



Síntesis y actividad antimicrobiana de derivados de 4,6-diaminopirimidinas análogos de citosina

Gricela Lobo^{*1}, Jaime Charris¹, Antonieta Taddei³, Melina Monasterios², Margaret Valderrama¹, Jesús Romero¹, Katuska Charris¹

- 1) Unidad de Síntesis de Medicamentos, Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.
- 2) Unidad de Química Medicinal, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.
- 3) Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Caracas-Venezuela.

(*) gricela.lobo@ucv.ve

Recibido: 21/05/2012

Revisado: 19/08/2012

Aceptado: 23/08/2012

Resumen

Se reporta una síntesis nueva de 4,6-diaminopirimidinas **2a-j**, análogas de citosina. Esta involucra una reacción de ciclización entre bencilidenomalononitrilos **1a-j** (BMNs) con urea, asistida por base. Los compuestos **1a-j** fueron preparados mediante una reacción de condensación de Knoevenagel con benzaldehídos y malononitrilo a temperatura ambiente, empleando EtOH como disolvente. También se reportan los resultados de la actividad antimicrobiana de las nuevas 4,6-diaminopirimidinas **2a-j** frente a microorganismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus cereus* (ATCC 14579) y Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35218) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y la levadura *Candida tropicalis* (MLDM 372). Los resultados muestran que los productos **2c**, **2e**, **2f**, **2g**, **2i** y **2j** son considerados de amplio espectro.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana; bencilidenomalononitrilos (BMNs); citosina; diaminopirimidina (DAP); urea.

Abstract

A new synthesis of novel 4,6-diaminopyrimidines **2a-j**, cytosine analogous, is described. This involves the base-assisted cyclization reaction of benzylidenemalononitriles **1a-j** (BMNs) with urea. Compounds **1a-j** were prepared by a Knoevenagel condensation reaction from benzaldehyde and malononitrile using EtOH as solvent at room temperature conditions. The antimicrobial activity against Gram-positive microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Bacillus cereus* (ATCC 14579) and Gram-negative: *Escherichia coli* (ATCC 35218) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and the yeast *Candida tropicalis* (MLDM 372) is also reported. The compounds **2c**, **2e**, **2f**, **2g**, **2i** and **2j** are considered wide spectrum.

Keywords: Antimicrobial activity; Benzylidenemalononitriles (BMNs); Cytosine; Diaminopyrimidine; urea.

Introducción

Las enfermedades fúngicas y microbianas originan la mayor morbilidad en cualquier especialidad médica y frecuentemente también la mortalidad en pacientes inmunosuprimidos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 90% de las defunciones prematuras especialmente en niños y adultos jóvenes son causadas por seis enfermedades infecciosas mortales (neumonía, tuberculosis, enfermedades diarreicas, malaria, sarampión y VIH/SIDA)¹. La creciente incidencia de infecciones son causadas por el desarrollo rápido de resistencia a la

mayoría de los antibióticos conocidos por parte de los microorganismos patógenos y esto realmente se ha convertido en un problema de salud muy serio. Las infecciones causadas por microorganismos resistentes no responden al tratamiento ordinario, lo que trae como consecuencia una enfermedad prolongada y el riesgo de morir. Cada año se producen unos 440.000 casos nuevos de tuberculosis multirresistente que causan al menos 150.000 muertes. La resistencia a los antimaláricos disponibles es generalizada en la mayoría de los países donde la malaria es endémica. Un alto porcentaje de infecciones hospitalarias se debe a bacterias muy

resistentes, como *Staphylococcus aureus*^{2,3}. Aunque muchos factores pueden ser los responsables de las mutaciones del genoma microbiano, se ha demostrado ampliamente que el mal uso de los antibióticos puede incrementar el desarrollo de genotipos resistentes^{4,5}. Esta situación ha incentivado la búsqueda de nuevos compuestos con potencial empleo clínico que sean más específicos y ofrezcan la menor cantidad de efectos adversos al hospedador.

Hay una amplia diversidad de familias y grupos de antimicrobianos de interés clínico, siendo la pirimidina uno de los núcleos presentes en compuestos antimicrobianos. La pirimidina tiene tres derivados que forman parte de los ácidos nucleicos que son timina, uracilo y citosina (figura 1). Los compuestos que contienen estos núcleos, exhiben propiedades farmacológicas variadas, siendo estos agentes citostáticos, antivirales, anticonvulsivantes, antimaláricos, antituberculosos, analgésicos, anti-HIV y antimicrobianos⁶⁻¹⁵. El mecanismo de acción de las pirimidinas y análogos consiste en la inhibición de la de la enzima dihidrofoloreductasa (DHFR) del microorganismo invasor. La DHFR está involucrada en la biosíntesis del ADN bacteriano, por lo que su inhibición impide la supervivencia del microorganismo¹⁶.

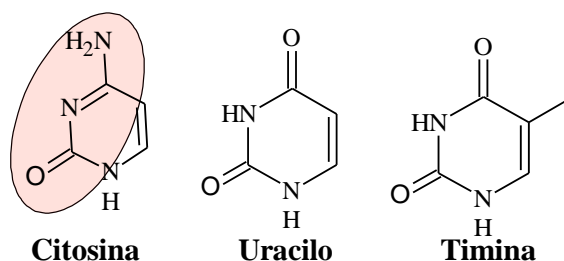


Fig. 1: Núcleos de pirimidinas presentes en los ácidos nucleicos

Entre los derivados de pirimidinas inhibidores de DHFR se encuentran las diaminopirimidinas como iclaprin, trimetoprin, pirimetamina y emtricitabina análoga de la citosina en el que se incorporó un fluor y tetrahidrofuril en la posiciones C₅ y C₆ respectivamente (figura 2)¹⁷⁻²⁰. Estos antifolatos son utilizados para la profilaxis y tratamiento de infecciones oportunistas en pacientes con sistemas inmunológicos debilitados como resultado de la infección con el virus de inmunodeficiencia o con terapias inmunosupresoras^{21,22}.

En la literatura especializada se encuentran diferentes artículos de síntesis y actividad antimicrobiana de diaminopirimidinas²³⁻²⁷. Ahora bien, como parte de un proyecto de investigación para la síntesis de compuestos heterociclos con potencial actividad antimicrobiana²⁸, en este trabajo se presentan los resultados de la síntesis y la actividad antimicrobiana de una serie 4,6-diamino-5-

(bencilideno)-pirimidin-2-(5*H*)-ona, análogos a la citosina de estructura general 2.

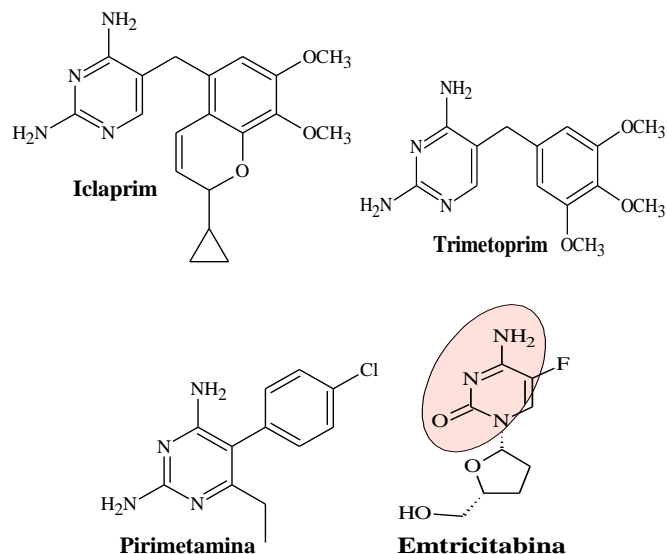


Fig. 2: Estructuras de diaminopirimidinas inhibidoras de DHFR

En estas nuevas estructuras, se introduce el grupo bencilideno sustituido en la posición C₅ y otro grupo amino en la posición C₆ de la citosina, manteniendo el resto de la estructura (figura 3).

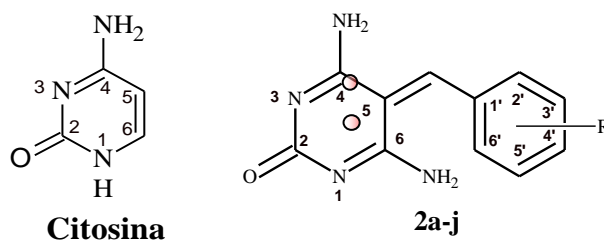


Fig. 3: Cambios estructurales realizados en las posiciones C₅ y C₆ de la citosina.

Parte experimental

Caracterización general

Los puntos de fusión de los productos obtenidos fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros de infrarrojo (IR) se tomaron usando pastillas de KBr, en un espectrofotómetro Shimadzu 470, las absorciones más importantes son señaladas y designadas en cm⁻¹ y se reportan los grupos funcionales más importantes. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protones y carbono 13 (RMN-¹H y RMN-¹³C, respectivamente) fueron registrados en un espectrómetro JEOL Eclipse 270 Mhz. El desplazamiento químico (δ) está reportado en ppm con relación al CHCl₃ o DMSO-d₆ residual como referencia interna y las señales se representan como singlete (*s*), singlete ancho (*sa*), doblete (*d*), doblete de doblete (*dd*), triplete (*t*), doblete de doblete

de dobletes (*ddd*), doblete de tripletes (*dt*), cuarteto (*c*) y multiplete (*m*), constante de acoplamiento (*J*) y valor de la constante de acoplamiento en hertz (Hz). Los espectros de masas (EM) se registraron en un espectrómetro Varian Saturno 2000, la relación *m/z* que se reportan corresponden al ión molecular (M^+) y el pico base correspondiente al patrón de fragmentación de cada molécula. Los reactivos químicos fueron obtenidos de Aldrich Chemical Co. y Riedel-de Haën. Los disolventes utilizados fueron destilados y secos de la manera usual.

a) Parte química

Procedimiento general para la síntesis de los derivados intermediarios *bencilidenomalononitrilos* (BMNs) **1a-j**.

En un matraz balón se colocaron (2mmoles) del benzaldehído correspondiente, (0,66g, 2mmoles) malononitrilo y (40mL) de EtOH en ausencia de catalizador. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente y bajo agitación magnética en un intervalo de tiempo comprendido de 8 y 12h. La formación de un sólido indica la formación del producto. El sólido formado en cada caso, se filtra a vacío y se lava con una pequeña cantidad EtOH frío. Los derivados BMNs pueden recrystalizarse de EtOH, pero la pureza de los productos crudos es suficiente, que puede utilizarse en el paso siguiente sin recrystalización. El rendimiento (Rto.) obtenido está entre 80-90%. El análisis de los datos espectroscópicos de infrarrojo (IR), Resonancia magnética de protones (RMN- 1H), de carbono 13 (RMN- ^{13}C) y espectros de masas (EM) se ajustan a las estructuras esperadas para los productos **1a-j** (figura 4)

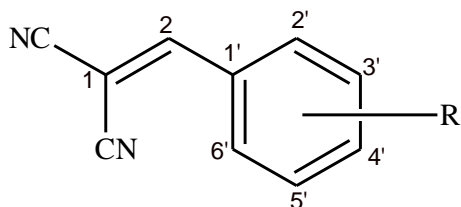


Fig. 4: Estructura y esquema de asignación de los datos de RMN- 1H y RMN- ^{13}C de los intermediarios BMNs³¹ **1a-j**.

4-dimetilamino-bencililidenomalononitrilo (1a): sólido anaranjado, 95%. P.F: 178-179°C. IR (KBr, cm^{-1}): 2224 ($C\equiv N$); 2269 ($C=C$); 1580; 1460. RMN- 1H (270 MHz, $CDCl_3$), δ : 3,0 (*s*, 6H, $N(CH_3)_2$); 6,6 (*dd*, 2H, $J = 8,91$ y 1,88 Hz, $H_{3,5}$); 7,7 (*dd*, 2H, $J = 8,91$ y 1,88 Hz, $H_{2,6}$); 9,7 (*s*, 1H, $=CH$, H_2). RMN- ^{13}C (67,5 MHz, $CDCl_3$) δ : 81,0 (C-1); 40,2 ($(CH_3)_2N$); 112,0 y 111,7 ($2C\equiv N$); 116,0(C-Ar); 120,0 (2C-Ar); 133,8(2C-Ar); 155,0 (C-Ar) y 158,1 (C-2). EM, IE (*m/z*, %): 198 ($M^+ + 1$, 10%); 197 (M^+ , 60%); 196 ($M^+ - 1$, 100%).

4-metil-bencililidenomalononitrilo (1b): Sólido blanco, Rto. 90%, P.F: 140°C, IR (KBr, cm^{-1}): 2224 ($C\equiv N$); 2269 ($C=C$); 1580; 1460. RMN- 1H (270 MHz, $CDCl_3$), δ : 2,5 (*s*, 3H, CH_3); 7,3_d (*dd*, 2H, $J = 8,91$ y 1,88 Hz, $H_{3,5}$); 7,7 (*s*, 1H, $=CH$, H_2); 7,7 (*dd*, 2H, $J = 8,91$ y 1,88 Hz, $H_{2,6}$). RMN- ^{13}C (65,7, $CDCl_3$), δ : 21,7(CH_3); 80,6 (C-1); 112,0 y 111,0 ($2C\equiv N$); 129,0 (C-Ar); 130,7 (2C-Ar); 130,3 (2C-Ar); 148,0 (C-Ar) y 158,0 (C-2). EM, IE (*m/z*, %): 169 ($M^+ + 1$, 15%); 168 (M^+ , 50%); 167 ($M^+ - 1$, 100%).

4-nitro-bencililidenomalononitrilo (1c): Sólido dorado, Rto. 99%, P.F: 159-160°C, IR (KBr, cm^{-1}): 2224 ($C\equiv N$); 2269 ($C=C$); 1580; 1460. RMN- 1H (270 MHz, $CDCl_3$), δ : 7,9 (*s*, 1H, $=CH$, H_2); 8,1 (*dd*, 2H, $J = 8,91$ y 2,44 Hz $H_{3,5}$); 8,4 (*dd*, 2H, $J = 8,91$ y 2,44 Hz, $H_{2,6}$). RMN- ^{13}C (67,5-MHz, $CDCl_3$), δ : 82,0 (C-1); 112,00 y 111,73 ($2C\equiv N$); 120,00 (C-Ar); 125,00 (2C-Ar); 132,0 (2C-Ar); 158,0 (C-Ar); 164,0 (C-2). EM, IE (*m/z*, %): 200 ($M^+ + 1$, 10%); 99 (M^+ , 40%); 198 ($M^+ - 1$, 100%).

4-metoxi-bencililidenomalononitrilo (1d): Sólido amarillo, Rto. 85%, P.F: 113-116°C, IR: (KBr, cm^{-1}): 2224 ($C\equiv N$); 2269 ($C=C$); 1580; 1460. RMN- 1H (270 MHz, $CDCl_3$), δ : 3,80 (*s*, 3H, OCH_3); 6,9 (*dd*, 2H, $J = 8,91$ y 1,98 Hz, $H_{3,5}$); 7,64 (*s*, 1H, $=CH$, H_2); 7,86 (*dd*, 2H, $J = 8,91$ y 1,98 Hz, $H_{2,6}$). RMN- ^{13}C (67,5 MHz, $CDCl_3$), δ : 53,9 (OCH_3); 80,64 (C-1); 112,0 y 111,7 ($2C\equiv N$); 116,00 (2C-Ar); 125,1 (C-Ar); 133,0 (C-Ar); 154,3 (C-Ar); 160,0 (C-Ar); 165,0 (C-2). EM, IE (*m/z*, %): 185 ($M^+ + 1$, 5%); 184 (M^+ , 60%); 183 ($M^+ - 1$, 100%).

4-fluor-bencililidenomalononitrilo (1e): Sólido blanco, Rto. 80%, P.F: 123-124°C, IR (KBr, cm^{-1}): 2224 ($C\equiv N$); 2269 ($C=C$); 1580; 1460. RMN- 1H (270 MHz, $CDCl_3$), δ : 7,22 (*td*, 2H, $J = 5,20$, 5,20 y 6,49 Hz, F, $H_{3,5}$); 7,75(*s*, 1H, $=CH$, H_2), 7,95 (*dd*, 2H, $J = 5,20$, 5,20 y 6,49Hz, F, $H_{2,6}$). RMN- ^{13}C (67,5 MHz, $CDCl_3$), δ : 80,6 (C-1); 112,0 y 111,7 ($2C\equiv N$); 116,0 (2C-Ar); 128,0 (C-Ar); 133,3 (2C-Ar); 154,3 (C-Ar); 164,0 (C-2). EM, IE (*m/z*, %): 173 ($M^+ + 1$, 10%); 174 (M^+ , 20%); 175 ($M^+ - 1$, 100%).

4-hidroxi-bencililidenomalononitrilo (1f): Sólido blanco, Rto. 89%, P.F: 186-188°C, IR (KBr, cm^{-1}): 3328 (OH); 2224 ($C\equiv N$); 1612 ($C=C$); 1580; 1460. RMN- 1H (270 MHz, $CDCl_3$), δ : 5,8 (*s*, 1H, OH); 6,9 (*dd*, 2H, $J = 9,01$ y 1,98 Hz, $H_{3,5}$); 7,6 (*s*, 1H, $=CH$); 7,89_{a,e} (*dd*, 2H, $J = 8,78$ y 2,00 Hz, $H_{2,6}$). RMN- ^{13}C (67,5 MHz, $CDCl_3$), δ : 81,0 (C-1); 111,7 ($2C\equiv N$); 116,0 (2C-Ar); 124,8 (C-Ar); 133,9 (2C-Ar); 154,3 (C-Ar); 164,2 (C-2). EM, IE (*m/z*, %): 171 ($M^+ + 1$, 5%); 170 (M^+ , 40%); 169 ($M^+ - 1$, 100%).

4-cloro-bencililidenomalononitrilo (1g): Sólido amarillo, Rto. 98%, P.F: 150-151°C, IR (KBr, cm^{-1}): 2224 ($C\equiv N$); 2269 ($C=C$); 1580; 1460. RMN- 1H (270 MHz, $CDCl_3$), δ : 7,5 (*dd*, 2H, $J = 9,01$ y 1,98 Hz, $H_{2,6}$); 7,7 (*s*, 1H, $=CH$); 7,8 (*dd*, 2H, $J = 8,78$ y 1,99 Hz, $H_{2,6}$). RMN- ^{13}C (67,5

MHz, CDCl_3), δ : 80,4 (C-1); 111,7 (2C \equiv N)); 130,4 (2C-Ar); 132,3 (C-Ar); 133,3 (2C-Ar); 154,3 (C-Ar); 164,0 (C-2). EM, IE (m/z, %): 190 ($\text{M}^+ + 2$, 38%); 189 ($\text{M}^+ + 1$, 10%); 188 (M^+ , 50%); 187 ($\text{M}^+ - 1$, 100%).

2-metoxi-bencilidenomalonitrilo (1h): Sólido amarillo, Rto. 90%, P.F: 113-116°C, IR (KBr, cm^{-1}): 2224 (C \equiv N); 2269 (C=C); 1580; 1460. RMN- ^1H (270 MHz, CDCl_3), δ : 3,85 (s, 3H, OCH $_3$); 6,9 (dd, 1H, $J = 8,02$ y 1,98 Hz); 7,2 (ddd, 1H, $J = 8,01$; 7,07 y 1,98 Hz, H $_3$); 7,2 (ddd, 1H, $J = 8,01$; 7,07 y 1,98 Hz, H $_4$); 7,8 (dd, 1H, $J = 10,00$ y 2,02 Hz, H $_5$); 8,0 (s, 1H, =CH). RMN- ^{13}C (67,5 MHz, CDCl_3), δ : 55,7 (OCH $_3$); 76,0 (C-1); 111,7 (2 C \equiv N); 115,0 (C-Ar); 120,0 (C-Ar); 121,9 (C-Ar); 130,0 (C-Ar); 133,9 (C-Ar); 158,2 (C-Ar); 164,3 (C-2). EM, IE (m/z, %): 185 ($\text{M}^+ + 1$, 12%); 184 (M^+ , 60%); 183 ($\text{M}^+ - 1$, 100%).

3,4-diclorobencilidenomalonitrilo (1i): sólido amarillo. Rto. 95%, P.f: 170°C, IR (KBr) cm^{-1} : 2224 (C \equiv N); 2269 (C=C); 1580; 1460. ^1H RMN (270 MHz, CDCl_3), δ : 7,58 $_f$ (dd, 1H, $J = 10,8$ y 1,98); 7,76 $_b$ (d, 1H, $J = 2,23$); 7,96 $_e$ (d, 1H, $J = 9,41$ Hz); 8,04 $_g$ (s, 1H). ^{13}C RMN (270 MHz, CDCl_3): 80,64 (C(CN) $_2$); 111,73 (2C \equiv N); 128,66 (C-Ar); 129,10(C-Ar); 130,00 (C-Ar); 131,45(C-Ar); 134,16(C-Ar); 136,00(C-Ar); 165,00 (C $_g$). EM, IE (m/z, %): 227 ($\text{M}^+ + 4$, 38%); 125 ($\text{M}^+ + 2$, 20%); 224 ($\text{M}^+ + 1$, 16%); 223 (M^+ , 21%); 222($\text{M}^+ - 1$, 100%)

3,4,5-trimetoxibencilidenomalonitrilo (1j): sólido amarillo. Rto. 98%, P.F:136-138°C. IR (KBr) cm^{-1} : 2224 (C \equiv N); 2269 (C=C); 1580; 1460. ^1H RMN (270 MHz, CDCl_3), δ : 6,55 (s, 2H, H $_{2,6}$); 6,1 (s, 1H, =CH); 3,75 (s, 6H, 2OCH $_3$); 3,65 (s, 3H, OCH $_3$). ^{13}C RMN (270 MHz, CDCl_3), δ : 50,30 (2OCH $_3$); 60,90 (OCH $_3$); 80,64 (C-2); 110,20 (2C-Ar); 112,00 y 111,73 (2CN); 128,70 (C-Ar); 146,86 (C-2); 151,00 (C-Ar), 154,28 (2C-Ar); 158,15 (C-Ar). EM, IE (m/z, %): 245 ($\text{M}^+ + 1$, 10%); 244 (M^+ , 50%); 243 ($\text{M}^+ - 1$, 100%)

Procedimiento general para la síntesis de los derivados de diaminopirimidinas análogos de citosina 2a-j.

El BMN (**1a-j**) correspondiente se disolvió en MeOH (40mL) (1,19mmoles), urea (0,14g, 2,33mmoles) y K_2CO_3 (0,20g, 1,17mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura de reflujo del EtOH por 24h. Se dejó enfriar la mezcla y la formación de un sólido indicó la formación del producto. El sólido formado en cada caso, se filtró a vacío y se lava con una pequeña cantidad agua. Todos los sólidos se recristalizan en una mezcla de etanol, DMF y agua en caliente. Los cristales obtenidos se filtraron al vacío se lavaron con suficiente agua y se secaron en la estufa al vacío. El rendimiento (Rto.) estuvo entre 60-90%. El análisis de los datos espectroscópicos de IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C RMN y EM

conducen con las estructuras de las diaminopirimidinas análogas a la citosina esperadas **2a-j** (Figura 5).

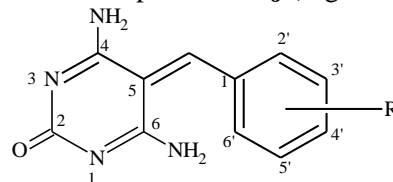


Fig. 5: Esquema de asignación de los datos de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de las diaminopirimidinas análogas a la citosina **2a-j**.

4,6-diamino-5-(4-dimetilaminobencilideno) pirimidin-2(5H)-ona (2a): sólido verde, Rto.: 95%. P.f: 210-212 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 3500-3400 (NH $_2$); 1780 (C=O), 1651 (C=N). ^1H RMN (270 MHz, DMSO- d_6), δ : 3,07 (s, 6H, N(CH $_3$) $_2$); 4,91 (sa, 4H, 2NH $_2$); 6,83 (dd, 2H, $J = 8,90$ y 2,00 Hz, H $_{3,5}$); 7,94 (s, 1H, =CH); 8,06 (dd, 2H, 2H, $J = 8,90$ y 2,00 Hz, H $_{2,6}$); ^{13}C RMN (270 MHz DMSO- d_6), δ : 40,79 (CH $_3$) $_2$ N); 121,43 (C-Ar); 129,00; 129,02 (2C-Ar); 130,64 (2C-Ar); 139,40 (carbono olefínico); 148,82 (C-Ar); 161,80(C—NH $_2$, C $_4$ y C $_6$); 166,43 (C=O). EM (m/z, %): 258 ($\text{M}^+ + 1$, 10%); 257 (M^+ , 25%); 197 ($\text{M}^+ - 2\text{NH}_2 - \text{CO}$, 100%).

4,6-diamino-5-(4-metilbencilideno) pirimidin-2(5H)-ona (2b): sólido anaranjado, Rto.: 80%. P.f: 172-175°C. IR (KBr, cm^{-1}): 3500-3400 (NH $_2$), 1780 (C=O); 1651 (C=N). ^1H RMN (270 MHz, CDCl_3), δ : 2,30 (s, 3H, CH $_3$); 5,00 (sa, 4H, 2NH $_2$); 6,74 (dd, 2H, $J = 8,9$ y 2,0 Hz, H $_{3,5}$); 7,93(dd, 2H, $J = 8,9$ y 2,0 Hz, H $_{2,6}$); 8,07 (s, 1H, =CH). ^{13}C RMN (270 MHz CDCl_3), δ : 21,17 (CH $_3$); 127,01 (C-Ar); 128,16); 130,89 (2C-Ar); 132,28 (2C-Ar); 139,07 (C-olefínico); 144,07 (C-Ar); 156,61 (C—NH $_2$, C $_4$ y C $_6$); 160,02 (C=O). EM, IE (m/z, %): 213 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 70%); 229 ($\text{M}^+ - 1$, 20%); 228 (M^+ , 29%); 227 ($\text{M}^+ - 1$, 50%); 168 ($\text{M}^+ - 2\text{NH}_2 - \text{CO}$, 100%).

4,6-diamino-5-(4-nitrobencilideno) pirimidin-2(5H)-ona (2c): sólido amarillo, Rto. 90%. P.f: 132-133°C. IR (KBr, cm^{-1}): 3360 (NH $_2$), 1780 (C=O); 1651 (C=N). ^1H RMN (270 MHz, CDCl_3), δ : 4,90 (sa, 4H, 2 NH $_2$); 6,92 (dd, 2H, $J = 8,1$ y 1,99 Hz, H $_{3,5}$); 7,38 (dd, 2H, $J = 8,1$ y 1,99 Hz, H $_{2,6}$); 7,64 (s, 1H, =CH). ^{13}C RMN (270 MHz, DMSO- d_6), δ : 121,46 (C-Ar); 125,03, 127,00 (2C-Ar); 139,07 (2C-Ar); 150,21(C-Ar); 156,61 (C—NH $_2$, C $_4$ y C $_6$); 162,41 (C=O). EM, IE (m/z, %): 260 ($\text{M}^+ + 1$, 10%); 259 (M^+ , 25%); 258 ($\text{M}^+ - 1$, 5%); 203 ($\text{M}^+ - 2\text{NH}_2 - \text{CO}$, 100%).

4,6-diamino-5-(4-metoxibencilideno) pirimidin-2(5H)-ona (2d): sólido amarillo, Rto. 90%. P.f: 172-175°C. IR (KBr, cm^{-1}): 3360 (NH $_2$), 1780 (C=O); 1651 (C=N). ^1H RMN (270 MHz, CDCl_3), δ : 3,95 (s, 3H, OCH $_3$); 5,10 (s, 4H, 2NH $_2$); 6,93 (dd, 2H, $J = 8,91$ y 1,98 Hz, H $_{3,5}$); 7,37 (dd, 2H, $J = 8,91$ y 1,98 Hz, H $_{2,6}$); 7,64 (s, 1H, =CH). ^{13}C RMN (270 MHz, CDCl_3), δ : 55,56 (OCH $_3$); 116,00 (2C-Ar); 125,25; 128,0 (C-Ar); 132,02 (2C-Ar); 140,00 (C-Ar); 154,41(C—NH $_2$, C $_4$ y

C₆); 176,00 (C=O). EM, IE (m/z, %): 243 (M⁺ - 1, 10%); 244 (M⁺); 245 (M⁺ + 1); 184 (M⁺ - 2NH₂ - CO, 100%).

4,6-diamino-5-(4-fluorbencilideno) pirimidin-2(5H)-ona (2e): sólido blanco, Rto 98%. P.f: 185°C desc. IR (KBr, cm⁻¹): 3360 (NH₂), 1780 (C=O); 1651 (C=N). ¹H RMN (270 MHz, DMSO-d₆), δ: 5,90 (*s*, 4H, 2NH₂); 7,30 (*dd*, 2H; *J*=8,91 y 1,98 Hz, H_{2',6'}); 7,38 (*s*, 1H, =CH); 7,58 (*ddd*, 2H, *J*=7,59; 6,67 y 3,64 Hz, H_{3',5'}). ¹³C RMN (270 MHz, DMSO-d₆). δ: 115,94 (C-Ar); 116,24 (C-Ar); 129,00; 131,02 (2C-Ar) y 131,55 (2C-Ar); 159,35 (C-NH₂, C₄ y C₆); 166,28 (C=O). EM, IE (m/z, %): 231 (M⁺ + 1); 230 (M⁺, 50%); 229 (M⁺ - 1, 8%); 172 (M⁺ - 2NH₂ - CO, 100%).

4,6-diamino-5-(4-hidroxibencilideno) pirimidin-2(5H)-ona (2f): sólido blanco, Rto: 60%. P.f: 265-266°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3400 (OH); 3360 (NH₂), 1780 (C=O); 1651 (C=N). ¹H RMN (270 MHz, CDCl₃), δ: 5,62 (*sa*, 5H, NH₂, OH); 8,07 (*s*, 1H, =CH); 8,36 (*dd*, 2H, *J*=8,90 y 1,99 Hz, H_{3',5'}); 8,38 (*dd*, 2H, *J*= 8,90 y 1,99 Hz, H_{2',6'}). ¹³C RMN (270 MHz, CDCl₃), δ: 111,07 (2C-Ar); 125,25 (C-Ar); 129,00; 132,02 (2C-Ar); 142,00; 154,41 (C-NH₂, C₄ y C₆); 160,30 (C=O); 166,68 (C-Ar). EM, IE (m/z, %): 229 (M⁺ + 1, 10%); 228 (M⁺, 50%); 227 (M⁺ - 1, 5%); 213 (M⁺ - H₂O); 170 (M⁺ - 2NH₂ - CO, 100%).

4,6-diamino-5-(4-clorobencilideno) pirimidin-2(5H)-ona (2g): sólido anaranjado, Rto: 90%. P.f: 187-188°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3360 (NH₂), 1780 (C=O); 1651 (C=N). RMN-¹H (270 MHz, DMSO-d₆), δ: 4,91 (*s*, 4H, 2NH₂); 6,69 (*dd*, 2H *J*= 10,8 y 1,99 Hz, H_{3',5'}); 7,73 (*dd*, 2H *J*= 10,8 y 1,99 Hz, H_{2',6'}); 9,72(*s*, 1H, =CH). ¹³C RMN (270 MHz, DMOSO-d₆), δ: 129,00; 130,73 (2C-Ar); 132,00 (2C-Ar); 133,73 (C-Ar); 135,60 (C-Ar); 139,40; 156,55 (C-NH₂, C₄ y C₆); 161,85 (C=O). EM, IE (m/z, %): 249 (M⁺ + 1, 5%); 248 (M⁺, 50%); 247 (M⁺ - 1, 10%); 188 (M⁺ - 2NH₂ - CO, 100%).

4,6-diamino-5-(2-metoxibencilideno) pirimidin-2(5H)-ona (2h): sólido marrón, Rto: 89%. P.f: 260-262°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3360 (NH₂), 1780 (C=O); 1651 (C=N). ¹H RMN (270 MHz, DMSO-d₆), δ: 3,95 (*s*, 3H, OCH₃); 4,91 (*sa*, 4H 2NH₂); 7,48 (*m*, 1H, H_{6'}); 7,56 (*m*, 1H, H_{3'}); 7,76 (*m*, 1H, H_{2'}); 7,95 (*m*, 1H, H_{5'}); 8,04 (*s*, 1H, =CH). ¹³C RMN (270 MHz, DMSO-d₆), δ: 55,26 (OCH₃); 112,05 (C-Ar); 112,81 (C-Ar), 122,42 (C-Ar); 122,03 (C-Ar); 128,06; 126,56 (C-Ar); 134,28 (C-Ar); 139,33; 159,90 (C-NH₂); 166,43 (C=O). EM, IE (m/z, %): 245 (M⁺ + 1, 5%); 244 (M⁺, 70%); 243 (M⁺ - 1, 10%); 184 (M⁺ - 2NH₂ - CO, 100%).

4,6-diamino-5-(3,4-diclorobencilideno) pirimidin-2(5H)-ona (2i): sólido beige, Rto.: 90%. P.f: 133-135°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3360 (NH₂), 1780 (C=O); 1651 (C=N). ¹H RMN (270 MHz, DMSO-d₆), δ: 6,94 (*d*, 1H, *J*=10,8, H₄); 4,91

(*sa*, 4H, NH₂); 6,94 (*dd*, 1H, *J*=10,8 y 1,99 Hz, H_{6'}); 7,62 (*s*, 1H, =CH); 7,64 (*d*, 1H, *J*=1,99 Hz, H_{2'}). ¹³C RMN (270 MHz, DMSO-d₆), δ: 126,55 (Ar); 130,00 (Ar); 131,96 (Ar); 132,00 (Ar); 133,50 (Ar); 134,00 (Ar); 135,6; 140,00; 156,61 (C-NH₂); 166,43 (C=O). EM, IE (m/z, %): 284 (M⁺ + 1, 10%); 283 (M⁺, 50%); 282 (M⁺ - 4,5%); 223 (M⁺ - 2NH₂ - CO, 100%).

4,6-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencilideno)pirimidin-2(5H)-ona (2j): sólido amarillo, Rto.: 90%. P.f: 223-225°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3360 (NH₂), 1780 (C=O); 1651 (C=N). ¹H RMN (270 MHz, DMSO-d₆), δ: 3,68 (*s*, 3H, OCH₃); 3,75 (*s* 6H, 2OCH₃); 4,99 (*s*, 4H, 2 NH₂); 6,72 (*s*, 2H, H_{2',6'}); 6,5_g (*s*, 1H, =CH). ¹³C RMN (270 MHz, DMSO-d₆), δ: 60,96 (OCH₃); 107,00 (C-Ar), 129,00 (C-Ar); 131,74 (C-Ar); 141,00(C-Ar); 150 (C-Ar); 154 (C-Ar); 156 (C-NH₂, C₄ y C₆); 167,00 (C=O). EM, IE (m/z, %): 305 (M⁺ + 1, 10%); 304 (M⁺, 70%); 303 (M⁺ - 1, 12%); 244 (M⁺ - 2NH₂ - CO, 100%);

b) Actividad antimicrobiana

Los compuestos sintetizados se muestran en la tabla 1 con las características físicas más importantes. Los ensayos biológicos se realizaron utilizando el método de difusión sobre placas de agar²⁹. Se preparó una suspensión de cada compuesto en la mezcla de solventes DMSO/Acetona/H₂O 25:25:50 (C= 2-3mg/ml, 5µl). Las referidas suspensiones fueron colocadas en discos de papel absorbente (Ø = 5mm). La actividad biológica se evaluó contra los microorganismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection [ATCC] 25923) y *Bacillus cereus* (ATCC 14579), los microorganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* (ATCC 35218) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), y la levadura *Candida tropicalis* (Micoteca Lorenzo De Montemayor (USB) [MLDM] 372). *P. aeruginosa* y *C. tropicalis* fueron incubados a 30°C, mientras que *E. coli* y *S. aureus* fueron incubados a 37°C. Como controles positivos se utilizaron los antibióticos comerciales: Amikacina (AM), Ampicilina (AN), Norfloxacin (N) y Nistatina (Ny) (BBL-Sensi-Disc); como control negativo se empleó la mezcla de solventes utilizada para suspender los derivados preparados. 0,1ml de los cultivos microbianos crecidos en placas LB preparado en el laboratorio³⁰, y ajustados en solución salina (0,85% v/v) a la concentración correspondiente al Standard de McFarland N° 1, fueron sembrados en superficie en agar Mueller-Hinton (Merck 1.05437). Sobre el césped bacteriano se colocaron los discos de papel de filtro con las diferentes muestras.

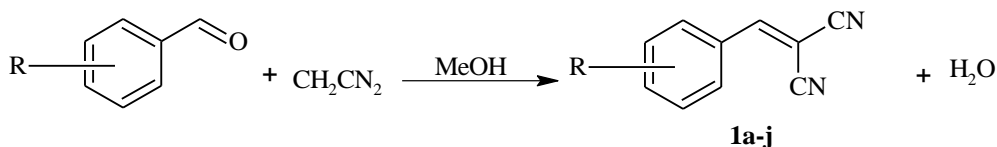
Resultados y discusión

a) Química

La estrategia diseñada para la obtención de los derivados con el núcleo de pirimidina análogos a la citosina **2a-j** se

fundamentó en un proceso de síntesis lineal de dos pasos. Dicha estrategia permitió la preparación de 10 derivados y el procedimiento es clave para futuras síntesis de heterociclos nuevos. En el primer paso se prepararon varios **BMNs (1a-j)** por reacción de adición del malononitrilo al carbonilo del benzaldehído sustituido seguido de deshidratación en metanol sin base y a temperatura ambiente (esquema 1). Los datos espectrales de los **BMNs** confirmaron su estructura. En los espectros de IR una banda a 2224cm^{-1} y 2269cm^{-1} corresponde a las vibraciones de enlace C—N del grupo nitrilo ($\text{C}\equiv\text{N}$) y al grupo ($\text{C}=\text{C}$) respectivamente. En los $\text{RMN-}^1\text{H}$, además de

mostrar todas las señales correspondientes a los patrones de sustitución dependiendo de los sustituyentes en el anillo aromático, revelaron un singlete común para todos los derivados que integró para un protón con un desplazamiento químico alrededor de 6,17-9,72ppm que fue asignado al protón olefínico ($=\text{CH}$)³¹ en los espectros de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$, los picos comunes en todos los compuestos emergieron a 112,00 y 111,73ppm y fueron asignados a los dos grupos nitrilo; los picos alrededor de 79,99-82,00ppm fueron asignados al carbono olefínico ($=\text{CH}$) y otro pico común entre 158,00-164,02ppm fue asignado al carbono que tiene unido los dos grupos nitrilos ($=\text{C}(\text{CN})_2$).

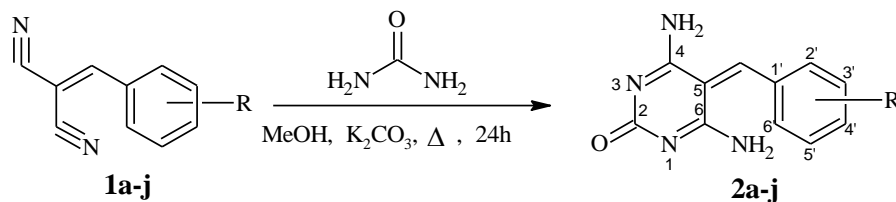


R: **a**=N(Me)₂; **b**=4.Me; **c**=4-NO₂; **d**=4-OMe; **e**=4-F; **f**=4-OH; **g**=Cl; **h**=2-OMe; **i**=3,4-Cl; **j**=3,4,5-OMe

Esquema 1: Síntesis de **BMNs (1a-j)**

Para la asignación de los grupos nitrilos y el carbono que los contiene, comparamos los valores con los obtenidos en estudios previos y reportes encontrados en la literatura para compuestos con estos grupos³²⁻³⁴. En el espectro de masas, en todos los derivados de **BMNs** aparecieron los picos correspondiente a ($\text{M}^+ - 1$, 100%) pico base y otros dos picos correspondientes al ión molecular (M^+) y ($\text{M}^+ + 1$) respectivamente.

La segunda etapa de la síntesis consistió en hacer reaccionar los derivados **BMNs (1a-j)** con urea utilizando K_2CO_3 como base en metanol bajo reflujo para producir las 4,6-diamino-5-bencilideno-pirimidinas análogas a la citosina (**DABPs 2a-j**) (esquema 2).

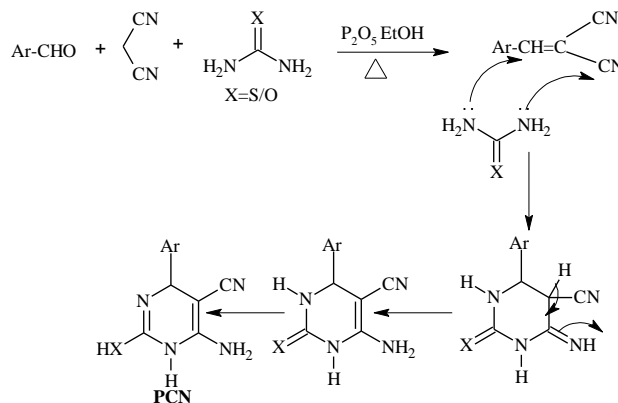


Esquema 2: Síntesis de 4,6-diamino-5-(bencilideno)-pirimidinas análogas de citosina (**DAMPs 2a-j**).

Ahora bien, en base a la estructura del **BMNs (1a-j)** se podría esperar que la reacción proceda vía adición Michael seguida de una ciclación intramolecular según el mecanismo mostrado (Esquema 3), propuesto en la literatura para reacciones análogas en un solo paso con los tres componentes juntos³⁵⁻³⁸, es decir, el compuesto con metileno activo ($\text{H}_2\text{C}(\text{CN})_2$), el benzaldehído sustituido y urea en este caso y los productos serían derivados de pirimidinacarbonitrilo (**PCN**).

Sin embargo, las evidencias espectroscópicas derivadas de **2a-j** confirman la estructura esperada en cada caso. El espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de todos los derivados mostró la presencia de un singlete que integró para un protón alrededor de 7,33-6,17 ppm asignado al protón olefínico que aun se

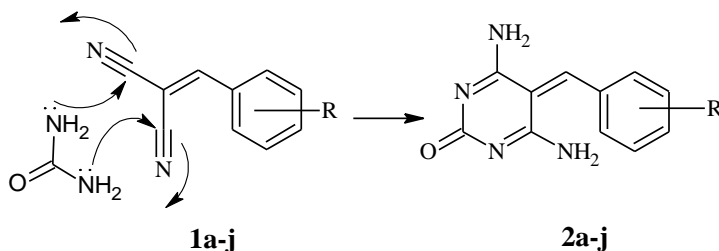
mantiene, demostrando que la adición Michael no ocurrió primordialmente.



Esquema 3: Mecanismo propuesto en la literatura³⁶

Por lo que en la posición C₅ está unido el grupo bencilideno sustituido. Un singlete ancho que integró para cuatro protones a alrededor de 5,90-4,91ppm fueron asignados a los dos grupos aminos unidos a los carbonos C₄ y C₆ del núcleo diaminopirimidina. Estos hechos corroboran que el dinucleófilo (urea) se adicionó al los grupos nitrilos principalmente del **BMN** correspondiente. En el IR, la presencia de una banda a 3500-3400cm⁻¹ son asignadas a las vibraciones de alargamiento N—H de amina primaria, confirmando la ciclación según el mecanismo propuesto en el esquema 4. Por otra parte, la banda a 1780cm⁻¹ corresponde al grupo carbonilo presente en la molécula y especialmente la ausencia de la banda característica de grupo C≡N en el IR, es otra evidencia importante que indica la adición a los grupos nitrilos en **1a-j** por los grupos aminos de la urea. En el RMN-¹³C aparecen todos los picos correspondientes al número de carbonos presentes en cada molécula y los picos comunes aparecen a 154-156ppm asignados a los carbonos que contienen los grupos aminos es decir los carbonos C₄ y C₆; los picos que surgen entre 160-167ppm son asignados al grupo carbonilo de la amida cíclica. En el EM, se evidencia un pico base (M⁺-60, 100%); cuyo valor del *m/z* depende del sustituyente en el anillo aromático presente en **2a-j** que corresponde a la pérdida de tres fragmentos (2HN₂ y CO) en todos los derivados.

Por todas las evidencias que confirman la estructura del los compuestos obtenidos, se propone el mecanismo representado en el esquema 4. En metanol y calor, el **BMN** reaccionó con urea mediante una cicloadición intermolecular y luego por recristalizaciones sucesivas se obtuvieron las 4,6-diamino-(bencilideno)-pirimidinas **DABPs** (**2a-j**) análogas a la citosina esperadas. En la tabla 1 se resume las características más resaltantes del IR, RMN-¹H y RMN-¹³C que corroboran la estructura esperada.



Esquema 4: Mecanismo propuesto para la síntesis de **DABPs** análogas de citosina **2a-j**.

b) Actividad antimicrobiana

Los resultados obtenidos de los bioensayos de **DABPs** (**2a-j**) se muestran en la figura 6. De ellos se desprende que ninguno de los microorganismos gran positivos y gran negativos muestra sensibilidad frente a la mezcla de

solventes, excepto la levadura *C. tropicalis*, mostrando una pequeña sensibilidad, por lo que se considera que los compuestos **2a**, **2i** y **2j** presentan moderada actividad contra la levadura, mientras que los compuestos **2e**, **2f**, y **2g** presentan buena actividad contra la misma.

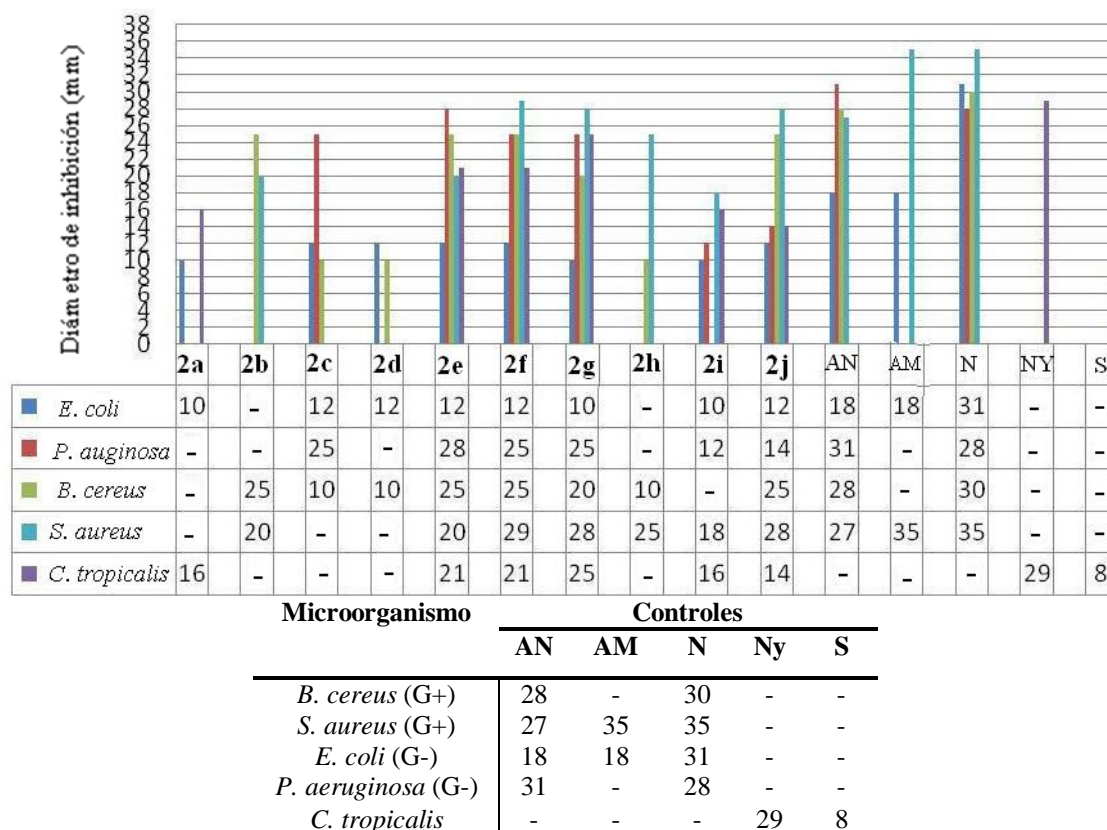
Tabla 1: Características físicas **DABPs** (**2a-j**) análogas a la citosina sintetizados y evaluados.

2a-j
DABPs

2	R	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C		IR (ν, cm ⁻¹)	
		(=CH)	NH ₂	(C=O)	(C=O)	(C=O)	NH ₂
a	4-N(CH ₃) ₂	7,94	4,91	166,43	1780		3360
b	4-Me	8,07	5,00	160,02	1780		3360
c	4-NO ₂	7,64	4,90	162,41	1780		3360
d	4-OMe	7,64	5,10	176,00	1780		3360
e	4-F	7,38	5,90	166,28	1780		3360
f	4-OH	8,07	5,62	160,30	1780	3400(OH),	3360
g	4-Cl	9,72	4,91	161,85	1780		3360
h	2-OMe	7,56	4,90	166,43	1780		3360
i	3,4-Cl	7,62	4,91	166,43	1780		3360
j	3,4,5-OMe	6,72	4,99	160,02	1780		3360

Los compuestos **2e**, **2f** y **2g** son activos contra todos los microorganismos probados, es decir que pueden considerarse de amplio espectro, incluyendo a la levadura *C. tropicalis*, siendo más activos contra las bacterias Gram positivas que contra las Gram negativas, y presentando valores de actividad comparables a los que han mostrado los antibióticos comerciales utilizados en este estudio. También es de resaltar la actividad que todos estos compuestos muestran contra *P. aeruginosa*, la cual es una bacteria Gram negativa sumamente resistente a gran cantidad de antibióticos comerciales, presentando en este estudio una actividad comparable al de la Norfloxacin y ligeramente por debajo de la Amikacina.

Los compuestos **2c**, **2i**, y **2j** también pueden considerarse de amplio espectro, ya que muestran moderada actividad contra organismos Gram positivos y Gram negativos, destacándose el compuesto **c** por su actividad contra *P. aeruginosa* y el compuesto **2j** por su actividad contra *S. aureus*.



Diámetro de inhibición expresado en mm a C = 2-3 mg/mL; (-) = No inhibición

Fig. 6: Actividad microbiana de los compuestos evaluados en 2a-j.

Los compuestos **2e**, **2f** y **2g** son activos contra todos los microorganismos probados, es decir que pueden considerarse de amplio espectro, incluyendo a la levadura *C. tropicalis*, siendo más activos contra las bacterias Gram positivas que contra las Gram negativas, y presentando valores de actividad comparables a los que han mostrado los antibióticos comerciales utilizados en este estudio. También es de resaltar la actividad que todos estos compuestos muestran contra *P. aeruginosa*, la cual es una bacteria Gram negativa sumamente resistente a gran cantidad de antibióticos comerciales, presentando en este estudio una actividad comparable al de la Norfloxacin y ligeramente por debajo de la Amikacina.

Los compuestos **2c**, **2i**, y **2j** también pueden considerarse de amplio espectro, ya que muestran moderada actividad contra organismos Gram positivos y Gram negativos, destacándose el compuesto **c** por su actividad contra *P. aeruginosa* y el compuesto **2j** por su actividad contra *S. aureus*.

Conclusiones

Se lograron sintetizar diez derivados nuevos de diaminobencilidenopirimidinas DABPs (**2a-j**) en dos pasos de reacción. Se obtuvieron compuestos cuya

actividad antimicrobiana puede considerarse de amplio espectro, incluyendo a la bacteria oportunista gram negativa *P. aeruginosa*, la cual es sumamente resistente a la mayoría de los antibióticos comerciales. El método de síntesis presenta un gran potencial de aplicación para la síntesis de una gran serie de nuevos derivados de 5-bencilideno-pirimidinas en futuros proyectos ya que nitrilos activados son útiles para la síntesis de nuevos heterociclos. Este hecho constituye una motivación más para seguir diseñando nuevas estructuras con el núcleo pirimidínico como potenciales agentes antimicrobianos.

Referencias

1. World Health Organization. Resistencia a los antimicrobianos (RAM). Nota descriptiva N° 194. Febrero 2011.
2. World Health Organization. Informe sobre las enfermedades infecto-contagiosas. 1999. [Documento en línea] disponible en: <http://www.who.int/infectious-disease-report/idr99-spanish/pages/ch2text.html>.
3. D Chu, J Plattner, L Chu, J Plattner, L Katz. New Directions in Antibacterial Research. *J. Med. Chem.*, **39**, 3853-3874 (1996).

4. B Beovic. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. **Int. J. Food Microbiol.**, **112**, 280-287 (2006).
5. R Finch, P Hunter. Antibiotic resistance—action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK, 12–13 December 2005. **J. Antimicrob. Chemoth.**, **58**, i3-i22 (2006).
6. M El-Gaby, S Abdei-Hamide, M Ghorab, S El-Sayed. Synthesis and anti-cancer activity *in vitro* of some new pyrimidines. **Acta Pharm.**, **49**, 149-158 (1999).
7. S Shigeta, S Mori, F Watanab, K Takahashi, T Nagata, N Koike, T Wakayama, M Saneyoshi. Synthesis and antihpves virus activities of 5-alkil-2-thiopyrimidine nucleoside analogues. **Antivir. Chem. Chemoth.**, **13**, 67-82 (2002).
8. A El-Galil, E Amr, H Sayed, M Abdulla. Synthesis and reactions of some new substituted pyridine and pyrimidine derivatives as analgesic, anticonvulsant and antiparkinsonian agents. **Archi. Pharm.**, **338(9)**, 433–440, (2005).
9. A Agarwal, K Srivastava, S Puri, S Sinh. A small library of trisubstituted pyrimidines as antimalarial and antitubercular agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **15(23)**, 5218-5221 (2005).
10. J Cieplik, M Stolarczyk, J Pluta, O Gubrynowicz, T Lis, M Mikulewicz. Synthesis and Antibacterial Properties of Pyrimidine Derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, **68(1)**, 57-65(2011)
11. M El-Gaby, A Gaber, A Atalla, K Al-Wahab. Novel synthesis and antifungal activity of pyrrole and pyrrolo [2, 3-*d*] pyrimidine derivatives containing sulfonamido moieties. **II Farmaco**, **5(8)**, 613-693 (2002).
12. B Holla, M Mahalinga, M Karthikeyan, P Akberal, N Shetty. Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. **Bioorg. Med. Chem.**, **14(6)**, 2040-2047 (2006).
13. H Sayed, A Shamroukh, A Rashad, Synthesis and Biological evaluation of some pyrimidine, pyrido[2,1-*b*][1,3]thiazine and thiazole[3,2-*a*]pyrimidine derivatives. **Acta Pharmaceut.**, **56**, 231-244 (2006).
14. J Morgan, R Haritakul, P Keller. Antimalarial Activity of 2,4-Diaminopyrimidines. **Lett. Drug Discov.**, **5(4)**, 277-280 (2008).
15. F El-Ablak, H Etman, M Metwally, F Amer. Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Aminopyrimidinedione and Aminothiazolidinedione Derivatives. Heterocyclic Compounds. **ChemInform.**, **26**, 30, (1995).
16. J Martínez, F Sánchez. Mecanismo de acción de los antibióticos. **JANO. N° 1.660** (2007). [Documento en línea] disponible en: www.doyma.es/jano.
17. C Sincak, J Schmidt. Iclaprim, A novel Diaminopyrimidine for the Treatment of Resistant Gram-Positive Infections. **Ann. Pharmacother.**, **43**, 1107-1114 (2009).
18. I Medina, J Mills, G Leoung, P Hopewell, G Modin, N Benowitz, C Wofsy. Oral therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A controlled trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus trimethoprim-dapsone. **N. Engl. J. Med.**, **323**, 773-782 (1990).
19. A Vermes, H Guchelaar, J Dankert. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **J. Antimicrob. Chemoth.**, **46(2)**, 171–179 (2000).
20. D Richman. Antiretroviral activity of Emtricitabine, a potent nucleoside reverse transcriptase inhibitor. **Antiviral Therapy**, **6**, 83-88 (2001)
21. D Podzamczar, A Salazar, J Jimenes, M Santin, E Consiglio, A Casanova, G Rufi, F Gudiol. Intermittent trimethoprim-sulfamethoxazole compared with dapsone-pyrimethamine for the simultaneous prophylaxis of pneumocystis pneumonia and toxoplasmosis in patients infected with HIV. **Ann. Intern. Med.**, **122**, 755-761 (1995).
22. B Roth, J Strelitz, B Rauckman. 2,4-Diamino-5-benzylpyrimidines and analogues as antibacterial agents.C-Alkylation of pyrimidines with Mannich bases and application to the synthesis of trimethoprim and analogues. **J. Med. Chem.**, **23(4)**, 379-384 (1980).
23. B Roth, E Aig, B Rauckman, J Strelitz, A Phillips, R Ferone, S Bushby, C Sigel. 2,4-Diamino-5-benzylpyrimidines and analogs as antibacterial agents. 5. 3',5'-Dimethoxy-4'-substituted-benzyl analogs of trimethoprim. **J. Med. Chem.**, **24(8)**, 933-941 (1981).
24. K Wellington, H Ooi, S Benner. A convenient synthesis of N,N'-dibenzyl-2,4-diaminopyrimidine-2'-deoxyribonucleoside and 1-methyl-2'-deoxypseudoisocytidine. **Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids**, **28(4)**, 275-291 (2009).
25. C Zificsak, J Theroff, L Aimone, M Albom, T Angeles, R Brown, D Galinis, J Grobelny, T Herbertz, J Husten, L Kocsis, C LoSardo, S Miknyoczki, S Murthy, D Rolon-Steele, T Underiner, K Wells-Knecht, C Worrell, K Zeigler, B Dorsey. 2,4-Diaminopyrimidine inhibitors of c-Met kinase bearing benzoxazepine anilines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **21(2)**, 660-663 (2010).
26. D Martyn, A Nijjar, C Celatka, R Mazitschek, J Cortese, E Tyndall, H Liu, M Fitzgerald, T O'Shea, S Danthi, J Clardy. Synthesis and antiplasmodial activity of novel 2,4-diaminopyrimidines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **20(1)**, 228-231 (2010).
27. M Bayrakdarian, J Butterworth, Y Hu, V Santhakumar, M Tomaszewski. Development of 2,4-diaminopyrimidine derivatives as novel SNSR4 antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **21(7)**, 2102-2105 (2011).
28. G Lobo, J Charris, M Valderrama, J Romero, C Castelli, A Taddei. 4,6-Diamino-5-(4-methylbenzylidene) pyrimidin-2-(5*H*)-one. **Molbank**, **M653**, 2010.
29. A Janssen, J Scheffer. S Baerheim. Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Review. Aspects of Tests Methods. **Planta Medica**, **53**, 395-398, (1987).

- 30 J Sambrook, E Fritsch, T Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3, Appendix A, pp A.1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd. Edition, New York, (1989).
31. P Gutch, P Kumar, M Suryanarayana, R Malhotra. Structure biological activity Relationship of analogues of 2-chlorozylidenemalononitrile - A Riot-control Agent. **Defense Science Journal**, **55(4)**, 447-456 (2005).
32. G Mata. Síntesis y evaluación de compuestos análogos de arilcromenos y quinolinas con potencial actividad citotóxica-anticancerígeno y antimalárica. Tesis de Doctorado. Caracas-Venezuela. Universidad Central de Venezuela (2010).
33. P Bosch, A Fernández-Arizpe, J Mateo, F Catalina, C Peinado. New fluorescent probes for monitoring the polymerization reaction: *p*-vinyliden derivatives of N,N-dimethylaminoaryl compounds. **J. Photobiol.**, **A153**, 135-143 (2002).
34. R Mohareb, E El-Arab, K El-Shakawy. The Reaction of Cyanoacetic Acid Hydrazide with 2-Acetylfuran: Synthesis of Coumarin, Pyridine, Thiophene and Thiazole Derivatives with Potential Antimicrobial Activities. **Sci. Pharm.**, **77**, 355–366(2009).
35. S Mashkouri, M Naimi-Jamal. Mechanochemical Solvent-Free and Catalyst-Free One-Pot Synthesis of Pyrano[2,3-d]Pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-Diones with Quantitative Yields. **Molecules**, **14**, 474-479 (2009).
36. D Patil, S Salunkhe, M Deshmukh, P Anbhule. One Step Synthesis of 6-Amino-5-Cyano-4-Phenyl-2-Mercapto Pyrimidine Using Phosphorus Pentoxide. **The Open Catalysis Journal**, **3**, 83-86 (2010).
37. R Dipti, S Patil, M Salunkhe, B Madhukar, P Anbhule. A Novel and Efficient Catalyst to One-pot Synthesis of 2-Amino-4*H*-chromenes by Methanesulfonic Acid. **J. Chin. Chem. Soc.**, **55(3)**, 659-662 (2008).
38. S Abdel-Mohsen. Synthesis, Reactions and Antimicrobial Activity of 2-Amino-4-(8-quinolinol-5-yl)-1-(*p*-tolyl)-pyrrole-3-carbonitrile. **Bull. Korean Chem. Soc.**, **26(5)**, 719-729 (2005).