

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias  
Biológicas

**DESARROLLO DE NUEVOS  
ECTOPARASITICIDAS BASADOS EN PIRAZOLES  
FLUORADOS PARA APLICACIÓN TÓPICA  
VETERINARIA**

Santiago Matías Ruatta

Director de Tesis: Marcelo C. Murguía

Co-director de Tesis: Santos Fustero

Lugar de realización: Laboratorio de Química Aplicada- Cátedra de  
Química Orgánica – ESS, FCB – Universidad Nacional del Litoral

**-2019-**

## Agradecimientos

*De todo lo que se ha escrito yo amo sólo aquello que se ha escrito con sangre.*

Friedrich Nietzsche  
*Así habló Zaratustra*

De las varias formas de presentar los resultados que pude haber elegido, opté por una que respete el desarrollo cronológico de la investigación, ya que de otro modo no se comprenderían muchas de las decisiones que hemos tomado. A su vez, darle la forma de un relato o una búsqueda permite apreciar cómo nos las hemos arreglado ante las dificultades y las casualidades afortunadas, que sin un ojo atento pasarían desapercibidas. Un eventual lector que no estuviera interesado en la química de pirazoles, aún apreciaría éste trabajo como una colección de vicisitudes y las ocurrencias que permitieron resolverlas.

Paul Feyerabend afirmaba que el error, necesario para el desarrollo del conocimiento, es un fenómeno histórico ya que *“Éste es expresión de la idiosincrasia de un pensador individual”*. Es decir que se origina no sólo en hechos y mediciones, sino que tiene mucho que ver con las ideas, cultura, sentido estético, y hasta sentido del humor del investigador. En esa línea, proponía que la mejor herramienta para un científico que pretenda instruirse a sí mismo sería una *“Teoría del error (...) que desarrolle la imaginación del estudiante sin proveerle de prescripciones y procedimientos ya preparados e inalterables”*. Éste trabajo podría aportar algunas páginas a ése libro universal.

Quiero destacar otros dos méritos de ésta investigación: haber alcanzado el objetivo inicial a través de un cuestionamiento a la hipótesis de partida y su reformulación; y haber abierto varios caminos para explorar a futuro, tanto en el conocimiento de la química como en la tecnología del control de garrapatas, e incluso en la búsqueda de nuevos fármacos antialzheimer. Debo a la extensa formación como bioquímico que recibí en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL la riqueza de éste trabajo, ya que me permitió abordarlo con una perspectiva multidisciplinaria.

Hace alrededor de diez años empezaba mi primera pasantía de investigación en síntesis orgánica aprendiendo del profesor Marcelo César Murguía, quien es hasta hoy mi director. A pesar de mi nula experiencia en ésta ciencia, desde el comienzo me alentó a generar propuestas para la investigación, compartiendo el entusiasmo ante cada nueva idea y escuchando mis hipótesis ante cada dificultad. Eventualmente, me llevó a desarrollar la inventiva necesaria para conducir la investigación según mi propio criterio. Desde que nos conocimos, Marcelo se ha dedicado a construir desde la base el grupo de investigación que hoy trabaja en FCB y en INTEC, siempre atento a generar un ambiente humano en el que todos pudieran desarrollarse con libertad.

Durante mi estancia de investigación en la Universitat de Valencia bajo la tutela de mi codirector, Santos, llevé a cabo buena parte de éste trabajo. El profesor Santos Fustero era una referencia para mí desde mucho antes de haber comenzado con la tesis, y cuando

pude conocerlo personalmente y me ofreció una campana en su laboratorio, comenzó una nueva etapa en mi crecimiento profesional. Entre las muchas enseñanzas y momentos compartidos, elijo destacar el afecto con que me trataron él y Raquel, y la noción que pude desarrollar de mi propio potencial como investigador al trabajar con ellos.

La creación es un acto divino. Como un moderno Prometeo, el químico de síntesis tiene el curioso afán de combinar átomos para imponer nuevas formas al universo, complejizándolo. Sabe que desconoce las interacciones que producirán sus nuevas criaturas en la naturaleza, sabe que manipula sustancias que podrían matarlo a corto o largo plazo, sabe que la mitología ha tratado mal a quienes se atrevían a robar secretos a los dioses. Pero continúa apasionado hasta la concreción de su Obra, que pocos comprenderán. Marcelo y yo somos responsables de haber iniciado a Belén en éste camino. Durante su tesina, se ha comprometido hasta el punto de hacer suya parte del trabajo que describimos en ésta tesis, demostrando una dedicación y voluntad únicas.

Considero que entre las cualidades de un investigador deben destacarse una curiosidad que le permita asistir a los fenómenos naturales con una emoción infantil; un pragmatismo que le permita abjurar rápidamente de sus propias hipótesis y teorías cuando sus observaciones las desmienten, para generar otras superiores; y una determinación de no retroceder ante las dificultades, haciendo uso de esfuerzos, astucias, y de cuanta herramienta disponga para conjurarlas. Si pude ejercitar en algún punto éstas facultades se lo debo a mis viejos, Susana y Telmo, que desde siempre han estimulado en mí el amor a los libros y a las ciencias.

Mis palabras finales son para Vero. Su apoyo fue fundamental para que pudiera llegar hasta acá, sosteniéndome cada vez que perdía las fuerzas y ayudándome a ver las opciones donde creía que no las había. Dedico ésta tesis a todas las personas que aquí he mencionado, pues tienen parte en su autoría.

## Publicaciones

- ✦ SM Ruatta, MC Murguía, C Ramírez, S Fustero (2017) Regio-specific synthesis of new 1-(tert-butyl)-1H-pyrazolecarboxamide derivatives. *Tetrahedron Letters*, 58(25), 2441 - 2444.

# Índice

Abreviaturas y símbolos	8
Resumen	9
Introducción general	13
Problemática de garrapatas	14
Estado actual de la resistencia	16
Mecanismos de resistencia	18
Sobre los pirazoles	21
En la industria	23
Métodos de síntesis	24
Objetivos generales	27
Capítulo I: Síntesis	29
Introducción	30
Objetivo	31
Metodología	32
Nivel I: síntesis de dicarbonílicos	32
Nivel II: síntesis de pirazol	35
Nivel III: funcionalización	43
Nivel IV: síntesis de arilamidas	49
Resultados	63
Conclusiones	64
Capítulo II: Ensayos en garrapatas	66
Introducción	67

Objetivo	67
Metodología	67
Resultados	70
Conclusiones	71
Capítulo III: Síntesis	73
Introducción	74
Objetivo	75
Metodología	76
Nivel I: síntesis de dicarbonílicos	76
Nivel II: síntesis de pirazol	77
Nivel III: funcionalización	78
Resultados	81
Conclusiones	81
Capítulo IV: Ensayos en garrapatas	82
Introducción	83
Objetivos	83
Metodología	83
Resultados	83
Conclusiones	90
Capítulo V: Pruebas en colinesterasas	91
Introducción	92
Objetivos	92
Metodología	92

Resultados	92
Conclusiones	99
Conclusión general	100
Bibliografía	103
Apéndice experimental	114

## Abreviaturas y símbolos

<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa	<b>IC50</b>	Conc. inhibitoria 50
<b>ACN</b>	Acetonitrilo	<b>KBr</b>	Bromuro de potasio
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo	<b>KIO<sub>4</sub></b>	Peryodato de potasio
<b>Br<sub>2</sub></b>	Bromo	<b>LiAlH<sub>4</sub></b>	Hidruro litio y aluminio
<b>BuChE</b>	Butirilcolinesterasa	<b>MLs</b>	Lactonas macrocíclicas
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloruro de carbono	<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano	<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>CL50</b>	Concentración letal 50	<b>NaClO</b>	Hipoclorito de sodio
<b>(COCl)<sub>2</sub></b>	Cloruro de oxalilo	<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sodio
<b><sup>13</sup>C RMN</b>	Res. Magnética Nuclear C	<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>DMF</b>	Dimetilformamida	<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromo succinimida
<b>EM</b>	Espectrometría de masas	<b>NCS</b>	<i>N</i> -cloro succinimida
<b>EtOH</b>	Etanol	<b>OPs</b>	Organofosforados
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Éter etílico	<b>Rto</b>	Rendimiento
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico	<b>RuCl<sub>3</sub></b>	Tricloruro de rutenio
<b>GSTs</b>	Glutación S-transferasa	<b>SPs</b>	Piretroides
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Res. Magnética Nuclear H	<b><i>t</i>-BuOK</b>	<i>terc</i> -butóxido de potasio
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico	<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno	<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>I<sub>2</sub></b>	Yodo		



# Resumen

## Introducción

La infestación por la garrapata del ganado *R. microplus* produce grandes pérdidas económicas a los productores de las zonas tropicales y subtropicales de América, África, Asia, y Oceanía. Ésta garrapata ha desarrollado resistencia a la mayoría de los agentes de control químicos que se han utilizado hasta hoy, por lo que se vuelve necesario encontrar nuevos compuestos capaces de erradicarla.

El anillo pirazol es un heterociclo presente en muchos agentes de control de plagas, destacándose el producto veterinario *fipronil*, que posee actividad garrapaticida. Con ése antecedente, nos propusimos sintetizar una biblioteca química de compuestos derivados de pirazol capaces de afectar a *R. microplus*.

## Metodología

Generamos precursores 1,3-dicarbonílicos para obtener pirazoles con distintos sustituyentes en las posiciones 3, 4, y 5. Luego realizamos transformaciones de grupos funcionales en esas posiciones hasta obtener derivados éster, carboxilo, amida, alcohol, y aldehído. A continuación seleccionamos una serie de compuestos entre los que sintetizamos para probarlos frente a larvas de *R. microplus* por el método del paquete larval, hasta definir un patrón estructural con actividad.

Asimismo, ensayamos algunos de los compuestos sintetizados frente a las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, encontrando algunos con muy buena actividad y especificidad hacia la butirilcolinesterasa. Éste dato es significativo para el desarrollo de potenciales nuevos fármacos para tratar la enfermedad de Alzheimer.

## Resultados

Sintetizamos una amplia biblioteca química de pirazoles, manteniendo en general altos rendimientos. Entre las reacciones que reportamos, se destacan:

✦ Condensaciones de Knorr regioespecíficas, que no poseen antecedente en la bibliografía y con gran potencial para diseñar rutas de síntesis simples y eficientes.

- ✦ Una reacción de transesterificación en presencia de rutenio. Su aplicación en el diseño de rutas de síntesis permite controlar mucho mejor la regioisomería de los productos.
- ✦ La adaptación de una técnica de síntesis de amidas a partir de arilaminas poco nucleofílicas y la doble acilación de éstas arilaminas, que incrementó sustancialmente la cantidad de compuestos sintetizados, logrando incluir grupos fluorados para evaluar su actividad biológica.

A partir de los ensayos biológicos, obtuvimos los siguientes hallazgos:

- ✦ La obtención de una primera generación de compuestos con actividad frente a *R. microplus*, orientados hacia un sitio activo que aún no ha explotado el mercado y en el cual la garrapata parece no haber generado resistencia.
- ✦ La revaloración del hidrodestilado de hojas de tabaco como agente de control de garrapatas, cuyo uso sólo recientemente está atrayendo la atención de los investigadores.
- ✦ La obtención de derivados de pirazol capaces de inhibir específicamente a la enzima butirilcolinesterasa, con una CI50 en el orden del fármaco *tacrina*.

### Conclusiones

Generamos una extensa biblioteca química, de compuestos en su mayoría inéditos. A lo largo del trabajo de síntesis hemos detectado un comportamiento inesperado en algunas reacciones, lo que utilizamos a nuestro favor para enriquecer nuestra colección de compuestos. Éstas reacciones resultan inspiradoras para el desarrollo de nuevos derivados de pirazol a futuro.

También hemos abierto un nuevo camino en el desarrollo de compuestos garrapaticidas, explotando rutas metabólicas en las que *R. microplus* no ha desarrollado resistencia. Ésto nos condujo a proponer compuestos naturales y sintéticos para el control de la garrapata.

Los ensayos frente a colinesterasas arrojaron resultados muy alentadores para seguir trabajando en compuestos antialzheimer basados en pirazoles en futuras investigaciones.

# Abstract

## Introduction

The cattle tick infestation by *R. microplus* produces huge economic losses amongst livestock farmers of tropical and subtropical areas of America, Africa, Asia, and Oceania. This tick has developed resistance to a vast majority of chemical control agents used up to the date. Therefore, it becomes mandatory to find new compounds able to eradicate it.

The pyrazole ring is a heterocycle present in many pest control agents, including the veterinary product *fipronil*, which displays activity against ticks. Considering this background, we envisioned of the synthesis of a chemical library of pyrazole derivatives capable of affecting *R. microplus*.

## Methodology

We generated 1,3-dicarbonyl precursors to obtain pyrazoles with different substituents on positions 3, 4, and 5. Then, we transformed functional groups on those positions in order to obtain ester, carboxylic, amide, alcohol, and aldehyde derivatives. Afterwards, we selected a series of compounds amongst those synthesized to test their activity on *R. microplus* larvae, through the larval pack method, until defining a structural pattern that ensures activity. Thus, we discovered the first generation of a series of unreported pyrazoles with potential application in that field.

Also, we tested some of the synthesized compounds against AChE and BuChE enzymes, finding some with powerful activity and specificity to BuChE. This is an important result for the development of new drugs to treat Alzheimer's disease.

## Results

We synthesized a large compound library, generally holding high yields. Amongst the reactions we report, the following stand out:

- ✦ Unrecorded regioselective Knorr condensations, with great potential for the design of efficient and simple synthesis paths.

- ✦ A transesterification reaction, which took place in the presence of ruthenium. Its application in the synthesis path design improves the control of regioisomer selection on the products.
- ✦ The adaptation of an amide synthesis technique from arylamines with low nucleophilicity, and the double acylation of arylamines, which increased the amount of synthesized compounds, thus achieving the inclusion of fluorinated groups to evaluate their biological activity.

The following discoveries resulted from the biological assays:

- ✦ The obtention of a first generation of active compounds against *R. microplus*, aimed at an unexploited active site where the tick does not seem to have developed resistance.
- ✦ The revalidation of the tobacco leaf hydrodistillate as a tick control agent, that has recently attracted the attention of numerous researchers.
- ✦ The obtention of pyrazole derivatives capable of inhibiting specifically the BuChE enzyme, with a CI50 in the order of the drug *tacrine*.

### Conclusions

We generated a large library of compounds, with a vast majority of unpublished ones. Along the synthesis work some reactions have shown an unexpected behaviour, from which we took advantage to grow our chemical collection. These reactions are an inspiration to develop new pyrazole derivatives in the future.

We've also opened a new path in the research for ixodicide compounds, by using metabolic routes in which *R. microplus* has developed no resistance. This led us to propose natural and synthetic compounds for the tick control.

The assays on cholinesterase enzymes have given encouraging results to keep working on pyrazole based anti-Alzheimer compounds in future research.

# Introducción General

## Problemática de garrapatas

Las garrapatas son ectoparásitos que se alimentan de la sangre de los vertebrados a través de sucesivos estadios. Además de la pérdida de sangre, las mordeduras de garrapata causan irritación, inflamación e hipersensibilidad, provocando anemia en los casos graves. Además son capaces de transmitir enfermedades virales, bacterianas, rickettsiales, y protozoarias [1]. Aproximadamente mil millones de cabezas de ganado, la mayoría en zonas tropicales, están expuestas a diversas especies de garrapatas o enfermedades que transmiten [2], causando pérdidas de producción.

*Rhipicephalus microplus* es la garrapata que causa mayores pérdidas económicas a los productores de ganado a través de los efectos directos en los animales parasitados e indirectamente por transmisión de agentes infecciosos como *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* [3,4,5]. Además de los costos de los productos químicos, mano de obra, equipamiento y pérdidas de producción asociadas con el tratamiento, es muy elevado el costo de mantener las garrapatas bajo control [6]. Cada garrapata adulta ingurgitada es capaz de reducir la ganancia de peso en 0,6 g en ganado bovino [7], de lo que el 65 % es atribuido a la infestación por las garrapatas (estrés y anorexia de la irritación que causan) y 35 % por la pérdida de sangre [8].

Se estima que el 80% de todo el ganado mundial se infecta con garrapatas en algún momento. Sin medidas de control activas, vastas regiones del mundo serían incapaces de sostener su producción ganadera, incluyendo las industrias pecuarias de África, Australia, y América. Las garrapatas también representan un problema médico serio por la transmisión de enfermedades como la encefalitis transmitida por garrapatas y la enfermedad de Lyme.

A pesar de los esfuerzos de los programas de cría de ganado, los avances en el desarrollo de vacunas anti garrapatas, y las apropiadas prácticas pecuarias, el control químico de las garrapatas aún permanece muy retrasado [9,10]. Para mayor preocupación, hay un incremento global en la resistencia a todos los garrapaticidas disponibles, llevando a la posibilidad real de agotar la oferta de agentes de control efectivos en un futuro cercano, a menos que se tomen serias medidas para desarrollar nuevos agentes [10,11]. Al igual que ocurre con muchos insecticidas y antihelmínticos, la mayoría de los acaricidas,

históricamente, afectan a componentes del sistema nervioso central o periférico. Del mismo modo, la vasta mayoría de los acaricidas que se desarrollen en los próximos años apuntará a objetivos dentro del sistema nervioso de la garrapata y es muy probable que se trate de nuevos sitios de acción.

A pesar de la enorme importancia de las garrapatas y su control químico, el campo de la neurobiología de garrapatas está muy retrasado respecto de otros invertebrados. Las razones del lento progreso en éste área son bastante prácticas y directas. Primero, en comparación con otros artrópodos, las garrapatas y su "cerebros" son relativamente pequeños, requiriendo muchos individuos para obtener el suficiente tejido para estudiarlo. Segundo, no hay especies de garrapatas no parasíticas que pudieran actuar como especies modelo para las que son de importancia médica y veterinaria. Finalmente, y más importante, mantener una colonia de garrapatas requiere alimentarlas en cada una de sus etapas en huéspedes vertebrados, lo que involucra un grado de experiencia, manipulación y recursos que puede desalentar a los neurobiólogos [12].

Las garrapatas (Arthropoda; Chelicerata; Acari) se clasifican en tres familias: Ixodidae (garrapatas duras), Argasidae (garrapatas blandas), y Nuttalliellidae (de las que sólo se conoce una especie). Las garrapatas ixodidae son las más significativas por ser parásitos de importancia médica y veterinaria. En las tres etapas de su vida (larval, ninfal, y adulta) son hematófagas obligatorias con largos períodos no parasíticos de vida libre. Por ejemplo, se estima que la garrapata de las ovejas (*Ixodes ricinus*) pasa el 97 % de su vida de 2 a 5 años en forma libre. Al contrario de otros artrópodos hematófagos que se alimentan por un breve período (segundos a minutos), las garrapatas se alimentan por dos semanas o más e ingieren enormes cantidades de sangre (100 veces su peso). Aunque la mayoría de las especies de garrapatas se alimentan y luego abandonan sus huéspedes (uno por cada etapa), algunas se alimentan, avanzan a la siguiente etapa, y vuelven a alimentarse del mismo huésped. Ésto lleva a que haya especies de uno, dos o tres huéspedes. Al completar su alimentación, las hembras adultas abandonan el huésped, ponen huevos (alrededor de 26.000 en un largo período de tiempo) y luego mueren [12].

El principal método de control químico de garrapatas involucra el uso de acaricidas sintéticos. Sin embargo, el desarrollo y selección de cepas resistentes de *R.*

*microplus* en diferentes partes del mundo ha quitado efectividad a muchos de los agentes químicos [13].

### Estado actual de la resistencia

Los métodos actuales para el control de la garrapata implican el uso de métodos químicos y no químicos, y la aplicación sistemática de dos o más métodos (manejo integrado de plagas). Aunque el control de las garrapatas se basa principalmente en el uso de productos químicos, el desarrollo de resistencia a estos compuestos es una grave amenaza para la sostenibilidad de este enfoque. El desarrollo de resistencia en artrópodos depende de la frecuencia de aplicación de los plaguicidas, así como ciclos de vida de las plagas. La resistencia de *R. microplus* a organofosforados (OPs), piretroides sintéticos (SPs) y amitraz se ha descrito alrededor del mundo, principalmente en Australia y Latinoamérica [14,15,16,17]. Esta resistencia de las garrapatas a los acaricidas es conferida principalmente por dos importantes mecanismos fisiológicos: Insensibilidad del sitio e incremento en la actividad de enzimas metabólicas, tales como esterases, oxidasasmixtas y glutatión-S-transferasas [14].

Desde el primer informe del desarrollo de resistencia de *R. microplus* a arsenicales en Australia en 1937 [18], la evolución progresiva de la resistencia de las garrapatas a casi todos los acaricidas disponibles que afectan el ganado, ha frustrado los esfuerzos de los productores de ganado para manipularla y controlar las enfermedades que transmite y que afectan a sus animales. La historia de la resistencia de garrapatas a acaricidas corre en paralelo, con un retraso relativo en algunos años, con la introducción de nuevos productos acaricidas que representan diferentes clases de sustancias químicas [10]. En el Cuadro 1 se presentan registros seleccionados de la distribución geográfica y el año de la documentación del primer informe de resistencia acaricida en *R. microplus* en todo el mundo. En los últimos años, la resistencia al Amitraz también se ha encontrado en poblaciones de *R. microplus* de Colombia [19], Brasil [20,21], México [16,17] y Argentina [22].

Recientemente, Pérez-Cogollo y col.[23] informaron por primera vez de la resistencia a la Ivermectina en poblaciones de *R. microplus* de México. El uso generalizado de la MLs para control de parásitos (endo y ectoparásitos) y una opción limitada de



acaricidas alternativos es motivo de preocupación de que la resistencia de MLs se convierta en un problema grave. Como en el caso de la resistencia emergente en *R. microplus* a los productos OPs, SPs, Amitraz y MLs en Australia y América Latina no significa que algunos de los productos que contengan este tipo de ingredientes activos no tengan más validez. Existen poblaciones de garrapatas que son susceptibles a una gran variedad de acaricidas y que pueden ser controladas, pero ahora es más importante que nunca utilizar las herramientas de diagnóstico existentes y mejoradas para determinar en qué sitio, esos productos son útiles todavía y emplear estrategias de control de garrapatas que minimicen la tasa de selección de resistencia [18].

**Tabla 1.** Años de introducción y detección de resistencia de garrapaticidas.

Compuesto	Año de introducción	Detección de resistencia
Arsenicales	1893	1936- Australia, Argentina 1948- Brasil, Colombia 1953- Uruguay 1966- Venezuela
DDT	1946	1953- Argentina, Brasil, Australia 1966- Venezuela
Organofosforados y carbamatos	1944	1963- Australia, Brasil 1964- Argentina 1967- Colombia, Venezuela 1983- Uruguay 1986- México
Formamidinas	1975	1978- Australia 1989- Brasil 1994- México 1995- Venezuela 1997- Colombia 2000- Argentina
Piretroides	1977	1981- Australia 1995- Brasil 2000- Colombia
Lactonas macrocíclicas	1981	2001- Brasil 2010- México

## Mecanismos de resistencia

La *resistencia* se define como la capacidad de soportar dosis mayores de un tóxico, que normalmente serían letales para la mayoría de los individuos en una población típica de la misma especie [24]. Los mecanismos de la resistencia en la mayoría de las garrapatas pueden clasificarse en dos grupos: insensibilidad del sitio de destino y aumento de las vías metabólicas [25,26]. Solos o en combinación, estos mecanismos confieren resistencia a todas las clases disponibles de acaricidas.

### Insensibilidad del sitio de destino

✦ **Canal de sodio:** Resistencia a SPs. Se observó en una cepa resistente al DDT de la mosca común, *Musca domestica* y se denominó resistencia de derribe o *kdr* [27]. Análisis posteriores identificaron también un tipo de resistencia a SP-mayor llamado *super-kdr*[28]. Vinculada genéticamente con el locus de gen del canal de sodio, las bases moleculares de la resistencia *kdr* han sido investigadas en muchos insectos incluyendo las garrapatas [29]. He y col.[30] investigaron el mecanismo molecular de la resistencia a los SPs en *R. microplus*, y obtuvieron y secuenciaron parcialmente el cDNA del gen *para*-homólogo del canal de sodio de cepas de garrapatas susceptibles y resistentes a SP.

✦ **Acetilcolinesterasa:** Ésta enzima tiene un papel clave en el sistema nervioso, para la terminación de impulsos nerviosos al catalizar la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. Los OPs son inhibidores irreversibles de AChE, provocando la falla del sistema nervioso central y la muerte del insecto [31]. Se ha informado que un importante mecanismo de resistencia a OPs en insectos [9,32,34], son las mutaciones puntuales en el gen estructural que codifica la AChE que dan por resultado la producción de una enzima alterada.

✦ **Ácido  $\gamma$ -aminobutírico:** En artrópodos, GABA es un neurotransmisor inhibitorio en uniones neuromusculares y sinapsis del sistema nervioso central. Uno de los principales agentes actuales en el control de la garrapata es *fipronil*, un antagonista de los canales de cloruro GABAérgicos [35]. Ya se ha informado de la presencia de mutaciones del gen GABA de *Drosophila melanogaster* [32], sin embargo hasta el momento, ningún gen GABA ha sido aislado de *R. microplus*.

✦**Receptor de Octopamina:** Existe una fuerte evidencia de que el sitio de destino de las formamidinas (esto es, amitraz) es el receptor octopamina. El receptor putativo octopamina fue secuenciado de Australia a partir de dos cepas *R. microplus*: una cepa amitraz susceptible y una resistente. Ambas secuencias fueron idénticas [35]. Dos explicaciones posibles para este hallazgo son que puede haber más de un gen del receptor de octopamina en *R. microplus*, o que la resistencia al Amitraz puede ser debido a un proceso metabólico [35,36].

## Resistencia metabólica

✦**Carboxilesterasas:** Estas enzimas hidrolizan las sustancias químicas que contienen grupos funcionales, tales como ácido carboxílico, éster, amida y tioéster. Estudios sobre carboxilesterasas en gran medida se centran en la desintoxicación de plaguicidas y en el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos [37]. Riddles *y col.* [38] describieron la purificación parcial de una enzima con actividad tipo carboxilesterasa en *R. microplus*, que podría hidrolizar la permetrina, proporcionando las primeras evidencias que enzimas metabólicas también pueden participar en la resistencia a los piretroides. Jamroz *y col.* [29] identifican una cepa de *R. microplus* (Cz) resistente a piretroides, que mostraba tener alta actividad hidrolítica de esterasa (CzEST9), en comparación con una cepa susceptible de *R. microplus*. Recientemente, seis cepas de *R. microplus* recolectadas al norte de México resultaron ser resistentes a *fipronil*. La selección con *fipronil* portres generaciones indujo resistencia a un rango de entre 8,3 y 9,4 en los estimadores de LC50 y LC99, respectivamente [39]. Los autores concluyeron que la resistencia a *fipronil* pareciera debida en parte a la actividad de la esterasa elevada (CZEST9), que fue preseleccionada por el uso generalizado de permetrina en la década de 1980 en México. Sin embargo, se deben realizar más estudios para conocer los verdaderos mecanismos de resistencia del *fipronil*.

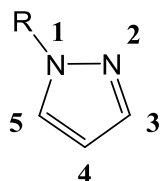
✦**Monooxigenasas P450:** Son una familia compleja de enzimas que contiene heme, que se encuentran en la mayoría de los organismos. Las enzimas P450 enlazan oxígeno molecular y reciben electrones del NADPH para introducir un átomo de oxígeno dentro del sustrato. En los insectos, las diversas funciones de las enzimas P450 van desde la síntesis y degradación de los ecdiesteroides y las hormonas juveniles al metabolismo de

los xenobióticos [40]. También desarrollan papeles importantes en la adaptación de los insectos a los compuestos tóxicos de las plantas huéspedes, y participan en el metabolismo de todos los insecticidas utilizados comúnmente. La bioactivación de OPs por P450 monooxigenasa es un requisito para desarrollar el efecto altamente tóxico de OP sobre la acetilcolinesterasa, su sitio de destino [40,41]. Sin embargo, en general, las enzimas P450 intervienen en la desintoxicación metabólica de los insecticidas, especialmente de SPs [42]. La diversidad es conferida por la existencia de múltiples isoformas de P450, diferentes patrones de expresión y un espectro amplio de sustratos [43]. Hay muchos informes demostrando elevada actividad de P450 en mosquitos resistentes a los insecticidas, frecuentemente de manera conjunta con la alteración de otras enzimas [32]. Otro estudio reciente [44] demostró la vinculación entre una mayor actividad de monooxigenasa y resistencia al acaricida piretroide en *R. (B). microplus* de México.

✦ **Glutación S-transferasa:** Son un grupo de enzimas que catalizan la conjugación entre glutación y otras moléculas. Estas enzimas tienen un papel central en la desintoxicación de compuestos xenobióticos y endógenos. En poblaciones con una larga historia de exposición a productos químicos, se asocia una alta actividad de GST con resistencia a los insecticidas [45]. La resistencia a los OCs y OPs está asociada específicamente con una mayor actividad de GST [46]. Estos hechos sugieren que la conjugación del insecticida al glutación, que es catalizada por GST, puede ser un mecanismo de desintoxicación en artrópodos [47]. He y col. [48] informaron de la purificación, caracterización y clonación molecular de GST de una larva *R. microplus*. Bioensayos sinérgicos con varias cepas resistentes a amitraz de México y una cepa brasileña de *R. microplus* indican que las esterasas y la GST intervienen en la resistencia [49,50].

## Sobre los pirazoles

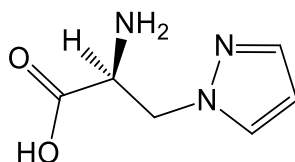
Entre los heterociclos, los derivados de pirazol son una clase importante de heterociclos nitrogenados que han atraído gran atención debido a su utilidad en el descubrimiento de nuevas drogas [51,52,53,54,55,56,57].



**Figura 1.** Estructura general del 1-*H*-pirazol y numeración de las posiciones en el anillo

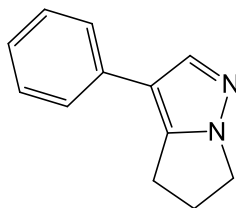
Éstos compuestos son raros en la naturaleza, probablemente por la dificultad de formar el enlace N-N en los organismos vivos [58]. Pero aún así numerosas publicaciones muestran el creciente interés de los químicos, en vista de su amplio campo de aplicaciones.

Algunos ejemplos de pirazoles naturales:



**Figura 2.** Ácido L- $\alpha$ -amino- $\beta$ -(pirazolil-N)-propanoico

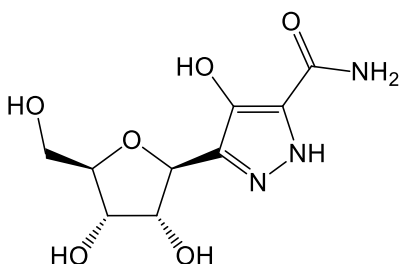
Un isómero de la histidina. Fue aislado por primera vez de la sandía (*Citrullus vulgaris*) [59,60,61]. Es un aminoácido natural que posee actividad antidiabética.



**Figura 3.** Withasomnina

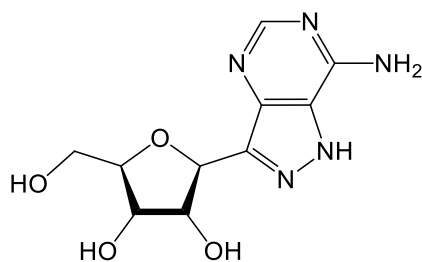
El alcaloide withasomnina fue originalmente aislado de las raíces de la planta medicinal *Withania Somnifera* Dun (Solanaceae) [62,63]. Ésta actúa como un depresor del SNC y del sistema circulatorio. También tiene efecto analgésico e inhibidor de las enzimas

COX-1, COX-2, y TBL4 [64]. 4-Hidroxiwithasomnina y 4-metoxiwithasomnina fueron halladas junto a withasomnina en la corteza de raíz de *Newbouldia laevis* [65]. Dicha corteza es usada para tratar varias afecciones, como la hipertrofia del bazo, disentería, parásitos intestinales, migraña, dolor de oído, conjuntivitis, y varias formas de orquitis [66].



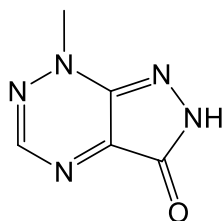
**Figura 4.** Pirazofurina

Es un antibiótico aislado de la fermentación de una cepa de *Streptomyces candidus* [67,68]. La pirazofurina tiene actividad antitumoral y antiviral de amplio espectro en cultivos celulares[69,70,71,72,73].



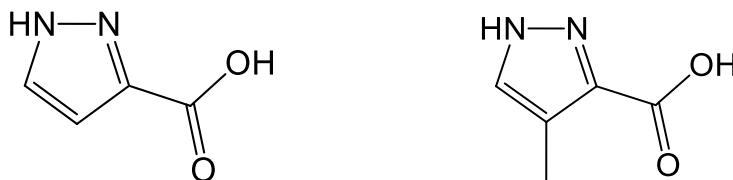
**Figura 5.** Formicina A

Es un antibiótico producido por *S. candidus*, *N. interforma*, y *S. lavendulae* [74,75,76]. Se trata de un isómero natural del nucleósido adenosina que tiene un anillo pirazol en lugar del imidazol y exhibe propiedades antitumorales y antivirales. Reemplaza efectivamente la adenosina en varias reacciones enzimáticas a nivel nucleosídico [77].



**Figura 6.** Nostocina A

Es un pigmento producido por la bacteria fijadora de  $N_2$  cianobacterium, *Nostoc spongiaeforma*, y aislada de campos de arroz en Tailandia. Su mecanismo de citotoxicidad es similar al del herbicida Paraquat [78]. La nostocina A reduce el  $O_2$  intracelular a radical  $O_2^-$ , que a su vez es precursor de otras especies reactivas de oxígeno. Éste compuesto se postula como un fuerte herbicida y alguicida, y como un inhibidor de la replicación de ADN.



**Figura 7.** Ácido pirazol-3(5)-carboxílico y ácido 4-metil pirazol-3(5)-carboxílico

Fueron aislados del extracto metanólico de la esponja *Tedania anhelans*, hallada comúnmente en la región intermareal a lo largo de la costa noroeste de India [79].

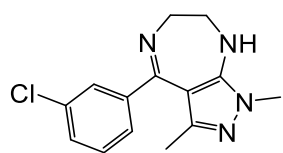
### En la industria

Los derivados de pirazol se han vuelto cada vez más importantes en los últimos años, dada su gran utilidad en la preparación de nuevos materiales biológicos. Un amplio rango de productos medicinales (antiinflamatorios, antitumorales, antihipertensivos, anticoagulantes, antimicrobianos, antivirales, anticonvulsivos, antidepresivos), así como químicos agrícolas (insecticidas, fungicidas, herbicidas) y pigmentos (incluyendo colorantes alimenticios) son derivados de pirazol. Los ligandos basados en pirazol también tienen su campo de aplicación en la química de coordinación y desarrollo de materiales [80].

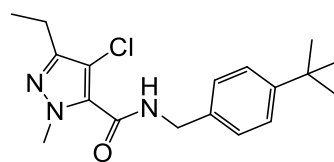
La unidad *N*-metilpirazol forma parte de numerosas drogas, como el antidepresivo *zometapina* [81], el inhibidor de la fosfodiesterasa 5 cGMP *sildenafil* [82], y el agente antibacterial FR21818 [83]. Ésta misma unidad es útil en la preparación de insecticidas y acaricidas incluye la obtención de *tebufenpirad* [84], *cianopirafen* [85], y *fenpiroximato* [86].

La introducción de átomos de flúor o grupos fluorados en heterociclos ha permitido descubrir nuevos productos bioactivos [87,88,89,90]. En particular los pirazoles

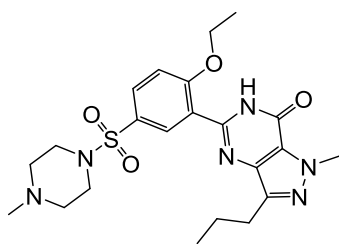
que contienen grupos fluoroalquilo tienen importantes propiedades como fármacos y agroquímicos [91,92,93,94,95,96].



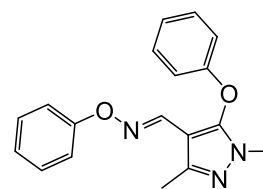
Zometapina



Tebufenpirad



Sildenafil

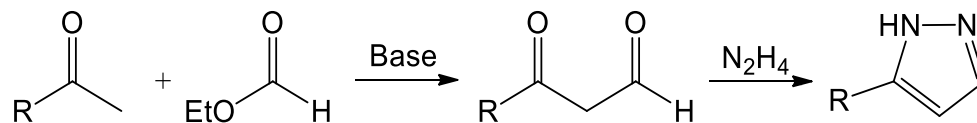


Fenpiroximato

**Figura 8.** Algunos pirazoles de relevancia en la industria

## Métodos de síntesis

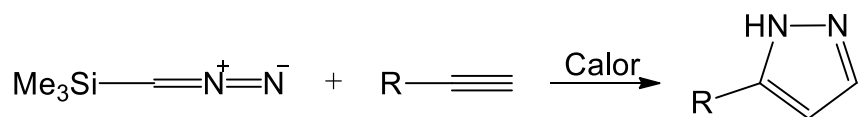
Los 3(5)-alquilpirazoles son comúnmente sintetizados por los dos métodos arquetípicos de Knorr y Pechmann [97]. En una síntesis de Knorr típica, un  $\beta$ -cetoaldehído (o el acetal correspondiente), preparado de etil (o metil) formiato y una cetona, se condensa con hidrazina [98,99,100,101,102,103].



**Figura 9.** Síntesis de Knorr

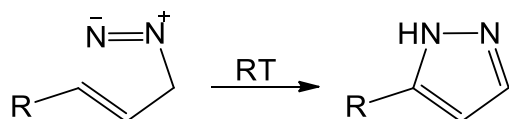
La síntesis de Pechmann consiste en la cicloadición 1,3-dipolar de diazometano a alquinos [104,105,106].





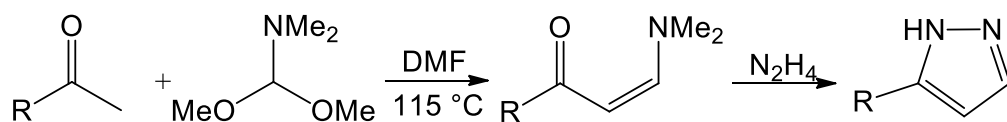
**Figura 10.** Síntesis de Pechmann

Los 3-diazoalquenos sufren una cicloadición 1,3-dipolar espontánea que da lugar a los 3(5)-alquilpirazoles [107].



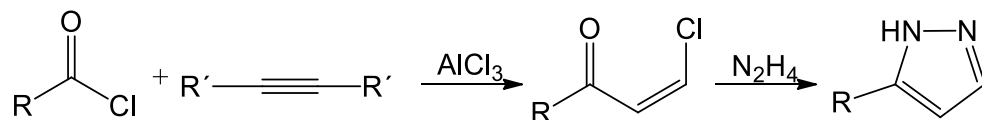
**Figura 11.** Cicloadición

Otras vías de obtención comunes incluyen la conversión de una cetona a  $\beta$ -(dimetilamino)vinil cetona usando *N,N*-dimetilformamida dimetilacetal [105,106], seguido de reacción con hidracina.



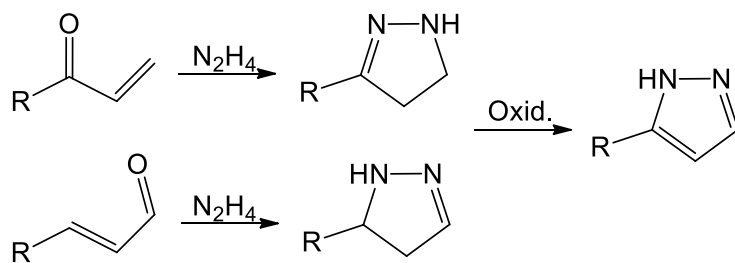
**Figura 12.** Generación de la aminovinil cetona

O la conversión de un cloruro de acilo a una  $\beta$ -clorovinil cetona usando acetileno o su derivado bis-trimetilsilil [108], reaccionando luego con hidracina.



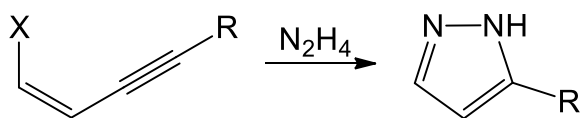
**Figura 13.** Generación de la clorovinil cetona

Las enonas o enales resultan en 2-pirazolininas tras la reacción con hidrazina [105,106,109,110,111], que pueden ser convertidas a los pirazoles correspondientes por oxidación (**figura 14**) [105,106]. Alternativamente, las correspondientes inonas o inales generan 3(5)-alquilpirazoles al ser tratadas directamente con hidrazina [112,113,114].



**Figura 14.** Generación de 2-pirazolinas

Iodo-[115] o los metoxieninos [116] también forman 3(5)-alquilpirazoles con hidrazina.



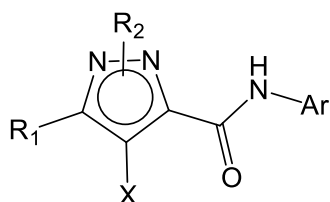
**Figura 15.** A partir de eninos

# Objetivos generales

Dado que *tebufenpirad* (**figura 8**) es una pirazolamida que muestra importante actividad acaricida, hemos decidido sintetizar análogos fluorados de éste compuesto para evaluar su posible actividad contra *R. microplus*. De ésta manera, proponemos:

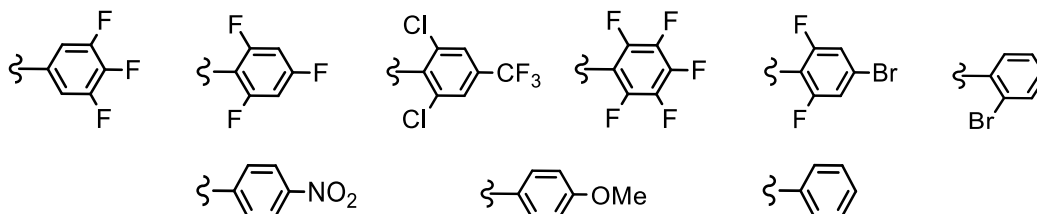
- ◆Explorar la química de la síntesis de pirazoles y la obtención de derivados fluorados.
- ◆Obtener compuestos de alto valor agregado en el área de la Química Fina.

Para introducir un elemento innovador a éstos análogos de *tebufenpirad*, hemos decidido ubicar el grupo *terc*-butilo en la posición 1 del anillo pirazol. Dado que hasta el momento no se han reportado *N-terc*-butil pirazoles en la literatura, todos los derivados que obtengamos con ése patrón estructural serán inéditos. Así, las estructuras que planteamos responderán a la fórmula general:



**Figura 16.** Fórmula general de las moléculas objetivo

Donde  $R_1$ , siguiendo la línea del trabajo de Fustero *et al.*[117], puede ser un anillo aromático (fenilo, furilo) o un grupo alifático (metilo, etilo, variantes fluoradas);  $R_2$  es un grupo *terc*-butilo;  $X$  es en principio H, pero exploraremos su sustitución por halógenos en la búsqueda de actividad biológica; y Ar representa a grupos arilos con diversos sustituyentes:



**Figura 17.** Sustituyentes arilo

# Capítulo I

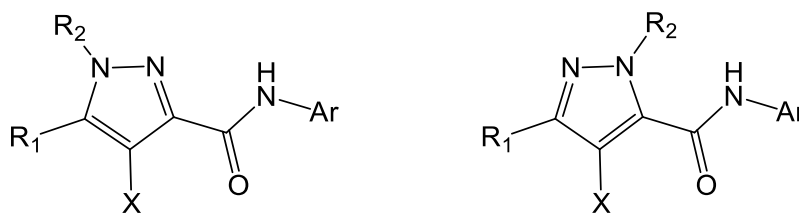
Síntesis

*Para un hombre sin anteojeras no hay espectáculo más bello que el de la inteligencia en lucha con una realidad que la supera.*

Albert Camus  
*El mito de Sísifo*

## Introducción

La síntesis clásica de Knorr fue el método elegido como el más versátil y directo para obtener las numerosas variantes que nos planteamos, ya que sus precursores son una hidrazina (*tert*-butilhidrazina en nuestro caso) y un compuesto 1,3-dicarbonílico que preparamos en el laboratorio según el grupo funcional que necesitemos en R<sub>1</sub>. Ésta síntesis además tiene la característica de generar dos regioisómeros del anillo pirazol (**figura 18**), lo que a menudo es un inconveniente cuando se intenta lograr un regioisómero específico. Si bien hay diferencia de actividad biológica entre otros regioisómeros de pirazol, al ser los *N-tert*-butilpirazoles compuestos inéditos para la literatura abierta, en nuestro caso sólo será una oportunidad de explorar también éste aspecto.

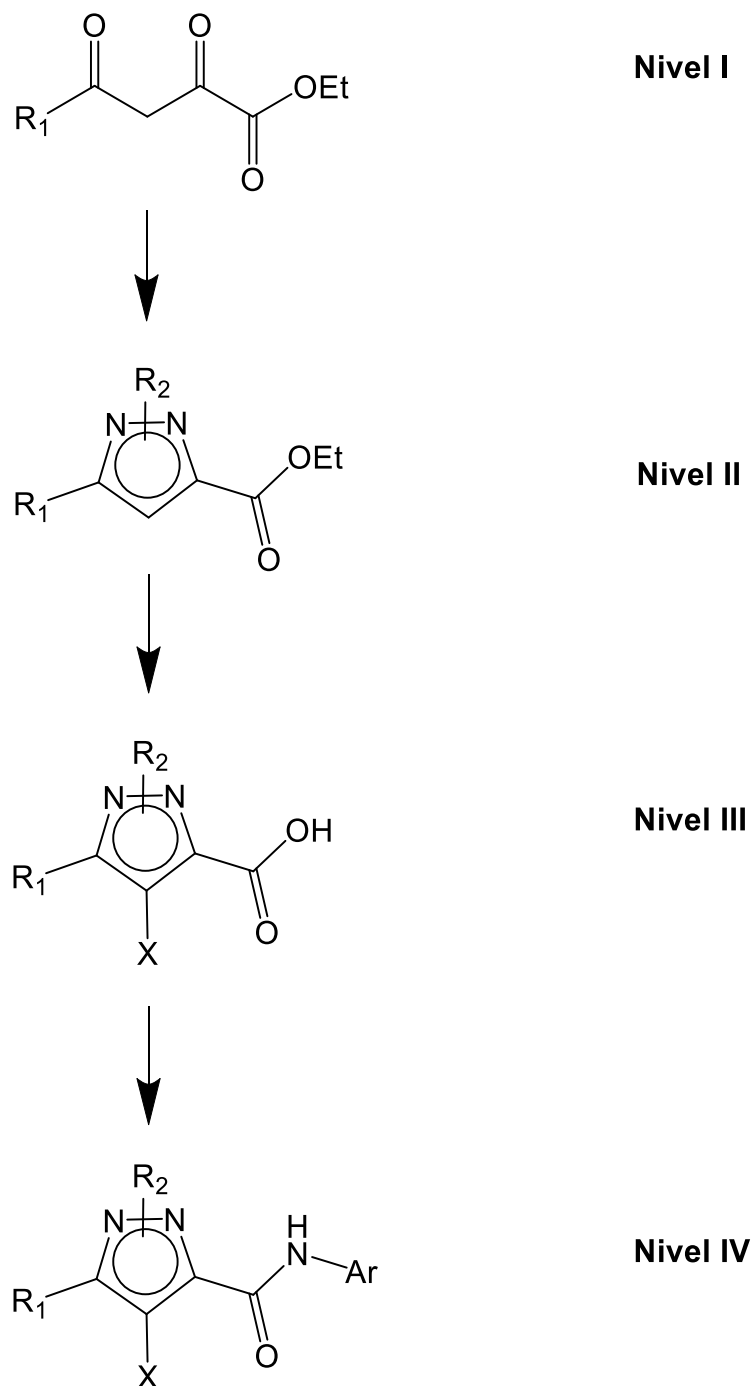


**Figura 18.** Regioisómeros resultantes de la síntesis de Knorr.

Las amidas correspondientes se obtienen a partir de los derivados cloruro de acilo de cada pirazol.

## Objetivo

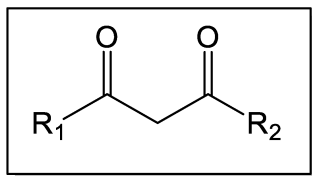
Obtener pirazolamidas a través del siguiente esquema de síntesis:



**Figura 19.** Mapa de la síntesis

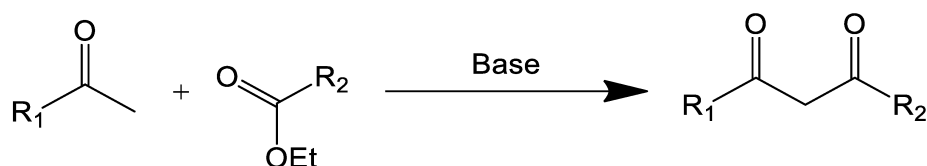
## Metodología

### Nivel I - Síntesis de dicarbonílicos



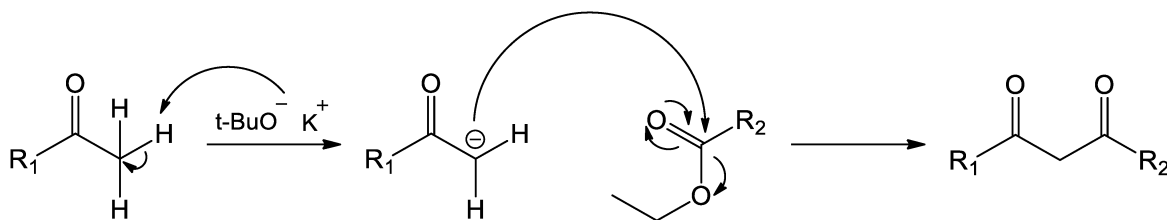
**Figura 20.** Fórmula general de un compuesto 1,3-dicarbonílico

Éstos precursores del pirazol se obtienen a partir de la reacción entre un ion enolato de una cetona y un éster. El resultado es un nuevo enlace C-C.



**Figura 21.** Reacción general

Ésta síntesis se lleva a cabo en disolventes apróticos polares y con atmósfera inerte. La reacción se inicia cuando una base fuerte toma un protón del C alfa de la cetona, generando el ión enolato:



**Figura 22.** Mecanismo de reacción

En todas las síntesis trabajamos con oxalato de dietilo, de manera que los pirazoles resultantes tengan un éster adyacente, fácil de transformar en otros grupos funcionales.



## Reacciones 1.1 y 1.2

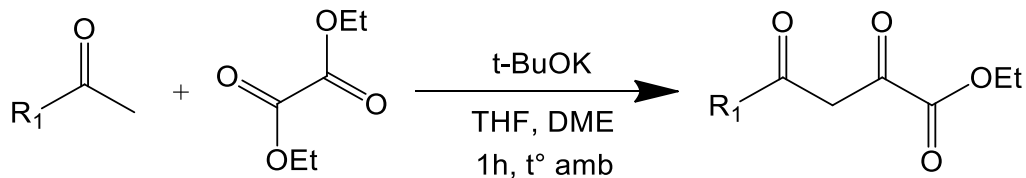


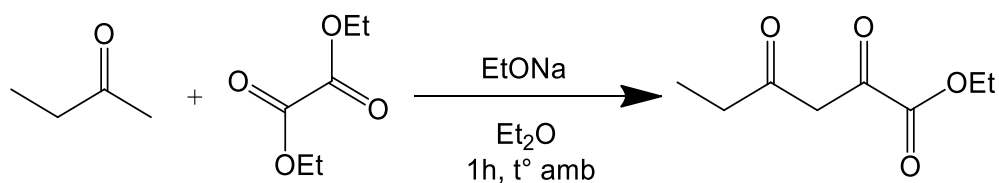
Figura 23. Condensación de Claisen

Tabla 2. Resultados

Reacción	R	Rto
1.1		89%
1.2		88 %

El objetivo inicial era trabajar con derivados de furilo, de los cuales obtuvimos numerosos pirazoles. Para explorar otras líneas de trabajo, también generamos los siguientes compuestos dicarbónicos basados en cetonas alifáticas:

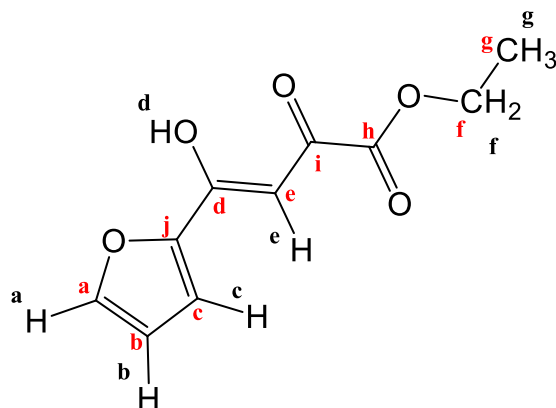
### Reacción 1.3



Rto:50 %

Figura 24. Condensación de Claisen

En los espectros de <sup>1</sup>H RMN de éstos compuestos se puede ver que el singulete correspondiente a la señal de H adyacente a ambos carbonilos integra para un sólo H, indicando que están en forma enólica. Tomando el compuesto 1.1 (tabla 2) como ejemplo:



**Figura 25.** Compuesto 1.1

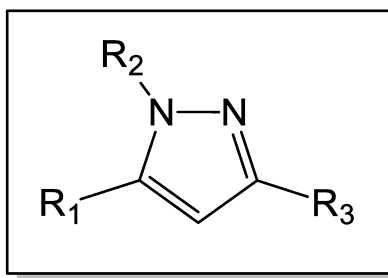
**Tabla 3.** Análisis del espectro  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )] para el compuesto 1.1

Desplazamiento Químico	Multiplicidad	Integración	Referencia
1,4	T	3 H	<b>g</b>
4,39	C	2 H	<b>f</b>
6,62	M	1 H	<b>b</b>
6,94	S	1 H	<b>e</b>
7,34	D	1 H	<b>c</b>
7,68	D	1 H	<b>a</b>

**Tabla 4.** Análisis del espectro  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )] para el compuesto 1.1

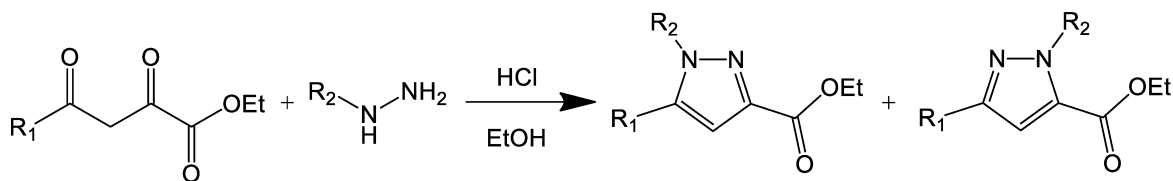
Desplazamiento Químico	Asignación	Referencia
14,23	$\text{CH}_3$	<b>g</b>
62,74	$\text{CH}_2$	<b>f</b>
99,18	CH	<b>e</b>
113,29	CH	<b>b</b>
118,67	CH	<b>c</b>
147,84	CH	<b>a</b>
151,02	C	<b>j</b>
162,15	C	<b>h</b>
165,98	C	<b>i</b>
181,23	C	<b>d</b>

## Nivel II-Síntesis de pirazol



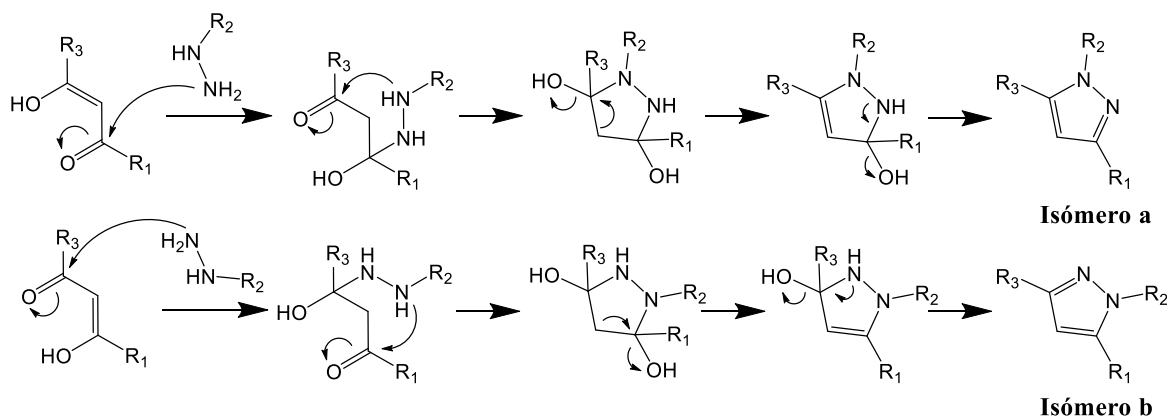
**Figura 26.** Fórmula general de los pirazoles sintetizados

La condensación de hidrazina con 1,3-dicarbonilos es un método clásico para la síntesis de pirazoles. Involucra la adición de dos nitrógenos nucleofílicos a dos carbonos carbonílicos. Ésto da como resultado un anillo de 5 miembros que luego aromatiza por deshidratación, catalizada por el medio ácido. Es un método que en general tiene buenos rendimientos, no genera subproductos, y no requiere condiciones especiales de reacción, como altas temperaturas, medio anhidro, atmósfera inerte, etc. Incluso puede llevarse adelante sin disolvente, mezclando los reactivos sólidos en un mortero. Sin embargo, al tratarse de dos adiciones nucleofílicas, no siempre es fácil controlar su regioselectividad.



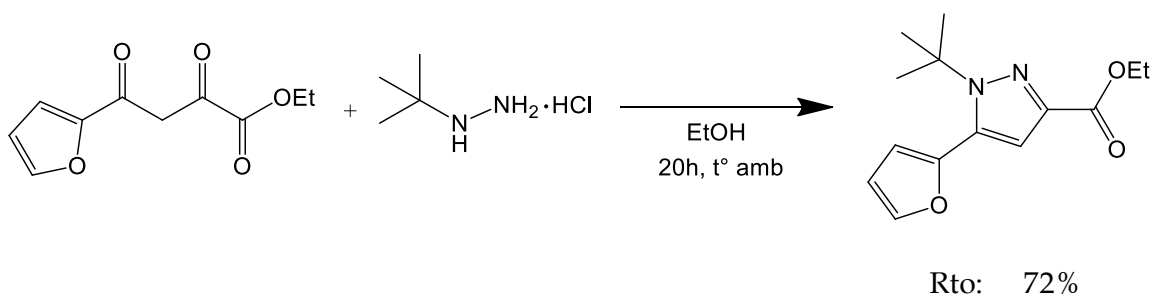
**Figura 27.** Reacción general

La búsqueda de condiciones que permitan dirigir la condensación hacia uno u otro regioisómero ha ocupado parte de la literatura sobre pirazoles de las últimas décadas. Al llevar adelante la síntesis de pirazoles con hidrazinas asimétricas, muchos autores optan por partir de precursores en que los carbonos reactivos están en diferentes situaciones electrónicas. En el trabajo de Fustero *y col.* [117], se reportan condiciones en que se puede orientar la regioselectividad de la condensación de diferentes 1,3-dicarbonilos con metilhidrazina. Sin embargo, ninguna de éstas condiciones logra la regioespecificidad de la reacción. Ya que no hay antecedentes de ésta reacción con *terc*-butil hidrazina, optamos por utilizar etanol como disolvente.



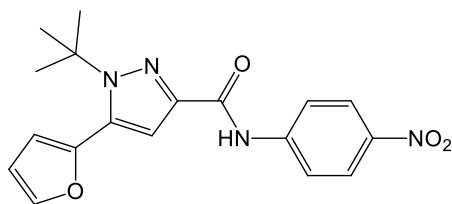
**Figura 28.** Mecanismo de reacción para ambos isómeros

**Reacción 2.1.1**



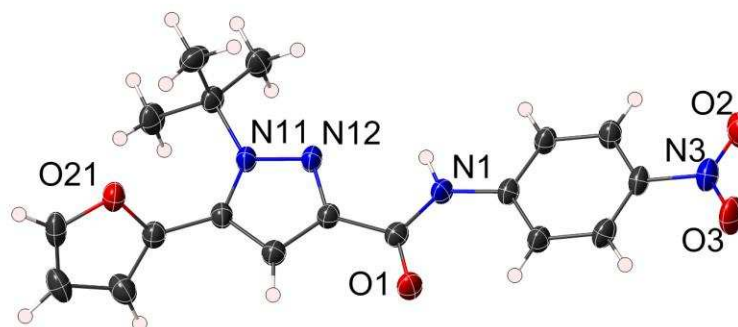
**Figura 29.** Síntesis de Knorr

Para nuestra sorpresa, sólo obtuvimos uno de los regioisómeros posibles. Aunque lo confirmamos por  $^1\text{H RMN}$  y  $^{13}\text{C RMN}$ , el espectro no aporta datos sobre cuál de los dos regioisómeros es. Para determinarlo, debimos hacer una cristalografía de rayos X sobre un compuesto derivado del que aquí obtuvimos, el **4.6.1**, que elegimos porque forma grandes cristales con facilidad:



**Figura 30.** Compuesto **4.6.1**

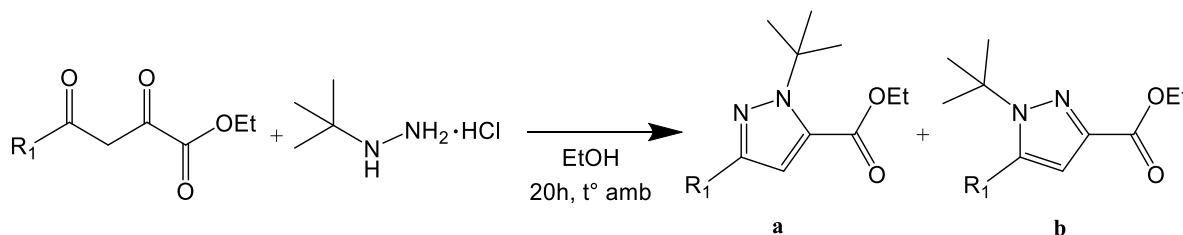
La cristalografía verificó la estructura:



**Figura 31.** Estructura determinada por cristalografía

A continuación ensayamos la misma reacción con los R<sub>1</sub> alifáticos:

**Reacciones 2.1.2 y 2.1.3**



**Figura 32.** Síntesis de Knorr

**Tabla 5.** Resultados

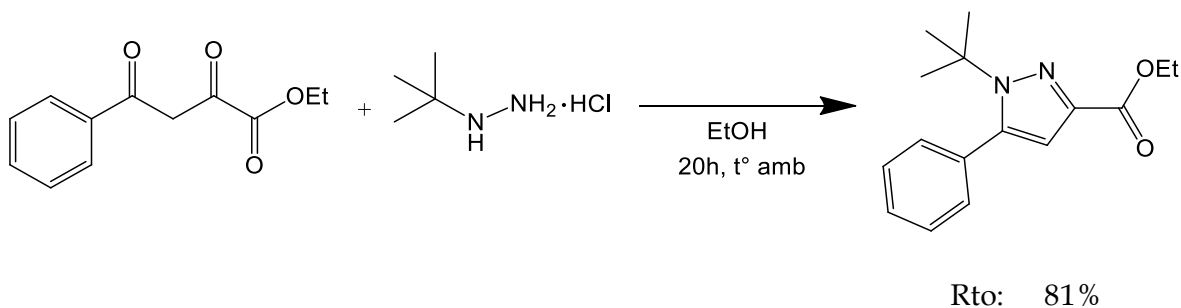
Reacción	R <sub>1</sub>	Rto a	Rto b
2.1.2	—	35%	18%
2.1.3	—	24%	19%

En ambos casos se obtuvieron los dos regioisómeros. Evidentemente, la *tert*-butilhidrazina no basta para orientar la regioselectividad; también es necesario un dicarbonílico con una situación electrónica particular.

Pudimos diferenciar los isómeros **2.1.2** al observar una interacción específica del compuesto **2.1.2.b** por HMBC (**figura 37**). En cuanto a los isómeros de **2.1.3**, sólo pudimos caracterizar el que designamos como **a**, por lo que las estructuras propuestas (basadas en la ausencia de interacción entre etilo y *terc*-butilo) son tentativas.

Repetimos el procedimiento con otro R<sub>1</sub> aromático:

#### Reacción 2.1.4



**Figura 33.** Síntesis de Knorr

Nuevamente se ha obtenido regioespecificidad. Éstos resultados nos permiten proponer los siguientes puntos para una hipótesis mecanística:

- ◆ El grupo *terc*-butilo atenúa la reactividad del nitrógeno al que está unido en la hidrazina. Presumimos que se trata de un efecto estérico, ya que electrónicamente el *terc*-butilo no difiere mucho del metilo.
- ◆ El grupo aromático define un carbono carbonílico marcadamente más reactivo que el otro. Estimamos que se trata de un efecto electrónico, ya que no hay mayor diferencia de tamaño con el grupo éster que queda en la posición 3 del anillo.

Para verificar éstos postulados, deberíamos llevar a cabo un estudio por modelado molecular que analice la estabilidad relativa de los intermediarios resultantes del ataque del N sobre uno u otro carbonilo.

Dilucidación estructural de los isómeros 2.1.2:

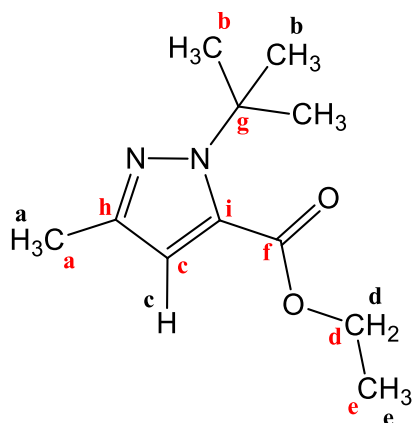


Figura 34. Compuesto 2.1.2.a

Tabla 6. Análisis del espectro  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )] para el compuesto 2.1.2.a

Desplazamiento Químico    Multiplicidad    Integración    Referencia

1,35	t	3 H	e
1,69	s	9 H	b
2,24	s	3 H	a
4,28	c	2 H	d
6,65	s	1 H	c

Tabla 7. Análisis del espectro  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )] para el compuesto 2.1.2.a

Desplazamiento Químico    Asignación    Referencia

13,40	$\text{CH}_3$	a
14,33	$\text{CH}_3$	e
29,78	$\text{CH}_3$	b
61,08	$\text{CH}_2$	d
61,91	C	g
113,37	CH	c
133,34	C	i
144,58	C	h
160,83	C	f

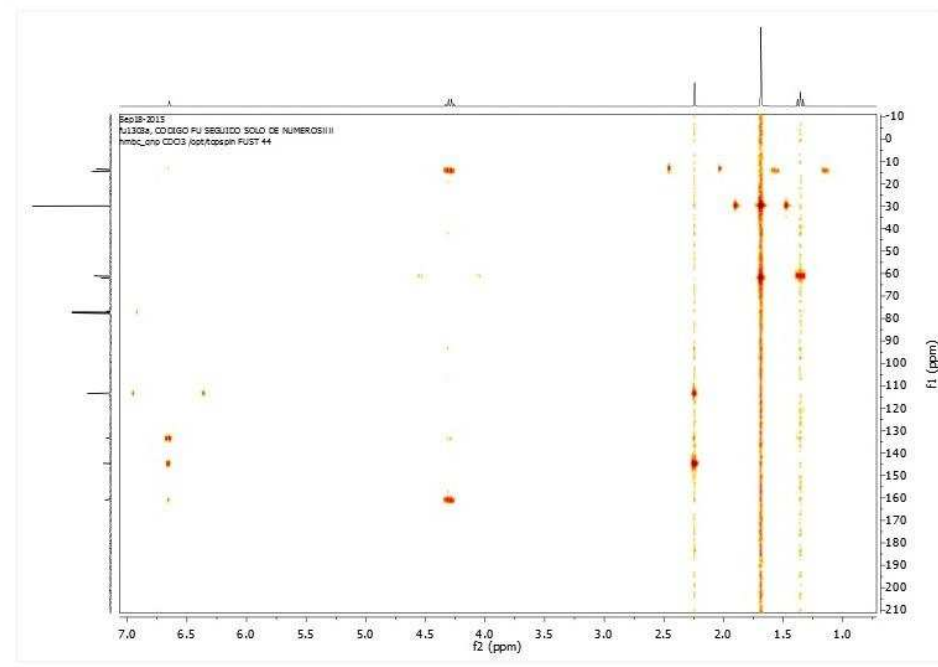


Figura 35. Espectro HMBC del compuesto 2.1.2.a

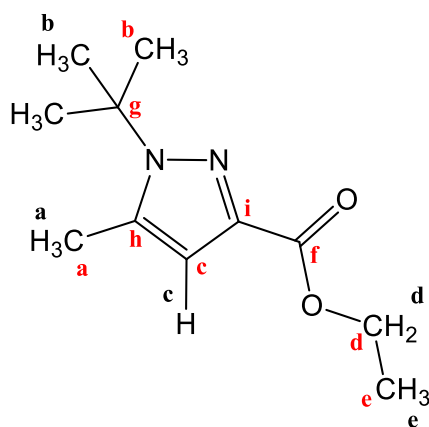


Figura 36. Compuesto 2.1.2.b

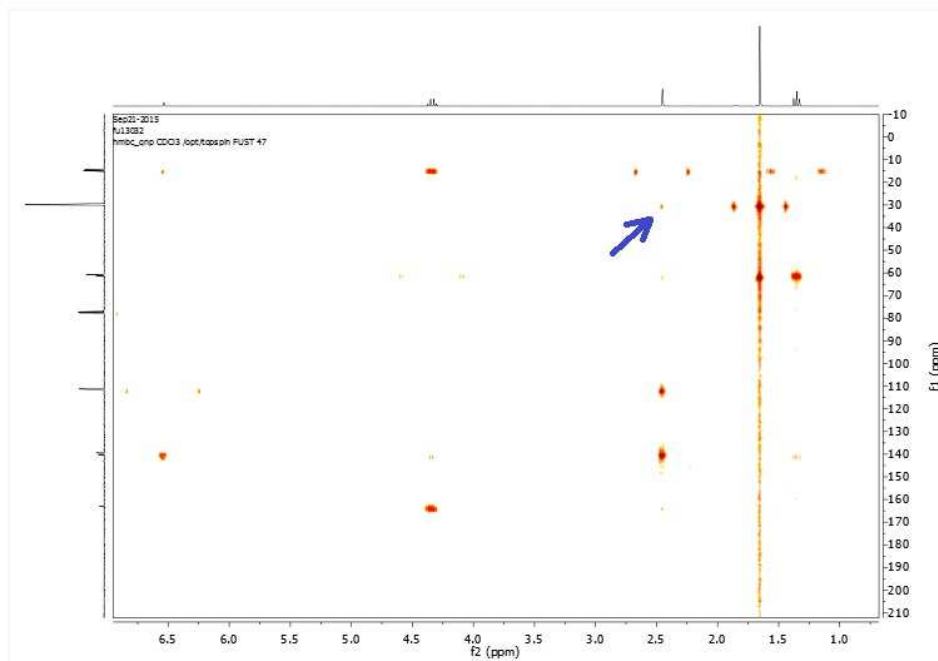


**Tabla 8.** Análisis del espectro  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )] para el compuesto **2.1.2.b**

Desplazamiento Químico	Multiplicidad	Integración	Referencia
1,35	t	3 H	<b>e</b>
1,65	s	9 H	<b>b</b>
2,45	s	3 H	<b>a</b>
4,33	c	2 H	<b>d</b>
6,53	s	1 H	<b>c</b>

**Tabla 9.** Análisis del espectro  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )] para el compuesto **2.1.2.b**

Desplazamiento Químico	Asignación	Referencia
14,48	$\text{CH}_3$	<b>a</b>
14,77	$\text{CH}_3$	<b>e</b>
29,95	$\text{CH}_3$	<b>b</b>
60,68	$\text{CH}_2$	<b>d</b>
61,23	C	<b>g</b>
111,23	CH	<b>c</b>
139,40	C	<b>h</b>
140,40	C	<b>i</b>
163,00	C	<b>f</b>



**Figura 37.** Espectro HMBC del compuesto **2.1.2.b**. La flecha azul indica la interacción entre los H del metilo en posición 3 y los C metilo del grupo *terc*-butilo.

A continuación trabajamos con fenilhidrazina y con hidrazina, que nos permitieron ampliar la biblioteca química de compuestos para las pruebas biológicas.

### Reacción 2.2.1

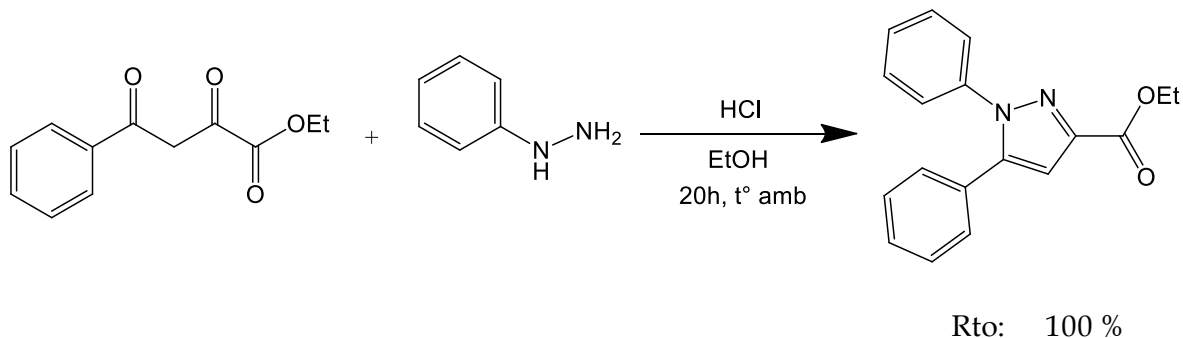


Figura 38. Síntesis de Knorr

En éste caso también se obtuvo un sólo isómero, como pudimos observar por  $^1\text{H}$  RMN.

### Reacción 2.3.1

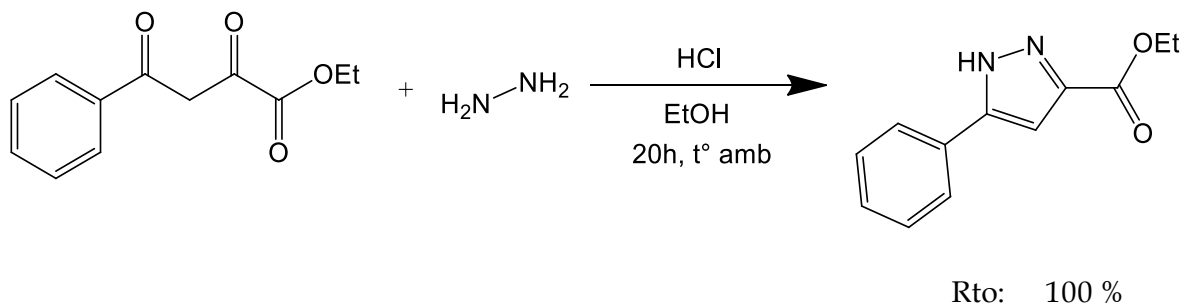


Figura 39. Síntesis de Knorr

Éste compuesto no presenta regioisomería, ya que la hidrazina es simétrica y el pirazol resultante existe en dos formas tautoméricas:

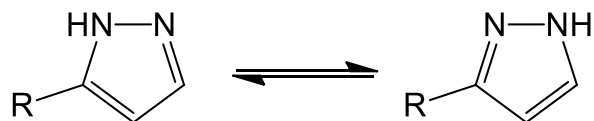
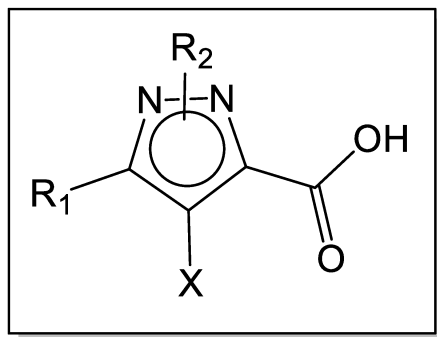


Figura 39. Formas tautoméricas del pirazol

### Nivel III - Funcionalización



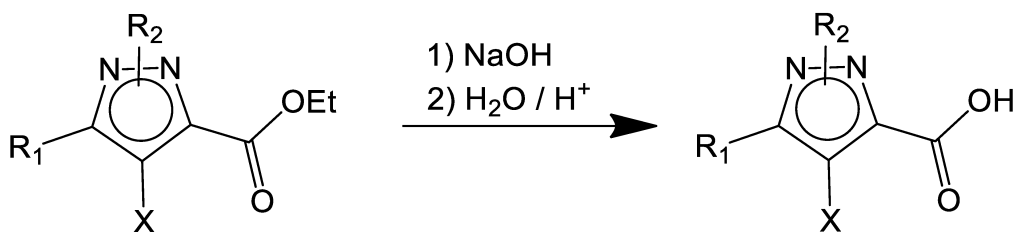
**Figura 40.** Fórmula general de los pirazoles modificados

Exponemos en ésta sección algunas modificaciones de grupos funcionales necesarias para llegar a las moléculas planteadas. Dado que se busca sintetizar amidas, la obtención de grupos carboxilo ocupa un lugar predominante, abordándola por dos vías diferentes: la hidrólisis del grupo éster, y la oxidación del anillo furilo. Para agregar una variable más que multiplique la cantidad de compuestos que podemos obtener, resolvimos ensayar halogenaciones en la posición 4 del pirazol.

#### Hidrólisis del éster

Es una reacción de saponificación, en la que una base fuerte hidroliza el éster en un alcohol y la sal del ácido carboxílico.

#### Reacciones 3.1.n



**Figura 41.** Reacción general de hidrólisis

Tabla 10. Resultados

Reacción	Sustituyente 3*	Sustituyente 5*	R <sub>2</sub>	X	Rto
3.1.1				H	92%
3.1.2				H	88%
3.1.3				H	84%
3.1.4				H	73%
3.1.5				H	66%
3.1.6 <sup>+</sup>				Br	78%
3.1.7				H	52%

\* de acuerdo a la numeración de posiciones señalada en la **Figura 1**

+ a partir del precursor 3.3.2 (tabla 14)

## Oxidación del furilo

En nuestro esquema de síntesis, éste paso nos permite operar sobre el grupo éster con libertad, llevando a cabo hidrólisis, reducciones y acilaciones, mientras el furilo, inerte a todos esos procesos, nos "reserva" otro grupo carboxilo.

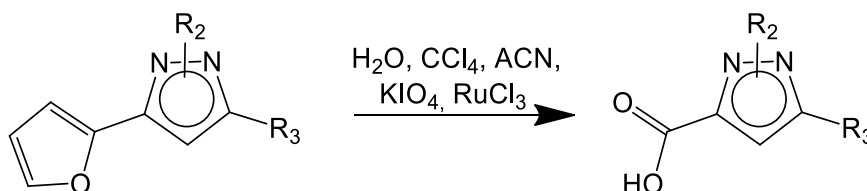
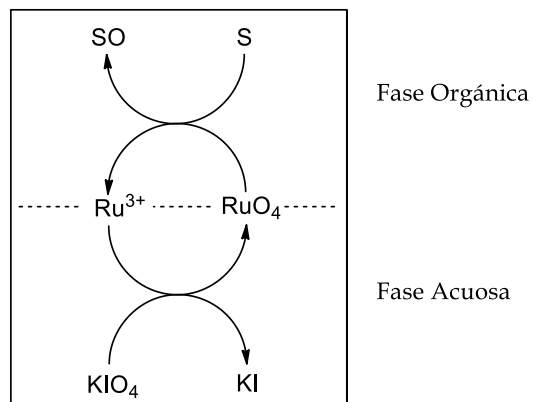


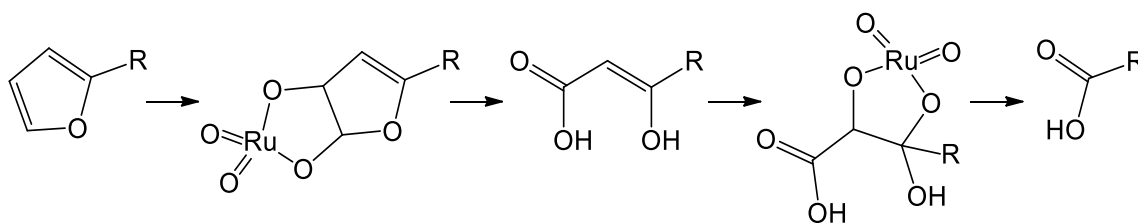
Figura 42. Reacción general

La reacción necesita un medio bifásico (acuoso/orgánico), un agente oxidante (normalmente KIO<sub>4</sub>, pero también obtuvimos buenos resultados con NaClO), y

RuCl<sub>3</sub> como catalizador. La función del RuCl<sub>3</sub> es generar *in situ* el potente oxidante tetróxido de rutenio, que rompe los enlaces dobles del sustrato en la fase orgánica y se regenera en la fase acuosa[118].

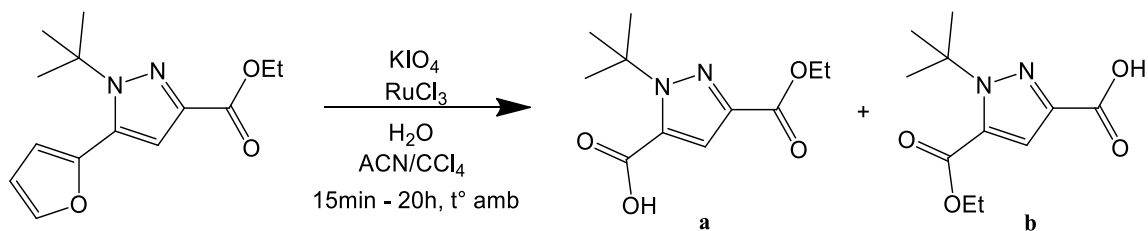


**Figura 43.** Ciclo catalítico del RuO<sub>4</sub>



**Figura 44.** Oxidación de los enlaces dobles en el furilo

### Reacción 3.2.1



Rto general: 65 a 81 %

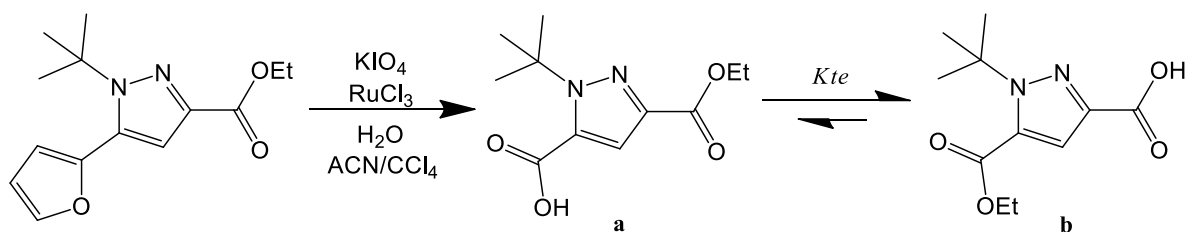
**Figura 45.** Oxidación del furilo y obtención de regioisómeros

**Tabla 11.** Rendimientos de **a** y **b** a distintos tiempos de reacción

Tiempo	Rto a	Rto b
5 min	100%	0%
30 min	78%	22%
1 h	44%	56%
20 h	0%	100%

La primera vez que ejecutamos éste experimento extendimos el tiempo de la técnica original (5 minutos) a 1 hora, lo que nos llevó a obtener un resultado inesperado: dos productos de igual peso molecular pero diferente polaridad y corrimiento químico en  $^1\text{H}$  RMN, ésto es, regioisómeros.

Tras descartar que los regioisómeros sean producto de la síntesis de Knorr, y observando que la relación cambiaba con los tiempos de reacción, supusimos que la oxidación genera inicialmente el isómero **a** (Fig.44), y luego ocurre una transesterificación que da como resultado el **b**. Ésta hipótesis se vió reforzada al observar que con 20 horas de reacción, el predominio del isómero **b** era total.



**Figura 46.** Formación del regioisómero **b**

Aún queda por responder qué impulsa a ésta transesterificación y cuál es su mecanismo. Sin embargo, la relación de frente observada en TLC y cromatografía en columna nos demostró que el isómero **b** es más polar que el **a**. A partir de esta diferencia de polaridad, inferimos que el medio acuoso durante la reacción desplaza el equilibrio

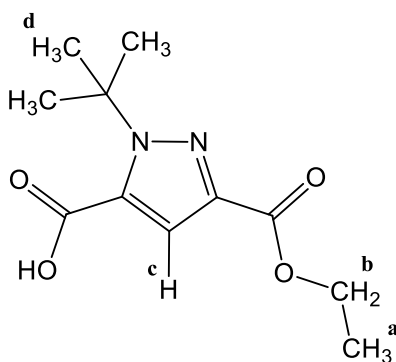
hacia la formación de **b** por diferencia de solubilidad. Podemos proponer una constante de transesterificación:

$$K_{te} = \frac{S_b}{S_a}$$

Donde  $K_{te} > 1$

Aunque no es el objetivo de ésta tesis investigar la cinética de las reacciones, tratar de dilucidar la forma en que operan ciertos mecanismos podría proveernos de herramientas clave para controlar y orientar la síntesis de nuestros compuestos. Sería interesante confirmar éstos supuestos a través de estudios cinéticos posteriores.

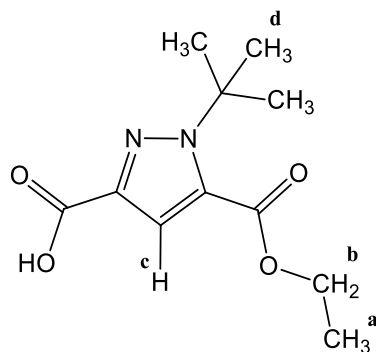
Al comparar los  $^1\text{H RMN}$ , la diferencia más significativa está en el corrimiento químico del H de la posición 4 del pirazol:



**Figura 47.** Compuesto **3.2.1.a**

**Tabla 12.** Análisis del espectro  $^1\text{H RMN}$  [300 MHz, (CDCl<sub>3</sub>)] para el compuesto **3.2.1.a**

Desplazamiento Químico	Multiplicidad	Integración	Referencia
1,39	t	3 H	a
1,77	s	9 H	d
4,40	c	2 H	b
7,55	s	H	c



**Figura 48.** Compuesto **3.2.1.b**

**Tabla 13.** Análisis del espectro  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )] para el compuesto **3.2.1.b**

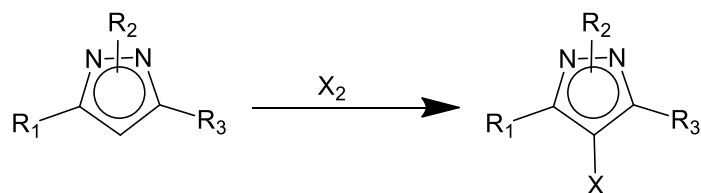
Desplazamiento Químico	Multiplicidad	Integración	Referencia
1,40	t	3 H	a
1,73	s	9 H	d
4.42	c	2 H	b
8.09	s	H	c

Ya que los espectros no nos permiten determinar la identidad de éstos regioisómeros, dedujimos las estructuras que proponemos en las figuras por el orden de aparición de cada producto. El compuesto esquematizado como **3.2.1.a** es el resultado directo de la oxidación del furilo, así que le asignamos ésa identidad al producto de los primeros 5 minutos de reacción. El compuesto **3.2.1.b** es producto de la transesterificación, así que corresponde al segundo en aparecer.

## Halogenaciones

Decidimos incluir éstas reacciones para diversificar la cantidad de compuestos que podemos sumar a nuestra biblioteca química. Aunque actualmente la búsqueda de nuevas drogas tiende a dejar de lado éste tipo de compuestos, los halógenos unidos a heterociclo están presentes en muchos productos líderes del mercado. Además, ésta funcionalización abre el camino a numerosas transformaciones por acoplamiento cruzado. Éstos derivados se obtienen por sustitución electrofílica aromática al tratar los pirazoles con agentes halogenantes, siendo los más comunes NCS y NBS.

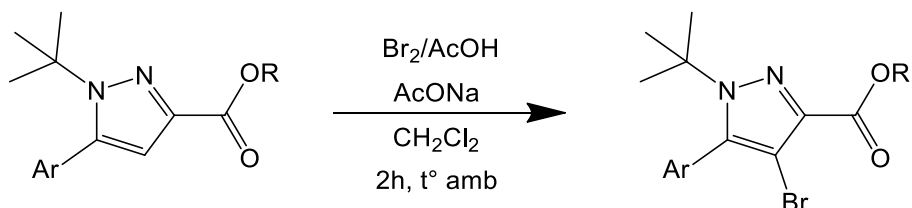




**Figura 49.** Reacción general de halogenación

En nuestro caso, al no disponer de las succinimidias halogenadas, decidimos ensayar algunas técnicas que utilizan halógenos elementales. Reportamos el método más eficaz[119]:

### Reacciones 3.3.n



**Figura 50.** Bromación de la posición 4

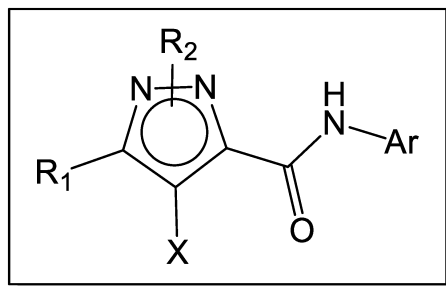
**Tabla 14.** Resultados

Reacción	Ar	R	Rto
3.3.1		Et	100 %
3.3.2		Et	74 %
3.3.3*		H	100 %

\* El producto de 3.3.3 es igual al de 3.1.6

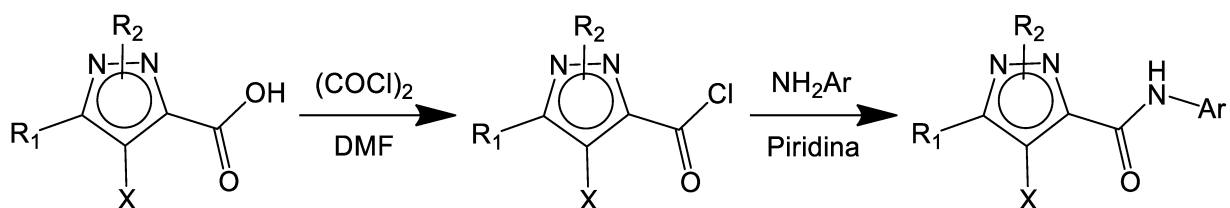
## Nivel IV -Síntesis de arilamidas

En ésta sección decidimos incluir la descripción de las técnicas operatorias en el cuerpo del texto, ya que constantemente hacemos referencia a ellas a través de sucesivas optimizaciones que nos permitieron obtener diferentes productos.



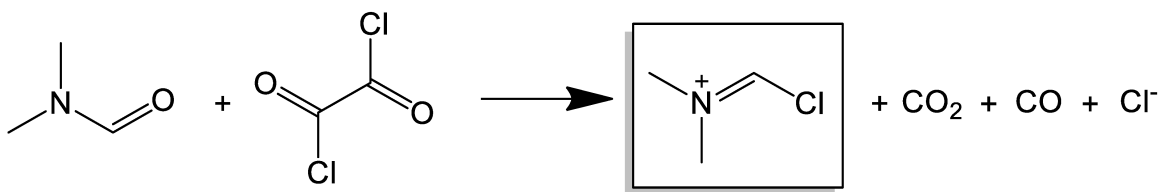
**Figura 51.** Fórmula general de las pirazolamidas

Los métodos de obtención de arilamidas requieren generar un derivado de ácido carboxílico con un buen grupo saliente, de manera que sea sustituido fácilmente por la amina aromática. Ya que utilizamos arilaminas con grupos muy tomadores de electrones, elegimos sintetizar las amidas a través del intermediario cloruro de acilo:



**Figura 52.** Reacción general

La obtención del cloruro de acilo ocurre a través de la generación *in situ* del reactivo de Vilsmeier-Haack[120]:



**Figura 53.** Reactivo de Vilsmeier-Haack

Éste es el reactivo que aporta el cloruro nucleofílico para generar el cloruro de acilo, regenerando la DMF:

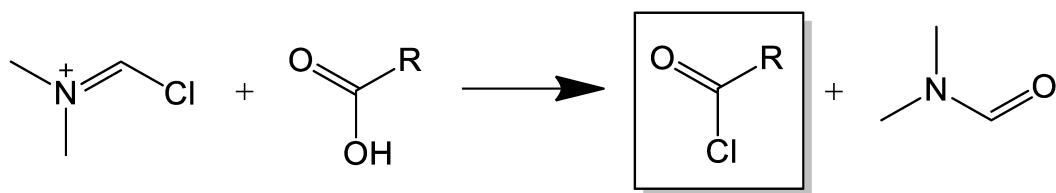


Figura 54. Obtención del cloruro de acilo

#### Reacciones 4.n.1



Figura 55. Obtención de pirazolamidas

Tabla 15. Resultados

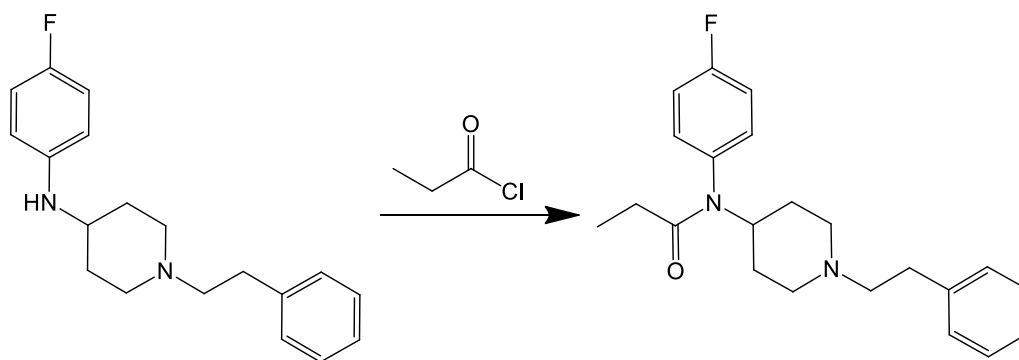
Reacción	Ar	Rto
4.1.1		53 %
4.2.1		49 %
4.3.1		9 %
4.4.1		Trazas
4.5.1		Trazas

Técnica operatoria general para las reacciones **4.n.1**:

En un reactor con atmósfera de  $N_2$  y baño de hielo disolvimos el ácido carboxílico en  $CH_2Cl_2$ , agregamos DMF en cantidad catalítica, y cloruro de oxalilo. Dejamos reaccionar ésta mezcla 1 hora a temperatura ambiente, luego conectamos la salida del reactor a vacío y lo calentamos hasta evaporar todo el  $CH_2Cl_2$  y el  $(COCl)_2$  remanente. Luego volvimos a inyectar  $N_2$  al sistema, pusimos en baño de hielo y agregamos por goteo una solución de la arilamina, piridina y trietilamina en  $CH_2Cl_2$ . Mantuvimos la agitación a temperatura ambiente por 12 hs.

Si bien ésta técnica dió lugar a algunos productos buscados, no fue adecuada para trabajar con las arilaminas que poseen grupos tomadores de electrones en posición *orto*. Éstos grupos deslocalizan los electrones y restan nucleofilicidad al nitrógeno, dificultando la reacción. Sin embargo, por más que la reactividad sea baja, eventualmente debería haberse dado la sustitución. Aunque cuidamos las condiciones anhidras del medio, que son necesarias para generar el reactivo de Vilsmeier-Haak, pensamos que una mínima fracción de humedad podría estar compitiendo con las arilaminas menos nucleofílicas.

Normalmente las arilaminas son mejores nucleófilos que el agua. Ejemplos de esto son la síntesis clásica de acetanilida, que se lleva a cabo por la reacción de anhídrido acético y anilina en medio acuoso; y la síntesis del analgésico *p*-fluorofentanilo, en la que la amina y el cloruro de propanoilo son mezclados sin necesidad de atmósfera inerte. En el caso de los fentanilos incluso se utiliza un cloruro de acilo unido a un carbono alifático, por lo que debería ser más reactivo (más susceptible a la humedad) que los de nuestro sistema, estabilizados por la aromaticidad del pirazol.



**Figura 56.** Última etapa de la síntesis del *p*-fentanilo

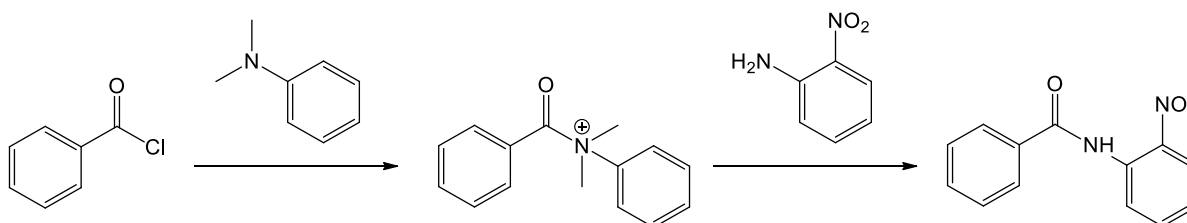
Basándonos en éstas observaciones, postulamos que en nuestro sistema había dos factores que disminuían la reactividad:

- ◆ Cloruro de acilo estabilizado por aromaticidad.
- ◆ Arilamina poco nucleofílica por grupos tomadores de electrones.

Ya que ambos factores son intrínsecos de nuestros precursores, para favorecer la reacción debimos trabajar sobre los otros componentes del medio de reacción: el disolvente, la base, y el catalizador.

La búsqueda de un medio adecuado nos llevó a un artículo de 1942 en que Ruggli y Rohner [121], reportan la acilación de *o*-nitroanilina con cloruro de benzoílo, utilizando la siguiente receta:

*“Disolver 14 g de *o*-nitroanilina en 15 g de dietilanilina en baño de hielo. Agregar 14 g de cloruro de benzoílo de a porciones. Enfriar a medida que la temperatura aumenta espontáneamente. Al finalizar la adición, calentar 20 minutos en baño maría. Luego verter en agua fría (...), obteniendo 22.7 g de agujas color amarillo oro. Rendimiento: 93%.”*



**Figura 57.** Papel de la dimetilaniilina como catalizador

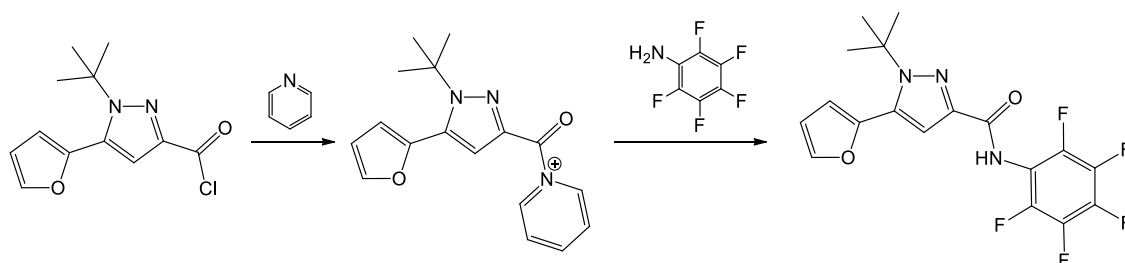
Observaciones:

- No especifica que los disolventes deban estar anhidros.
- No especifica que el cloruro de benzoílo se manipule en atmósfera inerte.
- La dietilanilina cumple las funciones de disolvente, base y catalizador, generando un intermediario más reactivo que el cloruro de acilo.
- Al igual que con la síntesis de fentanilos, el cloruro de acilo se agrega al medio que ya contiene la amina.

Con algunas modificaciones, adaptamos la técnica operatoria a las reacciones **4.1.4** y **4.1.5**, reformulándola en los siguientes pasos:

- ◆ Preparamos el cloruro de acilo como se detalló antes. Evaporamos el disolvente y el  $(\text{COCl})_2$  remanente, y agregamos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  nuevamente para redissolver.
- ◆ En otro reactor, bajo atmósfera inerte, preparamos una solución de la arilamina en piridina anhidra (calentada a reflujo con  $\text{NaOH}$ ) [122].
- ◆ Agregamos la solución del cloruro de acilo en el segundo reactor en baño de hielo.
- ◆ Al finalizar el agregado, calentamos hasta evaporar todo el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (para que el medio de reacción sea 100% piridina) y dejamos con agitación a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

Como no disponíamos de dimetilnilina, decidimos sustituirla por piridina, que cumple la misma función de generar un amonio cuaternario fácilmente desplazable por las arilaminas:



**Figura 58.** Formación de un intermediario piridinio

**Tabla 16.** Resultados

Reacción	Ar	Rto
4.4.1		Trazas
4.5.1		20 %

La reacción 4.5.1 indica que nos hemos acercado a un medio de reacción que favorece la acilación. Sin embargo los rendimientos son muy bajos, aún cuando se cuidaron las condiciones de la reacción para evitar cualquier fuente de humedad. Nos planteamos entonces dos posibilidades:

- Las medidas tomadas para mantener la atmósfera anhidra no fueron suficientes.
- Por alguna razón es necesario que haya un mínimo de agua en el medio.

Lo que resolvimos mediante dos experimentos:

#### Experimento 1:

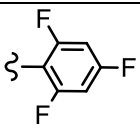
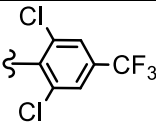
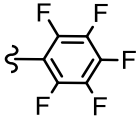
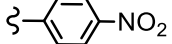
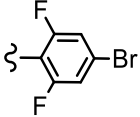
Repetir la reacción 4.5.1 agregando 1 gota de agua al reactor 2. Resultado: No se formó la amida.

Conclusión: el bajo rendimiento se debe a la presencia de humedad en el medio.

#### Experimento 2:

Repetir la reacción 4.5.1 utilizando doble cantidad de cloruro de acilo para que consuma el agua, anhidrando el medio. Utilizar la mínima cantidad de piridina, que es una posible fuente de humedad en el paso crítico.

Tabla 17. Resultados

Reacción	Ar	Rto
4.3.1		90 %
4.4.1		90 %
4.5.1		72 %
4.6.1		79 %
4.7.1		55 %

Técnica general para obtención de amidas a partir de arilaminas poco nucleofílicas (reacciones **4.n.m**):

En una bomba de Schlenk de 25 ml, bajo atmósfera inerte, colocamos 0.7 mmol de un pirazol carboxilato y lo disolvimos en la mínima cantidad necesaria de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Luego la colocamos en baño de hielo y añadimos 3  $\mu\text{l}$  de DMF y 1.7 ml de una solución 2 M de  $(\text{COCl})_2$ , y agitamos la mezcla una hora a temperatura ambiente. Al finalizar, aumentamos el flujo de gas inerte y calentamos suavemente el reactor hasta obtener un producto crudo semisólido, que redisolvimos en la mínima cantidad de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En otra bomba de Schlenk con atmósfera inerte, disolvimos 0.35 mmol de una arilamina en 1 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 1 ml de piridina, y la colocamos en baño de hielo. A continuación tomamos la solución del cloruro de acilo que habíamos preparado y la agregamos por goteo a éste segundo reactor, observando desprendimiento de vapores. Al finalizar, cerramos la bomba, la calentamos suavemente, y la conectamos a vacío hasta observar el cese del burbujeo, asegurándonos que la piridina sea el único disolvente del medio. Finalmente, dejamos la mezcla enfriarse a temperatura ambiente y la dejamos agitando hasta el día siguiente, en que extrajimos el crudo añadiendo 10 ml de una solución 1 M de HCl y 15 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El producto quedó en la fase orgánica, a la que añadimos 10 ml de NaOH 2 M para remover el pirazol carboxilato remanente con la fase acuosa. Anhidramos la fase orgánica de ésta segunda extracción y la evaporamos a presión reducida, purificando posteriormente los productos por cromatografía en columna de sílica gel con una mezcla de hexano : acetato de etilo 9:1.

Una vez puesta a punto ésta técnica, la aplicamos a otras arilaminas y a los otros pirazoles obtenidos.

#### Reacciones 4.n.1



**Figura 59.** Pirazolamidas a partir de anilina



Tabla 18. Resultados

Reacción	Sustituyente 3'	Sustituyente 5'	Rto
4.1.1			95 %
4.1.2			60 %
4.1.3			92 %
4.1.4			62 %
4.1.5			100 %
4.1.6			76 %
4.1.7			100 %

Reacción 4.2.8

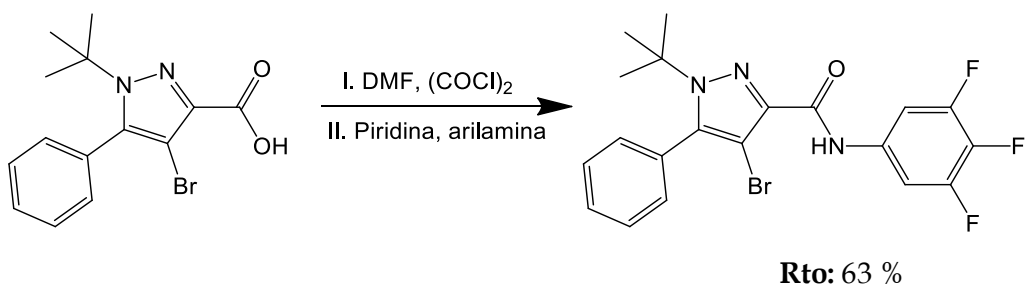


Figura 60. Obtención de pirazolamida 4.2.8

Reacciones 4.4.n.b

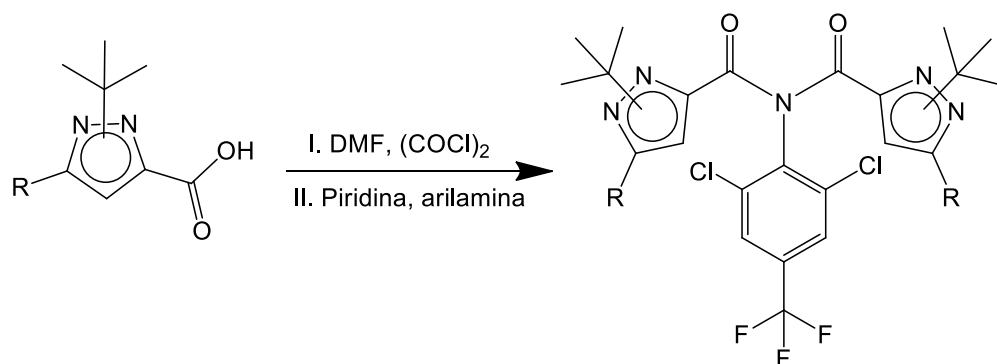


Figura 61. Pirazolamidas a partir de 2,6-dicloro-4-(trifluorometil)anilina

Tabla 19. Resultados

Reacción	Sustituyente 3'	Sustituyente 5'	Rto
4.4.2.b			20 %
4.4.3.b			71 %
4.4.5.b			98 %

En éste caso la arilamina sufrió una doble acilación, que detectamos al observar que la integración de H en el  $^1\text{H}$  RMN no coincidía con la estructura monoacilada. La EM nos permitió confirmar el producto de doble acilación.

Los productos diacilados parecen formarse exclusivamente a partir de la 2,6-dicloro-4-(trifluorometil)anilina, pero ¿por qué no observamos ésta doble acilación en la obtención del compuesto 4.4.1 (tabla 17)? La explicación está en que entre ambas series de experimentos hemos cambiado la piridina utilizada. A continuación repetimos la reacción 4.4.1 con la piridina nueva:

Reacción 4.4.1

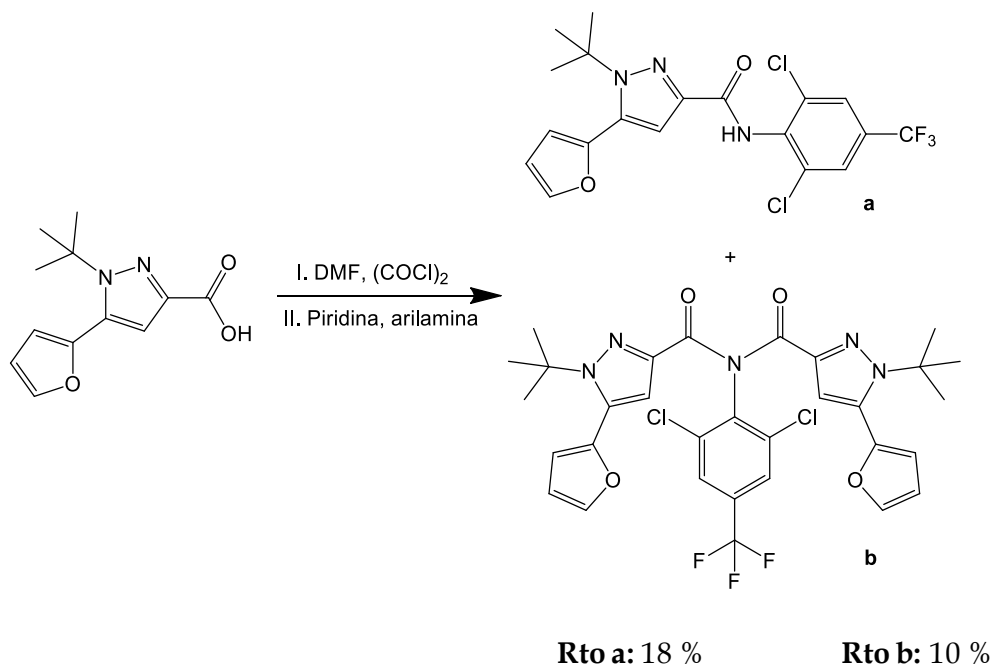
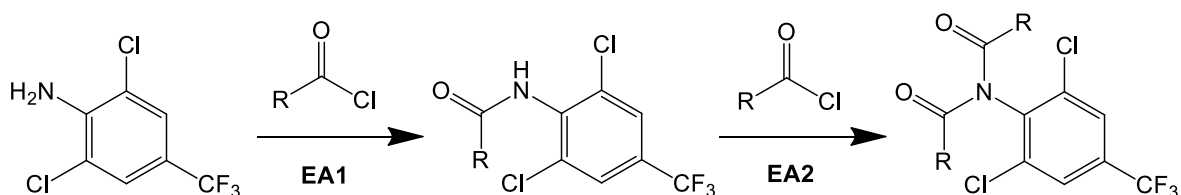


Figura 62. Obtención de productos mono y diacilado

Inesperadamente, obtuvimos mezcla de productos. Los rendimientos manifiestan un comportamiento anómalo de la reacción: éstos indican que sólo el 28% de la arilamina inicial reaccionó para generar el monoacilado **a**, quedando el resto sin reaccionar. Luego, parte del compuesto **a** formado reaccionó con un segundo cloruro de acilo para dar el diacilado **b**.

Es decir que de las dos acilaciones, la energía de activación de la segunda es menor a la de la primera:



**Figura 63.** Reacción general de diacilación

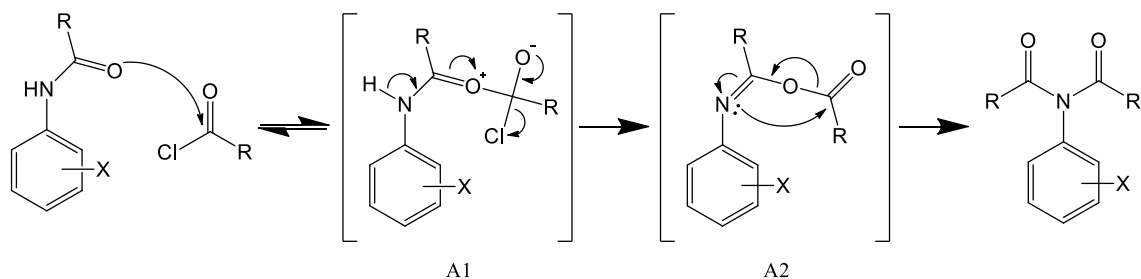
Donde  $EA1 > EA2$

Para controlar la formación de los productos, modificamos la estequiometría de la reacción 4.4.1:

**Tabla 20.** Resultados

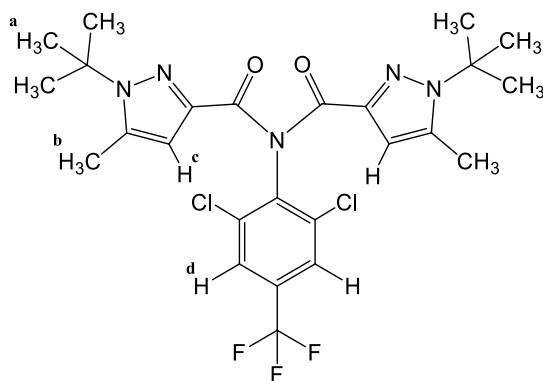
Eq Acido	Eq Amina	Productos	Rto
2	1	<b>a, b</b>	18 %, 10 %
1	3	<b>a</b>	24 %
3	1	<b>b</b>	97 %

Los rendimientos muestran que la formación de **a** está desfavorecida. Ésto puede deberse al efecto inductivo de los átomos de cloro en posición *orto* de la arilamina. Pero, al contrario de los otros derivados monoacilados obtenidos, el nitrógeno de la amida es suficientemente nucleofílico para atacar a un segundo cloruro de acilo espontáneamente. Nagaraj y Kumar [123] han reportado un caso similar y propusieron un mecanismo plausible que explica éste comportamiento:



**Figura 64.** Mecanismo de la segunda acilación

Según ésta hipótesis, la fuerza impulsora de la segunda acilación no es la nucleofilicidad del nitrógeno de la amida, sino del oxígeno. Los autores calcularon que en el enlace amida el O es más básico que el N. Así, en un medio aprótico y en presencia de un cloruro de acilo, el O actúa como nucleófilo y las amidas monoaciladas estarán en equilibrio con su respectivo intermediario **A1**. Sin embargo, la transformación irreversible al intermediario **A2** requiere una alta densidad electrónica en el enlace amida, que sólo se observa en los casos que el arilo posee dos sustituyentes en posición *orto*. Éste par de sustituyentes ejerce un efecto estérico que impide a los electrones  $\pi$  del enlace C=N conjugarse con el anillo aromático, ya que no están en el mismo plano. De ésta forma, los átomos de cloro simultáneamente desfavorecen la primera acilación y facilitan la segunda.



**Figura 65.** Compuesto 4.4.3.b

**Tabla 21.** Análisis del espectro  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )] para el compuesto 4.4.3.b

Desplazamiento Químico Multiplicidad Integración Referencia

1,44	s	18 H	a
2,36	s	6 H	b
6,52	s	2 H	c
7,62	s	2 H	d

## Reacciones 4.5.n

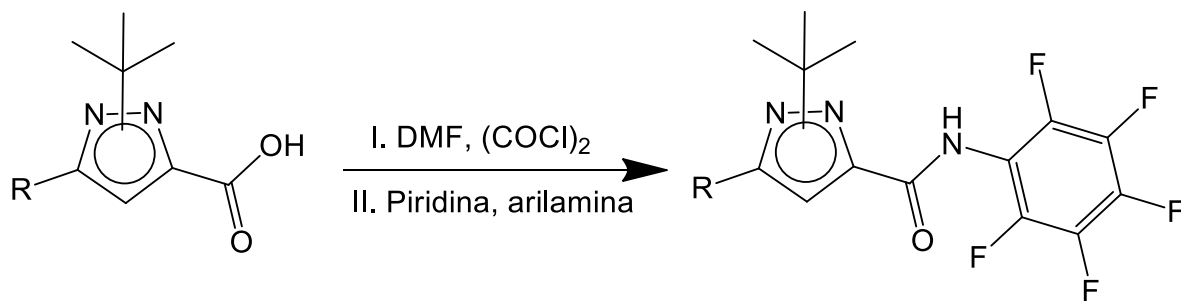


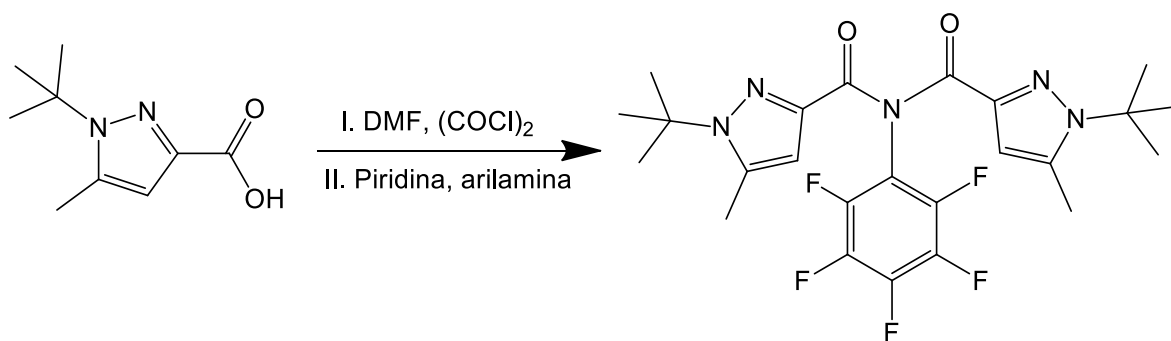
Figura 66. Pirazolamidas a partir de pentafluoroanilina

Tabla 22. Resultados

Reacción	Sustituyente 3*	Sustituyente 5*	Rto
4.5.2			48 %
4.5.4			21 %
4.5.5			49 %

\* de acuerdo a la numeración de posiciones señalada en la Figura 1

### Reacción 4.5.3



Rto: 55 %

Figura 67. Obtención del diacilado 4.5.3

En general, obtuvimos productos monoacilados, excepto en la reacción 4.5.3, donde observamos doble acilación.

## Reacciones 4.6.n

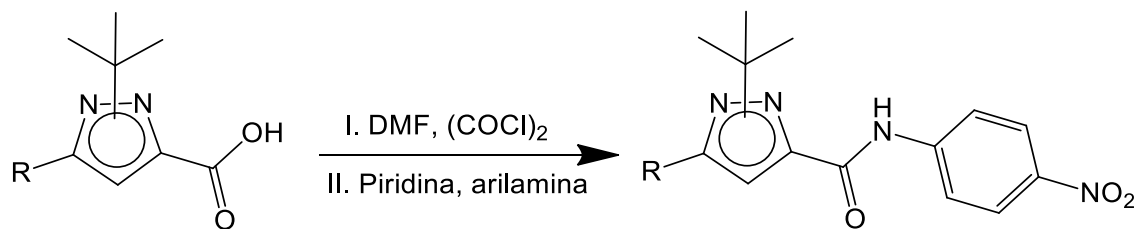
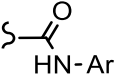
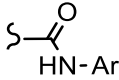

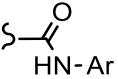

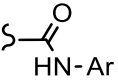
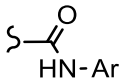



Figura 68. Pirazolamidas a partir de 4-nitroanilina

Tabla 23. Resultados:

Reacción	Sustituyente 3*	Sustituyente 5*	Rto
4.6.2	$\zeta$ -	$\zeta$ - 	81 %
4.6.3	$\zeta$ - 	$\zeta$ -	74 %
4.6.4	$\zeta$ - 	$\zeta$ - 	73 %
4.6.5	$\zeta$ - 	$\zeta$ - 	80 %
4.6.7	$\zeta$ - 	$\zeta$ - 	84 %

\* de acuerdo a la numeración de posiciones señalada en la Figura 1

Reacción 4.7.1

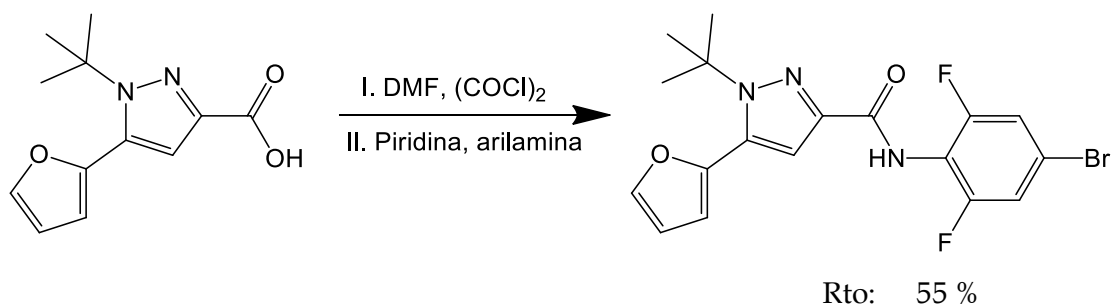
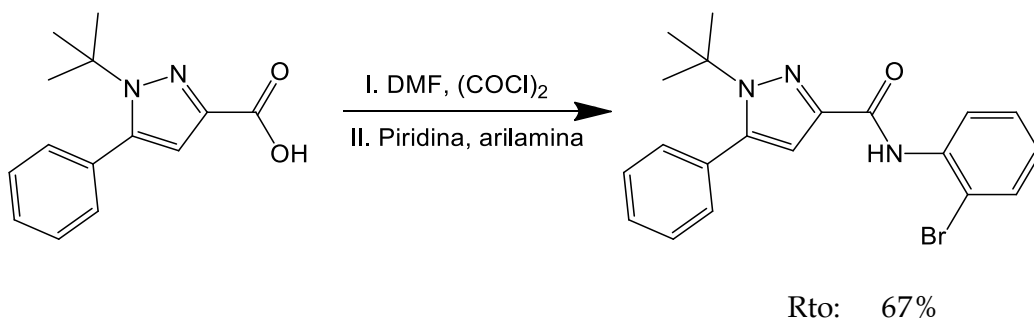


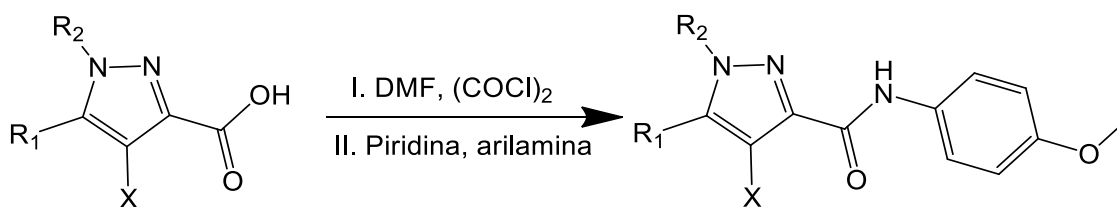
Figura 69. Pirazolamidas a partir de 2,6-difluoro-4-bromoanilina

Reacción 4.8.7



**Figura 70.** Pirazolamidas a partir de 2-bromoanilín

#### Reacciones 4.9.n



**Figura 71.** Pirazolamidas a partir de *p*-anisidina

**Tabla 24.** Resultados

Reacción	R1	R2	X	Rto
4.9.1			H	66 %
4.9.7			H	61 %
4.9.8			Br	74 %
4.9.10			H	71 %

### Resultados

- ✦ Hemos generado precursores dicarboxílicos para obtener pirazoles con distintos sustituyentes.
- ✦ Sintetizamos el anillo de pirazol, descubriendo casos en que ésta síntesis es regioespecífica.

- ✦ Llevamos adelante distintas funcionalizaciones, en especial aquellas que nos permitieron obtener grupos carboxilo para la siguiente etapa. Entre ellas, encontramos un efecto de transesterificación que nos permite invertir la regioisomería de los pirazoles.
- ✦ Logramos acilar arilaminas poco nucleofílicas y obtener productos de doble acilación.

## Conclusiones

Hemos logrado una síntesis eficiente y versátil que nos permitirá evaluar el efecto de numerosos sustituyentes para buscar aquellos que se destaquen por su actividad biológica. La mayoría de los compuestos que obtuvimos en ésta etapa son inéditos en la literatura, lo que los vuelve sumamente interesantes para el desarrollo tecnológico en química fina y farmacología.

Si bien no hemos sintetizado todos los compuestos que podríamos generar a partir de los distintos pasos de síntesis que reportamos, no supondría una dificultad obtenerlos si las pruebas biológicas sugieren que podrían ser de utilidad.

Si pensamos en el eventual escalado de alguno de los compuestos, contamos con las siguientes ventajas: altos rendimientos en las reacciones; capacidad de controlar la regioisomería o de separar los regioisómeros por cromatografía; pasos de síntesis relativamente simples y con escasa formación de subproductos.

Algunas reacciones son interesantes desde el punto de vista de la química verde:

- ✦ La síntesis de Knorr llevada a cabo en etanol, a temperatura ambiente, y sin atmósfera inerte.
- ✦ La hidrólisis de ésteres, que no requiere más que un medio acuoso y NaOH, y que remueve impurezas y productos secundarios de reacciones anteriores, elimina la necesidad de hacer cromatografías en columna hasta éste paso (suponiendo que se trabaja con métodos optimizados).



✦ La oxidación del furilo, si bien tiene baja economía atómica, se destaca por la utilización de un catalizador y porque hemos cambiado el  $\text{CCl}_4$  y el  $\text{KIO}_4$  por  $\text{AcOEt}$  y  $\text{NaClO}$  sin afectar los rendimientos.

✦ Las síntesis de amidas, aunque requiere un exceso de pirazol carboxilatos para lograr una buena conversión, nos permite separar al final de la reacción productos de sustratos simplemente por extracción ácido-base, recuperando los pirazol carboxilatos. Excepto en los casos de doble acilación que reportamos, éstas reacciones no suelen generar subproductos, lo que simplifica mucho el paso de purificación.

# Capítulo II

Ensayos en garrapatas

*Pero no he abandonado las otras ramas de la ciencia. Mal químico sería el que se limitara exclusivamente a esa porción del conocimiento humano.*

Mary Shelley  
*Frankenstein*

## Introducción

Para los ensayos sobre garrapatas utilizaremos el método que se conoce como *Prueba del paquete larval*, y fue reportado por Stone y Haydock en 1962[124]. Decidimos utilizarlo por indicación del grupo dirigido por el Dr. Alberto Guglielmone en INTA Rafaela, de reconocida trayectoria en el estudio de *R. microplus*.

## Objetivo

Evaluar la actividad de los compuestos más representativos entre los sintetizados sobre larvas de *R. microplus*.

## Metodología

El estudio consistió en impregnar papeles de filtro de 10x10 cm con los compuestos disueltos en aceite de oliva y depositar entre 40 y 80 larvas en cada papel. Luego doblarlos y cerrarlos con broches, incubarlos durante 24 hs, y al cabo de ese tiempo contar las larvas vivas y muertas.

Ya que la especie *R. microplus* no puede reproducirse en laboratorio, el grupo de INTA Rafaela, dirigido por el Dr. Guglielmone, obtuvo varias hembras "engorged" de vacas en Santiago del Estero, provincia donde la problemática no está controlada. Luego incubaron éstas hembras hasta que liberaron los huevos (alrededor de 3000), que a su vez fueron incubados hasta que eclosionaron las garrapatas en etapa larval.

Preparamos las soluciones de impregnación disolviendo los compuestos en una parte de diclorometano y dos de aceite de oliva extra virgen, de manera de obtener dos concentraciones: 0.005 M y 0.00015 M, basadas en estudios sobre cipermetrina.

Para tener un control positivo, purificamos por cromatografía en columna el compuesto *fipronil* de una muestra del producto veterinario CLAP y le dimos el mismo tratamiento que a los pirazoles sintetizados.



**Figura 72.** Papel impregnado, doblado y asegurado con broches a los costados. El tercer broche cerrará la abertura restante.



**Figura 73.** Prole larval de una sola hembra en placa de petri.



**Figura 74.** Colocamos algunas larvas en el papel con una espátula.



**Figura 75.** Colocado el tercer broche, las larvas no pueden escapar del paquete.



**Figura 76.** Paquetes larvales en una caja antes de cerrarla y llevarla a incubadora



**Figura 77.** Tras 24 h en incubadora, realizamos el conteo de larvas en cada papel sobre una lámpara de recuento.

## Resultados

Ensayamos los siguientes compuestos (**figura 78**) en dos concentraciones; 0.005 M, y 0.00015 M. De éstos, sólo el Fipronil tuvo actividad, con una mortalidad de larvas de 100% a 0.005 M y de 0% a 0.00015 M.

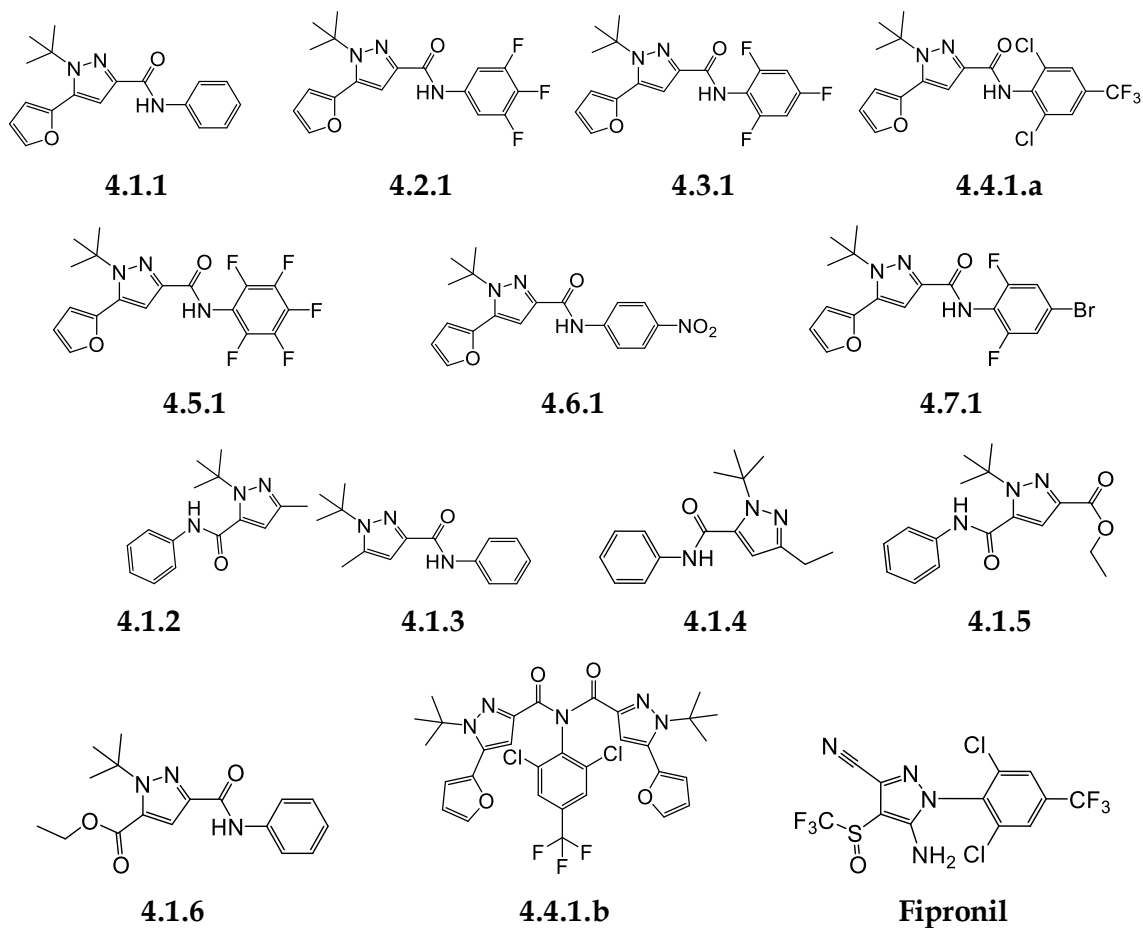


Figura 78. Compuestos ensayados

## Conclusiones

Debe tenerse en cuenta que los resultados negativos no son producto de la falta de absorción. Se trata de un ensayo por contacto, es decir que las larvas absorben los compuestos a través de los espiráculos que usan para respirar. El método de Stone y Haydock fue desarrollado y probado con plaguicidas muy lipofílicos (DDT, dieldrin, coumaphos) e incluso lo hemos puesto a prueba con fipronil, obteniendo resultados positivos. Ésto nos lleva a pensar que la inactividad de nuestros compuestos lipofílicos no es producto de la falta de absorción, ya que el método se adecúa bien a otros igual de lipofílicos.

La ausencia de resultados positivos entre los compuestos ensayados nos obligó a revisar la bibliografía para buscar los cambios estructurales que pudieran conferirle actividad a los compuestos. De los dos compuestos en que nos basamos, *tebufenpirad* y *fipronil*, sólo *fipronil* tiene actividad sobre *R. microplus*. *Tebufenpyrad* es muy efectivo para controlar ácaros como *P. citri* y *T. urticae* en cultivos de algodón, cítricos, berenjena, y ornamentales, pero no tiene actividad reportada sobre la garrapata bovina. De hecho, un árbol filogenético de las secuencias de acetilcolinesterasas en vertebrados y artrópodos, muestra que nuestra especie de estudio se encuentra no sólo separada de los insectos y otras garraptas, sino en una rama diferente a *T. urticae*.

Incluso, en el trabajo de Baxter *y col.*[35], los autores encontraron mayor similitud de secuencia entre las colinesterasas de vertebrados y de *R. microplus* que entre garrapatas e insectos. En su review de 2007 Lees y Bowman [12], decepcionados por el lento avance de la neurobiología de garrapatas, aciertan al afirmar que:

*“Hay una distancia evolutiva considerable entre garrapatas e insectos que provoca dificultades en estrategias de clonación basadas en homología. Las garrapatas no son simplemente insectos de ocho patas!”*

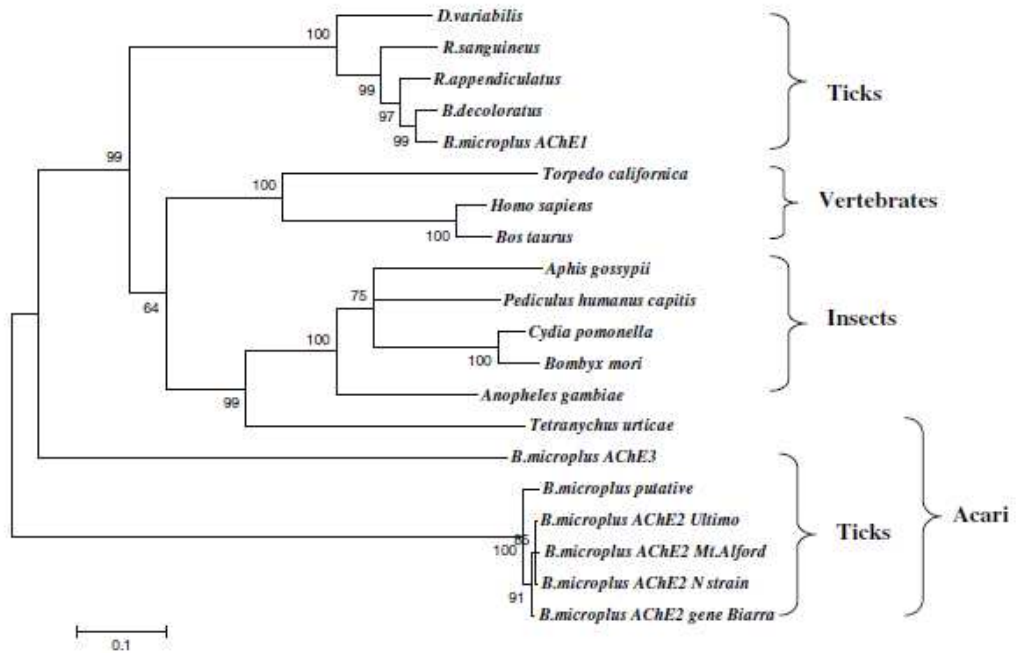


Figura 79. Extraído de Baxter y col.[35]

Los datos filogenéticos tienen su consecuencia directa en el control de plagas, y se aprecia al estudiar los compuestos neonicotinoides. Ya en 2014, Lees y Bowman[125] publicaron un estudio indagando las causas de la inactividad del neonicotinoide Imidacloprid sobre garrapatas. En dicho trabajo clonaron el nAChR de *R. sanguineus* (garrapata canina), lo expresaron sobre un tejido de *X. laevis*, y midieron la respuesta del receptor a potenciales agonistas. El estudio concluye que el receptor es sensible a acetilcolina y nicotina, pero insensible a los neonicotinoides imidacloprid y spinosad.



# Capítulo III

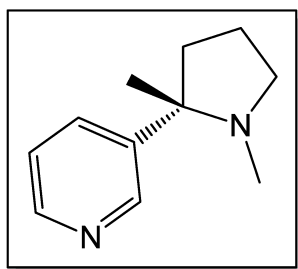
Síntesis

*Cada ciencia pone en marcha un conjunto de hipótesis; estas hipótesis son decisiones en tanto que construyen realidad. Hoy en día esto es ampliamente aceptado. Lo que se niega es la significación ética de cada una de estas decisiones, cómo cada una de ellas implica una cierta forma de vida, un cierto modo de percibir el mundo.*

Tiqqun  
Llamamiento y otros fogonazos

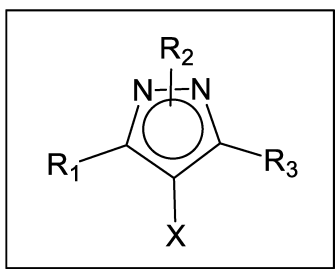
## Introducción

Numerosos estudios mencionan al extracto de la hoja de tabaco como un acaricida e insecticida orgánico de uso extendido en las poblaciones rurales [126, 127, 128, 129], y en un trabajo de 2016 [130], los autores exploran la efectividad de distintos extractos de tabaco sobre huevos de *R. microplus*. Incluso en un trabajo de 2010, Booker y col [131] estudian el potencial uso bactericida, fungicida e insecticida del bio-aceite producto de la pirólisis del tabaco, haciendo énfasis en la abundancia de ésta materia prima y el decrecimiento gradual de la industria tabacalera.



**Figura 80.** Estructura de la nicotina

Con ése marco decidimos reenfocar el trabajo haciendo algunos ajustes en la síntesis para obtener derivados de pirazol más simples, conformados por dos anillos adyacentes y evitando los grupos voluminosos. Aunque de modo intuitivo, éstas modificaciones nos permitirían obtener moléculas que no estén impedidas de entrar al sitio activo de los receptores nicotínicos. Incluimos también el grupo piridinilo como una variante sintética que nos permitiría obtener análogos pirazólicos de la nicotina.



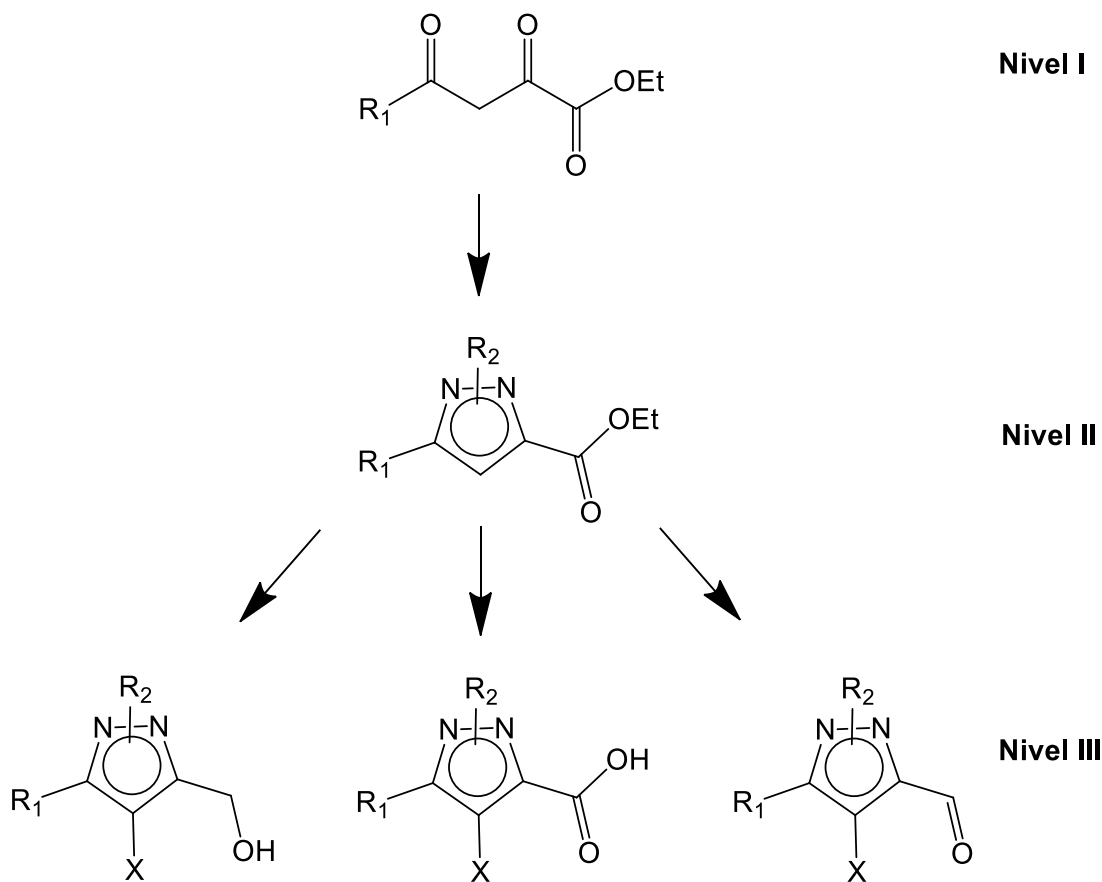
**Figura 81.** Estructura planteada

Donde:

- R<sub>1</sub> es un anillo aromático que puede ser los ya trabajados furilo y fenilo, o un piridinilo.
- R<sub>2</sub> es *terc*-butilo, metilo o un hidrógeno.
- R<sub>3</sub> es un grupo poco voluminoso más o menos polar.
- X es un hidrógeno o un halógeno.

## Objetivo

Obtener pirazoles conformados por dos anillos adyacentes, evitando la inclusión de grupos voluminosos y explorando variantes en la polaridad, a través del siguiente esquema de síntesis:



**Figura 82.** Mapa de síntesis

## Metodología

### Nivel I -Síntesis de dicarbonílicos

Para ésta etapa utilizamos la misma técnica que para la síntesis de **1.1**. Sin embargo, debimos modificar la metodología de extracción del crudo, ya que el grupo piridinilo, a diferencia del furilo, es protonable. Esto significa que al neutralizar el *terc*-butóxido, debemos evitar que el *pH* baje demasiado para que el producto sea soluble en acetato de etilo.

## Reacciones 1.n

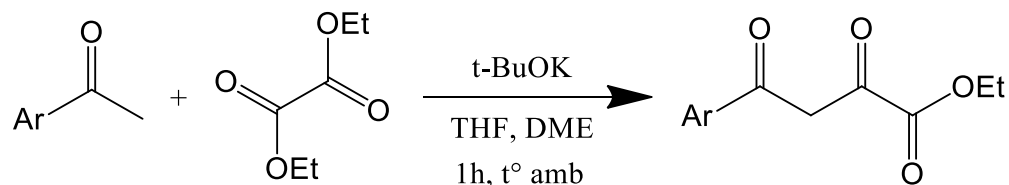


Figura 83. Condensación de Claisen

Tabla 25. Resultados

Reacción	Ar	Rto
1.4		44 %
1.5		52 %

## Nivel II-Síntesis de pirazol

La síntesis de Knorr utilizando dicarbonílicos con grupos piridinilo tenía el doble propósito de obtener análogos de nicotina y verificar si en éstos casos la condensación es regioespecífica. Utilizamos la misma técnica que describimos para 2.1.1.

### Reacciones 2.1.n

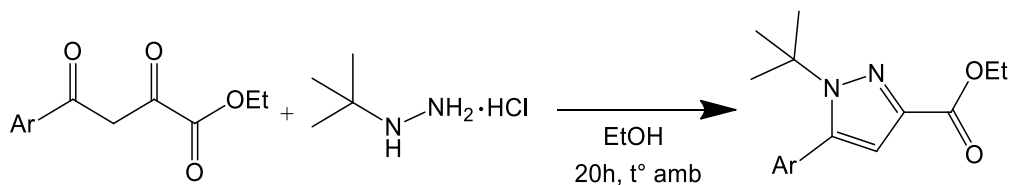


Figura 84. Síntesis de Knorr

Tabla 26. Resultados

Reacción	Ar	Rto
2.1.5		40 %
2.1.6		45 %

## Nivel III - Funcionalización

Nuevamente hidrolizamos los ésteres, no ya para obtener precursores de amidas, sino para evaluar la actividad biológica de compuestos polares.

### Reacciones 3.1.n

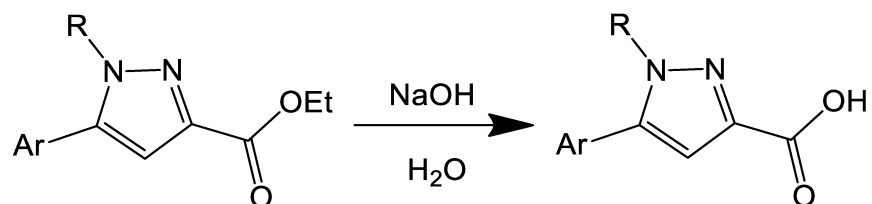


Figura 85. Hidrólisis del éster

Tabla 27. Resultados

Reacción	Ar	R	Rto
3.1.8		H	80 %
3.1.9			72 %
3.1.10			69 %

## Reducción

Otra alternativa para generar pirazoles polares es reducir los ésteres a alcoholes, lo cual aplicamos a una variedad de compuestos previamente sintetizados:

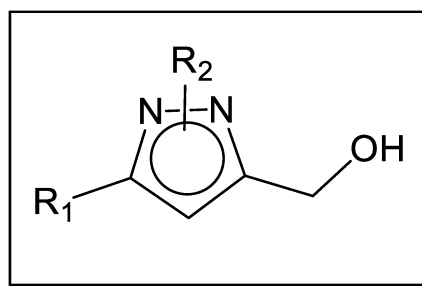


Figura 86. Fórmula general de pirazoles reducidos

La reducción de los carboxilatos se lleva a cabo con  $\text{LiAlH}_4$  en THF anhidro, bajo atmósfera inerte y con un ligero calentamiento.

### Reacciones 3.4.n

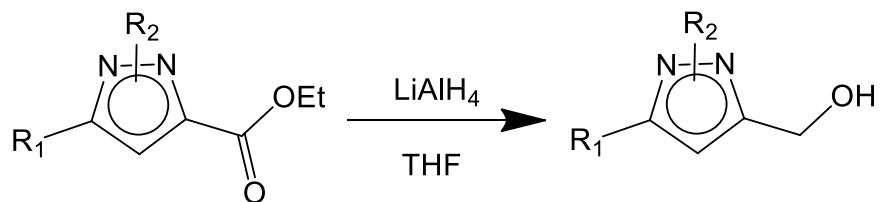


Figura 87. Reacción general de reducción

Tabla 28. Resultados

Reacción	Sustituyente 3*	Sustituyente 5*	R2	Rto
3.4.1	$\zeta$ -	$\zeta$ -OH	$\zeta$ -	82 %
3.4.2	$\zeta$ -OH	$\zeta$ -	$\zeta$ -	75 %
3.4.3	$\zeta$ -OH	$\zeta$ -	$\zeta$ -	72 %
3.4.4	$\zeta$ -OH	$\zeta$ -	H	75 %
3.4.5	$\zeta$ -OH	$\zeta$ -	$\zeta$ -	79 %
3.4.6	$\zeta$ -OH	$\zeta$ -	H	80 %
3.4.7	$\zeta$ -OH	$\zeta$ -	$\zeta$ -	95 %
3.4.8	$\zeta$ -OH	$\zeta$ -	$\zeta$ -	97 %

\* de acuerdo a la numeración de posiciones señalada en la Figura 1

### Oxidación a aldehído

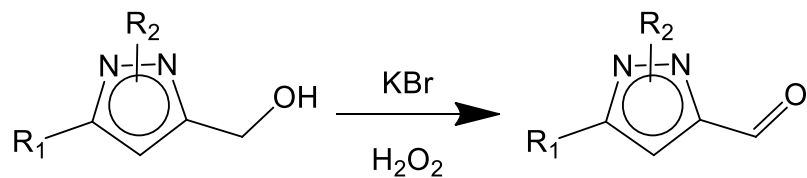
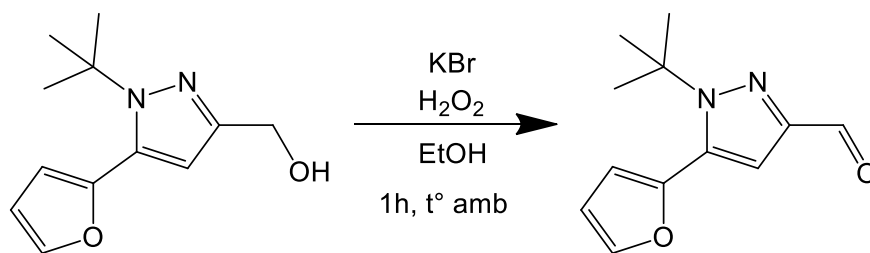


Figura 88. Reacción general de oxidación

Reacción 3.5.1



Rto: 98 %

Figura 89. Oxidación a aldehído

Eliminación del grupo *tert*-butilo

Reacciones 3.6.n

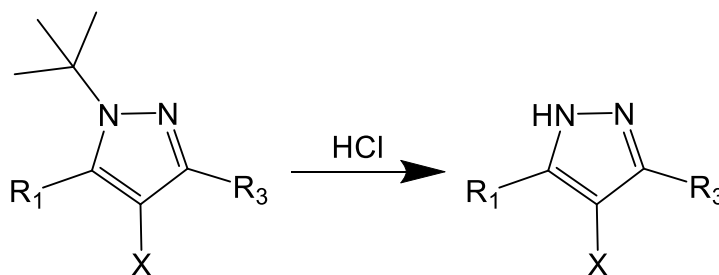


Figura 90. Reacción general de la eliminación del *tert*-butilo

Tabla 29. Resultados

Reacción	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	X	Rto
3.6.1			Br	70 %
3.6.2			H	95 %



## Resultados

- ✦ Añadimos nuevos precursores dicarbonílicos que resultan en pirazoles con un piridinilo adyacente.
- ✦ Obtuvimos pirazoles a partir de los nuevos precursores, que mantuvieron la regioespecificidad de los casos anteriores.
- ✦ Ensayamos numerosas transformaciones de grupos funcionales con el objetivo de explorar la actividad biológica de sustituyentes pequeños y polares, éstos son: carboxilatos, hidroxilos, aldehídos, e incluso la remoción del *terc*-butilo unido al nitrógeno pirazólico.

## Conclusiones

La síntesis de Knorr a partir de dicarbonílicos con grupos piridinilo fue regioespecífica en ambos casos, reforzando nuestra hipótesis de que la presencia de un grupo aromático en los dicarbonílicos favorece la enolización del carbonilo en  $\alpha$ . A futuro debemos seguir estudiando a través de modelado molecular para determinar los factores que la rigen. También sería muy interesante encontrar hidrazinas con otros sustituyentes que se comporten de ésta manera, sobre todo si esos sustituyentes unidos a N son fáciles de funcionalizar.

En general las reacciones de ésta etapa tuvieron buenos rendimientos. Destaca sobre todo la oxidación del hidroxilo a aldehído por su buen rendimiento y porque usamos un método que respeta varios postulados de la química verde: usar disolventes renovables, catalizadores, y generar agua como único subproducto.

# Capítulo IV

Ensayos en garrapatas

*Cada descubrimiento y progreso, cada incremento en la riqueza de la humanidad, se origina en el conjunto del trabajo manual y cerebral de ayer y hoy. Entonces, qué derecho tiene nadie de apoderarse de una partícula de ese todo y decir: "Esto es mío y no vuestro"?*

Piotr Kropotkin

## Introducción

Nuevamente trabajamos en INTA Rafaela con el método de Stone y Haydock. Ésta vez presentamos una serie de compuestos en febrero de 2019 y nos basamos en esos resultados para generar una segunda serie para el screening y dos estudios de CL50.

## Objetivo

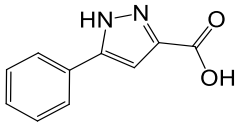
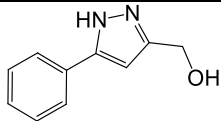
Evaluar la actividad de los compuestos más representativos entre los sintetizados sobre larvas de *R. microplus*.

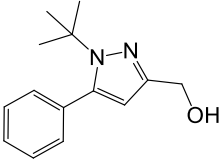
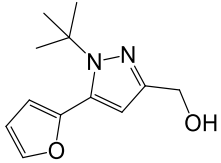
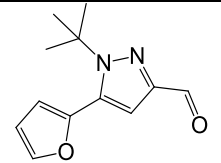
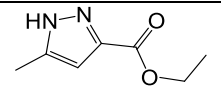
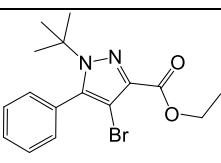
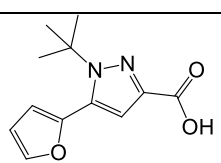
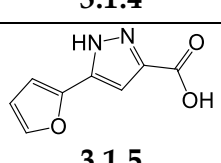
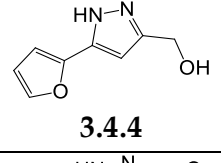
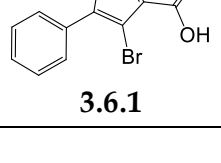
## Metodología

Repitiendo el método del capítulo II, impregnamos papeles de filtro de 10x10 cm con los compuestos disueltos en aceite de oliva y depositamos entre 40 y 80 larvas en cada papel. Al cabo de 24 hs de incubación, contamos las larvas vivas y las muertas.

## Resultados

**Tabla 30.** Resultados.

Referencia	Compuesto	V1	M1	V2	M2	% Muertas
A	 <p><b>3.1.8</b></p>	69	4	35	3	6
B	 <p><b>3.4.6</b></p>	58	0	77	0	0

C	 <p><b>3.4.5</b></p>	54	0	34	0	0
D	 <p><b>3.4.3</b></p>	78	10	90	1	6
E	 <p><b>3.5.1</b></p>	78	0	61	0	0
F	 <p><b>2.3.1</b></p>	83	0	64	0	0
G	 <p><b>3.3.2</b></p>	38	0	62	0	0
H	 <p><b>3.1.4</b></p>	80	0	45	5	4
I	 <p><b>3.1.5</b></p>	34	2	87	0	2
J	 <p><b>3.4.4</b></p>	15	41	77	21	40
K	 <p><b>3.6.1</b></p>	4	60	10	36	87

L	Hidrodestilado de hojas de tabaco	0	40	2	70	98
Blanco		77	0	42	0	0

Actividad larvicida sobre *R. microplus*. Concentraciones al 1%. V y M refieren a la cantidad de individuos vivos y muertos en los ensayos por duplicado (1 y 2).

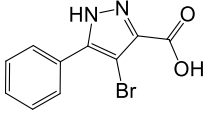
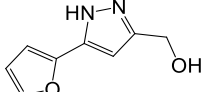
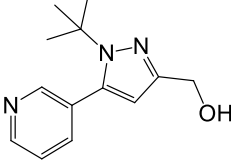
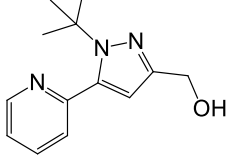
La mayoría de los compuestos no tuvieron actividad significativa. Mención aparte merece el compuesto **3.4.3**, que aunque no provocó un alto número de muertes, observamos que alteraba el comportamiento de las larvas. En éste tipo de ensayos, las larvas quietas cuentan como muertas (aunque su tamaño es mínimo, se observan aplastadas e inmóviles), y las larvas que se desplazan cuentan como vivas. Sin embargo, las larvas del ensayo D, aunque vivas, mostraban cierta descoordinación que les impedía desplazarse o lo hacían muy lentamente y sin rumbo cierto. Aunque el compuesto tiene baja actividad larvicida, éste efecto disruptivo sobre la motilidad puede ser significativo a la hora de buscar un método para el control de plagas.

El ensayo con mayor actividad resultó ser el del hidrodestilado de hojas de tabaco (ensayo L), con un efecto larvicida prácticamente total al 1%. Los ensayos J y K también mostraron una importante actividad, aunque los resultados no se reproducen en el ensayo duplicado. Ésto nos llevó a pensar que puede tratarse de falsos positivos, producto de la contaminación con el hidrodestilado de tabaco, ya que éstos sobres compartían incubadora con el ensayo L. Si bien tuvimos el recaudo de que los papeles no se tocaran para evitar contaminaciones, estimamos que la mínima volatilización o aerosolización de los compuestos del hidrodestilado con la humedad en la incubadora cerrada puede haber afectado a las larvas de los otros sobres, generando resultados tan dispares. Por éste motivo, decidimos repetir los ensayos correspondientes a los compuestos **3.4.4** y **3.6.1**.

Sin considerar D, J y K, los compuestos sintetizados que presentan cierta actividad larvicida son A, H e I. Todos ellos comparten una constante estructural: el grupo carboxilo. Asimismo, los compuestos sin actividad son precisamente los que tienen grupos más hidrofóbicos.

Basados en esos resultados, generamos un nuevo grupo de compuestos que fueron ensayados en julio de 2019, con concentraciones de 1%. En ésta ocasión repetimos los dos compuestos que podían ser falsos positivos, y añadimos dos pirazoles derivados de acetilpiridinas.

**Tabla 31.**Resultados

Referencia	Compuesto	V1	M1	V2	M2	%Muertas
M	 <b>3.6.1</b>	69	93	16	32	60
N	 <b>3.4.4</b>	17	105	59	162	78
O	 <b>3.4.8</b>	0	100	0	100	100
P	 <b>3.4.7</b>	36	112	55	131	73
Blanco		209	14	227	18	7

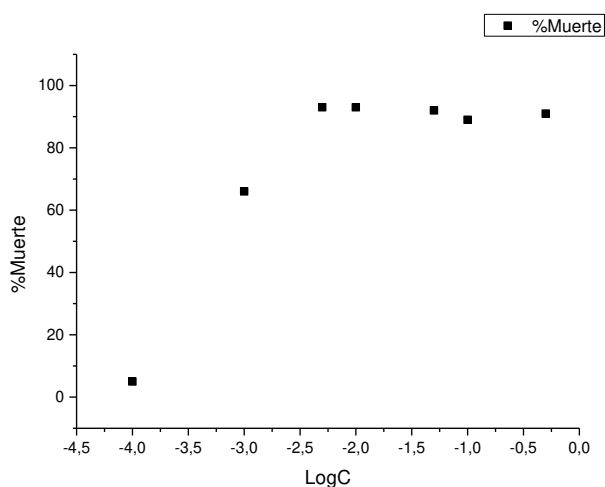
Actividad larvicida sobre *R. microplus*. Concentraciones al 1%.

Los ensayos M y N muestran que los compuestos **3.6.1** y **3.4.4** efectivamente tienen actividad propia. En cuanto a los derivados de acetilpiridinas, éstos tuvieron una actividad larvicida muy importante, especialmente el **3.4.8**.

Para obtener datos más precisos de los compuestos de interés, llevamos adelante estudios de CL50 del hidrodestilado de tabaco y del compuesto **3.4.3** (ensayo D).

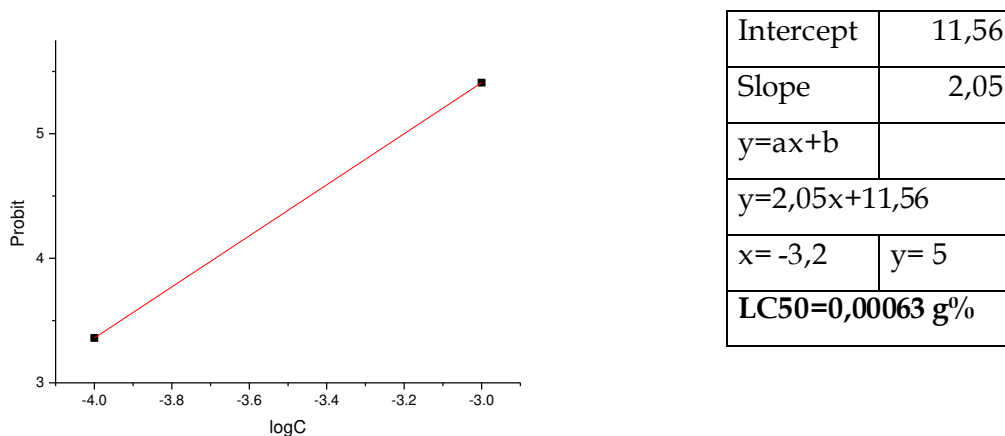
**Tabla 32.** Estudio de Concentración Letal 50 para el hidrodestilado de hojas de tabaco.

C %	logC	V <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>TOTAL</sub>	V+M <sub>TOTAL</sub>	%M	%M <sub>CORR</sub>	Probit
0		209	14	227	18	32	468	6,838		
0,0001	-4	198	17	103	25	42	343	12	5	3,36
0,001	-3	37	137	71	170	307	415	73	66	5,41
0,005	-2,30103	0	100	0	100	200	200	100	93	
0,01	-2	0	100	0	100	200	200	100	93	
0,05	-1,30103	3	275	0	284	559	562	99	92	
0,1	-1	12	259	7	215	474	493	96	89	
0,5	-0,30103	5	318	5	217	535	545	98	91	



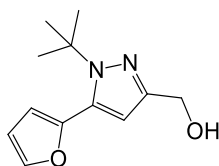
**Figura 91.** Distribución de los datos de **Tabla 36**

Las concentraciones iguales o mayores a  $5 \times 10^{-3}$  muestran una efectividad máxima, que ronda el 90 % por la corrección con el blanco. De todas las concentraciones ensayadas, sólo se dibuja una pendiente distinta de cero entre  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-3}$ . Por tanto, la CL50 se calcula a partir de éstos dos datos:



**Figura 92.** Pendiente entre los dos valores más bajos

Sin duda, dos puntos no son suficientes para obtener una CL50 confiable. Sin embargo, éste estudio nos da una buena aproximación para conocer el rango de concentraciones en que debemos trabajar en adelante.

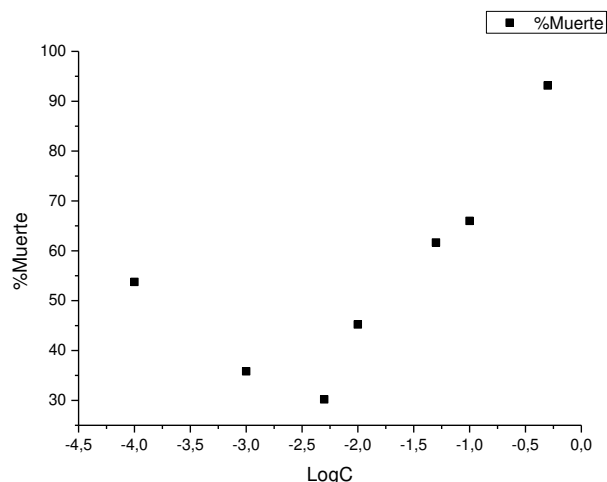


**Figura 93.** Compuesto 3.4.3

**Tabla 33.** Estudios de Concentración Letal 50 para el compuesto 3.4.3

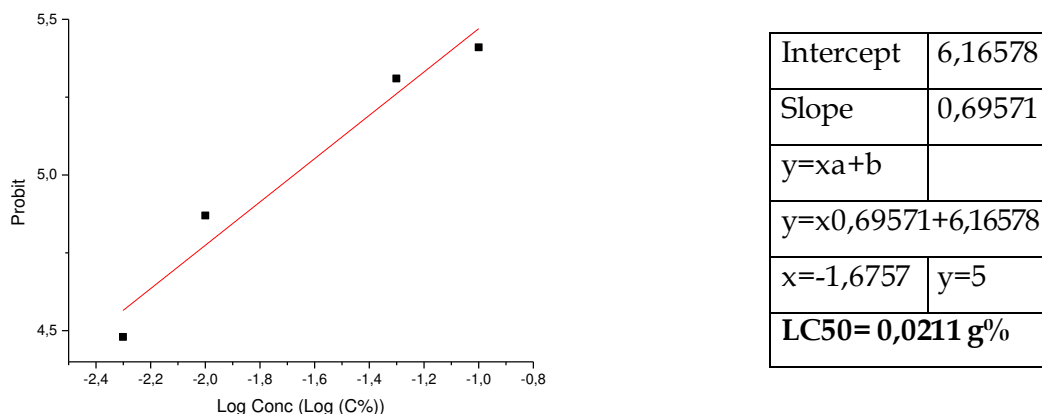
C%	Log C%	V <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>TOTAL</sub>	V+M <sub>TOTAL</sub>	%M	%M <sub>CORR</sub>	Probit
0		209	14	227	18	32	468	6,838		
0,0001	-4	136	140	65	169	309	510	60,588	53,750	
0,001	-3	56	42	30	22	64	150	42,667	35,829	
0,005	-2,30103	42	18	77	52	70	189	37,037	30,199	4,48
0,01	-2	34	56	47	32	88	169	52,071	45,233	4,87
0,05	-1,30103	21	55	31	58	113	165	68,485	61,647	5,31
0,1	-1	18	57	29	69	126	173	72,832	65,994	5,41
0,5	-0,30103	0	100	0	100	200	200	100,00	93,162	





**Figura 94.** Distribución de los datos de **Tabla 37**

Se observa una pendiente entre 0.005 y 0.1, a partir de cuyos datos calculamos la LC50. Además hay dos datos anómalos que corresponden a las concentraciones más bajas, en las que hay aumento de la mortalidad.



**Figura 95.** Regresión lineal de los datos tomados

Ésta pendiente de cuatro puntos nos permite calcular una CL50 confiable para el compuesto **3.4.3**. Sin embargo, la aparición de resultados anómalos en las concentraciones más bajas nos obliga a repetir el estudio, descartando cualquier error en la operatoria, para confirmar éste hallazgo. Otro dato que no debemos despreciar es que el compuesto **3.4.3** se

ha comportado diferente en los ensayos de febrero y los de julio. En los primeros, su efecto sobre las larvas no era la muerte sino un "aletargamiento". En los segundos, observamos efecto larvicida.

Esa diferencia de comportamiento y el hecho de que el blanco de muestra haya presentado un alto número de muertes en los ensayos de julio (cercano al 7%), mientras en febrero se mantenía en 0%, nos hace pensar que en ésta ocasión las larvas pueden no haber estado en su condición óptima. Si bien el objetivo del blanco de muestra es corregir numéricamente el umbral de falsos positivos, no sabemos en qué medida un cierto "debilitamiento" de las larvas puede estar afectando su resistencia a los compuestos.

### Conclusiones

Tras haber observado ausencia de actividad en los compuestos ensayados en el capítulo II, finalmente hemos logrado sintetizar un grupo de compuestos con similitud estructural que tienen efecto larvicida. Éstos son los primeros pasos en el diseño de una nueva familia de garrapaticidas hacia los que *R. microplus* parece no haber desarrollado resistencia. Planteamos los siguientes pasos en la continuidad del trabajo:

- ✦ Avanzar con los estudios de CL50 para determinar qué compuestos son más potentes. Repetir los ya realizados para obtener datos más fiables, y estudiar los compuestos derivados de acetilpiridinas, que resultan prometedores.
- ✦ A medida que se obtienen resultados, realizar estudios de docking que nos permitan hacer predicciones de la relación estructura/actividad.
- ✦ Evaluar la toxicidad hacia los mamíferos de los compuestos que perfilen como líderes.

# Capítulo V

Pruebas en colinesterasas

*Modelos fijos, incapaces de adaptación, de flexibilidad, tan sólo ofrecen una jaula mejor. La verdad está afuera de todos los modelos.*

Bruce Lee  
*El tao del jeet kune do*

## Introducción

En el último tiempo, la búsqueda de agentes anticolinesterásicos ha ocupado gran parte de los esfuerzos de la química medicinal. Ésto se debe a que la inhibición de la colinesterasa es la estrategia terapéutica más aceptada para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer [132, 133, 134]. El hallazgo de compuestos pirazólicos con actividad contra AChE [135, 136, 137] nos inspiró a ensayar algunos de los que sintetizamos para evaluar su potencial farmacológico.

Con éste objetivo, nos pusimos en contacto con la Doctora Ana Murray, de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca), de reconocida experiencia en la investigación de ésta enzima.

## Objetivo

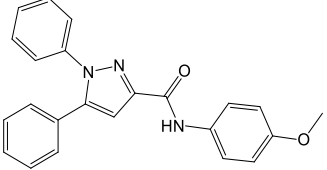
Evaluar la actividad de una serie de compuestos representativos entre los sintetizados sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

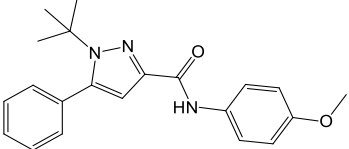
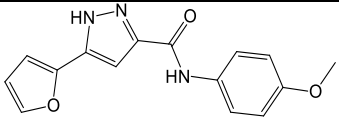
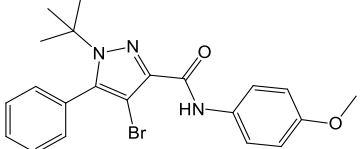
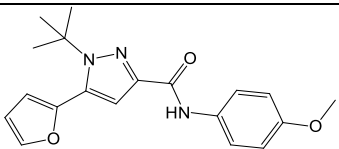
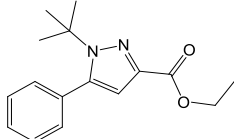
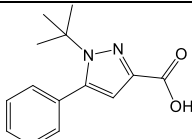
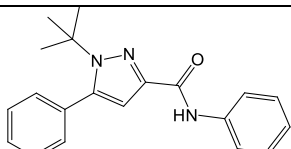
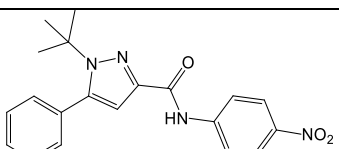
## Metodología

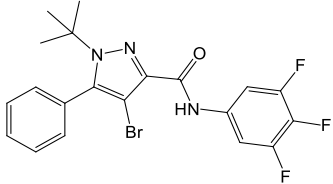
Como un trabajo colaborativo entre ambos grupos, ensayamos la actividad inhibitoria de 10 compuestos frente a AChE y BuChE, dado que ambas enzimas cumplen un rol en la progresión de la enfermedad [138].

## Resultados

**Tabla 34.** Resultados de inhibición de AChE y BuChE

Referencia	Estructura	Actividad
A	 4.9.10	IC <sub>50</sub> ACE > 100 µM IC <sub>50</sub> BuCE = 53.9 µM

<b>B</b>	 <p style="text-align: center;"><b>4.9.7</b></p>	<p><math>IC_{50}</math> ACE &gt; 100 <math>\mu</math>M  <math>IC_{50}</math> BuCE = 0.35 <math>\mu</math>M</p>
<b>C</b>	 <p style="text-align: center;"><b>3.6.2</b></p>	<p><math>IC_{50}</math> ACE &gt; 100 <math>\mu</math>M  <math>IC_{50}</math> BuCE = 13.3 <math>\mu</math>M</p>
<b>D</b>	 <p style="text-align: center;"><b>4.9.8</b></p>	<p><math>IC_{50}</math> ACE &gt; 100 <math>\mu</math>M  <math>IC_{50}</math> BuCE = 2.4 <math>\mu</math>M</p>
<b>E</b>	 <p style="text-align: center;"><b>4.9.1</b></p>	<p><math>IC_{50}</math> ACE &gt; 100 <math>\mu</math>M  <math>IC_{50}</math> BuCE = 46.8 <math>\mu</math>M</p>
<b>F</b>	 <p style="text-align: center;"><b>2.1.4</b></p>	<p><math>IC_{50}</math> ACE &gt; 100 <math>\mu</math>M  <math>IC_{50}</math> BuCE = 0.022 <math>\mu</math>M</p>
<b>G</b>	 <p style="text-align: center;"><b>3.1.5</b></p>	<p><math>IC_{50}</math> ACE &gt; 100 <math>\mu</math>M  <math>IC_{50}</math> BuCE = 6.94 <math>\mu</math>M</p>
<b>H</b>	 <p style="text-align: center;"><b>4.1.7</b></p>	<p><math>IC_{50}</math> ACE &gt; 100 <math>\mu</math>M  <math>IC_{50}</math> BuCE = 38.22 <math>\mu</math>M</p>
<b>I</b>	 <p style="text-align: center;"><b>4.6.7</b></p>	<p><math>IC_{50}</math> ACE &gt; 100 <math>\mu</math>M  <math>IC_{50}</math> BuCE &gt; 100 <math>\mu</math>M</p>

<b>J</b>	 <p><b>4.2.8</b></p>	$IC_{50} \text{ ACE} > 100 \mu\text{M}$ $IC_{50} \text{ BuCE} = 1.49 \mu\text{M}$
----------	---	--

Control positivo *tacrina*:  $IC_{50} \text{ ACE} = 0.029 \mu\text{M}$      $IC_{50} \text{ BuCE} = 0.004 \mu\text{M}$

La cantidad de pirazoles sintetizados desde el comienzo de la tesis nos obligó a ser estratégicos en la selección de los compuestos para los ensayos enzimáticos. Primero enviamos 5 compuestos pirazolamida para evaluar si la estructura general que trabajamos presenta algún tipo de actividad. Decidimos variar únicamente los grupos funcionales de las posiciones 1, 4, y 5 del pirazol para tratar de orientarnos respecto de cuáles son los más activos. Si bien ninguno de los compuestos tuvo efecto significativo sobre la acetilcolinesterasa, todos, en mayor o menor grado, inhibieron la butirilcolinesterasa. Los mejores desempeños se observaron en los ensayos B y D, indicando que el *terc*-butilo y el fenilo en posiciones 1 y 5 son una buena opción. La comparación entre éstos dos sugiere que el bromuro en posición 4 es contraproducente. Otra conclusión importante surge de comparar los ensayos C y E, donde la eliminación del *terc*-butilo parece mejorar la actividad.

Los siguientes 5 compuestos fueron seleccionados manteniendo el fenilo y el *terc*-butilo, pero variando los sustituyentes en posición 3. En el ensayo F se observó una actividad notable, apenas 5 veces menor al control positivo (*tacrina*), pero mostrando en cambio especificidad para la butiril colinesterasa.

### Estudio de docking de los compuestos relevantes

Para analizar los resultados de inhibición en función de la interacción de grupos funcionales, decidimos calcular el anclaje de diferentes compuestos en el sitio catalítico de BuChE humana [139, 140].

Comenzamos calculando el anclaje del compuesto con mejor desempeño:

◆ **Docking del compuesto 2.1.4:**

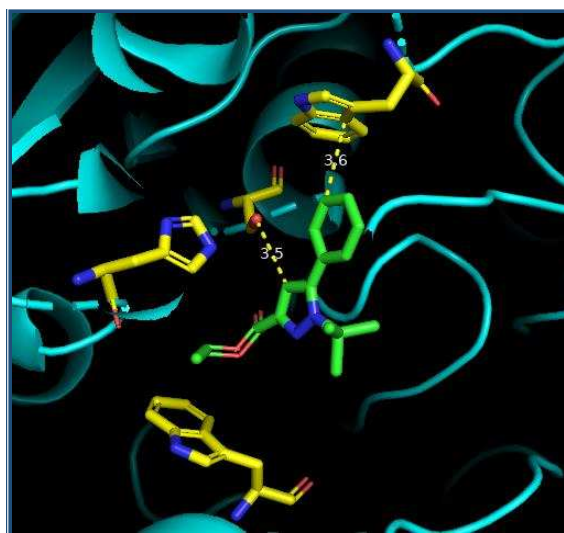
6/10 conformaciones ubican al éster cerca de la serina catalítica (S198)

1/10 conformaciones ubican al nitrógeno del pirazol cerca de S 198

1/10 conformaciones ubican al carbono en posición 4 del pirazol cerca de S 198

0/10 conformaciones ubican al tándem pirazol-fenilo paralelo a W82

1/10 conformaciones ubican al fenilo perpendicular a W231



**Figura 96.** Conformación destacada compuesto 2.1.4

Fenilo- Interacción pi con W231

C4 pirazol- Interacción con S198

A continuación ensayamos cómo se modifican las interacciones al remover el grupo *terc*-butilo:

◆ **Docking del compuesto 2.1.4 sin el *terc*-butilo:**

0/10 conformaciones ubican al éster cerca de S198.

3/10 conformaciones ubican al nitrógeno pirazol cerca de S 198

3/10 conformaciones ubican al carbono en posición 4 del pirazol cerca de S 198

3/10 conformaciones ubican al tándem pirazol-fenilo paralelo a W82

7/10 conformaciones ubican al fenilo perpendicular a W231

Comparando ambos compuestos, el *terc*-butilo parece bloquear numerosas interacciones del anillo pirazol, como la interacción pi con W82, o las orientaciones hacia la serina catalítica.

Entre las numerosas variaciones estructurales ensayadas, se destacan los ésteres fluorados en posición 3:

♦ **Docking del compuesto 2.1.4 sin el *terc*-butilo y reemplazando el etilo por trifluoroetilo:**

2/10 conformaciones ubican al éster cerca de la S198

3/10 conformaciones ubican al nitrógeno pirazol cerca de S 198

1/10 conformaciones ubican al carbono en posición 4 del pirazol cerca de S 198

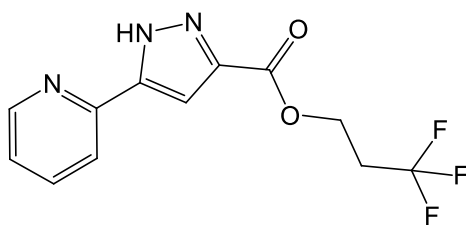
2/10 conformaciones ubican al tándem pirazol-fenilo paralelo a W82

3/10 conformaciones ubican al CF<sub>3</sub> frente a W82

6/10 conformaciones ubican al fenilo perpendicular a W231

2/10 conformaciones ubican al CF<sub>3</sub> frente a W231

Hemos observado que el CF<sub>3</sub> tiende a orientarse hacia los W en numerosas conformaciones, por lo que debería incluirse ésta variante en los estudios enzimáticos. Tras numerosas variaciones, logramos diseñar una molécula líder por sus interacciones con el sitio activo:



**Figura 97.** Compuesto diseñado a partir de los datos del docking

♦ **Docking del compuesto diseñado:**

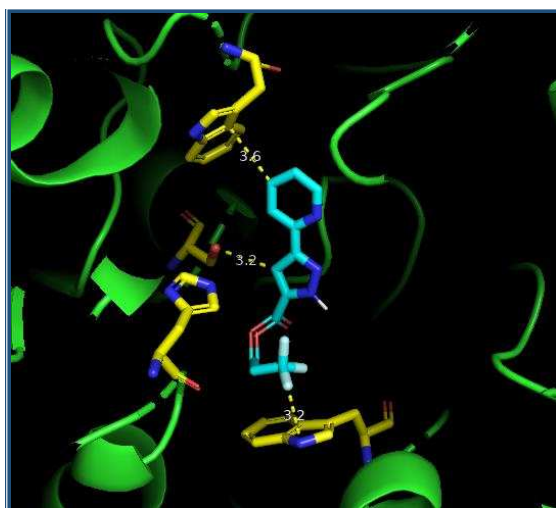
0/10 conformaciones ubican al éster cerca de la S198

2/10 conformaciones ubican al nitrógeno pirazol cerca de S 198



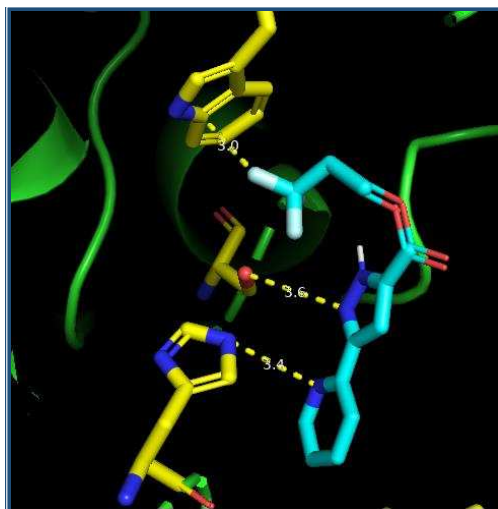
- 2/10 conformaciones ubican al carbono en posición 4 del pirazol cerca de S 198
- 1/10 conformaciones ubican al nitrógeno piridina cerca de S 198
- 1/10 conformaciones ubican al nitrógeno piridina cerca de H438
- 2/10 conformaciones ubican al tándem pirazol-fenilo paralelo a W82
- 4/10 conformaciones ubican al CF<sub>3</sub> frente a W82
- 6/10 conformaciones ubican al fenilo perpendicular a W231
- 2/10 conformaciones ubican al CF<sub>3</sub> frente a W231

La elongación del alquilo fluorado en 1 carbono parece fundamental para que la molécula tenga múltiples sitios de interacción.



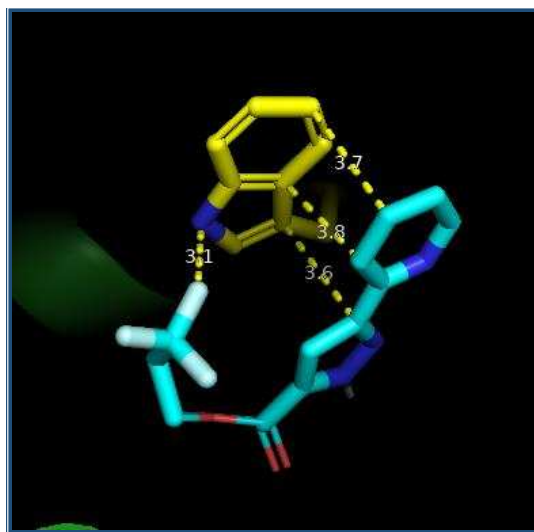
**Figura 98.** Conformación destacada del compuesto diseñado.

- |                         |   |
|-------------------------|---|
| Piridinilo-             | interacción aromática perpendicular con W231. |
| Posición 4 del pirazol- | interacción con S198.                         |
| CF <sub>3</sub> -       | interacción con W82.                          |



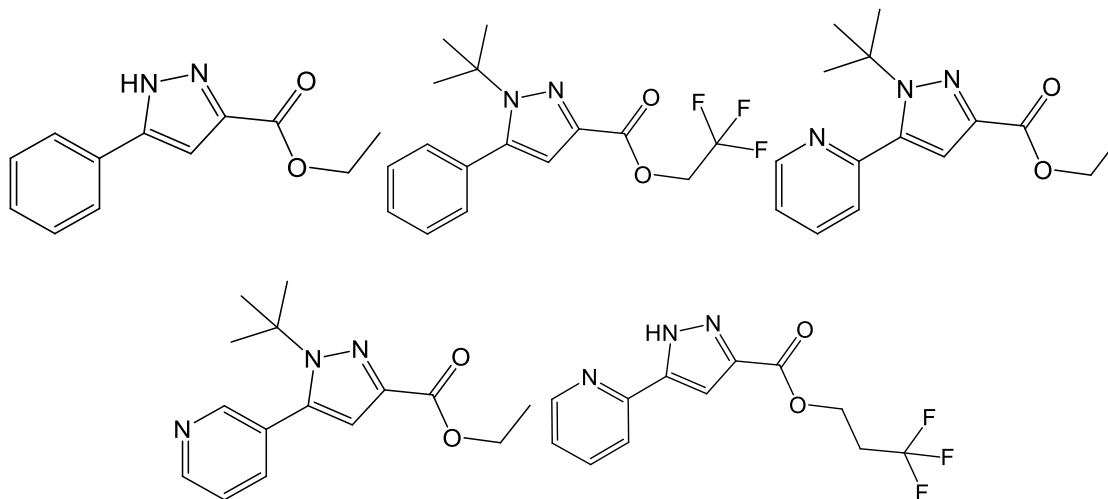
**Figura 99.** Conformación destacada del compuesto diseñado.

Piridinilo-	interacción puente de hidrógeno con H 438
Nitrógeno pirazol-	interacción puente de hidrógeno con S198
CF <sub>3</sub> -	interacción con W231



**Figura 100.** Conformación interesante del compuesto diseñado.

El tándem pirazol-piridinilo y el CF<sub>3</sub> interactúan con W82, probablemente bloquee fuertemente al residuo. Basados en éste análisis, proponemos los siguientes compuestos:



**Figura 101.** Estructuras con chance de lograr actividad

## Conclusiones

- ✦ Hemos obtenido varios compuestos con actividad selectiva sobre butirilcolinesterasa, entre los que destaca **2.1.4** por su baja IC<sub>50</sub>.
- ✦ Estudiamos las posibles interacciones de éste compuesto con el sitio activo a través del docking y pudimos proponer numerosas modificaciones para mejorar la actividad en una tercera serie de compuestos.

# Conclusión general

*He creado la Bestia que liberaría a la humanidad de la tiranía de los dioses. Pero no hice más que proveer el instrumento perfecto para que la humanidad se tiranice a sí misma.*

Sin  
*Path of Exile*

Considero que éste trabajo ha cumplido buena parte de sus objetivos iniciales.

Respecto a la etapa de síntesis, pudimos generar una prolífera biblioteca química de compuestos inéditos, cuya actividad biológica deberá investigarse en el futuro. A lo largo de la síntesis encontramos algunas reacciones que son particularmente interesantes porque alteran el paradigma estructural con que nos propusimos trabajar, y en ése sentido, ramifican el tronco original de la tesis.

La primera de ellas fue la condensación regioespecífica de Knorr, que por un lado nos aseguró tener buenos rendimientos y ahorrar pasos de purificación, pero por otro nos limita la cantidad de moléculas que podemos generar. Poner a prueba la condensación para evaluar los factores que condicionan la regioespecificidad significó proponer reacciones que nos permitan estudiar el efecto de los grupos funcionales adyacentes al pirazol.

Un efecto secundario del medio utilizado para la oxidación fue la transesterificación. Éste hallazgo nos proporcionó la posibilidad de invertir a voluntad el isómero resultante de la síntesis regioespecífica, por lo que pudimos explorar la actividad de los compuestos derivados de cada regioisómero.

En cambio, no fue fortuita la obtención de amidas a partir de acilos y arilaminas de baja reactividad. El adaptar ésta técnica a nuestro sistema requirió un gran esfuerzo para evaluar y controlar todas las variables de la reacción. Finalmente logramos la acilación, e incluso una doble acilación que sólo se verificó con las arilaminas menos reactivas.

La primera serie de pruebas en garrapatas nos hizo replantear nuestra hipótesis inicial de generar compuestos similares a *tebufenpirad*, por lo que buscamos un nuevo modelo que no requiera hacer grandes modificaciones al plan de síntesis. Encontramos inspiración en la molécula de nicotina y, aunque aún resta indagar si actúan sobre el mismo receptor, los compuestos obtenidos bajo ese nuevo paradigma tuvieron el buscado

efecto larvicida. Éste resultado, lejos de ser un final, es un comienzo. Se trata de una primera generación de compuestos eficaces contra *R. microplus* con características estructurales comunes. La continuación del trabajo exige estudiar la CL50 de cada uno de los compuestos y contrastar esos resultados con estudios enzimáticos y de docking que nos permitan conocer a ciencia cierta el modo de acción para perfeccionar las estructuras.

No deja de ser interesante mencionar que la utilización del tabaco como plaguicida es un recurso antiguo que sólo recientemente está empezando a merecer la atención de la academia, como lo demuestran las fechas de las investigaciones que hemos consultado al respecto (algunas de ellas, simultáneas a la realización de ésta tesis). No es el objetivo de éste trabajo el indagar por qué se ha intentado controlar plagas con biocidas poco degradables como los organoclorados o tóxicos de amplio espectro como los organofosforados, cuando existe un producto natural para el que no se ha generado resistencia y que cuenta con una matriz agrícola e industrial que lo produce hace años.

Como una primera aproximación a usos alternativos para la biblioteca de compuestos que generamos, decidimos ensayarlas contra enzimas colinesterasas, con resultados muy interesantes. A partir de éstos, pudimos estudiar posibles anclajes de la molécula en el sitio de acción de la butirilcolinesterasa, lo que nos llevó a proponer nuevas estructuras. Si bien esto escapa al objetivo original de la tesis, es un muy buen punto de partida para una nueva investigación.

# Bibliografía

- [1] MA Taylor, RL Coop, RL Wall (2007) *Veterinary Parasitology*. 3rd edition, Blackwell Publishing.
- [2] RG Pegram, RJ Tatchell RJ, J de Castro (1993) Tick control, new concepts. *World Anim Rev* 74-75:2-11
- [3] JL Solorio-Rivera, RI Rodriguez-Vivas, E Pérez-Gutierrez, G Wagner (1999) Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern Yucatán, Mexico. *Prev Vet Med* 40:261-269.
- [4] RI Rodriguez-Vivas, AF Quiñones, SH Fragoso (2005) Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. *Enfermedades de importancia económica en producción animal*. México D.F: McGraw- Hill-UADY, 571-592.
- [5] RI Rodriguez-Vivas, MY Mata, GE Pérez, G Wagner (2004) The effect of management factors on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican tropics. *Trop Anim Hlth Prod* 36:135-143.
- [6] A Nari, HJ Hansen, C Hedi, JR Martins (2000) Control de la resistencia a los antiparasitarios a la luz de los conocimientos actuales. *Congreso Mundial de Buiatría*. Montevideo, Uruguay. 2000:1-19.
- [7] RW Sutherst, GF Maywald, JD Kerr, DA Stegeman (1983) The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Aust J Agric Res* 183,34:317-327.
- [8] RM Seebeck, PH Springell, JC O'Kelly (1971) Alterations in host metabolism by the specific and anorectic effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*), I Food intake and bodyweight growth. *Aust J Biol Sci*, 24:373-380.
- [9] MA Taylor (2001) Recent Developments in Ectoparasiticides. *The veterinary Journal* 161 (3), 253-268.
- [10] JE George, JM Pound, RB Davey (2004) Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129, 353-366.
- [11] JF Graf, R Gogolewski, N Leach-Bing, GA Sabatini, MB Molento, EL Bordinm, GJ Arantes (2004) Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, 129, S427-S442
- [12] K Lees, AS Bowman (2007) Tick neurobiology: recent advances and the post-genomic era. *Invertebrate Neuroscience* 7 (4) 183-198.

- [13] FAO (2004) Resistance Management and integrated parasite control in ruminants. Guidelines. Publications-sales@fao.org
- [14] FD Guerrero, JH Pruett (2003) Status and future prospects for molecular diagnosis of acaricide resistance in *Boophilus microplus*. Trends Entomol 3:97-103.
- [15] RI Rodriguez-Vivas, MA Alonso-Díaz, F Rodríguez- Arevalo, H Fragoso-Sanchez, VM Santamaria, R Rosario- Cruz (2006) Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. Vet Parasitol; 136:335-342.
- [16] RI Rodriguez-Vivas, F Rodríguez-Arevalo F, MA Alonso-Díaz, H Fragoso-Sanchez H, VM Santamaria, R Rosario-Cruz (2006) Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico, prevalence and potential risk factors. Prev Vet Med; 75:280-286.
- [17] RI Rodriguez-Vivas, AL Rivas, G Chowell, SH Fragoso, CR Rosario, Z García, SD Smith, JJ Williams, SJ Schwager (2007) Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in south eastern Mexico. Vet Parasitol; 146:158-169.
- [18] LG Newton (1967) Acaricide resistance and cattle tick control. Aust Vet J; 43:389-394.
- [19] E Benavides, JL Rodríguez, A Romero (2000) Isolation and partial characterization of the Montecinos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multi-resistant to different acaricides. Ann NY Acad Sci; 916:668-671.
- [20] J Furlong (1999) Diagnóstico de la susceptibilidad de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas en el estado de Minas Gerais, Brasil. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 41-46.
- [21] RJ Miller, RB Dave, JE George (2002) Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz-susceptibility against Ixodidae. J Med Entomol; 39:645-651.
- [22] C Cutullé, L Lovis, BI D'Agostino (2013) In vitro diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina. Veterinary Parasitology 192,18; 296-300.
- [23] LC Perez-Cogollo, RI Rodriguez-Vivas, GT Ramirez-Cruz, RJ Miller (2010) First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. Vet Parasitol; 168:165-169.
- [24] WHO (World Health Organization) Expert Committee on Insecticides. Seventh report, Geneva, World Health Organization. Technical Report Series No. 125. 1957.



- [25] J Nolan (1985) Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickicides in Australia. Whitehead GB, Gibson JD editors. Tick biology and control. University Rhodes-Grahamstown, South Africa. 1985:109-114.
- [26] AC Chen, H He, RB Davey (2007) Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Vet Parasitol*; 148:379-383.
- [27] R Milani (1954) Comportamento medxeliario della resistenza alla azione abbattante del DDT, Correlazione abbattimento e mortalita in *Musca domestica* L. *Rivista e Parasitologia*; 15:513-542.
- [28] RM Sawicki (1978) Unusual response of DDT-resistant houseflies to carbinol analogues of DDT. *Nature*; 275:443-444.
- [29] RC Jamroz, FD Guerrero, JH Pruett, DD Oehler, RJ Miller (2000) Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Insect Physiol*; 46:685-695.
- [30] H He, AC Chen, RB Davey, GW Ivie, JE George (1999) Identification of a point mutation in the *para*-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochem Biophys Res Commun*; 261:558-561.
- [31] D Fournier, A Mutero (1994) Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative biochemistry and physiology: Toxicol Pharmacol*; 108:19-31.
- [32] J Hemingway, NJ Hawkes, L McCarroll, H Ranson (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*; 34:653-666.
- [33] KB Temeyer, RB Davey, AC Chen (2004) Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. *J Med Entomol*; 41:259-268.
- [34] KB Temeyer, AY Li, KH Lohmeyer, AC Chen, PU Olafson, DW Sanson, LD Foil (2007) Acetylcholinesterase mutation in diazinon-resistant *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Vet Parasitol*; 154:300-310.
- [35] GD Baxter, S Barker (1999) Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol*; 29:461-467.
- [36] NN Jonsson, M Hope (2007) Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*; 146:193-198.
- [37] T Satoh, M Hosokawa (1998) The mammalian carboxylesterases, from molecules to functions. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*; 38:257-288.

- [38] PW Riddles, PA Davey, J Nolan (1983) Carboxylesterases from *Boophilus microplus* hydrolyze trans-permethrin. *Pesticide Biochem Physiol*; 20:133-140.
- [39] RJ Miller, AY Li, M Tijerina, RB Davey, JE George (2008) Differential response to diazinon and coumaphos in a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected in Mexico. *J Med Entomol*; 45(5):905-911.
- [40] R Feyereisen (1999) Insect P450 enzymes. *Ann Rev Entomol*; 44:507-533.
- [41] C Sams, HJ Mason, R Rawbone (2000) Evidence of the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in humans liver microsomes. *Toxicological Letter*; 116: 217-221.
- [42] H He, AC Chen, RB Davey, GW Ivie (2002) Molecular cloning and nucleotide sequence of a new P450 gene, *CYP319A1*, from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol*; 32:303-309.
- [43] JG Scott, Z Wen (2001) Cytochromes P450 of insects: The tip of iceberg. *Pest Manage Sci*; 57:958-967.
- [44] R Cossio-Bayugar, E Miranda-Miranda, A Ortiz-Najera, S Neri-Orantes (2008) *Boophilus microplus* pyrethroid resistance associated to increased levels of monooxygenase enzymatic activity in field isolated Mexican ticks. *J. Biol Sci*; 8(2):404-409.
- [45] AJ Ketterman, P Prommeenate, C Boonchaay, U Chanama, S Leetachewa, N Promtet, L Prapanthadara (2001) Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. *Insect Biochem Mol Biol*; 31:65-74.
- [46] JG Vontas, GJ Small, J Hemingway (2001) Glutathione S-transferase as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J*; 357:65- 72.
- [47] JG Vontas, GJ Small, DC Nikou, H Ranson, J Hemingway (2002) Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem J*; 362:329-337.
- [48] SH Wei, AG Clark, M Syvanen (2001) Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem Mol Biol*; 31:1145-1153.
- [49] H He, AC Chen, RB Davey, GW Ivie, JE George (1999) Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol*; 29:737-743.
- [50] AY Li, RB Davey, RJ Miller, JE George. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*; 41(2):193-200

- [51] AM Vijesh, AM Isloor, P Shetty, S Sundershan, HK Fun (2013) New pyrazole derivatives containing 1,2,4-triazoles and benzoxazoles as potent antimicrobial and analgesic agents, *Eur. J. Med. Chem.* 62 410-415.
- [52] V Kumar, R Aggarwal, P Tyagi (2005) Synthesis and antibacterial activity of some new 1-heteroaryl-5-amino-4-phenyl-3-trifluoromethylpyrazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 40 922-927.
- [53] R Aggarwal, V Kumar, P Tyagi, SP Singh (2006) Synthesis and antibacterial activity of some new 1-heteroaryl-5-amino-3H/methyl-4-phenylpyrazoles. *Bioorg. Med. Chem.* 14 1785-1791.
- [54] V Kumar, K Kaur, GK Gupta, S Kumar (2013) Developments in synthesis of the anti-inflammatory drug, celecoxib: a review, *Recent Pat Inflamm. Allergy Drug Discov.* 7 124-134.
- [55] R Aggarwal, V Kumar, SP Singh (2007) Synthesis of some new 1-(6-fluorobenzothiazol-2-yl)-3-(4-fluoro-phenyl)-5-arylpyrazolines and their iodine(III) mediated oxidation to corresponding pyrazoles. *Indian J. Chem. Sect. B* 46 1332-1336.
- [56] SP Singh, R Aggarwal, V Kumar (2006) Synthesis and NMR spectral studies of new 1-heteroaryl-5-amino-4-cyano-3-alkyl/arylpyrazoles. *Indian J. Chem. Sect. B* 45 1426-1430.
- [57] R Aggarwal, V Kumar, R Kumar, SP Singh (2011) Approaches towards the synthesis of 5-aminopyrazoles. *Beilstein J. Org. Chem.* 7 179-197.
- [58] M Suri, T Jousseume, JJ Neumann, F Glorius (2012) An efficient copper-catalyzed formation of highly substituted pyrazoles using molecular oxygen as the oxidant. *Green Chem.* 14 2193-2196.
- [59] EG Brown, FM Diffin (1990) Biosynthesis and metabolism of pyrazole by *Cucumis sativas*: enzymic cyclization and dehydrogenation of 1,3-diaminopropane, *Phytochemistry* 29 469-478.
- [60] EG Brown, KAM Flayeh, JR Gallon (1982) The biosynthetic origin of the pyrazole moiety of  $\beta$ -pyrazol-1-yl-L-alanine, *Phytochemistry* 21 863-867.
- [61] NC Seeman, EL McGandy, RD Rosenstein (1972) Crystal and molecular structure of  $\beta$ -(3-pyrazolyl)-L-alanine. *J. Am. Chem. Soc.* 94 1717-1720.
- [62] A Schmidt, A Dregar (2011) Recent advances in the chemistry of pyrazoles, properties, biological activities, and syntheses. *Curr. Org. Chem.* 15 1423-1463.
- [63] HB Schroter, D Neumann (1966) Withasomnine a pyrazole alkaloid from *withania somifera* dun. *Tetrahedron* 22 2895-2897.

- [64] AA Wube, EM Wenzig, S Gibbons, K Asres, R Bauer, F Bucar (2008) Constituents of the stem bark of *discopodium penninervium* and their LTB<sub>4</sub> and COX-1 and -2 inhibitory activities. *Phytochemistry* 69 982-987.
- [65] AJ Aladesanmi, R Nia, A Nahrstedt (1998) New pyrazole alkaloids from the root bark of *Newbouldia laevis*. *Planta Med.* 64 90-91.
- [66] M Pangerl, CC Hughes, D Trauner (2010) Total synthesis of newbouldine via reductive NeN bond formation. *Tetrahedron* 66 6626-6631).
- [67] PF Crain, JA McCloskey, AF Lewis, KH Schram, LB Townsend (1973) Mass spectra of C-nucleosides II. An unusual fragmentation reaction of the heterocyclic. *J. Heterocyclic Chem.* 10 843-847.
- [68] GE Gutowski, MO Chaney, RL Jones, RL Hamil, FA Davis, RD Miller (1973) Pyrazomycin B: isolation and characterization of an a-C-nucleoside antibiotic related to pyrazomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51 312-317.
- [69] K Mizuno, M Takada, M Hayashi, K Atsumi, K Asano, T Matsuda (1974) Studies on bredinin. I. Isolation, characterization and biological properties. *J. Antibiot.* 27 775-782.
- [70] JT Witkowski, RK Robins, RW Sidwell, LN Simon (1972) Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3- carboxamide and related nucleosides. *J. Med. Chem.* 15 1150-1154.
- [71] CR Petrie, GR Revankar, NK Dalley, RD George, PA McKernan, RL Hamill, RK Robins (1986) Synthesis and biological activity of certain nucleoside and nucleotide derivatives of pyrazofurin. *J. Med. Chem.* 29 268-278.
- [72] WM Shannon (1977) Selective inhibition of RNA tumor virus replication in vitro and evaluation of candidate antiviral agents in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 284 472-507.
- [73] MJ Sweeney, FA Davis, GE Gutowski, RL Hamill, DH Hoffman, GA Poore (1973) Experimental antitumor activity of pyrazomycin. *Cancer Res.* 33 2619- 2623.
- [74] G Koyama, K Maeda, H Umezawa (1966) The structural studies of formycin and formycin b. *Tetrahedron Lett.* 7 597-602.
- [75] K Ochi, S Iwamoto, E Hayase, S Yashima, Y Okami (1974) Biosynthesis of formycin role of amino acids in formycin biosynthesis. *J. Antibiot.* 27 909-916.
- [76] N Otake, S Aizawa, T Hidhaka, H Seto, H Yonehara (1965) Biological and chemical transformations of formycin to laurusin. *Agric. Biol. Chem.* 29 377-378.
- [77] JG Buchanan, AR Edgar, RJ Hutchison, A Stobie, RH Wightman (1980) A new synthesis of formycin via nitropyrazole derivatives. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 237-238.

- [78] K Hirata, S Yoshitomi, S Dwi, O Iwabe, A Mahakhant, J Polchai, K Miyamoto (2004) Generation of reactive oxygen species undergoing redox cycle of nostocine A: a cytotoxic violet pigment produced by fresh water cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme*. *J. Biotechnol.* 110 29-35.
- [79] PD Mishra, S Wahidullah, SY Karnat (1998) A heteroaromatic acid from marine sponge *Suberites vestigium*. *Indian J. Chem. Sect. B* 37 199-200.
- [80] BM Ahmed, G Mezei (2015) Green protection of pyrazole, thermal isomerization and deprotection of tetrahydropyranylpyrazoles, and high-yield, one-pot synthesis of 3 (5)-alkylpyrazoles. *RSC Adv.*, 5, 24081-24093.
- [81] HA De Wald, S Lobbstaël, BPH Poschel (1981) Pyrazolodiazepines. III. 4-Aryl-1,6,7,8-tetrahydro-1,3-dialkylpyrazolo[3,4-e][1,4]diazepines as antidepressant agents. *J. Med. Chem.* 24, 982-987.
- [82] NK Terret, AS Bell, D Brown, P Ellis (1996) Sildenafil (VIAGRA™), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, 1819-1824.
- [83] H Azami, D Barrett, A Tanaka, H Sasaki, K Matsuda, M Sakurai, T Terasawa, F Shirai, T Chiba, Y Matsumoto, S Tawara (2001) Synthesis and antibacterial activity of novel 4-pyrrolidinylthio carbapenems Part IV. 2-Alkyl substituents containing cationic heteroaromatics linked via a C-C bond. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 961-982.
- [84] D Marcic (2005) Sublethal Effects of Tebufenpyrad on the Eggs and Immatures of Two-Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol.* 36, 177-185
- [85] H Murakami, S Masuzawa, S Takii, T Ito. *Jpn. Patent* 2,012,802,003, 2003.
- [86] M Kim, C Sim, D Shin, E Suh, K Cho (2006) Residual and sublethal effects of fenpyroximate and pyridaben on the instantaneous rate of increase of *Tetranychus urticae*. *Crop Protect* 2006, 25, 542-548.
- [87] C Isanbor, D O'Hagan (2006) Fluorine in medicinal chemistry: A review of anticancer agents. *Fluorine Chem.* 127, 303-319.
- [88] KL Kirk (2006) Fluorine in medicinal chemistry: Recent therapeutic applications of fluorinated small molecules. *Fluorine Chem.* 127, 1013-1029.
- [89] P Jeschke (2004) The unique role of fluorine in the design of active ingredients for modern crop protection. *ChemBioChem* 5, 570-589.
- [90] HJ Böhm, D Banner, S Bendels, M Kansy, B Kuhn, K Müller, U Obst-Sander, M Stahl (2004) Fluorine in medicinal chemistry. *ChemBioChem* 5, 637-643.

- [91] BC Hamper, MK Mao, WG Phillips. *U.S. Patent 5,698,708*, 1997.
- [92] M Dryden, TM Denenberg, S Bunch, S (2000) Control of fleas on naturally infested dogs and cats and in private residences with topical spot applications of fipronil or imidacloprid *Vet. Parasitol.* 93, 69–75.
- [93] J Phillips, M Pilato, T Wu, PCT Int. Appl. WO 9,828,277, 1998.
- [94] FH Arthur (2002) Efficacy of ethiprole applied alone and in combination with conventional insecticides for protection of stored wheat and stored corn *J. Econ. Entomol.* 95, 1314–1318.
- [95] TD Penning, JJ Talley, SR Bertenshaw, JS Carter, PW Collins, S Docter, MJ Graneto, LF Lee, JW Malecha, JM Miyashiro, RS Rogers, DJ Rogier, SS Yu, GD Anderson, EG Burton, JN Cogburn, SA Gregory, CM Koboldt, WE Perkins, K Seibert, AW Veenhuizen, YY Zhang, PC Isakson (1997) Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib) *J. Med. Chem.* 40, 1347–1365.
- [96] KL Kees, JJ Fitzgerald, KE Steiner, J Mattes, B Mihan, T Tosi, D Mondoro, L McCaleb (1996) New Potent Antihyperglycemic Agents in db/db Mice: Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies of (4-Substituted benzyl)(trifluoromethyl)pyrazoles and -pyrazolones. *J. Med. Chem.* 39, 3920–3928.
- [97] H von Pechmann (1898) Pyrazol aus Acetylen und Diazomethan *Chem. Ber.* 31, 2950–2951.
- [98] T Kosuge, H Okeda (1954) Nonylpyrazole, a new antimicrobial substance *J. Biochem.*, 1954, 41, 183–186.
- [99] GD Prestwich, MS Collins (1982) Chemical defense secretions of the termite soldiers of *Acorhinotermes* and *Rhinotermes* (Isoptera, Rhinotermitinae) *J. Chem. Ecol.* 8, 147–161.
- [100] JA Jiménez, RM Claramunt, C Escolástico and J Elguero (2000) Some considerations about the structure of 3 (5)-methylpyrazole. *Struct. Chem.* 11, 77–83.
- [101] NR Easton (1961) Use of 4-chloro-1, 2-pyrazole for controlling epileptic seizures. *U.S. Patent US 2992163*.
- [102] G Karmas, RA Mallory (1959) *U.S. Patent 2,883,392*.
- [103] W Franke, R Kraft (1953) Über Acetale des Acetessigaldehyds. *Chem. Ber.* 86, 797–800.

- [104] I Zrinski, M Juribasic, M Eckert-Maksic (2006) Microwave-assisted synthesis of pyrazole by 1, 3-dipolar cycloaddition of diazo compounds to acetylene derivatives *Heterocycles*. 68, 1961–1967.
- [105] T Wang, JF Kadow, NA Meanwell, KS Yeung, Z Zhang, Z Yin, Z Qiu, DH Deon, CA James, EH Ruediger, C Bachand, (2004) US Patents US 0063744 A1 and US 0186292 A1.
- [106] T Wang, Z Zhang, NA Meanwell, JF Kadow, Z Yin, QM Xue, A Regueiro-Ren, JD Matiskella and Y Ueda (2004) U.S. Patent US 0110785 A1.
- [107] JL Brewbaker, H Hart, (1969) Cyclization of 3-diazoalkenes to pyrazoles]. *Am. Chem. Soc.* 91, 711–715.
- [108] D Dehe, C Lothschütz, WR Thiel (2010) Novel pyrazole functionalized phthalocyanines and their first row transition metal complexes *New J. Chem.*, 2010, 34, 526–532.
- [109] NW Huber, HJ Niclas, U Radics, W Kristof (2007) Ger. Patent DE 19826669 B4.
- [110] HR Merkle and E Fretschner (1995) Ger. Patent DE 4328228 A1.
- [111] N Yoshihara, T Hasegawa, S Hasegawa (1991) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 64, 719–720.
- [112] NV Galapagos (2007) Worldwide Patent WO 2007/138072 A2.
- [113] JJ Hale, CL Lynch, CG Caldwell, CA Willoughby, D Kim, DM Shen, SG Mills, KT Chapman, L Chen, A Gentry, M MacCoss, ZD Konteatis (2002) U.S. Patent US 0094989 A1.
- [114] R Grandi, UM Pagnoni, R Trave (1979) Green protection of pyrazole, thermal isomerization and deprotection of tetrahydropyranylpyrazoles, and high-yield, one-pot synthesis of 3 (5)-alkylpyrazoles. *J. Chem. Res., Synop.*, 1979, 327; *J. Chem. Res., Miniprint*, 1979, 3782–3789.
- [115] R Martín, M Rodríguez Rivero, SL Buchwald (2006) Domino Cu-Catalyzed C–N Coupling/Hydroamidation: A Highly Efficient Synthesis of Nitrogen Heterocycles *Angew. Chem., Int. Ed.* 45, 7079–7082.
- [116] M Winter (1963) Sur l'hydrolyse acide du méthoxy-1-hexène-1-yne-3 et du méthoxy-1-hexadiène-1, 3. Synthèse de pyrazoles substitués et du cis-hexène-3-al *Helv. Chim. Acta*. 46, 1754–1760.
- [117] S Fustero, R Roman, J Sanz Cervera (2008) Improved regioselectivity in pyrazole formation through the use of fluorinated alcohols as solvents: synthesis and biological activity of fluorinated tebufenpyrad analogs. *J Org Chem*. 73:3523–3529.
- [118] C M Plummer, T W Breadon, J R, Pearson, O A H Jones (2016) The synthesis and characterisation of MDMA derived from a catalytic oxidation of material isolated from black pepper reveals potential route specific impurities. *Science and Justice*; 56(3):223–230.

- [119] O Karlsson (1981) Bromination of Some Heteroaromatic Acyl Compounds with Aqueous Bromine/Sodium Acetate. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 11:1, 29-34
- [120] A Vilsmeier, A Haack (1927) Über die Einwirkung von Halogenphosphor auf Alkyl-formanilide. Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer *p*-Alkylamino-benzaldehyde. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* 60(1), 119-122.
- [121] P Ruggli, J Rohner. (1942) Über *o*-disazo-benzol. *Helvetica Chimica Acta*, 25, 7, 1533-1542.
- [122] BS Furniss, AJ Hannaford, PWG Smith, AR Tatchell (1989) *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. 5<sup>th</sup> edition, Prentice-Hall.
- [123] RA Nagaraj, VS Kumar (1984) Effect of substituents in the formation of diacetanilides. *Can J Chem*. 62:1292-1296.
- [124] BF Stone, KP Haydock (1962) A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bulletin of entomological research*, 53, 3, 563-578.
- [125] K Lees, K Andrew, M Kazuhiko, M Akamatsu, D Sattelle, D Woods, A Bowman (2014) Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *International Journal for Parasitology*. 44, 75-81.
- [126] RL Bushey (1943) *Plants That Help Kill Insects*. 765:772.
- [127] H Casanova, C Ortiz (2002) Insecticide formulations based on nicotine oleate stabilized by sodium caseinate. *J. Agric. Food Chem*. 2002. 50, 6389-6394.
- [128] E Fuentes-Contreras, E Basoalto (2007) Evaluación de la Eficacia, Efecto Residual y de Volteo de Aplicaciones en Pretrasplante de Insecticidas Nicotinoideos y Mezclas de Nicotinoide-Piretroide para el Control de *Myzus persicae nicotianae* (Hemiptera: Aphididae) en Tabaco. *Agricultura técnica*. 67(1):16:22.
- [129] W Murillo, P Araque (2012) Actividad fungicida e insecticida de emulsiones agua/aceite de mezclas de extractos de *Nicotiana tabacum*, *Azadiractha indica* y *Eucalyptus tereticornis* *Información Tecnológica*. 23 (1): 139-152.
- [130] IM Araújo, MB Silva, N de Paula Silva (2016) ATIVIDADE ACARICIDA DE *Nicotiana tabacum* SOBRE OVOS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Acta Veterinaria Brasilica*. 10, 2, 190-193.



- [131] CJ Booker, R Bedmutha, T Vogel, A Gloor (2010) Experimental investigations into the insecticidal, fungicidal, and bactericidal properties of pyrolysis bio-oil from tobacco leaves using a fluidized bed pilot plant. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 10074–10079
- [132] SO Bachurin, EV Bovina, AA Ustyugov (2017) Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: the major trends. *Med. Res. Rev.* 37. 1186–1225.
- [133] J Cummings, G Lee, T Mortsdorf, A Ritter, K Zhong (2017) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017, *Alzheimers Dement.* 3, 367–384.
- [134] KL Lanctôt, J Amatniek, S Ancoli-Israel, SE Arnold, C Ballard, J Cohen-Mansfield, Z Ismail, C Lyketsos, DS Miller, E Musiek, RS Osorio, PB Rosenberg, A Satlin, D Steffens, P Tariot, LJ Bain, MC Carrillo, JA Hendrix, H Jurgens, B Boot (2017) Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: new treatment paradigms, *Alzheimers Dement.* 3 440–449.
- [135] A Kumar, S Jain, M Parle, N Jain, P Kumar (2013) 3-aryl-1-phenyl-1h-pyrazole derivatives as new multitarget directed ligands for the treatment of alzheimer's disease, with acetylcholinesterase and monoamine oxidase inhibitory properties, *EXCLI Journal*; 12:1030-1042 - ISSN 1611-2156.
- [136] U Gulberk, G Nesrin, Y Akgul, A. Altan Bilgin (2005) 1-N-Substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-pyrazolines: A novel cholinesterase and selective monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases, *Neuroscience letters*; 382 327–331.
- [137] K Ashwani, J Sandeep, P Milind (2013) Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of 3-aryl-1-phenyl-1H-pyrazole derivatives as novel acetylcholinesterase inhibitors, *Der Pharmacia Lettre*; 5 (4):286-295.
- [138] A Nordberg, C Ballard, R Bullock, T Darreh-Shori, M Somogyi (2013) A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease, *Prim. Care Companion J. Clin. Phys.* 15(2).
- [139] L Qi, Y Hongyu, C Yao, S Haopeng (2017) Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease; *European Journal of Medicinal Chemistry* 132, 294-309.
- [140] N Yvain, L Oksana, M Patrick, J Fontecilla-Camps, N Florian (2003) Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products; *The journal of biological chemistry*, Vol. 278, No. 42, Issue of October 17, pp. 41141–41147.

# Apéndice experimental

## Técnicas operatorias

### Técnica general de reacciones 1.1 y 1.2:

En un reactor con atmósfera de N<sub>2</sub> suspendimos 50 mmol de *terc*-butóxido de potasio en 20 ml de THF. A continuación enfriamos el reactor en baño de hielo y agregamos gota a gota una solución de 19.9 mmol de una cetona y 43 mmol de oxalato de dietilo en 20 ml de dimetoxietano. Al completar la adición, lo retiramos del hielo y agitamos la mezcla por una hora. Al confirmar por TLC que toda la cetona se había consumido, añadimos 15 ml de una solución 1M de HCl y extrajimos el producto crudo con acetato de etilo. A continuación secamos la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporamos el disolvente, obteniendo un sólido. Purificamos el producto disolviendo el sólido en etanol caliente y recristalizando el producto puro, que se observa como cristales.

### Técnica de reacciones 1.3:

En un reactor a 0 °C con atmósfera inerte introdujimos 0.6 g de Na metálico y 50 ml de EtOH. Agitamos la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente, luego evaporamos la mezcla a sequedad en rotavapor, y volvimos a poner el reactor en un baño de hielo, añadiendo 30 ml de Et<sub>2</sub>O. A continuación agregamos por goteo una solución de 15 ml de Et<sub>2</sub>O, 22 mmol de 2- butanona y 26 mmol de oxalato de dietilo. Tras 1 h de agitación a temperatura ambiente, dimos por terminada la reacción añadiendo 15 ml de HCl 1 M y extrayendo con AcOEt. Secamos la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y removimos el disolvente en rotavapor, obteniendo un sólido amarillo con un olor dulce muy característico. Un análisis por TLC del crudo de reacción reveló el agotamiento de los reactivos de partida y la aparición de dos nuevas manchas que sugieren mezcla de productos. Finalmente purificamos el compuesto **1.3** por cromatografía en columna.

En todos los casos monitoreamos el avance de las reacciones por TLC, dándolas por terminadas cuando se agotó la cetona de partida. Aunque los compuestos dicarbonílicos

obtenidos recristalizan bien en etanol, el producto crudo puede usarse directamente como sustrato para la síntesis de Knorr.

#### **Técnica general de reacciones 2.1.n:**

Disolvimos 3.2 mmol del compuesto dicarbonílico en 13 ml de etanol en un matraz. Luego añadimos 3.5 mmol de clorhidrato de *terc*-butilhidrazina, y agitamos la mezcla a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Al comprobar por TLC el fin de la reacción, procedimos a evaporar el etanol en rotavapor, y luego agregamos agua y acetato de etilo para extraer el crudo. Secamos la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporamos el disolvente. Purificamos los productos por cromatografía en columna de sílica gel, eluyendo con una mezcla hexano : acetato de etilo (9:1). Si bien la reacción no genera subproductos, el paso de purificación tiene por objeto remover subproductos de la síntesis del dicarbonílico difíciles de remover en la etapa previa. Los isómeros generados en las reacciones **2.1.2** y **2.1.3** tienen la suficiente diferencia de polaridad para ser separados por cromatografía de columna.

#### **Técnica general de reacciones 3.1.n:**

Suspendimos 2.37 mmol de un pirazol éster en una solución 6M de NaOH. Luego calentamos la mezcla, manteniéndola a 80 °C con agitación por una hora. Al cabo de ese tiempo la TLC reveló que se había consumido todo el sustrato de partida, apareciendo una nueva señal que apenas se separaba del punto de siembra. Luego neutralizamos la mezcla con 2 ml de una solución 10M de HCl y extrajimos el crudo con acetato de etilo. Secamos la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporamos el disolvente.

Normalmente, ésta reacción no necesita pasos de purificación posteriores. Hemos observado que el elevado pH y la alta temperatura eliminan impurezas que pudieran arrastrarse de reacciones previas.

#### **Técnica de reacción 3.2.1:**

Disolvimos 1.97 mmol del compuesto **2.1.1** (Fig.28) en 15.5 ml de AcOEt y 15.5 ml de ACN. Luego añadimos 23 ml de agua, 22.9 mmol de KIO<sub>4</sub> y 0.1 mmol de RuCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, y comenzamos a agitar la mezcla a temperatura ambiente. Tras una hora de reacción, al observar por TLC el agotamiento del éster de partida, añadimos 40 ml de salmuera y realizamos múltiples extracciones con AcOEt. Secamos la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporamos el disolvente bajo presión reducida. El crudo obtenido contenía ambos isómeros, pero pudimos separarlos por cromatografía en columna eluyendo con una mezcla hexano : acetato de etilo 7:3.

Si bien la técnica original de ésta reacción empleaba CCl<sub>4</sub> como uno de los disolventes orgánicos, resolvimos cambiarlo por AcOEt en un momento en que nuestro proveedor había discontinuado el tetracloruro. Ésta modificación fue un acierto, ya que la fase orgánica clorada retenía todo el I<sub>2</sub> que se generaba *in situ* como subproducto de la reducción del KIO<sub>4</sub>, haciendo muy difícil obtener los cristales blancos de los productos. El AcOEt, además de reducir la retención de I<sub>2</sub>, resulta menos tóxico y es un residuo menos peligroso.

Otra modificación exitosa fue el reemplazo del KIO<sub>4</sub> por NaClO. Éste oxidante es más barato y tampoco genera I<sub>2</sub> como residuo.

### **Técnica general de reacciones 3.3.n:**

Preparamos el reactivo de bromación diluyendo 15 ml de Br<sub>2</sub> en 35 ml de ácido acético glacial. Luego, por motivos de manipulación y conservación, lo diluímos con agua hasta llegar a 3.2 M, que resultó una concentración adecuada.

En un reactor con baño de hielo y agitación disolvimos 11 mmol de un pirazol en la mínima cantidad necesaria de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y añadimos 6.6 g de acetato de sodio. A continuación agregamos 6.6 ml del reactivo de bromación (2 Eq), lo que provocó que el medio de reacción se solidifique instantáneamente. Aseguramos la tapa del reactor para evitar la pérdida de Br<sub>2</sub>, retiramos el baño de hielo y, tras una hora observamos que el medio seguía sólido, así que añadimos 15 ml de agua, logrando disolver el sólido. Dejamos agitar a temperatura ambiente por 12 hs, en que realizamos las extracciones con agua y

acetato de etilo, secamos la fase orgánica con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y evaporamos el disolvente en el rotavapor. La TLC del crudo no mostraba diferencia significativa entre los desplazamientos de sustrato y producto, pero por  $^1\text{HRMN}$  confirmamos la conversión a través de la desaparición de la señal del H en la posición 4.

#### **Técnica general para obtención de amidas a partir de arilaminas poco nucleofílicas (reacciones 4.n.m):**

En una bomba de Schlenk de 25 ml, bajo atmósfera inerte, colocamos 0.7 mmol de un pirazol carboxilato y lo disolvimos en la mínima cantidad necesaria de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Luego la colocamos en baño de hielo y añadimos 3  $\mu\text{l}$  de DMF y 1.7 ml de una solución 2 M de  $(\text{COCl})_2$ , y agitamos la mezcla una hora a temperatura ambiente. Al finalizar, aumentamos el flujo de gas inerte y calentamos suavemente el reactor hasta obtener un producto crudo semisólido, que redisolvimos en la mínima cantidad de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En otra bomba de Schlenk con atmósfera inerte, disolvimos 0.35 mmol de una arilamina en 1 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 1 ml de piridina, y la colocamos en baño de hielo. A continuación tomamos la solución del cloruro de acilo que habíamos preparado y la agregamos por goteo a éste segundo reactor, observando desprendimiento de vapores. Al finalizar, cerramos la bomba, la calentamos suavemente, y la conectamos a vacío hasta observar el cese del burbujeo, asegurándonos que la piridina sea el único disolvente del medio. Finalmente, dejamos la mezcla enfriarse a temperatura ambiente y la dejamos agitando hasta el día siguiente, en que extrajimos el crudo añadiendo 10 ml de una solución 1 M de HCl y 15 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El producto quedó en la fase orgánica, a la que añadimos 10 ml de NaOH 2 M para remover el pirazol carboxilato remanente con la fase acuosa. Anhidramos la fase orgánica de ésta segunda extracción y la evaporamos a presión reducida, purificando posteriormente los productos por cromatografía en columna de sílica gel con una mezcla de hexano : acetato de etilo 9:1.

#### **Técnica general de reacciones 1.4 y 1.5:**

Llevamos a cabo las reacciones replicando el método descrito para la reacción 1.1, con la diferencia de que antes de las extracciones agregamos 30 ml de una solución 1M de

HCl (para una reacción que utiliza 1 g de acetilpiridina como sustrato de partida). Por TLC observamos que las reacciones no se completaron a la hora, ni avanzaba la conversión más allá de ese punto. Sin embargo, las extracciones con agua y acetato de etilo nos permitieron separar el dicarbonilo de la acetilpiridina de partida, ya que ésta última se protonaba y quedaba en la fase acuosa.

#### **Técnica general de reacciones 3.4.n:**

En un reactor en baño de hielo, con agitación y atmósfera de  $N_2$ , suspendimos 50 mg de  $LiAlH_4$  en 1.5 ml de THF anhidro. Luego añadimos una solución del pirazol en 1.5 ml de THF, retiramos el baño de hielo, y calentamos a 50 °C durante una hora. Al cabo de ese tiempo verificamos por TLC que el compuesto de partida se hubiera consumido completamente, retiramos el calentamiento, dejamos que el reactor alcance la temperatura ambiente, y volvimos a enfriarlo con hielo. Agregamos luego 3 gotas de agua, 3 gotas de NaOH 20%, y 10 gotas más de agua. Luego de 30 minutos de agitación, añadimos salmuera y acetato de etilo al medio para extraer el producto. Secamos la fase orgánica con  $Na_2SO_4$  y evaporamos el disolvente bajo presión reducida, obteniendo un sólido blanco.

#### **Técnica de reacción 3.5.1:**

En un matraz colocamos 0.65 g del alcohol de partida, 2.3 moles de  $H_2O_2$  (solución al 30%), 50 ml de agua, 60 mg de KBr, y 10 gotas de etanol. Agitamos a temperatura ambiente durante 12 hs, en que verificamos por TLC la conversión total. A continuación extrajimos el producto con 5 lavados de AcOEt, secamos la fase orgánica con  $Na_2SO_4$ , y evaporamos el disolvente.

#### **Técnica general de reacciones 3.6.n:**

En un matraz colocamos 95 mg del compuesto de partida, la mínima cantidad necesaria de  $CH_2Cl_2$  para disolverlo, y 20 ml de una solución 2M de HCl. Lo calentamos a ebullición y mantuvimos así por 1 hora, al cabo de la cual verificamos la conversión total por TLC. A continuación neutralizamos el medio y extrajimos el producto con numerosos

lavados con AcOEt. Anhidramos la fase orgánica y evaporamos el disolvente bajo presión reducida.

#### **Técnica de aislamiento de nicotina de hojas de tabaco:**

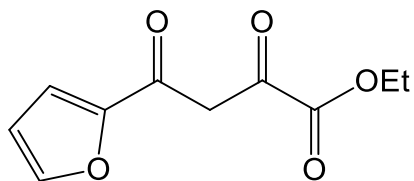
Trabajamos con hebras de tabaco comerciales, colocando 50 g de hebras en un matraz, empapadas en una solución de NaOH 10% saturada con NaCl, y realizamos una destilación por arrastre con vapor de agua, reponiendo el agua que se iba destilando. Luego utilizamos acetato de etilo para extraer los compuestos orgánicos del destilado. Por  $^1\text{H}$  RMN pudimos observar la presencia de nicotina como el principal componente del extracto.

#### **Cálculo de anclaje de compuestos en BuChE:**

Se trabajó con la estructura cristalizada 1p0i de BChE humana, y se calculó el anclaje de diferentes compuestos, en ausencia de moléculas de agua, delimitando un espacio que incluye el sitio catalítico y alrededores tomando las coordenadas de la bibliografía (139, 140). El programa utilizado fue Autodock Vina, y las imágenes fueron extraídas de Pymol 2.3. En todos los casos se calcularon las 10 conformaciones de menor energía. Los ligandos fueron generados en ChemDraw, obteniendo el mínimo energético de cada uno y no se consideró su movilidad conformacional.

## Datos experimentales

### 1.1 Etil 4-furanil-2,4-dioxobutanoato



**Apariencia:** Cristal amarillo

**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

**Peso molecular:** 210 g/mol

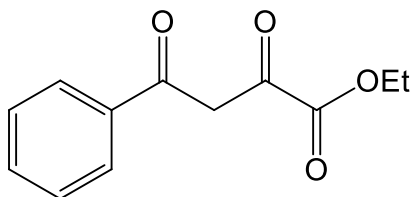
**Punto de fusión:** 85.4 - 86.3 °C

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.39 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.37 - 4.39 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.61 - 6.62 (c, H, CH); 6.93 (s, H, CH); 7.33 - 7.34 (d, H, CH); 7.67 (d, H, CH); 14.46 (s, H, OH)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 14.07 (CH<sub>3</sub>); 62.59 (CH<sub>2</sub>); 99.02 (CH); 113.12 (CH); 118.51 (CH); 147.68 (CH); 150.86 (C); 161.99 (C); 165.81 (C); 181.06 (C)

EM calculada para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup>: 233.0420; Encontrada: 233.0407.

### 1.2 Etil 2,4-dioxo-4-fenilbutanoato



**Apariencia:** Cristal incoloro

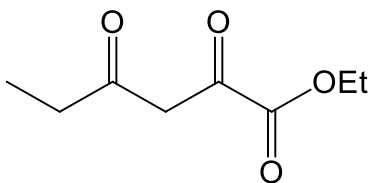
**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

**Peso molecular:** 220,0736 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.33 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.33 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 7.08 (s, H, CH); 7.35-7.42 (m, 3H, CH); 7.74 (d, 2H, CH)



### 1.3 Etil 2,4-dioxohexanoato



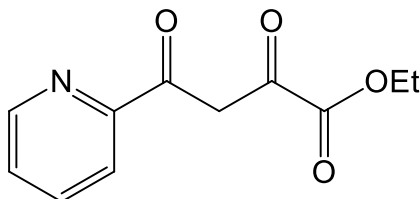
**Apariencia:** Sólido amarillo

**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

**Peso molecular:** 172,0736 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):]** δ = 1.09 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.29 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.46 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 4.26 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.29 (s, 2H, CH<sub>2</sub>)

### 1.4 Etil 2,4-dioxo-4-(piridin-2-il)butanoato



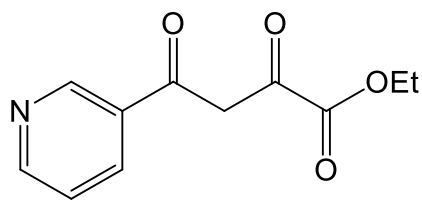
**Apariencia:** Cristal amarillo

**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>

**Peso molecular:** 221,0688 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):]** δ = 1.46 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.46 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 7.45 (m, H, CH); 7.82 (t, H, CH); 8.12 (d, H, CH); 8.74 (d, H, CH)

### 1.5 Etil 2,4-dioxo-4-(piridin-3-il)butanoato



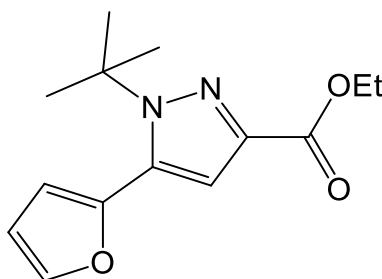
**Apariencia:** Cristal amarillo

**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>

**Peso molecular:** 221,0688 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.36 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.67 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.69 (s, H, CH); 7.67 (d, H, CH); 8.57 (s, H, CH); 8.65 (d, H, CH); 8.75 (d, H, CH)

### 2.1.1 Etil 1-(*terc*-butil)-5-furanil-1*H*-pirazol-3-carboxilato



**Apariencia:** Aceite amarillo

**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

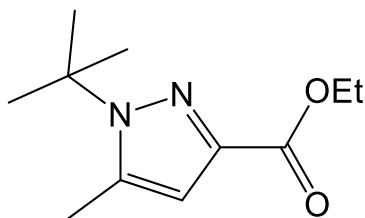
**Peso molecular:** 262.1317 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.36 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.53 (s, 9H, *t*-butyl); 4.35 - 4.38 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.46 - 6.47 (m, 2H, CH); 6.85 (s, H, CH); 7.53 (m, H, CH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 14.32 (CH<sub>3</sub>); 29.83 (CH<sub>3</sub>); 60.72 (CH<sub>2</sub>); 62.48 (C); 111.27 (CH); 112.01 (CH); 113.29 (CH); 133.29 (C); 140.46 (C); 142.62 (C); 143.79 (CH); 162.40 (C)

**EM** calculada para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>: 285.1210; Encontrada: 285.1185.

### 2.1.2.a Etil 1-(*terc*-butil)-5-metil-1*H*-pirazol-3-carboxilato



**Apariencia:** Aceite amarillo

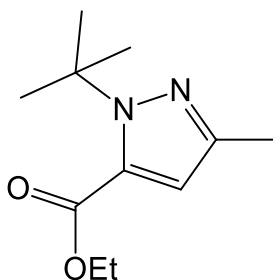
**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 210.1368 g/mol

**<sup>1</sup>H NMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.34 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.64 (s, 9H, t-butyl); 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.32 – 4.34 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.51 (s, H, CH)

**<sup>13</sup>C NMR [75 MHz]:** δ = 14.32 (CH<sub>3</sub>); 14.61 (CH<sub>3</sub>); 29.80 (CH<sub>3</sub>); 60.52 (CH<sub>2</sub>); 61.07 (C); 111.05 (CH); 139.23 (C); 140.23 (C); 162.83 (C)

### 2.1.2.b Etil 1-(*terc*-butil)-3-metil-1*H*-pirazol-5-carboxilato



**Apariencia:** Aceite amarillo

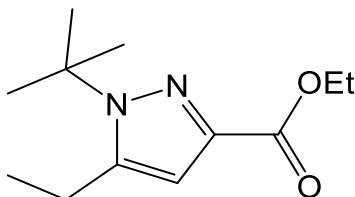
**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 210.1368 g/mol

**<sup>1</sup>H NMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.34 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.68 (s, 9H, t-butyl); 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.27 – 4.29 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.64 (s, H, CH)

$^{13}\text{C}$ NMR [75 MHz]:  $\delta = 13.26$  ( $\text{CH}_3$ );  $14.18$  ( $\text{CH}_3$ );  $29.63$  ( $\text{CH}_3$ );  $60.93$  ( $\text{CH}_2$ );  $61.76$  (C);  $113.20$  (CH);  $133.17$  (C);  $144.42$  (C);  $160.67$  (C)

### 2.1.3.a Etil 1-(*terc*-butil)-5-etil-1*H*-pirazol-3-carboxilato



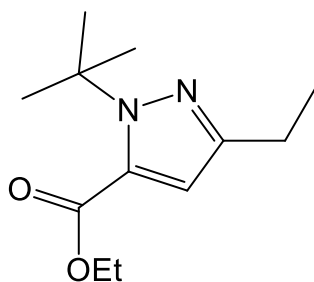
**Apariencia:** Aceite amarillo

**Fórmula molecular:**  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$

**Peso molecular:** 224.2994 g/mol

Sin embargo, no poseemos datos de resonancia de éste compuesto ya que en un primer momento tuvimos problemas para aislarlo, y cuando pudimos hacerlo no teníamos acceso a un equipo de RMN. Lo reportamos en base a los resultados observados en TLC y a los derivados que obtuvimos.

### 2.1.3.b Etil 1-(*terc*-butil)-3-etil-1*H*-pirazol-5-carboxilato



**Apariencia:** Aceite amarillo

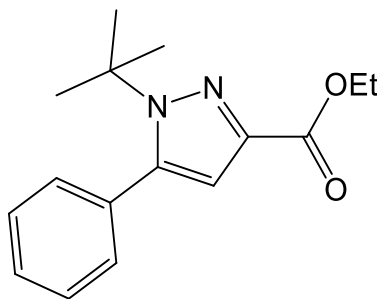
**Fórmula molecular:**  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$

**Peso molecular:** 224.2994 g/mol

$^1\text{HNMR}$  [300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.17$  (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.22 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.52 (s, 9H, *t*-butilo); 2.70 (c, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 4.20 (c, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 6.48 (s, H, CH)

$^{13}\text{CNMR}$  [75 MHz]:  $\delta = 13.05$  ( $\text{CH}_3$ ); 14.09 ( $\text{CH}_3$ ); 21.15 ( $\text{CH}_2$ ); 29.68 ( $\text{CH}_3$ ); 60.13 ( $\text{CH}_2$ ); 60.89 (C); 108.31 (CH); 139.93 (C); 145.71 (C); 162.57 (C)

#### 2.1.4 Etil 1-(*terc*-butil)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxilato



**Apariencia:** Cristales incoloros

**Fórmula molecular:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$

**Peso molecular:** 272.1525 g/mol

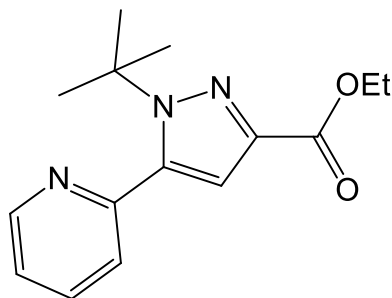
**Punto de fusión:** 77-78°C.

$^1\text{HNMR}$  [300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.37$  (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.48 (s, 9H, *t*-butyl); 4.36 – 4.39 (c, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 6.66 (s, H, CH); 7.33 – 7.40 (m, 5H, CH)

$^{13}\text{CNMR}$  [75 MHz]:  $\delta = 14.38$  ( $\text{CH}_3$ ); 31.01 ( $\text{CH}_3$ ); 60.69 ( $\text{CH}_2$ ); 62.73 (C); 112.06 (CH); 127.90 (CH); 128.78 (CH); 130.51 (CH); 133.15 (C); 140.51 (C); 144.08 (C); 162.80(C).

**EM m/z:** Calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}^+$ : 295.1417 ; Encontrada: 295.1429.

#### 2.1.5 Etil 1-(*terc*-butil)-5-(piridin-2-il)-1*H*-pirazol-3-carboxilato



**Apariencia:** Aceite amarillo

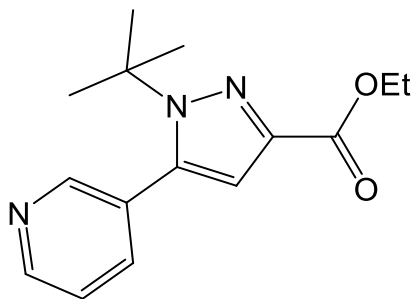
**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 273,1477 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>)]: δ = 1.41 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.59 (s, 9H, *t*-butilo); 4.37 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.79 (s, H, CH); 7.30 (t, H, CH); 7.40 (d, H, CH); 7.73 (t, H, CH); 8.68 (d, H, CH)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 14.57 (CH<sub>3</sub>); 30.66 (CH<sub>3</sub>); 60.26 (CH<sub>2</sub>); 63.37(C); 112.47 (CH); 122.91 (CH); 124.87 (CH); 136.23 (CH); 139.05 (C); 143.06 (C); 148.92 (CH); 152.51 (C)

#### 2.1.6 Etil 1-(*terc*-butil)-5-(piridin-3-il)-1H-pirazol-3-carboxilato



**Apariencia:** Aceite amarillo

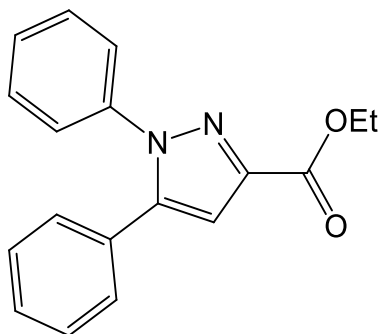
**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 273.1477 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>)]: δ = 1.38 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.49 (s, 9H, *t*-butyl); 4.36 - 4.38 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.69 (s, H, CH); 7.35 (t, 1H, CH); 7.66 (d, H, CH); 8.58 (s, H, CH); 8.65 (d, H, CH)

$^{13}\text{C}$ NMR [75 MHz]:  $\delta = 14.66$  ( $\text{CH}_3$ );  $31.46$  ( $\text{CH}_3$ );  $60.82$  ( $\text{CH}_2$ );  $63.07$  (C);  $113.22$  (CH);  $122.92$  (CH);  $129.74$  (C);  $137.85$  (CH);  $140.22$  (C);  $141.12$  (C);  $144.99$  (CH);  $150.70$  (CH)

### 2.2.1 Etil 1,5-difenil-1H-pirazol-3-carboxilato



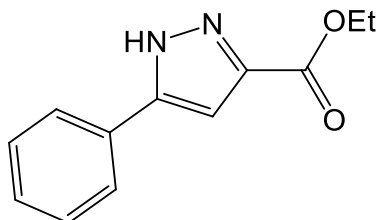
**Apariencia:** Cristal incoloro

**Fórmula molecular:**  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$

**Peso molecular:** 292,1212 g/mol

$^1\text{H}$ NMR [300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta = 1.37$  (t, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $4.38$  (c, 2H,  $\text{CH}_2$ );  $7.10$  (s, H, CH);  $7.21$  (d, H, CH);  $7.23$  (s, H, CH);  $7.34$  (m, 8H, CH)

### 2.3.1 Etil 5-fenil-1H-pirazol-3-carboxilato



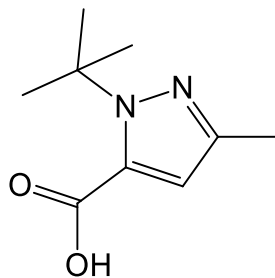
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:**  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$

**Peso molecular:** 216,0899 g/mol

$^1\text{HNMR}$  [300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.33$  (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 4.33 (c, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7.08 (s, H, CH); 7.35-7.42 (m, 3H, CH); 7.74 (d, 2H, CH)

### 3.1.1 Ácido 1-(*terc*-butil)-3-metil-1H-pirazol-5-carboxílico



**Apariencia:** Sólido anaranjado

**Fórmula molecular:**  $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

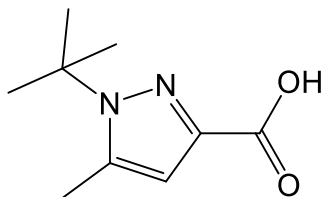
**Peso molecular:** 182,1055 g/mol

**Punto de fusión:** 118 - 119 °C

$^1\text{HNMR}$  [300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.72$  (s, 9H, *t*-butyl); 2.25 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6.85 (s, H, CH)

$^{13}\text{CNMR}$  [75 MHz]:  $\delta = 13.62$  ( $\text{CH}_3$ ); 30.01 ( $\text{CH}_3$ ); 62.64 (C); 115.64 (CH); 132.28 (C); 145.06 (C); 164.52 (C).

### 3.1.2 Ácido 1-(*terc*-butil)-5-metil-1H-pirazol-3-carboxílico



**Apariencia:** Sólido anaranjado

**Fórmula molecular:**  $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

**Peso molecular:** 182,1055 g/mol

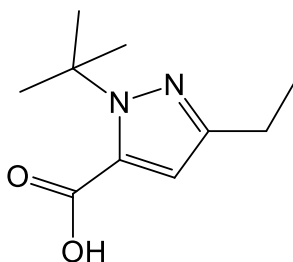


**Punto de fusión:** 125 - 126 °C

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.65 (s, 9H, *t*-butyl); 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.59 (s, H, CH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 15.09 (CH<sub>3</sub>); 30.21 (CH<sub>3</sub>); 61.84 (C); 111.91 (CH); 139.68 (C); 140.46 (C); 167.05 (C)

### 3.1.3 Ácido 1-(*terc*-butil)-3-etil-1*H*-pirazol-5-carboxílico



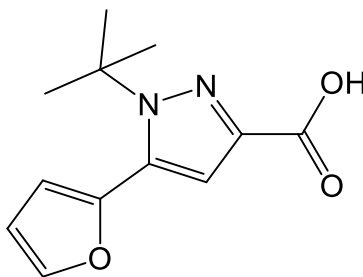
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 196,1212 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.34 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.67 (s, 9H, *t*-butilo); 2.85-2.88 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.64 (s, H, CH); 8.27 (s, H, OH)

### 3.1.4 Ácido 1-(*terc*-butil)-5-(furan-2-il)-1*H*-pirazol-3-carboxílico



**Apariencia:** Sólido anaranjado

**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 234.1004 g/mol

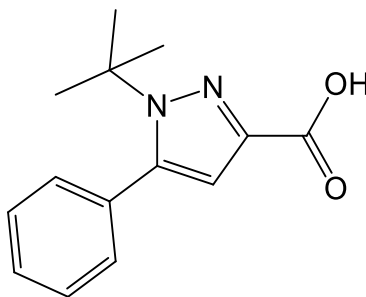
**Punto de fusión:** 137.8 - 139.7 °C

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.55 (s, 9H, *t*-butyl); 6.50 (m, 2H, CH); 6.95 (s, H, CH); 7.55 (m, H, CH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 29.83 (CH<sub>3</sub>); 62.86 (C); 111.39 (CH); 112.31 (CH); 114.06 (CH); 134.12 (C); 139.38 (C); 142.98 (C); 143.20 (CH); 165.74 (C).

**EM m/z:** Calculada para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>: 257.0897; Encontrada: 257.0892.

### 3.1.5 Ácido 1-(*tert*-butil)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico



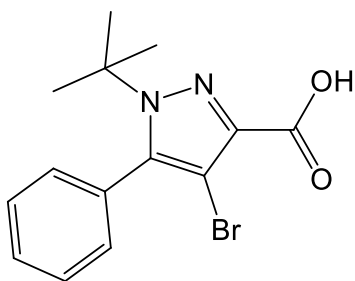
**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 244.1212 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.50 (s, 9H, *t*-butilo); 6.75 (s, H, CH); 7.30-7.31 (m, 2H, CH); 7.49-7.50 (m, 3H, CH)

### 3.1.6 Ácido 4-bromo-1-(*tert*-butil)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico



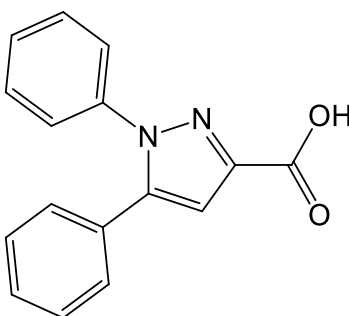
**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 322,0317 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.47 (s, 9H, *t*-butilo); 7.28-7.30 (d, 2H, CH); 7.47 (m, H, CH); 7.49 (d, 2H, CH)

### 3.1.7 Ácido 1,5-difenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico



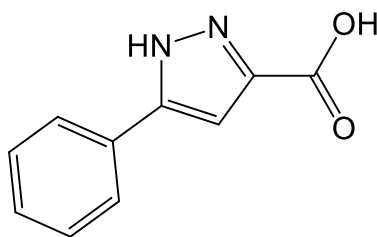
**Apariencia:** Cristales incoloros

**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 264,0899 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.10 (s, H, CH); 7.21 (d, H, CH); 7.24 (s, H, CH); 7.32-7.36 (m, 8H, CH)

### 3.1.8 Ácido 5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico



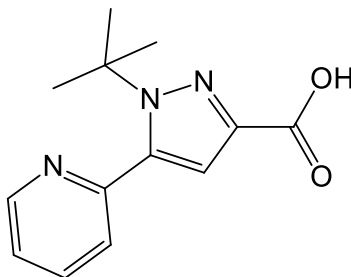
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 188,0568 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>)]: δ = 7.09 (s, H, CH); 7.36-7.43 (m, 3H, CH); 7.74 (d, 2H, CH)

### 3.1.9 Ácido 1-(*terc*-butil)-5-(piridin-2-il)-1H-pirazole-3-carboxílico



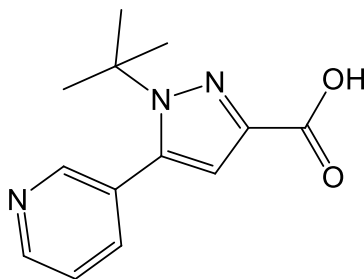
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 245,1164 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>)]: δ = 1.59 (s, 9H, *t*-butilo); 6.79 (s, H, CH); 7.30 (t, H, CH); 7.40 (d, H, CH); 7.73 (t, H, CH); 8.68 (d, H, CH)

### 3.1.10 Ácido 1-(*terc*-butil)-5-(piridin-3-il)-1H-pirazol-3-carboxílico



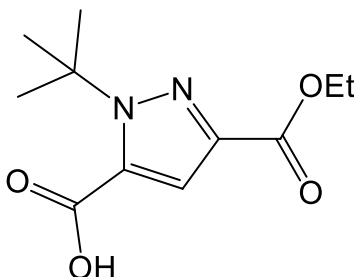
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 245,1164 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.49 (s, 9H, t-butyl); 6.69 (s, H, CH); 7.35 (t, 1H, CH); 7.66 (d, H, CH); 8.58 (s, H, CH); 8.65 (d, H, CH)

### 3.2.1.a Ácido 1-(*tert*-butil)-3-(etoxicarbonil)-1*H*-pirazol-5-carboxílico



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Peso molecular:** 240,1110 g/mol

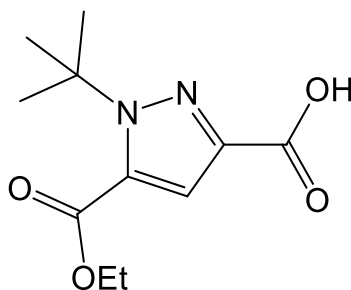
**Punto de fusión:** 103-105°C

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.38 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.76 (s, 9H, t-butyl); 4.38 - 4.40 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 7.54 (s, H, CH)

$^{13}\text{CNMR}$  [75 MHz]:  $\delta = 14.31$  ( $\text{CH}_3$ ); 29.32 ( $\text{CH}_3$ ); 61.13 ( $\text{CH}_2$ ); 64.65 (C); 118.54 (CH); 161.84 (C); 177.00 (C)

EM calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+$ : 263.1002; Encontrada: 263.1010.

### 3.2.1.b Ácido 1-(*terc*-butil)-5-(etoxicarbonil)-1*H*-pirazol-3-carboxílico



**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:**  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$

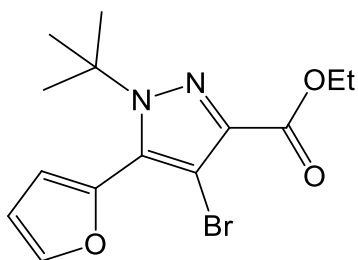
**Peso molecular:** 240,1110 g/mol

$^1\text{HNMR}$  [300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.40$  (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.73 (s, 9H, *t*-butilo); 4.42 (c, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 8.09 (s, H, CH)

$^{13}\text{CNMR}$  [75 MHz]:  $\delta = 14.33$  ( $\text{CH}_3$ ); 29.05 ( $\text{CH}_3$ ); 61.79 ( $\text{CH}_2$ ); 65.77 (C); 123.25 (CH); 135.82 (C); 140.65 (C); 161.46 (C); 161.99 (C)

EM calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+$ : 263.1002; Encontrada: 263.1010.

### 3.3.1 Etil 4-bromo-1-(*terc*-butil)-5-(furan-2-il)-1*H*-pirazol-3-carboxilato



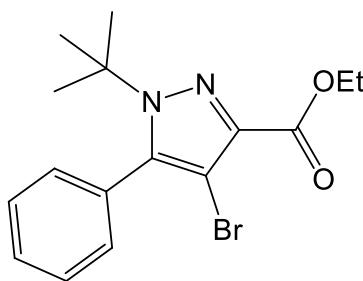
**Apariencia:** Aceite amarillo

**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 340,0423 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.38 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.55 (s, 9H, t-butyl); 4.40 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.48–6.50 (m, 2H, CH); 7.55 (m, H, CH)

### 3.3.2 Etil 4-bromo-1-(*terc*-butil)-5-fenil-1H-pirazol-3-carboxilato



**Apariencia:** Cristales incoloros

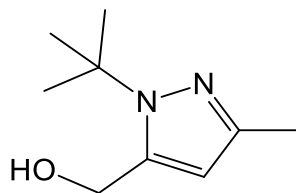
**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 350,0630 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.41 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.46 (s, 9H, *t*-butilo); 4.42 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 7.28 (m, 2H, CH); 7.46 (d, H, CH); 7.84 (d, 2H, CH)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 14.33 (CH<sub>3</sub>); 30.65 (CH<sub>3</sub>); 61.06 (CH<sub>2</sub>); 63.88 (C); 99.41 (C); 128.41 (CH); 129.47 (CH); 131.06 (CH); 137.93 (C); 143.40 (C); 161.70 (C).

### 3.4.1 (1-(*terc*-butil)-3-metil-1H-pirazol-5-il)metanol



**Apariencia:** Sólido blanco

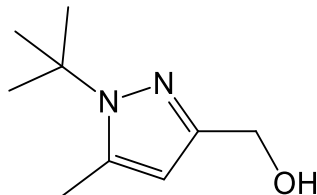
**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O

**Peso molecular:** 168,1263 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.61 (s, 9H, *t*-butilo); 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 5.99 (s, H, CH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 14.86 (CH<sub>3</sub>); 30.21 (CH<sub>3</sub>); 59.45 (CH<sub>2</sub>); 59.84 (C); 106.50 (CH); 139.21 (C); 148.68 (C)

### 3.4.2 (1-(*tert*-butil)-5-metil-1H-pirazol-3-il)metanol



**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O

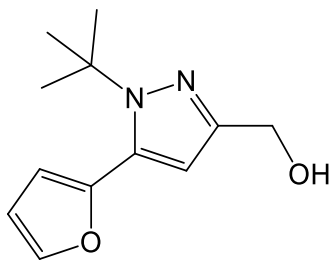
**Peso molecular:** 168,1263 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.63 (s, 9H, *t*-butilo); 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.04 (s, H, CH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 13.64 (CH<sub>3</sub>); 30.47 (CH<sub>3</sub>); 57.51 (CH<sub>2</sub>); 60.13 (C); 107.85 (CH); 142.24 (C); 145.60 (C)

### 3.4.3 (1-(*tert*-butil)-5-(furan-2-il)-1H-pirazol-3-il)metanol





**Apariencia:** Aceite amarillo

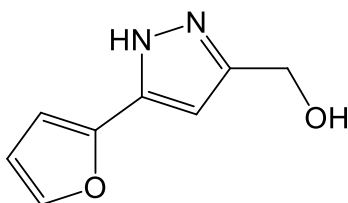
**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 220,1212 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.48 (s, 9H, *t*-butilo); 4.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.34 (s, H, CH); 6.41-6.42 (d, H, CH); 6.46 (m, H, CH); 7.51 (m, H, CH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 30.18 (CH<sub>3</sub>); 59.63 (CH<sub>2</sub>); 61.14 (C); 109.23 (CH); 111.32 (CH); 111.58 (CH); 133.93 (C); 142.63 (CH); 144.81 (C); 148.76 (C)

#### 3.4.4 (5-(furan-2-il)-1H-pirazol-3-il)metanol



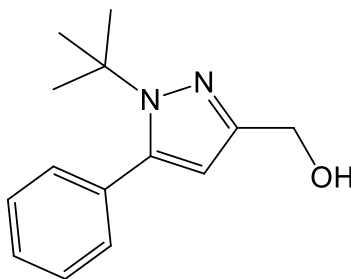
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 164,0568 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 4.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 7.05 (s, H, CH); 6.40-6.41 (d, H, CH); 6.44 (m, H, CH); 7.49 (m, H, CH)

#### 3.4.5 (1-(*terc*-butil)-5-fenil-1H-pirazol-3-il)metanol



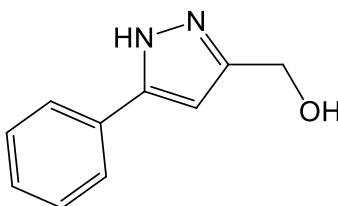
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O

**Peso molecular:** 230,1419 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.44 (s, 9H, *t*-butilo); 4.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.43 (s, H, CH); 7.33 – 7.50 (m, 5H, CH)

#### 3.4.6 (5-fenil-1*H*-pirazol-3-il)metanol



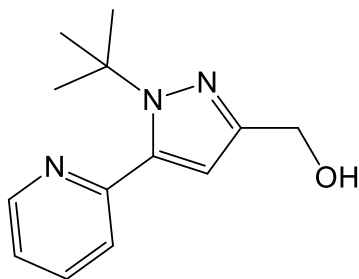
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O

**Peso molecular:** 174,0793 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.45 (s, H, CH); 7.37 – 7.52 (m, 5H, CH)

#### 3.4.7 (1-(*terc*-butil)-5-(piridin-2-il)-1*H*-pirazol-3-il)metanol



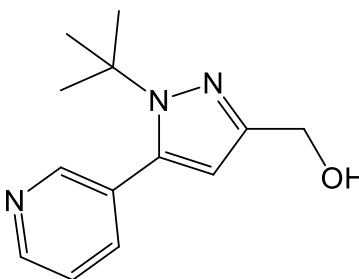
**Apariencia:** Sólido amarillo

**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 231,1372 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.43 (s, 9H, *t*-butilo); 4.66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.62 (s, H, CH); 7.33 (t, 1H, CH); 7.64 (d, H, CH); 8.56 (s, H, CH); 8.63 (d, H, CH)

### 3.4.8 (1-(*terc*-butil)-5-(piridin-3-il)-1*H*-pirazol-3-il)metanol



**Apariencia:** Sólido blanco

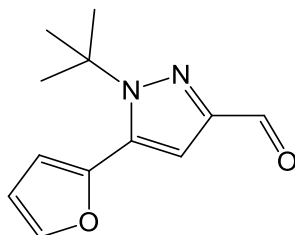
**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 231,1372 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.43 (s, 9H, *t*-butilo); 4.66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.16 (s, H, CH); 7.32 (t, H, CH); 7.63-7.66 (d, H, CH); 8.55 (s, H, CH); 8.61-8.62 (d, H, CH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 31.55 (CH<sub>3</sub>); 59.06 (CH<sub>2</sub>); 61.49 (C); 108.75 (CH); 122.81 (CH); 130.65 (C); 137.67 (CH); 139.77 (C); 149.45 (C); 149.60 (CH); 150.61 (CH)

### 3.5.1 1-(*terc*-butil)-5-(furan-2-il)-1*H*-pirazol-3-carbaldehído



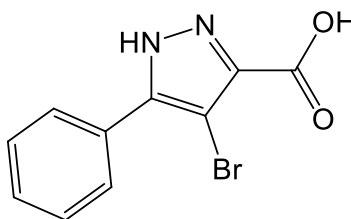
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 218,1055 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.50 (s, 9H, *t*-butilo); 6.37 (s, H, CH); 6.43-6.44 (d, H, CH); 6.48 (m, H, CH); 7.54 (m, H, CH)

### 3.6.1 Ácido 4-bromo-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico



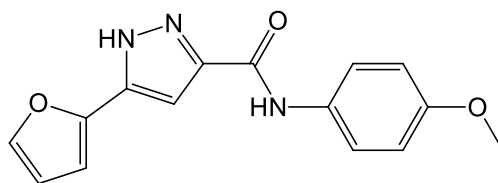
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 265,9691 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7.29 (m, 2H, CH); 7.49 (m, 2H, CH); 7.69 (m, H, CH)

### 3.6.2 5-(furan-2-il)-*N*-(4-metoxifenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida



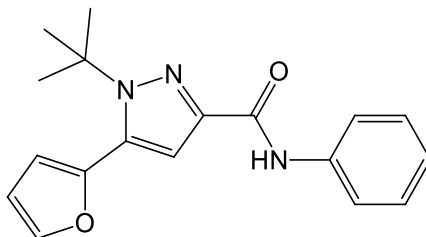
**Apariencia:** Sólido blanco

**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 283,0957 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 3.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.52 (m, H, CH); 6.69-6.70 (d, H, CH); 6.89-6.92 (d, 2H, CH); 7.05 (s, H, CH); 7.48 (s, H, CH); 7.58-7.61 (d, 2H, CH); 8.59 (s, H, NH)

#### 4.1.1 1-(*terc*-butil)-5-(furan-2-il)-*N*-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 309,1477 g/mol

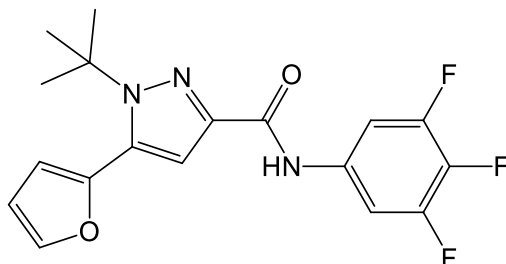
**Punto de fusión:** 102.5 - 104.2 °C

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.56 (s, 9H, *t*-butyl); 6.50 (m, 2H, CH); 6.97 (s, H, CH); 7.11 (m, H, CH); 7.36 (m, 2H, CH); 7.55 (m, H, CH); 7.68 (m, 2H, CH); 8.72 (s, H, NH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 29.88 (CH<sub>3</sub>); 62.23 (C); 111.39 (CH); 111.66 (CH); 112.13 (CH); 119.67 (CH); 123.92 (CH); 128.99 (CH); 134.27 (C); 137.92 (C); 142.85 (CH); 143.24 (C); 159.80 (C)

EM calculada para  $C_{18}H_{19}N_3O_2Na^+$ : 332.1369; Encontrada: 332.1346.

#### 4.2.1 1-(*terc*-butil)-5-furanil-N-(3,4,5-trifluorofenil)-1H-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:**  $C_{18}H_{16}F_3N_3O_2$

**Peso molecular:** 363,1195 g/mol

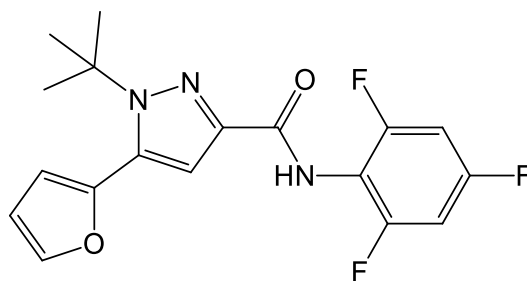
$^1H$ NMR [300 MHz ( $CDCl_3$ )]:  $\delta$  = 1.55 (s, 9H, *t*-butil); 6.49 (m, 2H, CH); 6.77 (m, 2H, CH); 6.97 (s, H, CH); 7.55 (m, H, CH); 8.15 (s, H, NH)

$^{19}F$ NMR [282 MHz]:  $\delta$  = -109.54 (F); -114.00 (2F)

$^{13}C$ NMR [75 MHz]:  $\delta$  = 29.85 ( $CH_3$ ); 62.38 (C); 100.23 (C); 100.58 (CH); 100.96 (C); 110.21 (C); 111.38 (CH); 112.01 (CH); 112.20 (CH); 134.23 (C); 141.98 (C); 142.90 (CH); 143.51 (C); 160.07 (C)

EM calculada para  $C_{18}H_{16}F_3N_3O_2Na^+$ : 386.1087; Encontrada: 386.1094.

#### 4.3.1 1-(*terc*-butil)-5-furanil-N-(2,4,6-trifluorofenil)-1H-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 363,1195 g/mol

**Punto de fusión:** 150.8 - 151.7 °C

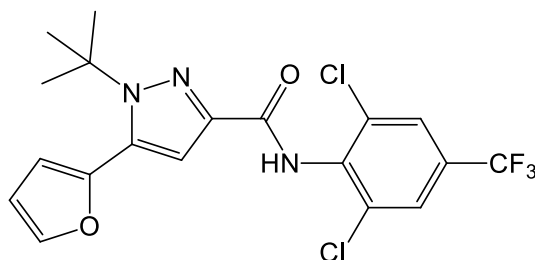
**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.55 (s, 9H, *t*-butyl); 6.49 (m, 2H, CH); 6.77 (m, 2H, CH); 6.97 (s, H, CH); 7.55 (m, H, CH); 8.15 (s, H, NH)

**<sup>19</sup>FNMR [282 MHz]:** δ = -109.54 (F); -114.00 (2F)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 29.85 (CH<sub>3</sub>); 62.38 (C); 100.23 (C); 100.58 (CH); 100.96 (C); 110.21 (C); 111.38 (CH); 112.01 (CH); 112.20 (CH); 134.23 (C); 141.98 (C); 142.90 (CH); 143.51 (C); 160.07 (C)

**EM** calculada para C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>: 386.1087; Encontrada: 386.1097.

#### 4.4.1.a 1-(*terc*-butil)-5-furanil-*N*-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-1*H*-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 445,0572 g/mol

**Punto de fusión:** 95-96 °C

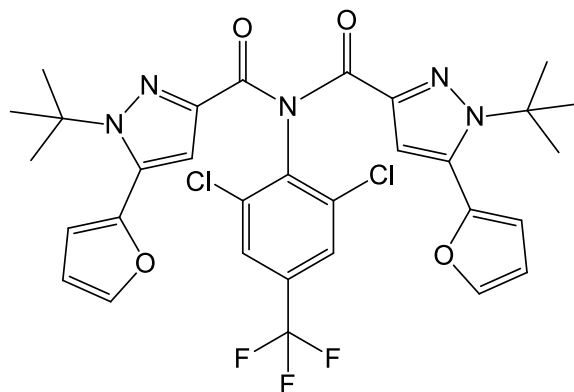
**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.57 (s, 9H, *t*-butyl); 6.50 (m, 2H, CH); 6.99 (s, H, CH); 7.56 (m, H, CH); 7.67 (m, 2H, CH); 8.64 (s, H, NH)

**<sup>19</sup>FNMR [282 MHz]:** δ = -62.78 (F)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 29.85 (CH<sub>3</sub>); 62.52 (C); 68.63 (C); 111.42 (CH); 112.07 (CH); 112.28 (CH); 125.28 (C); 125.60 (CH); 133.93 (C); 134.45 (C.); 141.79 (C); 142.97 (C); 143.43 (CH); 159.21 (C)

EM calculada para C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>: 468.0464; Encontrada: 468.0488

#### 4.4.1.b Bis-[1-(*terc*-butil)-5-furanil-1*H*-pirazol]-*N*-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-3,3-dicarboxamida



**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

**Peso molecular:** 661,1470 g/mol

**Punto de fusión:** 166.5 - 169.6 °C

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.33 (s, 18H, *t*-butil); 6.42 (m, 2H, CH); 6.47 (m, 2H, CH); 6.90 (s, 2H, CH); 7.51 (m, 2H, CH); 7.68 (s, 2H, CH); 8.64 (s, H, NH)

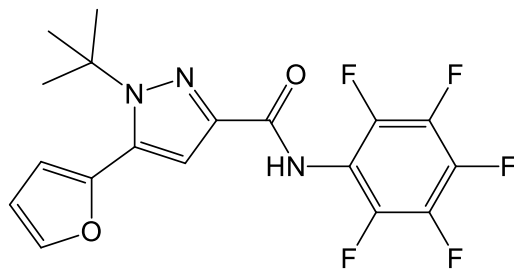
<sup>19</sup>FNMR [282 MHz]: δ = -62.98 (F)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 29.51 (CH<sub>3</sub>); 62.41 (C); 111.28 (CH); 112.06 (CH); 113.42 (CH); 125.60 (CH); 132.83 (C); 136.59 (C); 142.88 (CH); 143.41 (C.); 164.83 (C)

EM calculada para C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>: 684.1363; Encontrada: 684.1347

#### 4.5.1 1-(*terc*-butil)-5-furanil-*N*-(1,2,3,4,5-pentafluorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida





**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>F<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 399,1006 g/mol

**Punto de fusión:** 126.6 - 127.3 °C

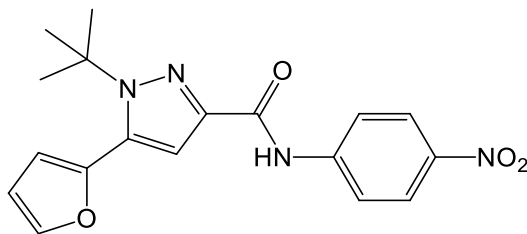
<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.56 (s, 9H, *t*-butil); 6.50 (m, 2H, CH); 6.98 (s, H, CH); 7.56 (m, H, CH); 8.24 (s, H, NH)

<sup>19</sup>FNMR [282 MHz]: δ = -162.48 (2F); -157.10 (F); -144.38 (2F)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 29.80 (CH<sub>3</sub>); 62.86 (C); 111.39 (CH); 112.31 (CH); 114.06 (CH); 134.12 (C); 139.38 (C); 142.98 (CH); 143.20 (C); 165.74 (C)

EM calculada para C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>F<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>: 422.0898; Encontrada: 422.0887

#### 4.6.1 1-(*terc*-butil)-5-furanil-*N*-(4-nitrofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales amarillo

**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

**Peso molecular:** 354,1328 g/mol

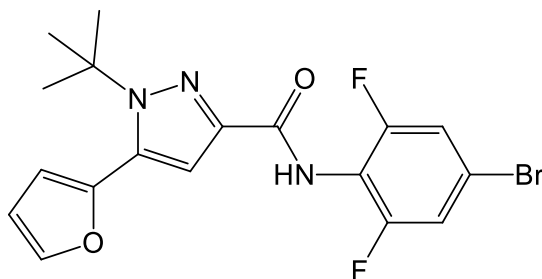
**Punto de fusión:** 187.2 - 188.9 °C

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.57 (s, 9H, *t*-butyl); 6.52 (m, 2H, CH); 6.98 (s, H, CH); 7.57 (m, H, CH); 7.86 – 7.89 (m, 2H, CH); 8.23 – 8.26 (m, 2H, CH); 9.06 (s, H, NH)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 29.83 (CH<sub>3</sub>); 62.59 (C); 111.46 (CH); 111.93 (CH); 112.36 (CH); 118.93 (CH); 125.15 (CH); 134.79 (C); 142.41 (C); 143.03 (CH); 143.19 (C); 143.78 (C); 145.44 (C); 159.91 (C)

EM calculada para C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>: 377.1220; Encontrada: 377.1193.

#### 4.7.1 1-(*terc*-butil)-5-furanil-*N*-(4-bromo-2,6-difluorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 423,0394 g/mol

**Punto de fusión:** 118-119 °C

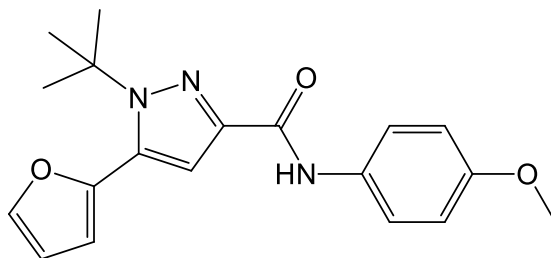
<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.55 (s, 9H, *t*-butyl); 6.49 (m, 2H, CH); 6.97 (s, H, CH); 7.17 – 7.20 (m, 2H, CH); 7.55 (m, H, CH); 8.19 (s, H, NH)

<sup>19</sup>FNMR [282 MHz]: δ = -115.13 (F)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 29.85 (CH<sub>3</sub>); 62.41 (C); 111.39 (CH); 112.04 (CH); 112.23 (CH); 113.44 (C); 115.59 (C); 115.62 (C); 115.95 (CH); 118.91 (C); 134.29 (C); 141.93 (C); 142.92 (CH); 143.46 (C); 159.68 (C).

EM calculada para C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>: 446.0286; Encontrada: 446.0296.

#### 4.9.1 1-(*terc*-butil)-5-(furan-2-il)-*N*-(4-metoxifenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida



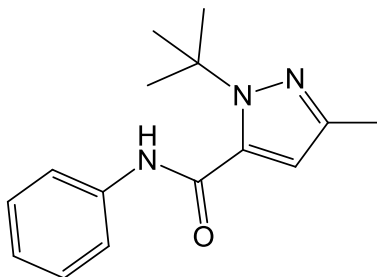
**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 339,1583 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.58 (s, 9H, *t*-butilo); 3.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.90-6.93 (d, 2H, CH); 7.13 (s, H, CH); 7.33-7.39 (m, 3H, CH); 8.72 (s, H, NH)

#### 4.1.2 1-(*terc*-butil)-3-metil-*N*-fenil-1*H*-pirazol-5-carboxamida



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 257,1528 g/mol

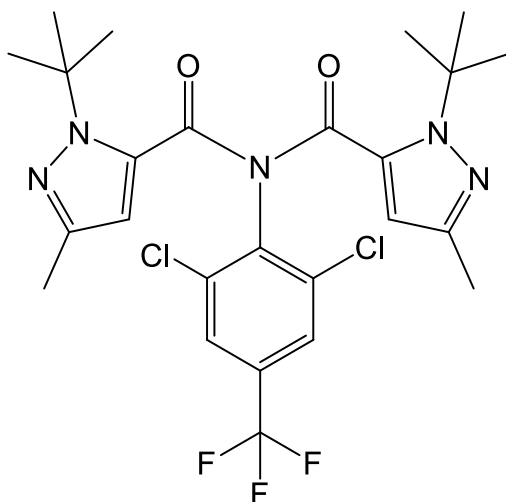
**Punto de fusión:** 111-112 °C

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.67 (s, 9H, *t*-butyl); 2.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.63 (s, H, CH); 7.08 (t, H, CH); 7.34 (t, 2H, CH); 7.65 - 7.68 (d, 2H, CH); 8.68 (s, H, NH);

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 14.76 (CH<sub>3</sub>); 29.87 (CH<sub>3</sub>); 60.85 (C); 109.04 (CH); 119.59 (CH); 123.68 (CH); 128.93 (CH); 138.09 (C); 140.27 (C); 143.14 (C); 160.33 (C).

EM calculada para  $C_{15}H_{19}N_3ONa^+$ : 280.1420; Encontrada: 280.1436.

**4.4.2.b 1-(*terc*-butil)-*N*-(1-(*terc*-butil)-3-metil-1*H*-pirazol-5-carbonil)-*N*-(2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil)-3-metil-1*H*-pirazol-5-carboxamida**



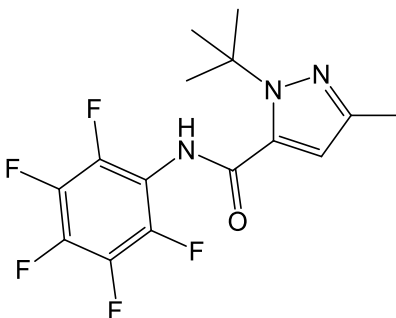
**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:**  $C_{25}H_{28}Cl_2F_3N_5O_2$

**Peso molecular:** 557,1572 g/mol

$^1H$ NMR [300 MHz ( $CDCl_3$ )]:  $\delta$  = 1.44 (s, 18H, *t*-butilo); 2.36 (s, 6H,  $CH_3$ ); 6.53 (s, 2H, CH); 7.62 (s, 2H, CH)

**4.5.2 1-(*terc*-butil)-3-metil-*N*-(perfluorofenil)-1*H*-pirazol-5-carboxamida**



**Apariencia:** Cristales blancos

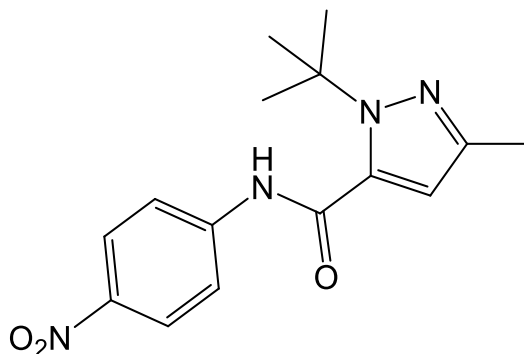
**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>F<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 347,1057 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.68 (s, 9H, *t*-butilo); 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.65 (s, H, CH); 8.20 (s, H, NH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 14.85 (CH<sub>3</sub>); 29.97 (CH<sub>3</sub>); 61.33 (C); 109.70 (CH); 140.68 (C); 141.48 (C); 160.34 (C)

#### 4.6.2 1-(*terc*-butil)-3-metil-*N*-(4-nitrofenil)-1*H*-pirazol-5-carboxamida



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 302,1379 g/mol

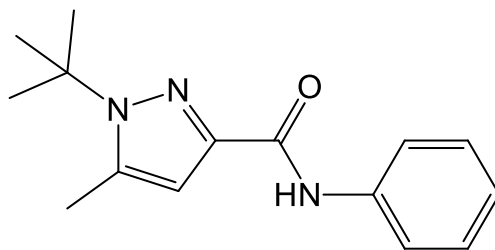
**Punto de fusión:** 141-142 °C.

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.68 (s, 9H, *t*-butyl); 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.65 (s, H, CH); 7.82 - 7.85 (d, 2H, CH); 8.20 - 8.23 (d, 2H, CH); 8.99 (s, H, NH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 14.77 (CH<sub>3</sub>); 29.85 (CH<sub>3</sub>); 61.20 (C); 109.38 (CH); 118.81 (CH); 125.12 (CH); 140.85 (C); 142.30 (C); 143.11 (C); 144.02 (CH); 160.42 (C).

**EM** calculada para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>: 325.1271; Encontrada: 325.1268.

#### 4.1.3 1-(*terc*-butil)-5-metil-*N*-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 257,1528 g/mol

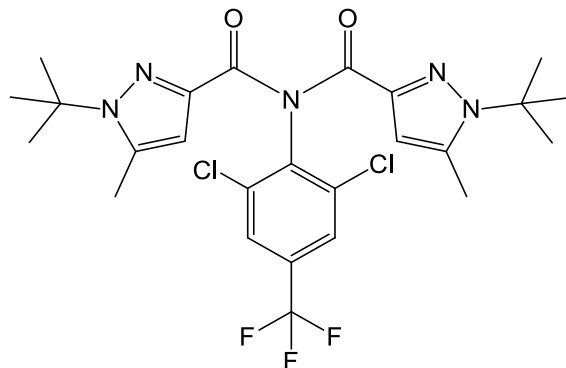
**Punto de fusión:** 105-106 °C

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.66 (s, 9H, t-butyl); 2.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.62 (s, H, CH); 7.08 (t, H, CH); 7.33 (t, 2H, CH); 7.65- 7.68 (c, 2H, CH); 8.69 (s, H, NH)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 14.72 (CH<sub>3</sub>); 29.84 (CH<sub>3</sub>); 60.83 (C); 109.00 (CH); 119.56 (CH); 123.65 (CH); 128.90 (CH); 138.09 (C); 140.24 (C); 143.07 (C); 160.30 (C)

EM calculada para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>ONa<sup>+</sup>: 280.1420; Encontrada: 280.1425.

#### 4.4.3.b 1-(*terc*-butil)-N-(1-(*terc*-butil)-5-metil-1H-pirazol-3-carbonil)-N-(2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil)-5-metil-1H-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 557,1572 g/mol

**Punto de fusión:** 191-192 °C

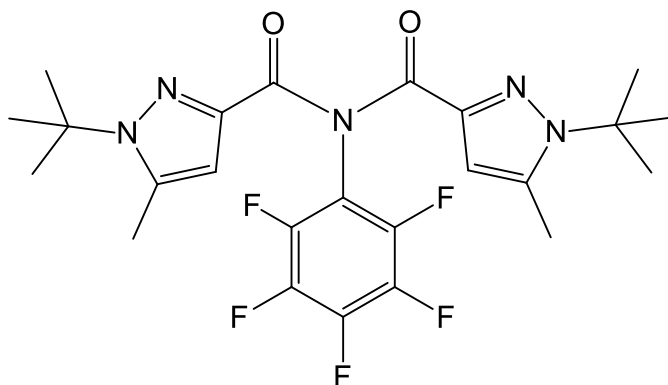
**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.43 (s, 18H, t-butyl); 2.35 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 6.51 (s, 2H, CH); 7.61 (s, 2H, CH)

**<sup>19</sup>FNMR [282 MHz]:** δ = -63.50 (F)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 14.37 (CH<sub>3</sub>); 29.45 (CH<sub>3</sub>); 60.93 (C); 110.70 (CH); 124.36 (C); 125.38 (CH); 131.11 (C); 131.56 (C); 136.59 (C); 138.51 (C); 143.12 (C); 165.20 (C)

**EM** calculada para C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>: 580.1464; Encontrada: 580.1463

#### 4.5.3 1-(*terc*-butil)-3-metil-*N*-(perfluorofenil)-1*H*-pirazol-5-carboxamida



**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>F<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 511,2007 g/mol

**Punto de fusión:** 130-131 °C

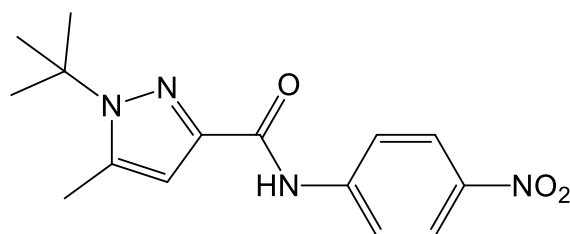
**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.43 (s, 18H, t-butyl); 2.34 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 6.51 (s, 2H, CH)

**<sup>19</sup>FNMR [282 MHz]:** δ = -144.11 (F)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 14.29 (CH<sub>3</sub>); 29.35 (CH<sub>3</sub>); 60.99 (C); 110.59 (CH); 138.91 (C); 142.92 (C); 165.25 (C)

EM calculada para  $C_{24}H_{27}F_5N_5O_2^+$ : 512.2080; Encontrada: 512.2088

#### 4.6.3 1-(*terc*-butil)-3-metil-N-(4-nitrofenil)-1H-pirazol-5-carboxamida



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:**  $C_{15}H_{18}N_4O_3$

**Peso molecular:** 302,1379 g/mol

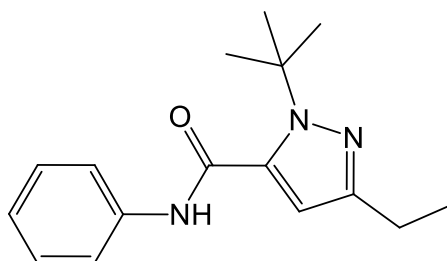
**Punto de fusión:** 141-142 °C

**$^1H$ NMR [300 MHz ( $CDCl_3$ )]:**  $\delta$  = 1.68 (s, 9H, t-butyl); 2.49 (s, 3H,  $CH_3$ ); 6.65 (s, H, CH); 7.82 - 7.85 (d, 2H, CH); 8.20 - 8.23 (d, 2H, CH); 8.99 (s, H, NH)

**$^{13}C$ NMR [75 MHz]:**  $\delta$  = 14.77 ( $CH_3$ ); 29.85 ( $CH_3$ ); 61.20 (C); 109.38 (CH); 118.81 (CH); 125.12 (CH); 140.85 (C); 142.30 (C); 143.11 (C); 144.02 (CH); 160.42 (C).

EM calculada para  $C_{15}H_{18}N_4O_3Na^+$ : 325.1271; Encontrada: 325.1268.

#### 4.1.4 1-(*terc*-butil)-3-etil-N-fenil-1H-pirazol-5-carboxamida



**Apariencia:**



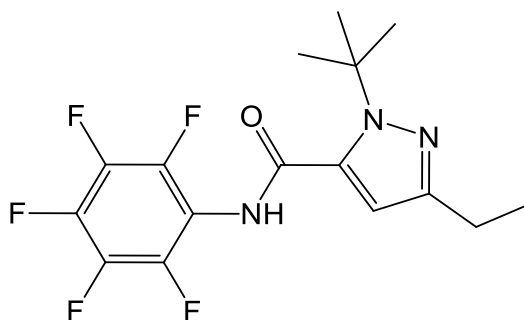
**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 271,1685 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.34 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.68 (s, 9H, *t*-butilo); 2.84-2.87 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.74 (s, H, CH); 7.10 (t, H, CH); 7.35 (t, 2H, CH); 7.68 (d, 2H, CH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 13.49 (CH<sub>3</sub>); 21.69 (CH<sub>2</sub>); 30.18 (CH<sub>3</sub>); 61.09 (C); 106.78 (CH); 119.76 (CH); 123.82 (CH); 129.08 (CH); 138.29 (C); 143.21 (C); 147.18 (C); 160.59 (C)

#### 4.5.4 1-(*terc*-butil)-3-etil-N-(perfluorofenil)-1*H*-pirazol-5-carboxamida



**Apariencia:** Cristales blancos

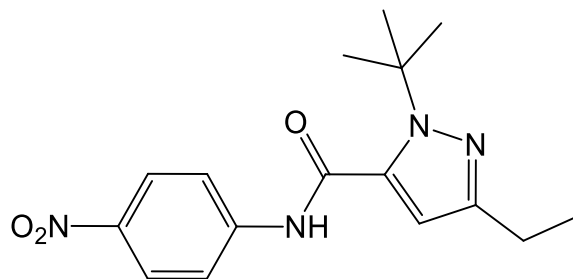
**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>F<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 361,1214 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.34 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.68 (s, 9H, *t*-butilo); 2.85-2.88 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.75 (s, H, CH); 8.20 (s, H, NH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 13.51 (CH<sub>3</sub>); 21.66 (CH<sub>2</sub>); 30.15 (CH<sub>3</sub>); 61.42 (C); 107.36 (CH); 141.46 (C); 147.43 (C)

#### 4.6.4 1-(*terc*-butil)-3-etil-N-(4-nitrofenil)-1*H*-pirazol-5-carboxamida



**Apariencia:** Sólido amarillo

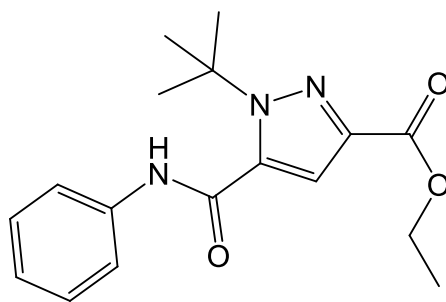
**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 316,1535 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.34 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.69 (s, 9H, *t*-butilo); 2.85-2.88 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.75 (s, H, CH); 7.83-7.87 (d, 2H, CH); 8.22-8.25 (d, 2H, CH); 9.01 (s, H, NH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 13.46 (CH<sub>3</sub>); 21.70 (CH<sub>2</sub>); 30.15 (CH<sub>3</sub>); 61.45 (C); 107.13 (CH); 118.98 (CH); 125.29 (CH); 142.39 (C); 143.24 (C); 144.19 (C); 147.76 (C); 160.70 (C)

#### 4.1.5 Etil 1-(*terc*-butil)-5-(fenilcarbamoi)-1*H*-pirazol-3-carboxilato



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 315,1583 g/mol

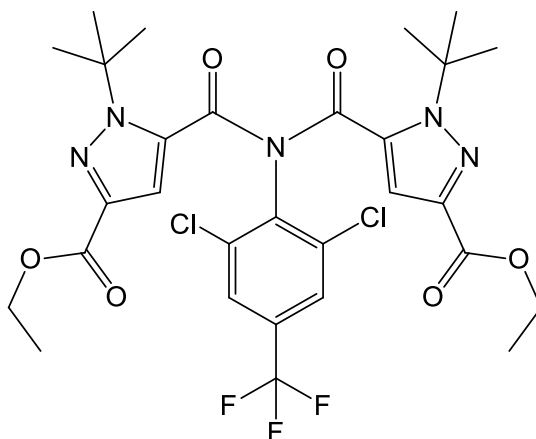
**Punto de fusión:** 121-122 °C

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.36 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.73 (s, 9H, *t*-butyl); 4.34 - 4.36 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.90 (s, H, CH); 7.17 (t, H, CH); 7.37 (t, 2H, CH); 7.65 (d, 2H, CH); 8.22 (s, H, NH)

$^{13}\text{C}$ NMR [75 MHz]:  $\delta = 14.29$  ( $\text{CH}_3$ );  $29.74$  ( $\text{CH}_3$ );  $61.12$  ( $\text{CH}_2$ );  $63.81$  (C);  $111.09$  (CH);  $120.11$  (CH);  $125.12$  (CH);  $129.16$  (CH);  $137.44$  (C);  $138.56$  (C);  $140.19$  (CH);  $159.66$  (C);  $162.27$  (C).

EM calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}^+$ : 338.1475; Encontrada: 338.1468.

#### 4.4.5.b Dietil 5,5'-(((2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil)azanediil)bis(carbonil))bis(1-(*terc*-butil)-1*H*-pirazol-3-carboxilato)



**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:**  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_6$

**Peso molecular:** 673,1682 g/mol

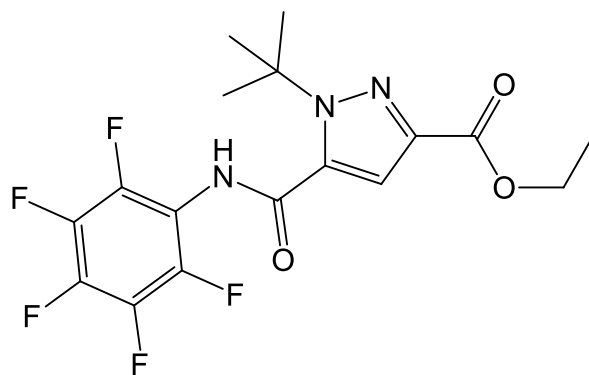
**Punto de fusión:** 144 - 146°C

$^1\text{H}$ NMR [300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta = 1.37$  (t, 6H,  $\text{CH}_3$ );  $1.74$  (s, 18H, *t*-butilo);  $4.36$  (c, 4H,  $\text{CH}_2$ );  $7.19$  (s, 2H, CH);  $7.74$  (s, 2H, CH)

$^{19}\text{F}$ NMR [282 MHz]:  $\delta = -63.18$  (F)

$^{13}\text{C}$ NMR [75 MHz]:  $\delta = 14.28$  ( $\text{CH}_3$ );  $29.72$  ( $\text{CH}_3$ );  $61.25$  ( $\text{CH}_2$ );  $65.39$  (C);  $114.33$  (CH);  $126.38$  (CH);  $135.95$  (C);  $140.36$  (C);  $161.32$  (C)

#### 4.5.5 Etil 1-(*terc*-butil)-5-((perfluorofenil)carbamoíl)-1*H*-pirazol-3-carboxilato



**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:**  $C_{17}H_{16}F_5N_3O_3$

**Peso molecular:** 405,1112 g/mol

**Punto de fusión:** 153-154 °C

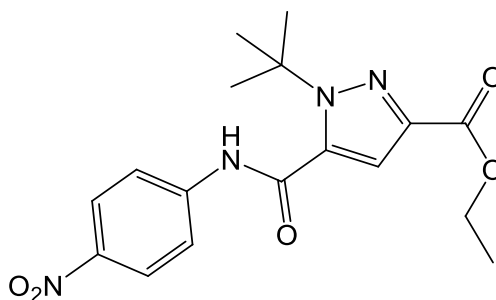
**$^1\text{H}$ NMR [300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ )]:**  $\delta$  = 1.36 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.73 (s, 9H, t-butyl); 4.34 - 4.36 (c, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7.15 (s, H, CH); 7.78 (s, H, NH)

**$^{19}\text{F}$ NMR [282 MHz]:**  $\delta$  = -161.58 (t, 2F, CF); -154.93 (t, F, CF); -144.44 - -144.38 (d, 2F, CF)

**$^{13}\text{C}$ NMR [75 MHz]:**  $\delta$  = 14.29 ( $\text{CH}_3$ ); 29.60 ( $\text{CH}_3$ ); 61.26 ( $\text{CH}_2$ ); 64.28 (C); 112.62 (CH); 135.99 (C); 140.33 (C); 159.48 (C); 161.96 (C)

**EM** calculada para  $C_{17}H_{16}F_5N_3O_3Na^+$ : 428.1004; Encontrada: 428.0990.

#### 4.6.5 Etil 1-(*terc*-butil)-5-((4-nitrofenil)carbamoíl)-1*H*-pirazol-3-carboxilato



**Apariencia:** Cristales Blancos

**Fórmula molecular:**  $C_{17}H_{20}N_4O_5$

**Peso molecular:** 360,1434 g/mol

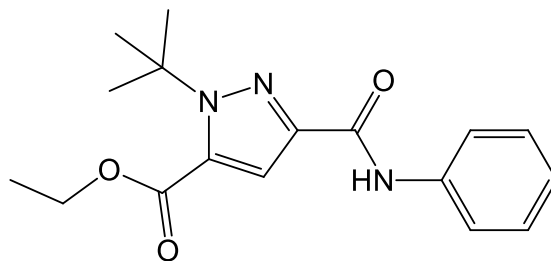
**Punto de fusión:** 143-145 °C

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.38 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.74 (s, 9H, *t*-butyl); 4.36 – 4.39 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.96 (s, H, CH); 7.84 – 7.87 (d, 2H, CH); 8.25 – 8.28 (d, H, CH); 8.46 (s, H, NH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 14.53 (CH<sub>3</sub>); 29.77 (CH<sub>3</sub>); 61.52 (CH<sub>2</sub>); 64.20 (C); 111.60 (CH); 119.53 (CH); 125.17 (CH); 143.95 (C); 144.52 (C); 161.48 (C)

**EM** calculada para C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup>: 383.1326; Encontrada: 383.1335

#### 4.1.6 Etil 1-(*terc*-butil)-3-(fenilcarbamóil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato



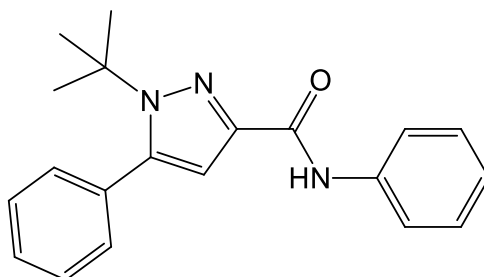
**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 315,1583 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.39 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.76 (s, 9H, *t*-butilo); 4.39 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 7.22 (t, H, CH); 7.40 (t, 2H, CH); 7.62 (d, 2H, CH); 8.24 (s, H, CH); 8.96 (d, H, CH)

#### 4.1.7 1-(*terc*-butil)-*N*,5-difenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



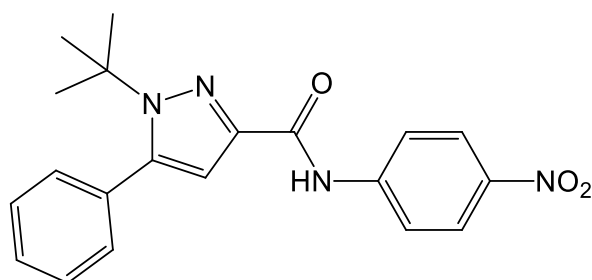
**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 319,1685 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.52 (s, 9H, *t*-butilo); 6.76 (s, H, CH); 7.10 (t, H, CH); 7.35-7.43 (m, 7H, CH); 7.69-7.71 (d, 2H, CH); 8.72 (s, H, NH)

#### 4.6.7 1-(*terc*-butil)-*N*-(4-nitrofenil)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



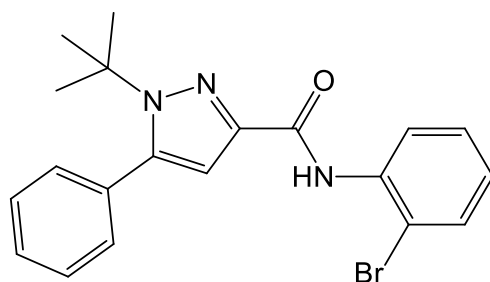
**Apariencia:** Cristales amarillos

**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 364,1535 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.52 (s, 9H, *t*-butilo); 6.79 (s, H, CH); 7.34-7.36 (d, 2H, CH); 7.42-7.44 (d, 2H, CH); 7.51-7.53 (d, H, CH); 7.87-7.91 (d, 2H, CH); 8.25-8.28 (d, 2H, CH); 9.03 (s, H, NH)

#### 4.8.7 *N*-(2-bromofenil)-1-(*terc*-butil)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales blancos

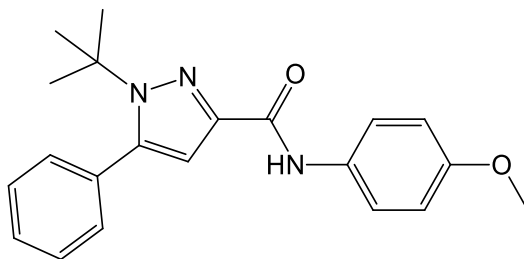
**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 397,0790 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.50 (s, H, *t*-butilo); 6.77 (s, H, CH); 6.97 (t, H, CH); 7.35-7.43 (m, 6H, CH); 7.57-7.59 (d, H, CH); 8.58-8.61 (d, H, CH); 9.63 (s, H, NH)

**<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]:** δ = 31.09 (CH<sub>3</sub>); 110.08 (CH); 113.21 (C); 121.19 (CH); 124.57 (CH); 128.14 (CH); 128.56 (CH); 130.66 (CH); 132.42 (CH); 133.14 (C); 136.40 (C); 143.15 (C)

#### 4.9.7 1-(*terc*-butil)-*N*-(4-metoxifenil)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



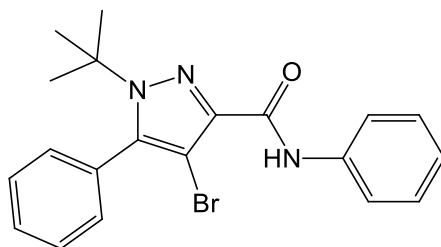
**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 349,1790 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.50 (s, 9H, *t*-butilo); 3.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.75 (s, H, CH); 6.89-6.92 (d, 2H, CH); 7.34-7.42 (m, 5H, CH); 7.60-7.63 (d, 2H, CH); 8.66 (s, H, NH)

#### 4.1.8 4-bromo-1-(*terc*-butil)-*N*,5-difenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



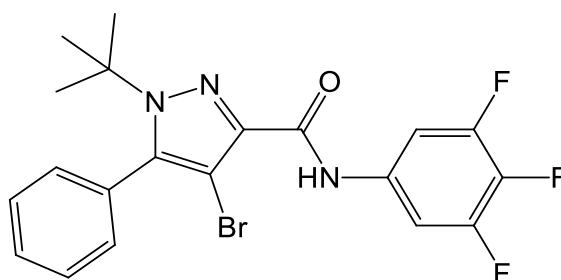
**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 397,0790 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.48 (s, 9H, *t*-butilo); 7.11 (t, H, CH); 7.31 (t, 2H, CH); 7.36 (t, 2H, CH); 7.47 (d, H, CH); 7.49 (d, 2H, CH); 7.72 (d, 2H, CH); 8.72 (s, H, NH)

#### 4.2.8 4-bromo-1-(*terc*-butil)-5-fenil-*N*-(3,4,5-trifluorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales blancos

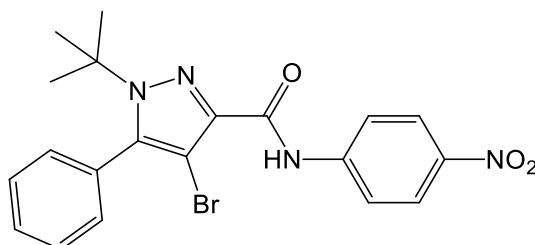
**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O

**Peso molecular:** 451,0507 g/mol

<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.48 (s, 9H, *t*-butilo); 7.30 (m, 2H, CH); 7.42-7.50 (m, 5H, CH); 8.69 (s, H, NH)

<sup>13</sup>CNMR [75 MHz]: δ = 30.66 (CH<sub>3</sub>); 63.93 (C); 103.78 (CH); 104.11 (CH); 128.356 (CH); 129.75 (CH); 130.95 (CH); 137.57 (C); 144.66 (C); 149.81 (C); 152.82 (C)

#### 4.6.8 4-bromo-1-(*terc*-butyl)-*N*-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide





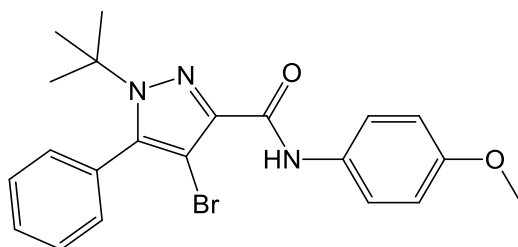
**Apariencia:** Sólido amarillo

**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 442,0641 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.49 (s, 9H, *t*-butilo); 7.28-7.31 (d, 2H, CH); 7.48 (d, H, CH); 7.50 (d, 2H, CH); 7.88-7.91 (d, 2H, CH); 8.23-8.26 (d, 2H, CH); 9.03 (s, H, NH)

#### 4.9.8 4-bromo-1-(*terc*-butil)-*N*-(4-metoxifenil)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



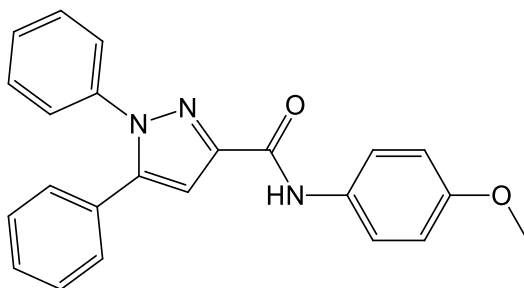
**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 427,0895 g/mol

**<sup>1</sup>HNMR [300 MHz (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.47 (s, 9H, *t*-butilo); 3.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.88-6.91 (d, 2H, CH); 7.30 (d, 2H, CH); 7.47 (m, H, CH); 7.48 (d, 2H, CH); 7.61-7.64 (d, 2H, CH); 8.62 (s, H, NH)

#### 4.9.10 *N*-(4-metoxifenil)-1,5-difenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



**Apariencia:** Cristales blancos

**Fórmula molecular:**  $C_{23}H_{19}N_3O_2$

**Peso molecular:** 369,1477 g/mol

$^1\text{H NMR}$  [300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.82$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6.90-6.93 (d, 2H, CH); 7.13 (s, H, CH); 7.33-7.39 (m, 7H, CH), 7.61-7.64 (d, 2H, CH); 8.72 (s, H, NH)

$^{13}\text{C NMR}$  [75 MHz]:  $\delta = 55.51$  ( $\text{CH}_3$ ); 108.26 (CH); 114.20 (CH); 121.48 (CH); 125.52 (CH); 128.42 (CH); 128.42 (CH); 128.63 (CH); 128.78 (CH); 129.19 (CH); 131.21 (C); 139.57 (C); 145.38 (C); 148.59 (C); 156.10 (C)