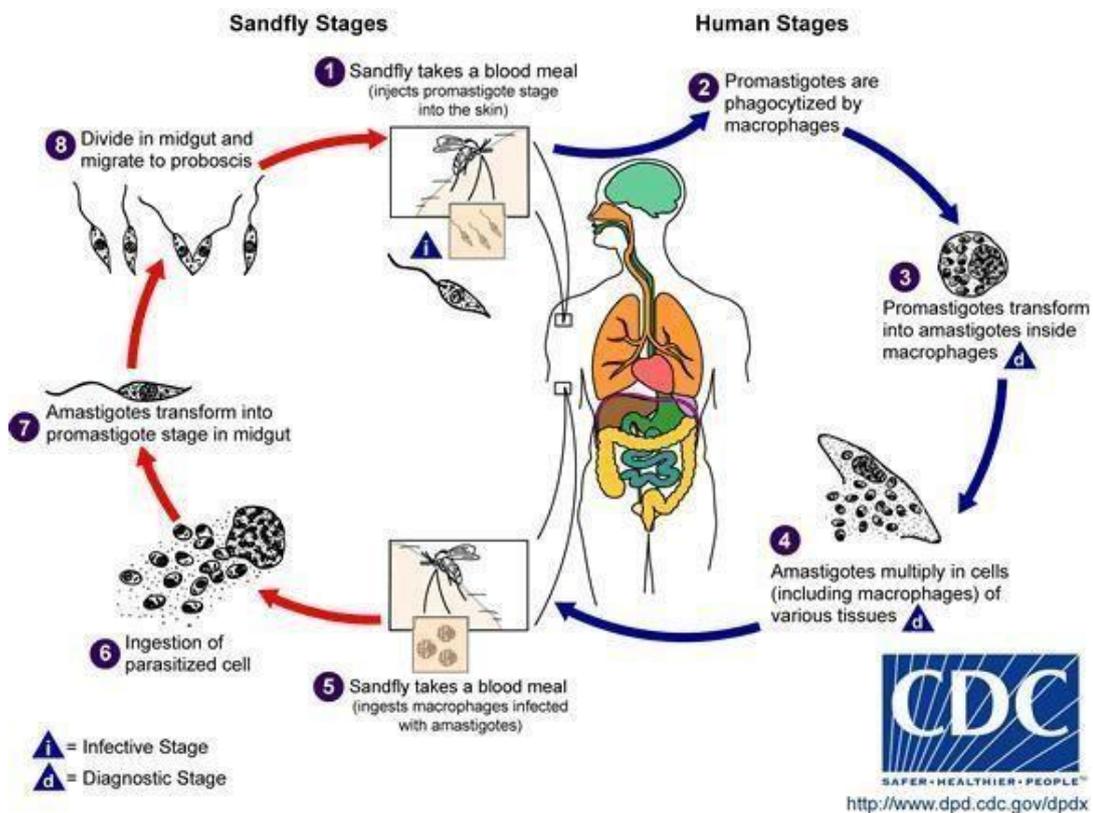
Figura 8- Casos de Leishmaniose Visceral por regiões no Brasil



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017.

As fêmeas de mosquito palha contaminadas ao se alimentarem de sangue, acabam injetando promastigotas metacíclicas, que é a forma infecciosa do parasita, no hospedeiro. Estas formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos, na célula, os promastigotas transformam-se em amastigotas, fase tecidual do parasita. Os amastigotas se multiplicam por divisão simples, infectando assim outras células (MSD MANUALS, 2020) (Figura 9).

Figura 9- Ciclo de vida da Leishmania



Fonte: MSD MANUALS, 2020.

As Leishmanioses manifestam-se com sintomas como dor, febre, úlceras com bordas avermelhadas, anemia, hepatomegalia, perda de peso, dentre outros sintomas não menos importantes. Uma das espécies mais comuns aqui no Brasil é a *Leishmania amazonensis* que se manifesta com lesões na pele e mucosas, feridas e sangramento. O diagnóstico pode ser realizado através de exames clínicos, utilizando métodos parasitológicos e imunológicos. Existem alguns medicamentos disponíveis para o tratamento desta enfermidade, como é o caso da anfotericina B lipossômica, da Paromicina e da Miltefosina. Esta última podendo ser usada em associação com outros medicamentos no tratamento desta infecção. Entretanto, são medicamentos caros que apresentam efeitos colaterais nos pacientes, tornando o tratamento difícil (WHO, 2020).

Além do tratamento, outras medidas importantes devem ser adotadas, como: Controle de vetores, limpeza dos ambientes domésticos e peridomésticos, além de evitar a degradação de habitats naturais (SILVA, 2019).

## RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência aos antimicrobianos é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um caso de saúde pública. Segundo Tedros Ghebreyesus (ONU, 2019) a resistência aos antibióticos é um dos riscos a saúde mais urgente do nosso tempo. Em 2018, o Ministério da Saúde lançou o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única, que visa garantir o tratamento de doenças infecciosas de maneira segura e consciente, além de assegurar o fornecimento adequado e supervisionado a quem necessita fazer uso dos antimicrobianos. Este plano tem vigência de cinco anos, estando válido até o ano de 2022, e possui um conjunto de cinco objetivos estratégico que visam o controle das *Antimicrobial resistance* (AMR) (Tabela 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Todavia, muitos países ainda negligenciam o uso dos antimicrobianos, pensando nisso, em 18 de junho de 2019 a OMS lançou uma campanha que convoca os países a adotar medidas a fim de estacionar a resistência das bactérias aos antibióticos. Resistência essa desenvolvida devido ao mau uso destes medicamentos, muitas vezes usa-se um antibiótico errado, com um espectro amplo. Ou utiliza-se antibiótico para tratar bactérias no tratamento de infecções virais. Com o tempo há evoluções e mudanças do material genético, e muitas bactérias acabam adquirindo resistência aos fármacos usuais (ONU, 2019).

Um estudo realizado em uma Unidade de Terapia Intensiva de Emergência (UTIE) em Xangai, China, analisou pacientes que deram entrada na unidade com quadro clínico de sepse, entre os anos de 2014-2018. As amostras isoladas destes pacientes demonstraram que 9,6% dos patógenos identificados eram de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, enquanto que *Acinetobacter baumannii* constituía 26,7% dos isolados. Esta pesquisa teve um n=92 pacientes

sépticos com infecções secundárias. Estudos como esse, deixam evidente o quão suscetível estão os pacientes a estes patógenos. Isto motiva a comunidade científica na busca por novas drogas com potencial bacteriostático e bactericidas eficazes (CHEN et al., 2019).

Tabela 1- Lista dos 5 objetivos estratégicos estipulados pelo Ministério da Saúde no Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única.

<b>Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única</b>	
<b>Objetivo Estratégico 1</b>	Melhorar a conscientização e a compreensão a respeito da AMR por meio de comunicação, educação e formação efetivas.
<b>Objetivo Estratégico 2</b>	Fortalecer os conhecimentos e a base científica por meio de vigilância e pesquisa.
<b>Objetivo Estratégico 3</b>	Reduzir a incidência de infecções com medidas eficazes de saneamento, higiene e prevenção de infecções.
<b>Objetivo Estratégico 4</b>	Otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal.
<b>Objetivo Estratégico 5</b>	Preparar argumentos econômicos voltados para um investimento sustentável e aumentar os investimentos em novos medicamentos, meios diagnósticos e vacinas além de outras intervenções.

Fonte: Ministério da Saúde, 2019.

Tanto *A. baumannii*, quanto *P. aeruginosa* são bactérias Gram-negativas, oportunistas com elevada patogenicidade. São conhecidas por causar infecções do aparelho respiratório e urinário. *A. baumannii* destaca-se por ter um perfil de multi-resistência. Segundo Guo (2019), as bactérias Gram-negativas são preocupantes, por possuírem vários mecanismos de defesa, muitas vezes mais de um mecanismo contra um único fármaco, dificultando o tratamento.

Não menos importantes e preocupantes *S. aureus* são bactérias gram-positivas, presentes na pele e na cavidade nasal de indivíduos saudáveis, e que ao romper algumas barreiras do corpo, podem levar pacientes já debilitados a quadros clínicos de bacteremia, podendo causar endocardite e osteomielite. Há na literatura inúmeros relatos a respeito da resistência adquirida por *S. aureus*. Alguns deles apontam para vertentes que caracterizam essa resistência como uma epidemia. Ou

relatam que a causa pode ser os genes de resistência existentes nesses microorganismos, como também o uso indiscriminado de medicamentos por pacientes. Estudos já mostram que há um crescente número de infecções causadas por *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), esta resistência está atrelada a síntese de uma proteína de ligação modificada à penicilina. Outro fator é o SCC *mec*, que trata-se de um cassete móvel de cromossomos que carrega o *mec-A*, que é o gene que determina a resistência de *S. aureus* a toda a classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção das cefalosporinas de quinta geração (LOZANO & TORRES, 2017; ALHARBI, 2019; HENRY & De LEO, 2009).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

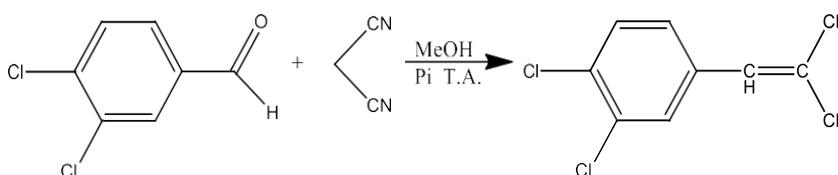
### SÍNTESE

Foi sintetizado um composto inédito, pirimidina, seguindo os procedimentos conhecidos e também desenvolvidos por Falcão e colaboradores (2006). No qual, a síntese ocorre através da reação das arilamidinas com bisnitrilas.

### SÍNTESE DO *m,p*-DICLOROBENZILIDENOMALONONITRILLO

O *m,p*-diclorobenzilidenomalononitrilo foi obtido através da condensação de *Knoevenagel*, por meio da reação de *m,p*-diclorobenzaldeído com a malononitrila em meio básico, piridina (Figura 10), descrito por Patai (1960).

Figura 10- Esquema reacional de obtenção do aduto de *Knoevenagel*

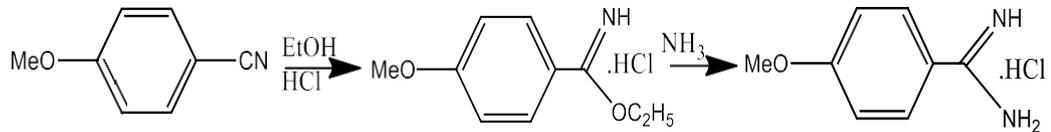


Fonte: O Autor.

### SÍNTESE DA *p*-METOXIBENZAMIDINA

Para a obtenção das amidinas foi utilizado à metodologia de Pinner (1892). Neste método foram necessárias duas etapas, sendo a primeira, a síntese do iminoéter pela reação das nitrilas **1a** com etanol em ácido clorídrico gasoso. Em seguida, os produtos foram submetidos à ação do amoníaco para obtenção da amidina, na segunda etapa (Figura 11).

Figura 11- Esquema reacional de obtenção da *p*-metoxibenzamidina

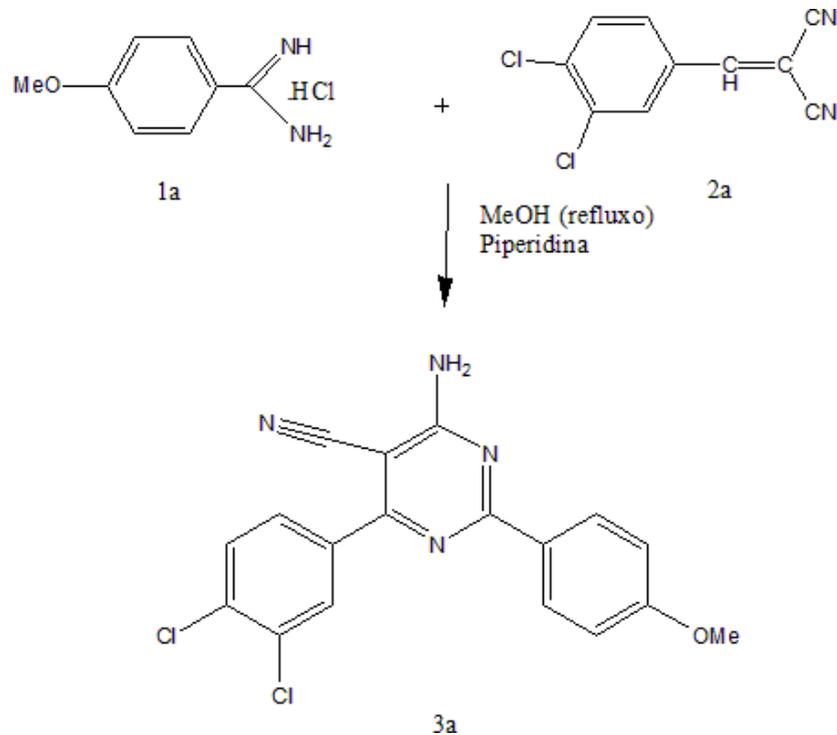


Fonte: O Autor.

### SÍNTESES DO 4-AMINO-5-CIANO-2-(*P*-METOXIFENIL)-6-(*M,P*-CLOROFENIL)-PIRIMIDINA

O composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina (**3a**) foi obtido segundo metodologia descrita por Melo e colaboradores (MELO et al., 2002), a partir de reação entre o composto *p*-metoxibenzamidina (**1a**) e o *m,p*-diclorobenzilidenomalononitrilo (**2a**), em meio a base piperidina sob refluxo. Após 7 horas os compostos **1a** e **2a** reagiram completamente formando a o derivado da pirimidina. Uma vez obtido o derivado, esse foi purificado por cristalização e recristalização em solvente éter etílico seco (Figura 12).

Figura 12- Esquema da síntese do composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina (3a)



Fonte: O Autor.

## ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade foi avaliada através de ensaios com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difenil tetrazólio) em macrófagos RAW 264.7. Os macrófagos foram cultivados em garrafas de cultura de células. Sequencialmente, plaqueados em placas 96 poços, e incubados por 24h, a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico. Posteriormente o composto foi adicionado em concentrações de 6-200 µg/mL e incubado por 48h. Para o controle negativo, utilizou-se apenas meio de cultura. Após a incubação foi acrescentado 25µL de MTT a 5 mg/mL em tampão fosfato-salino (PBS), seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C, no escuro. Parte do meio de cultura juntamente com o MTT foi aspirado e 100µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância se deu a 570 nm no espectrofotômetro *THERMO*

*SCIENTIFIC Multiskan FC*. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC 50%) foi determinada por análise de regressão pelo software *GraphPad Prism*. Cada ensaio foi realizado em triplicata (DOS SANTOS ALIANÇA et al., 2017).

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

### Formas Promastigotas

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) foram mantidas em meio *Schneider's* (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (meio completo) a 26°C. O antibiótico utilizado foi a Miltefosina. Em todos os experimentos, fez-se uso de parasitas na fase exponencial. Para o ensaio de atividade leishmanicida, os parasitas foram contabilizados e diluídos em meio *Schneider's* (Sigma) completo a  $1 \times 10^6$  células/mL. Sendo então incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações dos compostos (1,5 a 200 µg/mL) por 72h. Meio de cultura com Miltefosina foi utilizado como controle negativo. O crescimento celular foi avaliado em câmara de *Neubauer* com diluição de 1/10. A IC 50% /72h foi determinada por análise de regressão. Cada ensaio foi realizado em triplicata (DOS SANTOS ALIANÇA et al., 2017).

### Formas Amastigotas de *Leishmania*

Macrófagos RAW 264.7 foram distribuídos em placas de 24 poços ( $3 \times 10^5$  células/mL) contendo uma lamínula estéril. Os macrófagos foram incubados por 2h, a 37°C com atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>. Após essa incubação foram acrescentadas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* na proporção de 8 parasitas/macrófago, no período de 6h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os parasitas não internalizados foram removidos, e a cultura incubada na presença de diferentes concentrações do composto (6 a 200 µg/mL) por 24h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A Miltefosina foi o controle positivo. Após a incubação, as lamínulas contendo a cultura foram lavadas com PBS

e coradas com kit de coloração Panótico Rápido. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de 100 macrófagos, em duplicata. A atividade leishmanicida do composto foi verificada pela diminuição no número de macrófagos infectados e de amastigotas intracelulares nas culturas tratadas em comparação ao controle. Os valores de IC 50% foram calculados por análise de regressão utilizando o software *GraphPad Prism* (DOS SANTOS ALIANÇA et al., 2017).

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA

### **Avaliação da inibição da proliferação de formas Epimastigotas de *Trypanossoma cruzi***

Para avaliar a inibição da proliferação, formas epimastigotas da cepa DM28c ( $10^6$  parasitos/ml), foram mantidas em meio *Liver Infusion Triptose* (LIT) + 1% de antibiótico + 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), foram semeadas em placas de 96 poços a 27°C, com diferentes concentrações do composto (0,19 a 100 µg/ml) durante 96h. O controle negativo foi o meio de cultura, e o controle positivo o Benznidazol. Determinou-se a viabilidade parasitária por contagem direta em câmara de *Neubauer* e, a partir desses valores, obteve-se a IC 50% (concentração que inibe o crescimento de 50% de parasitos). Cada ensaio foi realizado em triplicata (DE MELO et al., 2018).

### **Avaliação do efeito antiproliferativo de formas Promastigotas de *T. cruzi***

As formas tripomastigotas (cepa Y) foram obtidas a partir da infecção *in vitro* de células L929. Para determinar o efeito antiproliferativo para formas tripomastigotas da cepa Y ( $4 \times 10^6$  parasitos/ml), mantidos em meio RPMI+1% de antibiótico+5% de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços a 37°C, juntamente com diferentes concentrações do composto (0,19 a 100 µg/ml) por 24h a atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O controle negativo foram poços sem tratamento, e o Benznidazol o

controle positivo. A viabilidade parasitária foi determinada por contagem direta em câmara de *Neubauer*, com diluição de 1/10. A partir desses valores, obteve-se a IC 50%. Cada ensaio foi realizado em triplicata (DE MELO et al., 2018).

### **Formas Amastigotas de *T. cruzi***

As formas tripomastigotas (cepa *Tulahuen*) foram obtidas a partir da infecção *in vitro* da linhagem de células L929. Para a obtenção de amastigotas, células L929 foram semeadas em placas de 96 poços, e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Parasitas foram adicionados na proporção de 10 tripomastigotas/célula. Após 3h, os parasitas não internalizados foram removidos, e as placas incubadas por 48h. O composto foi adicionado em diferentes concentrações (0,6 a 20 µg/mL), e as placas incubadas por 96h. Poços com meio de cultura foram o controle negativo e poços com Benznidazol o controle positivo. Ao final da incubação foi adicionado Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG), 500 µM, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS, e incubado por 18h, a 37°C. A absorbância foi lida a 570 nm no espectrofotômetro *THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC*. Os valores de IC 50% foram calculados por análise de regressão utilizando o software *GraphPad Prism*. Cada ensaio foi realizado em triplicata (DE MELO et al., 2018).

## **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

### **Preparação do inóculo**

Para a preparação dos inóculos utilizados no *screening* e nos demais testes foram realizados o repique das cepas de *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416) e *Acinetobacter baumannii* (UFPEDA 1024) em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (AN). As placas foram incubadas a 37 +/- 2°C por 18-24 horas. Após a incubação, com ajuda de uma alça de retirou-se um

pouco da colônia e incorporou em um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina a 0,9%. O tubo foi agitado em um vórtex por 30 segundos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, considerando como aceito valores de 0.8 nm a 0.13 nm.

### **Screening (Teste de difusão em poços)**

O *screening* serviu para avaliar a sensibilidade de alguns micro-organismos, a fim de decidir quais cepas seriam analisadas nos demais testes antimicrobianos. O método utilizado foi o teste de difusão em poços, onde em uma placa de Petri faz-se uma camada contendo meio sólido ágar *Mueller Hinton* (MH). Ponteiras azuis são então postas de maneira vertical, com a ponta para cima, acima desta camada a fim de formar 4 poços por placa. Em seguida meio MH semi-sólido já com o inóculo a  $10^8$  foi incorporado ao meio, e vertido nas placas. Após a solidificação, as ponteiras são retiradas. Com os poços já formados, cada um recebeu 40  $\mu$ L do composto, em concentrações diferentes (500-62,5  $\mu$ g/mL). As placas foram então incubadas em estufa a 37 +/- 2°C por 18-24 h. Os halos de inibição foram medidos ao final da incubação (BONA, 2014).

### **Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)**

A avaliação da CMI foi realizada através do método de micro diluição em placas multipoços, proposto pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2017). Neste teste analisamos a sensibilidade de *S. aureus* (UFPEDA 02), e algumas cepas de *S. aureus* resistentes (UFPEDA 1046B; 1047B; 1055B; 1058B; 1039B), obtidas de amostras clínicas provenientes do hospital das clínicas e cedidas pela coleção de micro-organismos da UFPEDA. *A. baumannii* (UFPEDA 1024B) e *P. aeruginosa* (UFPEDA 416) também foram testadas. Nesta metodologia fizemos o uso de placas 96 poços. O meio de cultura escolhido foi o MH.

Meio de cultura e inóculo foi tido como controle positivo, meio de cultura com inóculo e o solvente utilizado na diluição da molécula foi o controle negativo, e poços

apenas com MH foram o controle de esterilidade do meio. Deste modo, da coluna 1-9 foram realizadas micro diluições partindo de uma concentração de (1000 – 3,9 µg/mL) do composto. Após a realização da microdiluição, todos os poços, com exceção dos poços da coluna de esterilidade do meio, receberam 10 µL do inóculo. As placas então foram incubadas em estufa a 37 +/- 2°C por 18-24 horas.

### **Leitura da placa 96 poços e avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)**

Após o tempo de incubação das placas 96 poço, antes da leitura com resazurina, foi observado os poços que não tiveram crescimento e fez-se o semeio em placa de Petri contendo meio ágar MH. As placas de Petri foram incubadas em estufa a 37 +/- 2°C por 18-24 horas. Após a incubação observam-se os quadrantes da placa de Petri. A CMI é definida como a menor concentração da molécula/antibiótico que inibe parcialmente o crescimento do micro-organismo teste, enquanto que a CMB é definida como a menor concentração do antibiótico/molécula que inibe 99,9% o micro-organismo utilizado no teste. Em alguns casos a CMI e a CMB são visualizadas no mesmo quadrante. Após o plaqueamento dos poços, a leitura da placa foi realizada com 20 µL do corante resazurina a 0,1% em cada poço. As placas foram incubadas por 1-3 horas em estufa a 37 +/- 2°C para observar a mudança de coloração. A resazurina é um corante azul indicador do óxido-redução, onde a mudança para a coloração rosa indica crescimento microbiano (CLSI, 2017).

### **Atividade Sinérgica**

Na atividade sinérgica, foram testadas cepas de *A. baumannii* (UFPEDA 1024B), e cepas resistentes de *S.aureus* (UFPEDA 1046B; 1047B; 1055B; 1058B; 1039B). O sinergismo foi realizado pela análise *Checkerboard* (BONAPACE et al., 2002; DOUGHERTY et al., 1977; LORIAN, 2005) neste método foi utilizado placas multipoços de fundo “U”. A placa 1 recebeu o antibiótico comercial, enquanto que a placa 2 recebeu o composto. Nesta metodologia, faz-se a combinação do conteúdo

da placa 1 com a placa 2. A placa foi incubada a 37 +/- 2°C por 18-24 h. Após a incubação fez-se a leitura da placa com resazurina. Os resultados da atividade sinérgica são estipulados pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). Obtidos através das equações abaixo:

Equação 1:

$$\text{ICIF} = \text{CIF (antibiótico)} + \text{CIF (composto)}$$

Equação 2:

$$\text{CIF antibiótico} = \frac{\text{CMI (conjugada do antibiótico + composto)}}{\text{CMI antibiótico (isoladamente)}}$$

$$\text{CIF do composto} = \frac{\text{CMI (conjugada do composto + antibiótico)}}{\text{CMI do composto (isoladamente)}}$$

- ICIF < 0,5= efeito sinérgico
- 0,5 ≤ ICIF ≤ 0,75= efeito parcialmente sinérgico. 0,75
- 0,75 < ICIF < 2= efeito aditivo
- 2 ≤ ICIF ≤ 4= efeito indiferente
- ICIF > 4= efeito antagônico

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

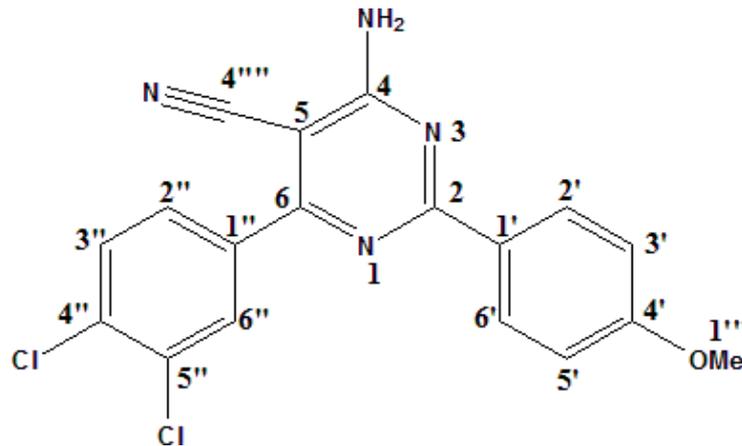
### SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

Na literatura ainda há poucos relatos acerca das Pirimidinas e seus benefícios terapêuticos. Resultados encontrados em algumas pesquisas nos mostram o quão significativo é o seu potencial, tanto frente a bactérias quanto a doenças de origem parasitária e demais infecções. Falcão et al., (2006), demonstrou que os derivados pirimidínicos sintetizados em sua pesquisa apresentaram atividade anti-inflamatória, que superou os do ácido salicílico. Melo (2018) sintetizou derivados de pirimidina com potencial ação contra proliferação de formas amastigotas de *T. cruzi*. Campos (2015) apresentou em sua pesquisa o potencial antiretroviral das pirimidinas. Do Monte (2016) e Silva (2019) apresentaram novos derivados pirimidínicos com notável atividade antimicrobiana. Fazendo uma comparação aos análogos encontrados, o composto (**3a**) apresentou atividade superior ou semelhante ao que foi relatado nestes estudos. Esta pesquisa demonstrou que o 4- Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina, é um sintético que possui bom rendimento, 94%, e atividades farmacológicas comprovadas.

Inicialmente, aldeído aromático e malonitrila são dissolvidos em metanol e mantidos sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas, a fim de se obter o intermediário de *Michael*, no caso o *m,p*-diclorocianocinamonitrila. Enquanto *p*-metoxi-benzamidina, foi obtida por meio de duas etapas reacionais: a primeira sendo a reação entre a nitrila e etanol anidro, utilizando ácido clorídrico gasoso, formando assim os iminoéter. Este, submetido à ação de amoníaco, formam o cloridrato de amidina, sendo esta a segunda etapa reacional. A 5-carbonitrila-pirimidina **3a** é obtida por reação entre o intermediário de *Michael* e *p*-metoxibenzamidina. Os reagentes são mantidos sob agitação, em refluxo, durante 7 horas, seguindo protocolo experimental (MELO et al., 2002). A pirimidina 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina(**3a**), com massa molar de 371,22, foi obtida como um sólido branco com 94% de rendimento, após 4 horas de refluxo utilizando etanol como solvente. O produto após purificação obteve ponto fusão de 226,4°C.

Será descrito a seguir a caracterização estrutural do composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina(**3a**) (Figura 13).

Figura 13- Esquema do 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina (3a)



Fonte: O Autor.

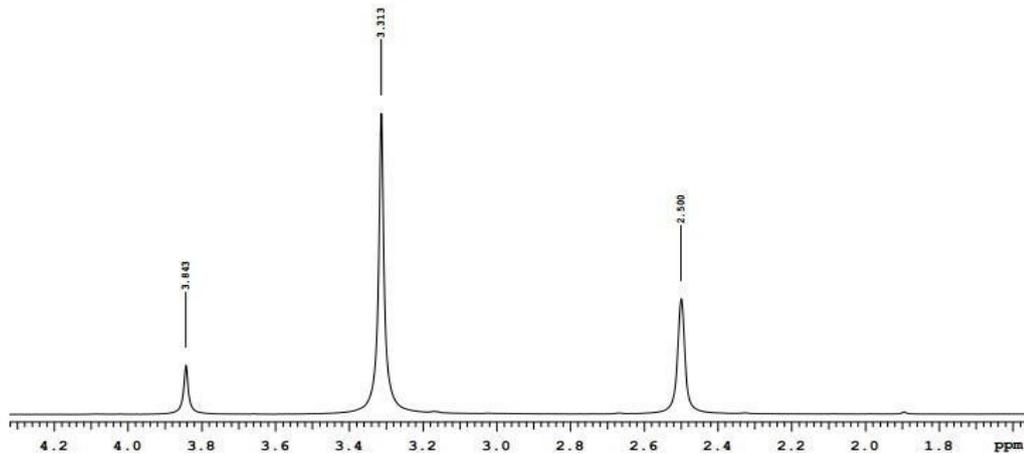
**Dados Espectroscópicos:** 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina(**3a**): Cristalizado em MeOH, 94% de rendimento, p.f. 226,4°C Rf = 0.40; *n*-hexano-acetato de etila, 7:3); IV, KBr,  $\mu$  cm<sup>-1</sup>: 3494 (NH<sub>2</sub>asim.), 3388 (NH<sub>2</sub>sim.), 2214 (CN), 1621 (C=N); 1H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz),  $\delta$ : 8.35 (d, 2H, H4' e H6', J 9.0 Hz); 8.18 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.90 (dd, 3H, H2'' e H4'' e H5'' J 8.0); 7.08 (d, 2H, H3' e H5', J 9.0 Hz); 3.84 (s, 3H, OMe); 13C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz),  $\delta$ : 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''); (1C, C1'); 123.8 (2C, C3'' e C5'') 115.6 (1C, C4) e 86.1 (1C, C5),  $\delta$ : 173,0 (1C, C4') ; 169,5 (1C,6); 166,6(1C, C C1'''); 164,2 (1C, C2); 148,7 (1C, C4''); 142,6 (1C,C1''); 130,8 (2C, C2' e C6'); 130,0 (2C, C2'' e C6''); 128,6 (1C, C1'); 113,7 (2C, C3' e C5'); 116,0 (1C, C4) ; 114,0 (2C, C3'' e C5''); 84,3 (1C, C5) ; e  $\delta$  55,3 (1C,C1''').

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H observam-se a presença do singlete em 8.18 ppm característico do dois hidrogênios do grupo amina, outro dois sinais dubletos homotópicos localizado no substituinte fenil na posição C-2 do núcleo pirimidínico

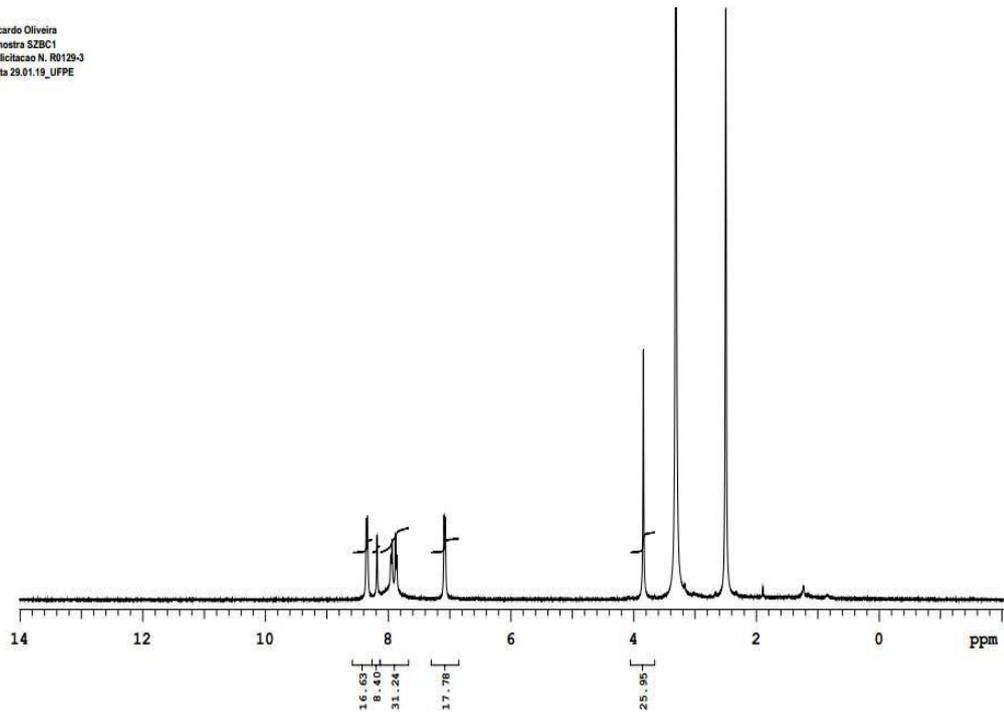
com deslocamento químico de 8.35 (d, 2H, H4' e H6', J 9.0 Hz); e de 7.08 (d, 2H, H3' e H5', J 9.0 Hz); e outro sinal em 7.90 ( dd, 3H, H2'' e H4'' e H5'' J 8.0); por fim, um sinal blindado em 3.84 (s, 3H, OMe) (Figuras 14, 15 e 16).

Figura 14- Cópia do Espectro de 1-H RMN d do composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina(3a).

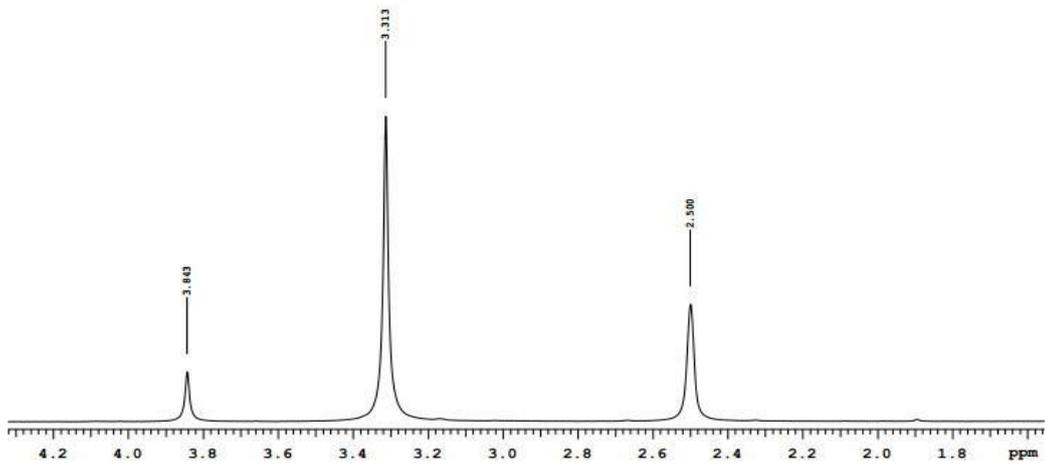
Ricardo Oliveira  
Amostra SZBC1  
Solicitacao N. R0129-3  
Data 29.01.15\_UFPE



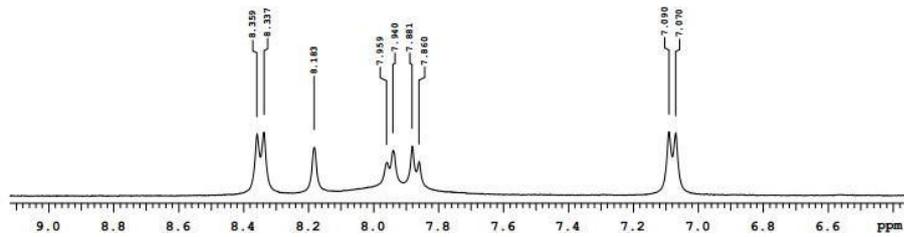
Ricardo Oliveira  
Amostra SZBC1  
Solicitacao N. R0129-3  
Data 29.01.19\_UFPE



Ricardo Oliveira  
Amostra SZBC1  
Solicitacao N. R0129-3  
Data 29.01.19\_UFPE



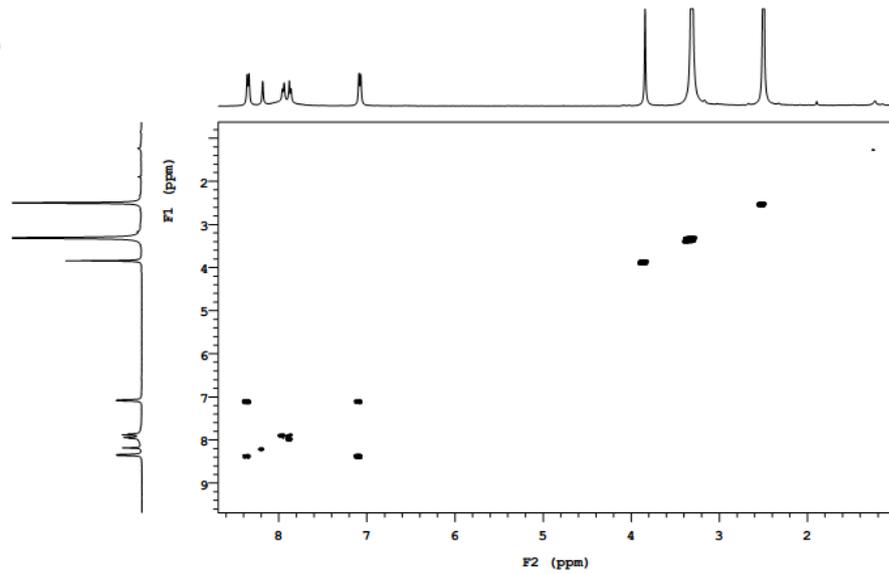
Ricardo Oliveira  
 Amostra SZBC1  
 Solicitação N. R0129-3  
 Data 29.01.19\_UFPE



Fonte: O Autor.

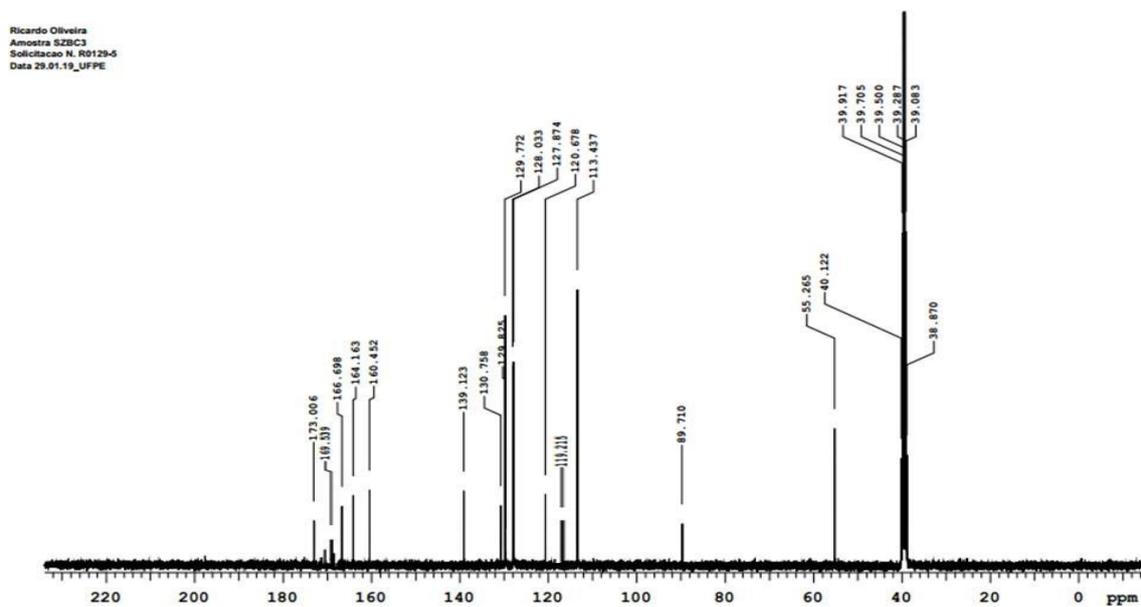
Figura 15- Cópia do Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina(3a)

Ricardo Oliveira  
 Amostra SZBC1  
 Solicitação N. R0129-3  
 Data 29.01.19\_UFPE



Fonte: O Autor.

Figura 16- Cópia do Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina(3a)



Fonte: O Autor.

## CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTICHAGÁSICA E TRIPANOCIDA

Após a caracterização do composto, a sua toxicidade foi determinada. O valor de CC 50% em macrófagos RAW 264.7, que é a concentração citotóxica para 50% das células foi de 76,32 $\mu$ M. Os valores para atividade leishmanicida e tripanocida foram determinados em IC 50%, que é a média de inibição de um composto (Tabela 2).

Tabela 2- Resultados da atividade Leishmanicida e Antichagásica do composto (3a)

Atividade Leishmanicida		
Forma evolutiva	IC 50% ( $\mu$ M)	IS
Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	133,32	0,57
Amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	66,21	1,15
Atividade Tripanocida		
Forma evolutiva	IC 50% ( $\mu$ M)	IS
Epimastigotas (cepa Dm28)	15,41	4,95
Tripomastigotas (cepa Y)	10,90	7,0
Amastigotas (cepa Y)	31,14	2,45

**Fonte:** O Autor.

IC 50%= Concentração Inibitória de 50%; IS= Índice de seletividade.

A atividade anti-amastigota para *L. amazonensis* foi excelente, superou o fármaco padrão Miltefosina, muito utilizado no tratamento das Leishmanioses, que apresenta um IC 50% de 89,98  $\mu$ g/mL frente a formas amastigotas do parasita. Nossos resultados de atividade tripanocida também são semelhantes aos apresentados por Melo (2018). Recentemente o autor publicou uma pesquisa na qual são sintetizados 28 derivados pirimidínicos, dos quais, 9 destes apresentaram resultados excelentes frente a formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Nosso composto apresentou semelhante resultado, com um IC 50% de 5,72  $\mu$ g/mL frente a formas epimastigotas e 4,05  $\mu$ g/mL frente a formas tripomastigotas do parasita.

## SCREENING E AVALIAÇÃO DA CMI E CMB

A triagem realizada demonstrou que o composto possui atividade contra as cepas de *S. aureus* (UFPEDA 02), *P. aeruginosa* (UFPEDA 416) e *A. baumannii* (UFPEDA 1024 B). Neste teste consideramos halos de inibição maior ou iguais a 6 mm (BONA et al., 2014). Essas foram então às linhagens utilizadas na avaliação da Concentração Mínima Inibitória e Bactericida (CMI e CMB). Por possuir bons resultados contra *S. aureus* (UFPEDA 02), cepas de *S. aureus* resistentes (UFPEDA 1039B; 1046B; 1047B; 1055B; 1058B) também foram averiguadas frente ao composto. Nos testes o composto partiu de uma concentração de 1000 a 3,9 µg/mL. Podemos notar na (Tabela 3), que o composto apresentou CMI que variaram de 62,5 a 250 µg/mL.

É notável o quanto os derivados pirimidínicos são eficientes. Nosso composto conseguiu inibir cepas de *S. aureus* (UFPEDA 02; 1039B; 1046B; 1047B; 1055B) a uma concentração de 62,5 µg/mL, enquanto que a oxacilina, antibiótico comumente utilizado no tratamento de infecções por *S. aureus* inibiu na concentração de 125 µg/mL. O composto (**3a**) também inibiu em concentrações satisfatórias cepas de *P. aeruginosa* UFPEDA 416 e *A. baumannii* UFPEDA 1024B, com CMI de 250 µg/mL e 125 µg/mL respectivamente. Do Monte (2016) em sua pesquisa também analisou os efeitos de derivados pirimidínicos frente a algumas bactérias e leveduras, a qual obteve CMI de 125 µg/mL. Os resultados obtidos são animadores, e nos motiva a realizar novos testes antimicrobianos, como a averiguação da inibição da formação de biofilmes, por exemplo.

Tabela 3- Valores de CMI e CMB do composto e dos antibióticos padrões utilizados no experimento

Micro-organismo	CMI e CMB do composto (3a)		CMI e CMB do antibiótico comercial	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S. aureus</i> UFPEDA 02	62,5µg/mL	125µg/mL	–	–
<i>S. aureus</i> UFPEDA 1046B	62,5µg/mL	250µg/mL	250µg/mL*	250µg/mL*
<i>S. aureus</i> UFPEDA 1047B	62,5µg/mL	250µg/mL	125µg/mL*	125µg/mL*
<i>S. aureus</i> UFPEDA 1058B	250µg/mL	250µg/mL	125µg/mL*	125µg/mL*
<i>S. aureus</i> UFPEDA 1055B	62,5µg/mL	250µg/mL	64µg/mL*	128µg/mL*
<i>S. aureus</i> UFPEDA 1039B	62,5µg/mL	250µg/mL	128µg/mL*	256µg/mL*
<i>A. baumannii</i> UFPEDA 1024B	125µg/mL	125µg/mL	16µg/mL**	–
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 416	250µg/mL	250µg/mL	–	–

Fonte: O Autor.

CMI (Concentração Mínima Inibitória); CMB (Concentração Mínima Bactericida); \*Oxacilina foi o antibiótico utilizado para *Staphylococcus aureus*; \*\*Ampicilina + Subactam foi o antibiótico utilizado para *Acinetobacter baumannii*

## ATIVIDADE SINÉRGICA

Os resultados da atividade sinérgica são estipulados pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). Na (Tabela 4) pode-se observar os resultados do efeito sinérgico. Os resultados obtidos na análise *Checkerboard* demonstraram que o fármaco combinado ao composto apresentou efeito sinérgico a parcialmente sinérgico. O ICIF obtido por cada combinação de tratamentos nos mostra uma boa redução na concentração do composto e do antimicrobiano. Por exemplo, o composto quando testado isoladamente para *S. aureus* UFPEDA 1046B apresentou uma CMI de 62,5µg/mL e a oxacilina uma CMI de 250µg/mL. Quando combinados a CMI do composto e da oxacilina foi de 3,9µg/mL, o que demonstra o seu efeito sinérgico, com um ICIF < 0,5. Em todas as nossas placas testadas o composto quando combinado ao antibiótico comercial reduziu a CMI do antimicrobiano em 64 vezes. Silva (2019) em sua pesquisa demonstrou que um dos derivados pirimidínicos sintetizados em sua pesquisa também reduziu em 64 vezes a CMI do Ampicilina com Sulbactam para *A. baumannii* UFPEDA 1024B. Os efeitos inibitórios constatados nos testes efetuados nos mostram que o composto é um forte componente na formulação de um novo antimicrobiano.

Tabela 4- Resultados obtidos por meio do ICIF comprovando a atividade sinérgica

Micro-organismo	Tratamento	CMI sozinho	CMI combinado	CIF	ICIF	Efeito
<b><i>S. aureus</i></b> <b>1046B</b>	Oxacilina	250µg/mL	3,9µg/mL	0,02	0,08	Efeito sinérgico
	Composto <b>(3a)</b>	62,5µg/mL	3,9µg/mL	0,06		
<b><i>S. aureus</i></b> <b>1047B</b>	Oxacilina	125 µg/mL	1,95µg/mL	0,02	0,08	Efeito sinérgico
	Composto <b>(3a)</b>	62,5µg/mL	3,9µg/mL	0,06		
<b><i>S. aureus</i></b> <b>1058B</b>	Oxacilina	125µg/mL	1,95µg/mL	0,02	0,05	Efeito sinérgico
	Composto <b>(3a)</b>	250µg/mL	7,8µg/mL	0,03		
<b><i>S. aureus</i></b> <b>1055B</b>	Oxacilina	64µg/mL	1µg/mL	0,02	0,04	Efeito sinérgico
	Composto <b>(3a)</b>	62,5µg/mL	0,97µg/mL	0,02		
<b><i>S. aureus</i></b> <b>1039B</b>	Oxacilina	128µg/mL	2µg/mL	0,02	0,04	Efeito sinérgico
	Composto <b>(3a)</b>	62,5µg/mL	0,97µg/mL	0,02		
<b><i>A. baumannii</i></b> <b>1024B</b>	Ampicilina+Subactam	16µg/mL	0,25µg/mL	0,02	0,52	parcialmente sinérgico
	Composto <b>(3a)</b>	125µg/mL	62,5µg/mL	0,5		

Fonte: O Autor.

CMI (Concentração Mínima Inibitória); CIF (Concentração Inibitória Fracionada); ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada).

## 6 CONCLUSÃO

Como suscitado no início da pesquisa, conseguimos sintetizar e caracterizar com êxito o composto 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metoxifenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina. Este composto inédito mostrou comprovada ação terapêutica frente a diferentes formas proliferativas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* que são responsáveis por duas das doenças parasitárias negligenciadas que mais acomete as populações pobres do globo. O nosso composto também evidenciou a sua atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Com destaque para cepas resistentes de *S. aureus*. Os dados obtidos nesta pesquisa nos motiva a continuar trabalhando neste composto. Posteriormente realizando testes para avaliar a inibição da formação de biofilmes, avaliar também o perfil de morte celular, como também obter imagens de microscopia eletrônica. Este composto promissor nos estima a cogitar também substituições na sua estrutura a fim de avaliar comparativamente suas atividades, descobrindo assim novas formas terapêuticas para essas doenças ainda tão esquecidas.

## REFERÊNCIAS

ALHARBI, Naiyf S. Triagem de estafilococos resistentes a antibióticos na cavidade nasal de pacientes e indivíduos saudáveis. **Journal Saudita de Ciências Biológicas**, v. 27, n. 1, p. 100-105, 2019.

BONA, Eliana Almeida Mira De et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BONAPACE, C. R. et al. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. V. 44, p. 363-366. 2002.

BROSSAS, Jean-Yves et al. Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0185504, 2017.

CAMPOS, Luana Janaína de et al. **Estudos QSAR de derivados de pirimidonas, pirimidinas e piridopirazinas carboxamidas inibidoras da HIV 1 integrase**. Dissertação. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2015.

CHEN, Y., HU, Y., ZHANG, J. *et al.* Características clínicas, fatores de risco, estado imunológico e prognóstico de infecção secundária por sepse: um estudo observacional retrospectivo. **BMC Anesthesiol** **19**, 185. doi: 10.1186 / s12871-019- 0849-9. 2019.

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

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, Issue 11–12, p 2512–2522 27: 2512, 2018.

DNDi. “Leishmanioses: Drugs for Neglected Diseases initiative”. 2020. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>. Acesso em: 03/02/2020.

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.**, 46, 11: 983-991. 2018.

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

DOUGHERTY, P. F., YOTTER, D. W.; MATTHEWS, T. R. Microdilution transfer plate technique for determining in vitro synergy of antimicrobial agents. **Antimicrob Agents Chemother.** 11(2):225-8. 1977.

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.

GRECO, S. J.; TARANTO, A. G.; KUSTER, R. M. Síntese e Docking de novas 2-amino-4-fenil-pirimidinas substituídas no C6 por carbo/heterociclos aromáticos com potencial atividade biológica. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 2019.

GUO, Wei et al. Antimicrobial resistance surveillance and prediction of Gram- negative bacteria based on antimicrobial consumption in a hospital setting: A 15-year retrospective study. **Medicine**, v. 98, n. 37, 2019.

HENRY, F. C., & DeLEO, F. R. Ondas de Resistência: Staphylococcus aureus na era dos antibióticos. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 629-641, 2009.

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

JÚNIOR, S. et al. Síntese e avaliação biológica de Arilidrazoimidazóis, Arilidrazopirimidínicos e Quinolin-4-Hidrazotiazolidinas sobre Amastigotas de Leishmania chagasi e potencial antitumoral. Dissertação. Universidade Federal de Alagoas. 2017.

LORIAN, Victor. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5 ed. Williams & Wilkins, London. 2005.

LOZANO, C., & TORRES, C. *Atualização sobre resistência a antibióticos em Gram-positivos*. **Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica**, 35, 2–8. doi: 10.1016 / s0213-005x (17) 30028-9. 2017.

MARTINS, Rubén et al. Síntesis y actividad antimicrobiana de derivados de pirimidinas análogas de uracilo. **Avances en Química**, v. 11, n. 1, p. 17-24, 2016.

MELO, S. J. DE; SANTOS, L.C.; FALCÃO, E.P.S.; SRIVASTAVA, R. M. AND LUUDUC, C. J. **Chem. Research**. 5, 216-217. 2002.

MICHELETTI, A. C., & BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade leishmanicida. **Revista Virtual de Química**, 4(3), 268-286. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas: O que é? Causas? Sintomas? Tratamento e Prevenção. 2017. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>. 27/03/2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde. 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/20/af-pan-br-17dez18-20x28-csa.pdf>. 01/01/2020.

MONTE, Zenaide Severina do et al. Pirimidinas: de potenciais fármacos a marcadores fluorescentes. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. 2016.

MAS MANUALS. Ciclo de vida da Leishmania. 2020. Disponível em: [https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/v1015907\\_pt](https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/v1015907_pt). 26/03/2020.

MSF. Doença de Chagas. Medecins Sans Frontieres. 2020. Disponível em: <https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas>. 03/01/2020.

ONU. OMS lança estratégia para combater resistência de bactérias a antibióticos. 2019. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/oms-lanca-estrategia-para-combater-resistencia-de-bacterias-a-antibioticos/>. 01/01/2020.

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

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

PINHEIRO, M. P. *Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato desidrogenase de Trypanosoma cruzi e Leishmania major* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2012.

RIBEIRO, K. R. C. *Prospecção de novas drogas contra a leishmaniose cutânea: avaliação da atividade biológica da lectina de Oreochromis niloticus* (Doctoral dissertation). 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.

SIQUEIRA, L.R.P; BARBOSA, M.O; OLIVEIRA, A.R; MORAES, P.A.T.G; FILHO, G.B.O; CARDOSO, M.V.O; PEREIRA, V.R.A; SANTOS, A.C.S; JÚNIOR, P.A.S; ROMANHA, A.J; LEITE, A.C.L. Synthesis and anti Trypanosoma cruzi profile of the novel 4-thiazolidinone and 1,3-thiazole derivatives. Artigo de Revisão. **Frontiers in Drug, Chemistry and Clinical Research**. V. 2. P. 1-12. 2019

SILVA, Elany Barbosa 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

SILVA, Wanda Juliana Lopes. Pírimidinas: Síntese de novos derivados e avaliação das atividades biológicas. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco. 2019.

SVS/MS. Cenários da Leishmaniose Visceral no Brasil. 2020. Disponível em: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/apresentacao/simposio/v/3.\\_francisco\\_edilson\\_ferreira\\_lima\\_jr.\\_cenarios\\_da\\_lv\\_e\\_perspectivas.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/apresentacao/simposio/v/3._francisco_edilson_ferreira_lima_jr._cenarios_da_lv_e_perspectivas.pdf). Acesso em: 26/03/2020.

WHO. Leishmaniose. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 26/03/2020.