



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019007644-5 A2



(22) Data do Depósito: 15/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

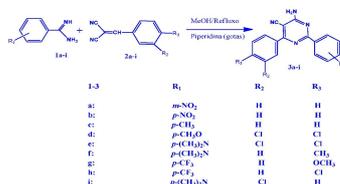
(54) **Título:** PIRIMIDINAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AÇÃO ANTIMICROBIANA E POTENCIAL SINÉRGICO COM ANTIMICROBIANO DE USO CLÍNICO

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/505; C07D 237/08; A61P 31/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** SEBASTIÃO JOSÉ DE MELO; WANDA JULIANA LOPES E SILVA; ZENAIDE SEVERINA DO MONTE; MARCELA DE ARAÚJO SOBRAL; GLÁUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA; RICARDO OLIVEIRA DA SILVA.

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a uma nova série de pirimidina, compostos heterocíclicos, utilizados com agentes antimicrobianos e sinérgico e sua caracterização estrutural. Os cientistas buscam desenvolver novos agentes antibacterianos por conseguinte, sintetizam novas estruturas com modo de ação continua no desenvolvimento de resistência bacteriana crescente contra agentes antibacterianos clássicos. As Pirimidinas são conhecidas por serem bons agentes antibacterianos. A apreciação desses achados nos motivou a sintetizar pirimidinas potencialmente bioativas para a descoberta de agentes antimicrobianos. Tendo em vista as propriedades farmacológicas associadas às pirimidinas, e seus derivados, fomos levados a sintetizar essa nova série heterocíclicas para chegar a resultados mais discerníveis. Aqui, relatamos a síntese de pirimidina 3a-i bem como suas caracterizações confirmadas por IV, RMN ^1H / ^{13}C e no estudo antimicrobiano o derivado pirimidínico 3e conseguiu reduzir a CMI do ampicilina + sulbactam em 16 vezes, tornando assim a cepa *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025b sensível ao antimicrobiano. Já para os derivados pirimidínicos 3e, 3g, e 3h conseguiram reduzir a CMI do ampicilina + sulbactam em 64 vezes, tornando assim a cepa *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1024b sensível ao antimicrobiano. Também como foi evidenciado uma redução na CMI do composto 3e, a redução da CMI do composto em 4 vezes demonstrando que o antibiótico (...).



Pirimidinas: síntese, caracterização química, ação antimicrobiana e potencial sinérgico com antimicrobiano de uso clínico

01. A presente invenção refere-se à síntese e aplicação biotecnológica de compostos heterocíclicos contendo o anel pirimidínico que têm recebido muita atenção devido à ampla aplicação de atividades farmacológica e biológica (US 9624243 B2; 2017).

02. A química dos derivados pirimidínicos recebeu considerável atenção devido à sua importância sintética e biológica (Agalave *et al.*, 2011; PI 0616799-3 A2; Rai *et al.*, 2014; Kumaresa *et al.*, 2004; Goudar *et al.*, 2012; Kota, *et al.*, 2011; Goudgaon e Reddy, 2014; Xiaoling e Mei-Lin, 2006).

03. Relata-se na literatura que a riqueza do potencial farmacológico dos derivados pirimidínicos pode estar possivelmente associada por apresentarem núcleo básico do DNA e RNA (US 8846708 B2, 2014).

04. Há numerosos exemplos na literatura que mostram atividade antimicrobiana associada aos derivados pirimidínicos, tais como antimicrobiano para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Syncephlastrum racemosum*, entre outros (Dansena *et al.*, 2015, Schaenzer *et al.*, 2017).

05. Tendo em vista as propriedades farmacológicas associadas às pirimidinas, suscitou-se a idéia de sintetizarmos uma nova série de compostos pirimidínicos **3a-i** com atividade antimicrobiana superior ou similar aos análogos desses compostos já descritos na literatura.

06. As elucidações estruturais foram realizadas por meio dos métodos físicos: espectroscopia do infravermelho (modelos Perkin Elmer Spectrum 400 e IFS66 com transformada de Fourier) sendo as amostras

preparadas como filmes finos ou pastilhas de KBr e as leituras obtidas na faixa de 650 a 4000 cm^{-1} e de ressonância magnética nuclear (^1H -RMN e de ^{13}C - RMN), por meio do espectrofotômetro Varian VNMRS operando 300MHz e 75MHz, respectivamente.

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

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

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

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

11. Os derivados pirimidínicos **3a-i** (Esquema 1) foram obtidos a partir da reação entre quantidades equimolares (5,63mmol) dos derivados da arilamidina **1a-i**, e do intermediário de Michael **2a-i** utilizando-se como solvente metanol (20mL) em um balão de fundo redondo, mantido sob agitação e em refluxo, no qual foram sendo adicionadas lentamente 10 gotas de piperidina, sendo necessárias em torno de 6 horas para a reação ser concluída, conforme metodologias utilizadas anteriormente por (Nicolle, 1990; Melo *et al* 2002).

12. O meio reacional foi mantido à temperatura ambiente, sendo que em alguns casos, houve a formação de cristais, que foram separados por filtração a vácuo, nos outros casos o solvente de reação foi evaporado sob pressão reduzida e o sólido resultante foi purificado por

cromatografia em coluna, utilizando sílica-gel como adsorvente, e diferentes sistemas de eluição, com a polaridade sendo aumentada gradualmente, e em alguns casos houve ainda a necessidade de cristalização para a purificação definitiva.

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

14. 4-Amino-5-ciano-2-(m-nitrofenil)-6-fenil-pirimidina(3a):
Cristalizado em MeOH, 91% de rendimento, p.f. 221-222°C, Rf = 0.31; n-hexano-acetato de etila, 7:3); IV, KBr, $\mu\text{ cm}^{-1}$: 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''); (1C, C1'); 123.8 (2C, C3'' e C5'') 115.6 (1C, C4) e 86.1 (1C, C5).

15. 4-Amino-5-ciano-2-(p-nitrofenil)-6-fenil-pirimidina (3b):Cristalizado em MeOH, 96% de rendimento, p.f. 220-221, Rf = 0.42; (n-hexano-acetato de etila, 7:3); IV, KBr $\mu\text{ cm}^{-1}$: 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).

16. 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-metilfenil)-6-fenil-pirimidina

(3c): Cristalizado em MeOH, 75% de rendimento, p.f. 220-221, R_f = 0.35; (n-hexano-acetato de etila, 7:3); IR, 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''').

17. 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-anisil)-6-(*m,p*-diclorofenil)-pirimidina

(3d): Cristalizado em MeOH, 85% de rendimento, p.f. 224-225, R_f = 0.41; (n-hexano-acetato de etila 7:3); IR, KBr, $\mu\text{max cm}^{-1}$: 3394 (NH₂asim.), 3128 (NH₂sim.), 2236 (CN), 1621 (C=N); 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 8.75 (s, 1H, H2''); 8.45 (t, 1H, H5''); 8.36 (d, 2H, J 8.4 Hz, H2' e H6'); 8.05 (b, 2H, C2-NH₂); 7.89 (t, 1H, H5''); 7.08 (d, 2H, J 8.4 Hz, H3' e H5'); e δ 3.84 (s, 3H); 13C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.8 (1C, C2'); 164.3 (1C, C2); 164.0 (1C, C1'''); 162.3 (1C, C6); 147.7 (1C, C3''); 138.1 (1C, C4''); 135.0 (1C, C5''); 130.4 (1C, C1''); 130.3 (1C, C6''); 128.65 (1C, C2''); 125.4 (2C, C2' e C6'); 123.3 (1C, C1'); 114.0 (2C, C3' e C5'); 116.2 (1C, C4); 84.1 (1C, C5) e 55.4 (1C, C1''').

18. 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-diclorofenil)-

pirimidina (3e): Cristalizado em MeOH, 59% de rendimento, p.f. 271-272, R_f = 0.38; (n-hexano-acetato de etila, 7:3); IR, KBr, $\mu\text{max cm}^{-1}$:

3436 (NH₂asim.), 3326 (NH₂sim.), 2227 (CN), 1647(C=N) 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 8.76 (s, 1H, H2''); 8.73 (d, 2H, J 8.4 Hz, H2' e H6'); 8.45-8.36 (m, 1H, H5''); 7.92-7.85 (m, 1H, H6''); 7.57-7.52 (b, 2H, C2-NH₂); 7.23 (d, 2H, J 8.4 Hz, H3' e H5') e δ 3.10 (s, 6H); 13C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.9 (1C, C2); 164.5 (1C, C1'''); 164.0 (1C, C6); 158.7 (1C, C4'); 131.7 (1C, C5''); 131.5 (1C, C4''); 128.8 (1C, C16''); 128.6 (1C, C6''); 128.5 (1C, C3''); 128.4 (1C, C2''); 128.2 (2C, C2' e C6'); 128.2 (1C, C1'); 128.0 (2C, C3 e C5''); 128.4 (2C, C3' e C5'); 116.2 (1C, C4); 81.9 (1C, C5); e δ 43.51 (2C, C1''').

19. 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*p*-metilfenil)-pirimidina (3f):Cristalizado em MeOH, 74% de rendimento, p.f. 227-228, R_f = 0.51(n-hexano-acetato de etila 7:3); IV, KBr, γ_{\max} cm⁻¹: 3317 (NH₂asim.), 3139 (NH₂sim.), 2230 (CN), 1602 (C=N); 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 8.48 (b, 2H, C2-NH₂); 7.92 (d, 2H, J 8.4 Hz, H2' e H6'); 7.54 (d, 2H, J 6.9 Hz, H3'' and H5''); 7.06 (d, 2H, J = 6.9 Hz, H2'' and H6''); 7.19 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H3' and H5'); 3. (s, 6H) and 2.07 (s, 3H); ; 13C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.9 (1C, C6); 164.5 (1C, C1'''); 164.0 (1C, C2) e C5''); 130.4 (2C, C2'' e C6''); 1230.0 (2C, C2'' e C6''); 128.6 (2C, C3 e C5'); 128.5 (1C, C1'); 116.2 (1C, C4); 84.4 (1C, C5); 43.5 (2C, C1''') e 22.0(1C, C1''').

20. 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-anisil)-pirimidina (3g):Cristalizado em MeOH, 57% de rendimento, p.f. 239-238, R_f = 0.35(n-hexano-acetato de etila 7:3); IV, KBr, μ_{\max} cm⁻¹: 3217 (NH₂asim.), 3099 (NH₂sim.), 2230 (CN), 1602 (C=N); 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ 8.40 (b, 2H, C2-NH₂); 7.98 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H3' e H5'); 7.67 (d, 2H, J 9.3 Hz, H2'' e H6''); 7.19 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H3'' e H5'') e 6.68 (d, 2H, J 9.3 Hz, H2' e H6'); 13C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.1 (1C, C4''); 164.3 (1C, C2); 160.4 (1C, C1'''); 158.4 (1C, C6); 150.9 (1C, C1'); 143.1 (2C, C2'' e C6''); 140.1 (2C, C2' e

C6'); 139.1 (2C, C3' e C5'); 133.3 (1C,C4'); 124.1 (1C, C1''); 118.4 (2C,C1'''); 114.8 (1C, C4) ; 113.0 (2C, C3'' e C5''); 76.8 (1C, C5) e 55.9 (1C,C1'''').

21. 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-clorofenil)-primidina (3h):Cristalizado em MeOH, 52% de rendimento, m.p. 263-262, R_f = 0.30(n-hexano-acetato de etila 7:3); IV, KBr, μ_{max} cm⁻¹: 3117 (NH₂asim.), 3039 (NH₂sim.), 2230 (CN), 1602 (C=N); 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ 8.55 (b, 2H, C2-NH₂); 8.27 (d, 2H, J = 9.3 Hz, H3' e H5'); 7.94 (d, 2H, J 11.4 Hz, H2'' e H6''); 7.71 (d, 2H, J = 11.4 Hz, H3'' e H5'') e 7.19 (d, 2H, J 9.9 Hz, H2' e H6'); 13C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 164.3 (1C, C2) ; 160.4 (1C, C1'''); 160.1 (1C, C6) ; 139.0 (1C, C1'); 133.3 (1C,C4''); 132.1 (2C, C2' e C6'); 130.0 (2C, C3' e C5'); 129.7 (1C, C4'); 128.1 (2C, C2'' e C6''); 124.1 (1C, C1''); 115.2 (2C,C1'''); 114.8 (1C, C4) ; 113.9 (2C, C3'' e C5'') e 82.2 (1C, C5).

22. 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m*-clorofenil)-pirimidina (3i): Cristalizado em MeOH, 73% de rendimento, p.f. 241-242, R_f = 0.38; (n n-hexano-acetato de etila 7:3); IR, KBr, μ_{max} cm⁻¹: 3265 (NH₂asim.), 3057 (NH₂sim.), 2284 (CN), 1601 (C=N); 1H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 8.36 (d, 1H, J 8.3 Hz H3''); 7.99 (d, 2H, J 8.7 Hz, H2' e H4'); 7.65 (d, 2H, J 8.7 Hz, H3'' e H5'); 7.54-7.48 (*m*, 1H, H2'', H4'', H5'' e C2-NH₂); e δ 3;01 (s , 6H); 13C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 167.0 (1C, C2'); 164.5 (1C, C2); 164.0 (1C,C1'''); 158.4 (1C, C6); 136.5 (1C, C4''); 136.3 (1C,C1''); 135.8 (1C, C6''); 135.3 (1C, C2''); 131.7 (1C, C4''); 130.5 (2C, C2' e C6'); 128.6 (1C, C1'); 128.5 (1C, C2''); 128.4 (2C, C3' e C5'); 116.2 (1C, C4); 84.4 (1C, C5) e 43.4 (2C,C1''')

23. Foi determinada a atividade antagônica de acordo com a norma M 100-S25 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015; 2017).

24. As cepas usadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Coleção de culturas do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).

25. Foram utilizadas as seguintes cepas: *S.aureus* (UFPEDA 02), *S.aureus* (UFPEDA 731) *Acinetobacter baumannii* (UFPEDA 1024b), *Acinetobacter baumannii* (UFPEDA 1025b), *Escherichia.coli* (UFPEDA 224), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *P. aeruginosa* (UFPEDA 416).

26. Para determinar a concentração mínima inibitória (CMI), os microrganismos foram previamente semeados em tubo inclinado contendo ágar Müller Hinton e incubados por 24 h a 37° C.

27. Após esse período foram preparadas suspensões bacterianas e na sequência as amostras foram analisadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, até obter uma densidade ótica entre 0,08 a 0,13 (o que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL).

28. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 180µL de caldo Müeller Hinton (MH) e, em seguida, foram feitas diluições seriadas dos derivados pirimidínicos nas concentrações de 1000 µg/mL a 1,95 µg/mL

29. Adicionalmente, as suspensões previamente preparadas foram diluídas para a concentração $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e 10 µL de cada suspensão bacteriana foram adicionados nos poços, obtendo assim uma concentração final de cada bactéria de 1×10^4 UFC/mL.

30. Como controle positivo utilizou-se o meio de cultura com a suspensão bacteriana sem os compostos e como controle negativo foi utilizado apenas o caldo MH.

31. As microplacas foram incubadas a 37° C por 24 horas.

32. Em seguida, foram adicionados 20 µL de solução de rezasurina a 0,001% e reincubados por duas horas, para observar se houve crescimento bacteriano nos poços.

33. A rezasurina é um corante azul, que quando há oxiredução, muda para a cor rosa, com isso, é possível observar a presença de células viáveis nos poços (ARAÚJO, 2016).

34. Os compostos testados apresentaram uma atividade antimicrobiana com amplo espectro, demonstrando ação antagônica frente a bactérias Gram positivas e negativas nas concentrações de 1000 a 250µg/mL e 500 a 62,5 µg/mL, respectivamente.

35. Maior destaque para o 4-amino-5-ciano-2-(p-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-diclorofenil)-pirimidina (**3e**) com atividade para *A. baumannii* UFPEDA 1025b na concentração de 62,5 µg/mL (Tabela 1).

36. Tal resultado é de grande importância, visto que, *A.baumannii* é uma espécie comumente associada a infecções hospitalares, que acometem o trato respiratório de pacientes hospitalizados, assim como outras enfermidades, como a sepse e a meningite.

37. Essa espécie se caracteriza, por possuir alta resistência a maioria dos antibióticos existentes, o que pode comprometer a terapêutica de pacientes acometidos por esse patógeno (GREIG, 2016; WEBER, 2015).

38. A bactéria *A. baumannii* UFPDA1025b apresenta perfil de sensibilidade ao antibiótico ampicilina + sulbactam na concentração mínima inibitória de 4 µg/mL de tampão fosfato, pH 8,0.

39. O estudo sinérgico foi realizado entre os derivados pirimidínicos e o antibiótico referência, que possuía moderada ou baixa ação antagônica frente às cepas resistentes.

40. Utilizou-se a metodologia do tabuleiro de xadrez com modificações (LORIAN, 2005).

41. Com base no resultado das atividades antagônicas foram preparadas diluições do composto 4-amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-diclorofenil)-pirimidina (**3e**) e do antibiótico ampicilina + sulbactam nas concentrações de quatro vezes a CMI.

42. Em seguida, foram pipetados 100 µL do caldo Muller Hinton nas placas de multipoços acrescidos de 100 µL do antibiótico, fazendo diluição na horizontal.

43. Posteriormente, foram pipetados 100 µL dos compostos supramencionados e sua diluição foi feita da direita para a esquerda e na vertical da placa (Figura 4)

44. Para interpretar os resultados fez-se uso do cálculo de Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI).

45. No qual o FICI A (CMI da menor associação do agente antimicrobiano com o composto/ CMI do antimicrobiano isolado) é somado ao FICI B (CMI do composto associado com o agente antimicrobiano/ CMI do composto isolado).

46. Valores de FICI $\leq 0,5$ foram interpretados como sinérgicos; $0,5 \leq$ FICI $\leq 0,75$ parcialmente sinérgicos; $0,75 <$ FICI < 2 efeito aditivo; $2 \leq$ FICI ≤ 4 efeito indiferente; > 4 é considerado efeito antagônico (FADLI et al., 2012).

47. No teste de sinergismo para *A. baumannii* UFPDA1025b foi evidenciada uma significativa redução na concentração tanto da ampicilina + sulbactam (de 4 µg/mL para 0,25 µg/mL) quanto do composto 4-amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-diclorofenil)-pirimidina (**3e**), descrito nesta patente, (de 62,5 µg/mL para 15,62 µg/mL), obtendo assim um: Índice de Concentração Inibitória

Fracionada -CIFI - 0,31 comprovando, de acordo com FADLI et al., 2012, o efeito sinérgico da substância testada como mostra a tabela 2.

48. O composto 4-amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-diclorofenil)-pirimidina (**3e**) reduziu a CMI do antibiótico ampicilina + sulbactam em 16 vezes, tornando assim a cepa UFPEDA 1025b sensíveis ao antimicrobiano de referência.

49. A redução da CMI do composto **3e** em aproximadamente 4 vezes, também demonstra que o antibiótico possui a capacidade de potencializar os seus efeitos antagônicos.

50. Esquema 1: Síntese dos derivados pirimidínicos **3a-i**

51. Figura 1 : Estruturas moleculares dos derivados **3a-i**

52. Tabela 1. Concentração mínima inibitória [CMI (em $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)] dos compostos sintetizados (**3a-h**) e dos agentes antimicrobianos padrão (em $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$).

53. Tabela 2. Efeito sinérgico do 4-amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina (**3e**) com ampicilina + sulbactam contra *A.baumannii*.

54. Figura 2: Representação do método do tabuleiro de xadrez do agente antimicrobiano ampicilina + sulbactam e o 4-amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-clorofenil)-pirimidina (**3e**).

55. Araujo, M. M.; Longo, P. L. In vitro antibacterial activity of *Origanum vulgare* (oregano) essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 83, 2016.

56. Bruno O, Brullo C, Schenone S, Bondavalli F, Ranise A, Tognolini M, Impicciatore M, Ballabeni V, Barocelli E. *MedChem.Synthesis*, antiplatelet and antithrombotic activities of new 2-substituted benzopyrano[4,3-d]pyrimidin-4-cycloamines and 4-amino/cycloamino-benzopyrano[4,3-d]pyrimidin-5-ones. 2006;14:121.

57. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
58. David VB, Babu VH, Reddy VM. Synthesis of novel 4,6-disubstituted-2-amino pyrimidines as antibacterial agents. *Int J Pharm Chem Res* 2014;3(1):2278-8700.
59. Dansena, H, Dhongade HJ, Chandrakar, K. PHARMACOLOGICAL POTENTIALS OF PYRIMIDINE DERIVATIVE: A REVIEW. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 8, Issue 4, 171-177, 2015.
60. Fadli, M. et al. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection-bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, v. 19, n. 5, p. 464-471, 2012.
61. Goudar V, Rashmi P, Shantharam U, Hazra K, Nargund LG. Synthesis of novel thienopyrimidines and evaluation for their anti-inflammatory activity. *J Chem Pharm Res* 2012;4(6):3100-6.
62. Goudgaon NM, Reddy RV. Analgesic and anti-inflammatory activities of 2-(4-fluorobenzylthio)-n-(substituted phenyl) Pyrimidine-4-amines. *Int J Pharm Chem Biol Sci* 2014;4(1):64-8
63. GREIG, S. L.; SCOTT, L. J. Intravenous minocycline: a review in *Acinetobacter* infections. *Drugs*, v. 76, n. 15, p. 1467-1476, 2016.
64. JOULE, J.A.; MILLES, K.; SMITH, G.F. *Heterocyclic chemistry*, Blackwell Publishing, 4^o ed., 2000.
65. LORIAN, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5 ed. Williams & Wilkins, London 2005.
66. Katiyar SB, Bansal I, Saxena JK, Chauhan PMS. Synthesis of 2,4,6-trisubstituted pyrimidine derivatives as a new

classofantifilarialtopoisomerase II inhibitors. *BioorgMed* 2005,3;15(1):47-50

67. Kota RK, Kompelly KK, Surampudi R, Kulakarni R. Synthesis and anti-inflammatory activity of novel pyrazolo [3,4-d] pyrimidines. *J Chem Pharm Res* 2011;3(4):848-53.

68. PI 0616799-3 A2. Derivado de piridina e derivado de pirimidina (3), uso dos mesmos na preparação de composição farmacêutica, e composição farmacêutica, inibidor contra receptor de fator de crescimento de hepatocito, inibidor de angiogênese, agente antitumor e inibidor contra metástase de cancer compreendendo os referidos compostos. MATSUSHIMA, TOMOHIRO; TAKAHASHI, KEIKO; FUNASAKA, SETSUO; OBAISHI, HIROSHI. SHIROTORI, SHUJI. Concedida: 28/06/2011.

69. PI 9611628-5 A2. Derivados de pirido [2,3-d] pirimidina e composições medicinais dos mesmos. TAKAYAMA, KAZUHISA; HISAMICHI, HIROYUKI; IWATA, MASAHIRO; KUBOTA, HIDEKI; KUBOTA, HIDEKI; AOKI, MOTONORI. Concedida: 01/06/1999.

70. Rai SU, Isloor AM, Shetty P, Pal KS, Fun HK. Synthesis and in vitro biological evaluation of new pyrazole chalcone and heterocyclic diamides as potential anticancer agents. *Arabian J Chem* 2014;8(3):317-21.

71. Schaenzer, A. J.; Wlodarchak, N. Drewry, D. H. Zuercher, W. J. Warren E. Rose, Rob Striker, John-Demian Sauer A screen for kinase inhibitors identifies antimicrobial imidazopyridine aminofurazans as specific inhibitors of the *Listeria monocytogenes* PASTA kinase PrkA. *J Biol Chem*. 2017, 13; 292,41, 17037-17045.

72. Valarmathy J, Joshua LS, Senthilkumar KL. Synthesis of 2-aminopyrimidine derivatives and evaluation for antitubercular, anti-convulsant and anti-inflammatory activity. *Univ Int J Chem* 2011;2(2):61-8.

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

74. WO2012046193 A1. Nueva sal de un derivado de pirimidina. PELÁEZ JUAN PABLO SENOSIAIN, ARROYO HÉCTOR SENOSIAIN, OCHOA MANUEL FRANCISCO LARA. Concedida: 12/04/2012.

75. US9624243 B2. Heterocyclic compounds and methods of their use. THOMAS DAVID MCCARTHY, ALAN NAYLOR. Concedida: 18/04/2017

76. US8846708 B2. Salt of a pyrimidin derivative. PELÁEZ JUAN PABLO SENOSIAIN, ARROYO HÉCTOR SENOSIAIN, OCHOA MANUEL FRANCISCO LARA. Concedida: 30/09/2014.

77. XIAOLING L, MEI-LIN G. XIAOLING L, MEI-LIN G. Bioorg Med Chem. Bioorg Med Chem. 2006;14:153.

REIVINDICAÇÕES

[1] Pirimidina sintética caracterizada por ser formada por heterociclo nitrogenado bioativo 4-Amino-5-ciano-2-(*m*-nitrofenil)-6-fenil-pirimidina (**3a**), obtido a partir dos intermediários *m*-nitrobenzamidina e benzilidenemalononitrila.

[2] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [1] caracterizada por apresentar ação antimicrobiana dos compostos bioativos.

[3] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [1] caracterizada por esta associada a antibiótico para efeito sinérgico.

[4] Pirimidina sintética caracterizada por ser formada por heterociclo nitrogenado bioativo 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-nitrofenil)-6-fenil-pirimidina (**3b**), obtido a partir dos intermediários *p*-nitrobenzamidina e benzilidenemalononitrila.

[5] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [2] caracterizada por apresentar ação antimicrobiana dos compostos bioativos.

[6] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [2] caracterizada por esta associada a antibiótico para efeito sinérgico.

[7] Pirimidina sintética caracterizada por ser formada por heterociclo nitrogenado bioativo 4-Amino-5-ciano-2-fenil-6-(*p*-metilfenil)-pirimidina (**3c**), obtido a partir dos intermediários *p*-metilbenzamidina e benzilidenemalononitrila.

[8] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [3] caracterizada por apresentar ação antimicrobiana dos compostos bioativos.

[9] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [3] caracterizada por esta associada a antibiótico para efeito sinérgico.

[10] Pirimidina sintética caracterizada por ser formada por heterociclo nitrogenado bioativo 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-anisil)-6-(*m,p*-

diclorofenil)-pirimidina (**3d**) obtido a partir dos intermediários *m,p*-clorobenzamidina e *p*-metoxibenzilidenemalononitrila.

[11] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [4] caracterizada por apresentar ação antimicrobiana dos compostos bioativos.

[12] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [4] caracterizada por esta associada a antibiótico para efeito sinérgico.

[13] Pirimidina sintética caracterizada por ser formada por heterociclo nitrogenado bioativo 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m,p*-diclorofenil)-pirimidina (**3e**) obtido a partir dos intermediários *m,p*-clorobenzamidina e *p*-dimetilaminobenzilidenemalononitrila.

[14] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [5] caracterizada por apresentar ação antimicrobiana dos compostos bioativos.

[15] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [5] caracterizada por esta associada a antibiótico para efeito sinérgico.

[16] Pirimidina sintética caracterizada por ser formada por heterociclo nitrogenado bioativo 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*p*-metilfenil)-pirimidina (**3f**) obtido a partir dos intermediários *p*-metilbenzamidina e *p*-dimetilaminobenzilidenemalononitrila.

[17] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [6] caracterizada por apresentar ação antimicrobiana dos compostos bioativos.

[18] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [6] caracterizada por esta associada a antibiótico para efeito sinérgico.

[19] Pirimidina sintética caracterizada por ser formada por heterociclo nitrogenado bioativo 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(*p*-clorofenil)-pirimidina (**3g**) obtido a partir dos intermediários *p*-clorobenzamidina e *p*-trifluorobenzilidenemalononitrila.

[20] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [7] caracterizada por apresentar ação antimicrobiana dos compostos bioativos.

[21] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [7] caracterizada por esta associada a antibiótico para efeito sinérgico.

[22] Pirimidina sintética caracterizada por ser formada por heterociclo nitrogenado bioativo 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-trifluorometilfenil)-6-(anisil)-pirimidina (**3h**) obtido a partir dos intermediários *p*-metoxibenzamidina e *p*-trifluorobenzilidenemalononitrila.

[23] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [8] caracterizada por apresentar ação antimicrobiana dos compostos bioativos.

[24] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [8] caracterizada por esta associada a antibiótico para efeito sinérgico.

[25] Pirimidina sintética caracterizada por ser formada por heterociclo nitrogenado bioativo 4-Amino-5-ciano-2-(*p*-dimetilaminofenil)-6-(*m*-clorofenil)-pirimidina (**3i**) obtido a partir dos intermediários *m*-clorobenzamidina e *p* dimetilaminobenzilidenemalononitrila.

[26] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [9] caracterizada por apresentar ação antimicrobiana dos compostos bioativos.

[27] Uso da pirimidina sintética definida na reivindicação [9] caracterizada por esta associada a antibiótico para efeito sinérgico.

Figura 1

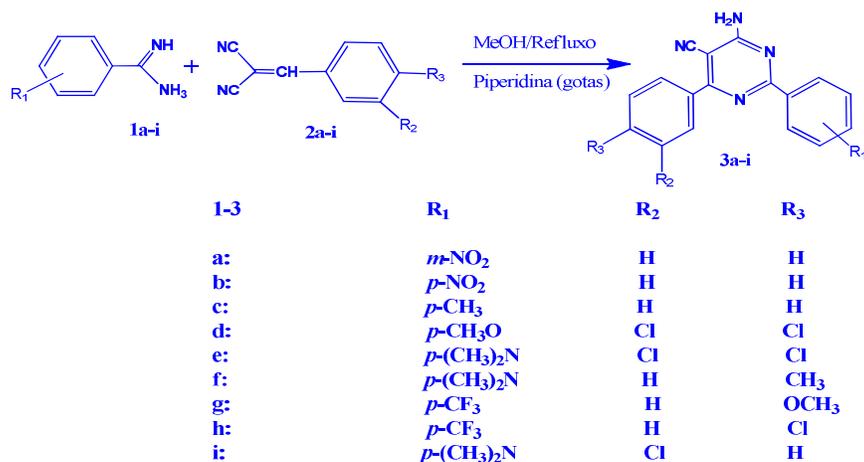


Figura 2

COMPOSTOS	<i>S. aureus</i> (02)	<i>E. faecalis</i> (138)	<i>E. coli</i> (224)	<i>K. pneumoniae</i> (396)	<i>P. aeruginosa</i> (416)	<i>A. baumannii</i> (1024b)	<i>A. baumannii</i> (1025b)
3a	125 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL
3b	125 µg/mL	>500 µg/mL	62,5 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	> 500 µg/mL	250 µg/mL
3c	250 µg/mL	500 µg/mL	125 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL
3d	125 µg/mL	500 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL
3e	125 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62,5 µg/mL
3f	125 µg/mL	500 µg/mL	>500 µg/mL	> 500 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	125 µg/mL
3g	125 µg/mL	1000 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL
3h	1000 µg/mL	>1000 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	250 µg/mL	1000 µg/mL	125 µg/mL
Cefoxitina						>256 µg/mL	32 µg/mL
Ampicilina + subactam						16 µg/mL	4 µg/mL
Gentamicina	0,25 µg/mL	8 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL		

Figura 3

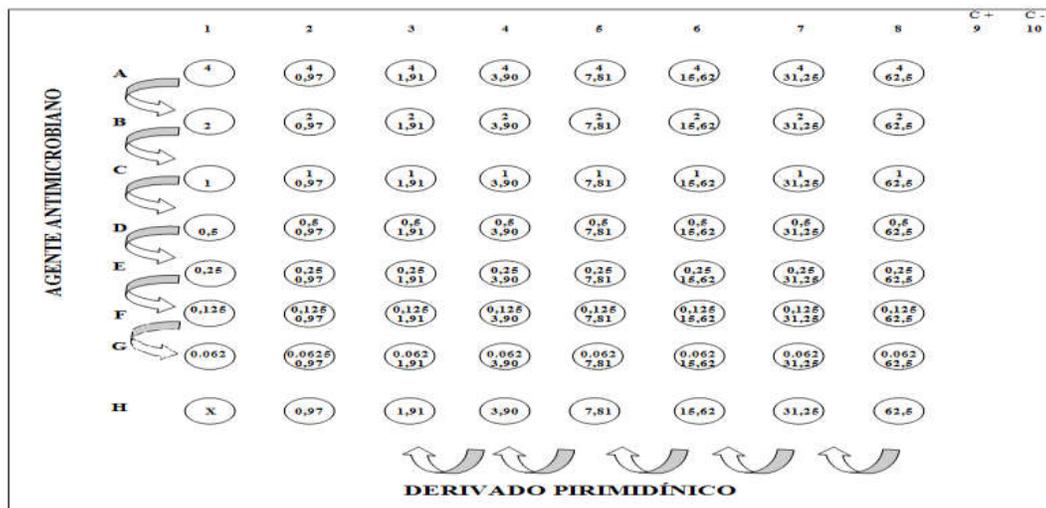
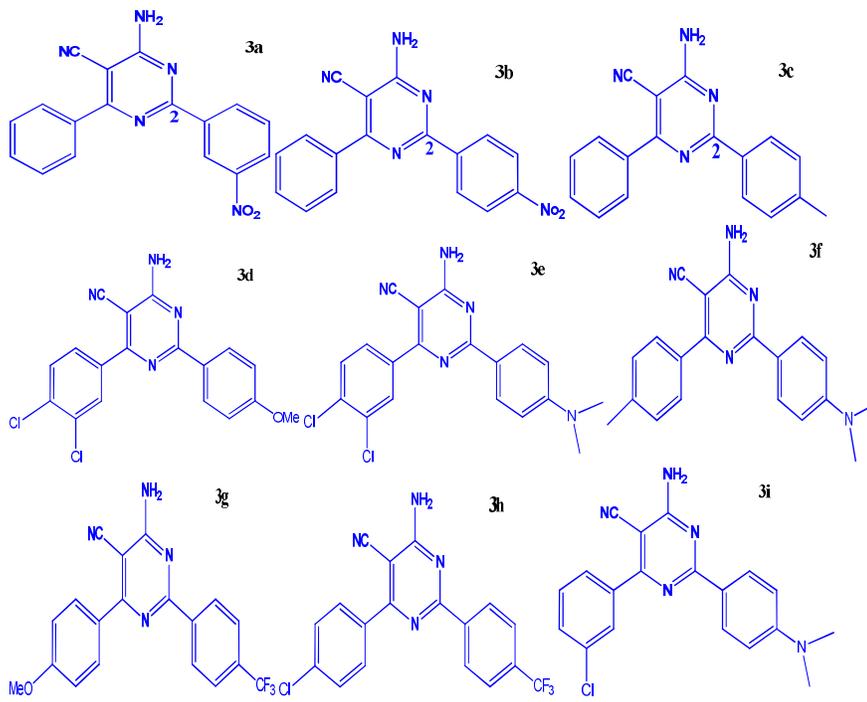


Figura 4

Microorganismo	Substância-teste	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CIF	ICIF	Resultado
Sozinho Combinado						
<i>A.baumannii</i> (1025b)	3e	62,5 $\mu\text{g/m}$	15,62	0,25	0,3124	Sinérgico
		L	$\mu\text{g/mL}$			
	Ampicilina + sulbactam	4 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,0625		
<i>A.baumannii</i> (1024b)	3e	125 $\mu\text{g/mL}$	31,25 $\mu\text{g/mL}$	0,25	0,26	Sinérgico
		Ampicilina + sulbactam	16 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,0156	
<i>A.baumannii</i> (1024b)	3g	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	1	1,0156	Efeito aditivo
		Ampicilina + sulbactam	16 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,0156	
<i>A.baumannii</i> (1024b)	3h	125 $\mu\text{g/mL}$	62,5 $\mu\text{g/mL}$	0,5	0,0515	Parcialmente sinérgico
		Ampicilina + sulbactam	16 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,0156	

Figura 5



RESUMO**Pirimidinas: síntese, caracterização química, ação antimicrobiana e potencial sinérgico com antimicrobiano de uso clínico**

A presente invenção refere-se a uma nova série de pirimidina, compostos heterocíclicos, utilizados com agentes antimicrobianos e sinérgico e sua caracterização estrutural. Tendo em vista as propriedades farmacológicas associadas às pirimidinas, e seus derivados, fomos levados a sintetizar essa nova série heterocíclicas para chegar a resultados mais discerníveis. Aqui, relatamos a síntese de pirimidina **3a-i** bem como suas caracterizações confirmadas por IV, RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ e no estudo antimicrobiano o derivado pirimidínico **3e** conseguiu reduzir a CMI do ampicilina + sulbactam em 16 vezes, tornando assim a cepa *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025b sensível ao antimicrobiano. Já para os derivados pirimidínicos **3e**, **3g** e **3h** conseguiram reduzir a CMI do ampicilina + sulbactam em 64 vezes, tornando assim a cepa *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1024b sensível ao antimicrobiano. Também como foi evidenciado uma redução na CMI do composto **3e**, a redução da CMI do composto em 4 vezes demonstrando que o antibiótico possui a capacidade de potencializar o seu efeito antagônico frente a *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1025b. Já a CMI dos compostos **3e**, **3g** e **3h** foram em 4, 1 e 2 vezes, respectivamente, demonstrando que o antibiótico possui a capacidade de potencializar o seu efeito antagônico frente a *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1024b.