

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“Síntesis de 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles con potencial actividad fitosanitaria”

Lic. Plem, Silvana Cristina

Director de Tesis: Dr. Marcelo C. Murguía

Lugar de realización: LAQUIMAP- Facultad de Bioquímica y Cs.
Biológicas – Universidad Nacional del Litoral e Instituto de Desarrollo
Tecnológico para la Industria Química (INTEC)UNL- CONICET

-Santa Fe, 2018-

Agradecimientos

Bernardo Houssay (1887-1971 Primer Premio Nobel de Latinoamérica): "*Tengamos ideales elevados y pensemos en alcanzar grandes cosas, porque como la vida rebaja siempre y no se logra sino una parte de lo que se ansía, soñando muy alto alcanzaremos mucho más. Para una voluntad firme, nada es imposible, no hay fácil ni difícil; fácil es lo que ya sabemos hacer, difícil, lo que aún no hemos aprendido a hacer*".

De seguro aprendí algo, o bastante según el punto de vista con que se lo mire, también crecí como persona, aprendí a valorar mi propio esfuerzo y el ajeno para que las cosas salgan lo mejor posible, a valorar el tiempo mío y de los demás...

Medi cuenta que nunca estuve sola, estuve rodeada de cariño y afecto tanto en las personas que me acompañaron día a día en el trabajo como en mi vida personal. Y que pidiendo ayuda a quienes saben se puede aprender muchísimo! aprendí que nunca hay que bajar los brazos y que vale la pena intentarlo, que las cosas siempre se pueden hacer mejor...Que él no ya está, vamos por el sí!...siempre estamos aprendiendo para crecer

Quiero agradecerles de corazón..

A mis padres Nely y Carlos y a mi Abuela Luisa por acompañarme siempre respetando mis decisiones y enseñarme desde pequeña la responsabilidad, el compromiso, el esfuerzo, a valorar las oportunidades y que hay que demostrarle a la vida!

A mis hermanos Susana Y Fernando por estar siempre, alentarme, ayudarme y apoyarme en el camino confiando en las posibilidades con entusiasmo

A Liliana quien me abrió las puertas al maravilloso mundo de la investigación en la carrera de grado y contagiarme su entusiasmo, por alentarme a crecer y superarme cada día más con su ejemplo y aliento, apostando a mejorar y dar siempre lo mejor

A Fer, Florita, Tato, Caro mis hermans del alma, por su amistad de oro a pesar del tiempo y las distancias

A Luci, Romi, Cristi, Ana, Vane, Fer y Facu que desde que recuerdo su amistad es parte de mi vida...que aunque el viento me haya llevado a otros caminos siempre nuestra amistad presente y fuerte

Gracias a Diana, Marcelo y Javier por abrirme las puertas del Laboratorio de Química Aplicada en la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas allá por diciembre de 2012 cuando me entrevistaron y confiaron en mí aún sin conocerme

A mi Director Marcelo por su paciencia eterna, por confiar en mí y darme la posibilidad de aprender y crecer en su grupo de investigación, brindándome las herramientas y recursos necesarios

A Javier por contagiarme entusiasmo por aprender, por su crítica constructiva y ayudarme a ver otras opciones, a seguir intentando y no ahogarme en un vaso de agua sino a ver el medio vaso lleno...por enseñarme a valorar el espacio de aprender y contribuir al conocimiento con responsabilidad; por su predisposición siempre, por todo el conocimiento transmitido y la paciencia de explicarme...Gracias!

A Esperanza, Estefy y Carolina por estar en el día a día, escuchando dificultades, opinando, alentándonos mutuamente y tratando de crecer con valores, entendiendo el sistema y sus cosas para mejorar, por los almuerzos, los momentos compartidos, el aliento y apoyo en todo momento, por saber que cuento con uds y su valiosa amistad

A Victoria y Eduardo por abrirme las puertas en Tucumán con total predisposición, entusiasmo y hacerme conocer un área mágica y llena de vida...Por aceptar trabajar en conjunto y aprender con uds, por recibirme siempre con tanto cariño

A Fernanda, Stella, Josefina por su predisposición constante y ayuda para brindar luz donde mis herramientas se limitaban oscuras...por el conocimiento transmitido
Gracias!

A todas las personas que fueron parte de distintos tramos del camino, mis compañeros de cursos, personas que me recibieron para hacer una estadía en otro centro de investigación brindándome los elementos y conocimiento necesario, a quienes me ayudaron con la estadística, con los análisis de resonancia, y tantas otras dificultades durante estos 5 años

A la Universidad Nacional del Litoral, al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) por brindarme el espacio físico y poner a disposición los equipos, seguridad y herramientas para poder desarrollar el tema de trabajo

A CEPAVE-Universidad Nacional de La Plata (UNLP), PROIMI-Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Departamento de Química Orgánica de la Universidad Nacional de Córdoba e INTEC Edificio Houssey, a todo el personal amable y siempre predispuerto a recibirme cordialmente y hacer llevaderas las tareas

A los Jurados que aceptaron con predisposición participar en mi crecimiento profesional, por su tiempo y conocimiento para contribuir a esta tesis doctoral

A todas las personas que forman parte del día a día y que contribuyen para que al llegar al laboratorio podamos desarrollar nuestras actividades, incluyendo a los choferes de colectivos siempre puntuales acercándonos al lugar de trabajo en forma segura, al personal de limpieza que nos acondiciona el laboratorio y espacios de seminarios para desarrollar nuestras tareas, y todas las personas que sin nombrarlas particularmente nos ayudan a modificar equipos, instalarlos, aprender a usarlos o interpretar análisis, en fin, a auxiliarnos con los traspíes diarios....Gracias!!!

A Dios por las fuerzas cada día....por situarme en este grupo de trabajo y darme las herramientas para desarrollar este trabajo, crecer y poder Doctorarme. Gracias por darme tanto para ser feliz

A tod@s por compartir mi felicidad con Ustedes... por ser parte de esta etapa y de mi vida....Gracias!!!!

Publicaciones

- 1) SC Plem, MJ Carrió, SM Vaira, DM Müller, MC Murguía. (2016) Comparative study of biological activity of fluorinated 5-aminopyrazoles on *Spodoptera frugiperda*. Int. J. of Env. and Agric. Res. (IJOEAR) 4 (2): 2454-1850.

- 2) SC Plem, MC Murguía, DM Muller. (2016) *Síntesis de 5-aminopirazoles a partir de 1,3 dielectrófilo y arilhidracinas*. Resúmenes de las XXIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo -1a ed. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Libro digital, PDF. Archivo Digital: descarga y online ISBN 978-950-34-1310-4 1. Ciencia y Tecnología. 2. Innovación Científica. 3. Innovación Tecnológica. I. Kretzer, Iara Fabricia CDD 629.89. Pág. 344.

- 3) SC Plem, DM Müller, MC Murguía (2015) Key Intermediates: A Simple and Highly Selective Synthesis of 5-Amino-1-aryl-1H-pyrazole-4-carbonitriles for Applications in the Crop Protection. *Adv. Chem. Eng. Sci.* (5) 239-261.

- 4) LM Machuca, U Reno, SC Plem, AM Gagneten, MC Murguía (2015) N-Acetylated Gemini Surfactants: Synthesis, Surface-Active Properties, Antifungal Activity, and Ecotoxicity Bioassays. *Adv. Chem. Eng. Sci.* (5), 215–224.

Índice

Agradecimientos	2
Publicaciones	5
Abreviaturas y Símbolos	8
Resumen	9
Abstract	9
Introducción General	11
Introducción al concepto de Seguridad Alimentaria	12
Uso de Fitosanitarios	14
Pirazoles y sus aplicaciones	16
Fipronil: un arilpirazol con actividad insecticida	17
Resistencia a Plaguicidas	20
Objetivos	23
Objetivo general	24
Objetivos Específicos	24
Capítulo 1: Síntesis de 5-amino-1 <i>H</i> -1-arilpirazoles	25
Introducción: Síntesis de 5-amino-1 <i>H</i> -1-arilpirazoles	26
Objetivo	29
Metodología	30
Metodología General para las síntesis	30
Síntesis de Etil-5-amino-1-aril-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxilato (5)	30
Síntesis de 5-amino-1-aril-1 <i>H</i> -pirazol-4-carbonitrilos (7a-f)	31
Síntesis de 5-amino-1 <i>H</i> -1-arilpirazoles (9a-f)	31
Resultados y Discusión	32
Conclusiones	38
Capítulo 2: Modificaciones químicas en la posición 4 del anillo pirazol y purificación de un formulado comercial	40
Introducción	41
Objetivos	44
Metodología	44
Modificación química de –CN a –C(O)NH ₂ en la posición 4 del anillo de pirazol	44
Sulfinilación en la posición 4 del anillo pirazólico	45
Purificación del testigo comercial	47

Resultados	47
Modificación química de –CN a –C(O)NH ₂ en la posición 4 del anillo de pirazol	47
Sulfinilación en la posición 4 del anillo pirazólico	48
Purificación de CLAP®: obtención del i.a. Fipronil.	53
Conclusiones	53
Capítulo 3: Ensayos de actividad insecticida y fungicida en diferentes modelos biológicos	55
Introducción	56
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Familia Noctuidae)	58
<i>Tuta absoluta</i> (Familia Gelechiidae)	62
Objetivo	72
Metodología	72
Bioensayo con <i>S. frugiperda</i>	72
Bioensayo con <i>T. absoluta</i>	74
Bioensayo con hongos	75
Resultados y Discusión	76
Bioensayos con <i>S. frugiperda</i>	76
Bioensayos con el microlepidóptero <i>T. absoluta</i>	79
Bioensayos en hongos	83
Conclusiones	85
Capítulo 4: Conclusiones Generales	86
Bibliografía	89
Anexo	94

Abreviaturas y Símbolos

AChE	acetilcolinesterasa
AcOEt	Acetato de Etilo
CG	cromatografía gaseosa
DMSO	dimetilsulfóxido
EFC	enfermedades de fin de ciclo
ESI	ionización por electrospray
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
Eq	equivalente
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GABA	ácido gamma aminobutírico
Ha	hectárea
HRAC	Comité de resistencia de acción a herbicidas
Hz	herzios
i.a.	ingrediente activo
IRAC	Comité de acción de resistencia a insecticidas
MS	Espectrometría de masa
HRMS	Espectrometría de masa de alta resolución
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	partes por millón
PTS	ácido <i>p</i> -toluensulfónico
RMN	resonancia magnética nuclear
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
TEA	trietilamina
THF	tetrahidrofurano
<i>t</i> -BuOK	<i>ter</i> -butóxido de potasio
WSSA	Sociedad de ciencia de semillas de américa

Resumen

En el presente trabajo de tesis doctoral se sintetizan 4 series diferentes de 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles con el objetivo de buscar análogos al insecticida comercial Fipronil® para evaluar su posible actividad fitosanitaria en diferentes modelos biológicos.

Para la síntesis química se procedió a la obtención y caracterización de la familia de 5-amino-1-*H*-1-arilpirazoles-4-carbonitrilos, la cual posteriormente se modificó por hidrólisis ácida de la posición 4 del anillo pirazol a 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles-4-carboxamidas. Por otro lado se realizó la síntesis de 5-amino-1*H*-1-aril-4-sulfinilpirazoles previa síntesis de la serie 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles. Los productos de síntesis se aislaron y posteriormente caracterizaron utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masa, punto de fusión, cuantificados por cromatografía.

Asimismo se aisló el ingrediente activo (i.a.) Fipronil® del comercial CLAP 20% por sucesivas extracciones y cromatografía en columna para luego utilizarlo como testigo en los bioensayos de actividad insecticida y fungicida.

Los ensayos de actividad insecticida de pirazoles sintetizados y seleccionados, se realizaron en el lepidóptero *Spodoptera frugiperda* o gusano cogollero; y en el microlepidóptero *Tuta absoluta* o minador del tomate, encontrando actividad insecticida de interés por parte de dos de los compuestos sintetizados y seleccionados y ensayados frente a ambos modelos biológicos. Respecto la actividad fungicida en cepas de hongos fitopatógenos y una especie de hongo saprófito, se ensayaron todos los compuestos sintetizados y ninguno presentó actividad fungicida en los hongos ensayados.

Abstract

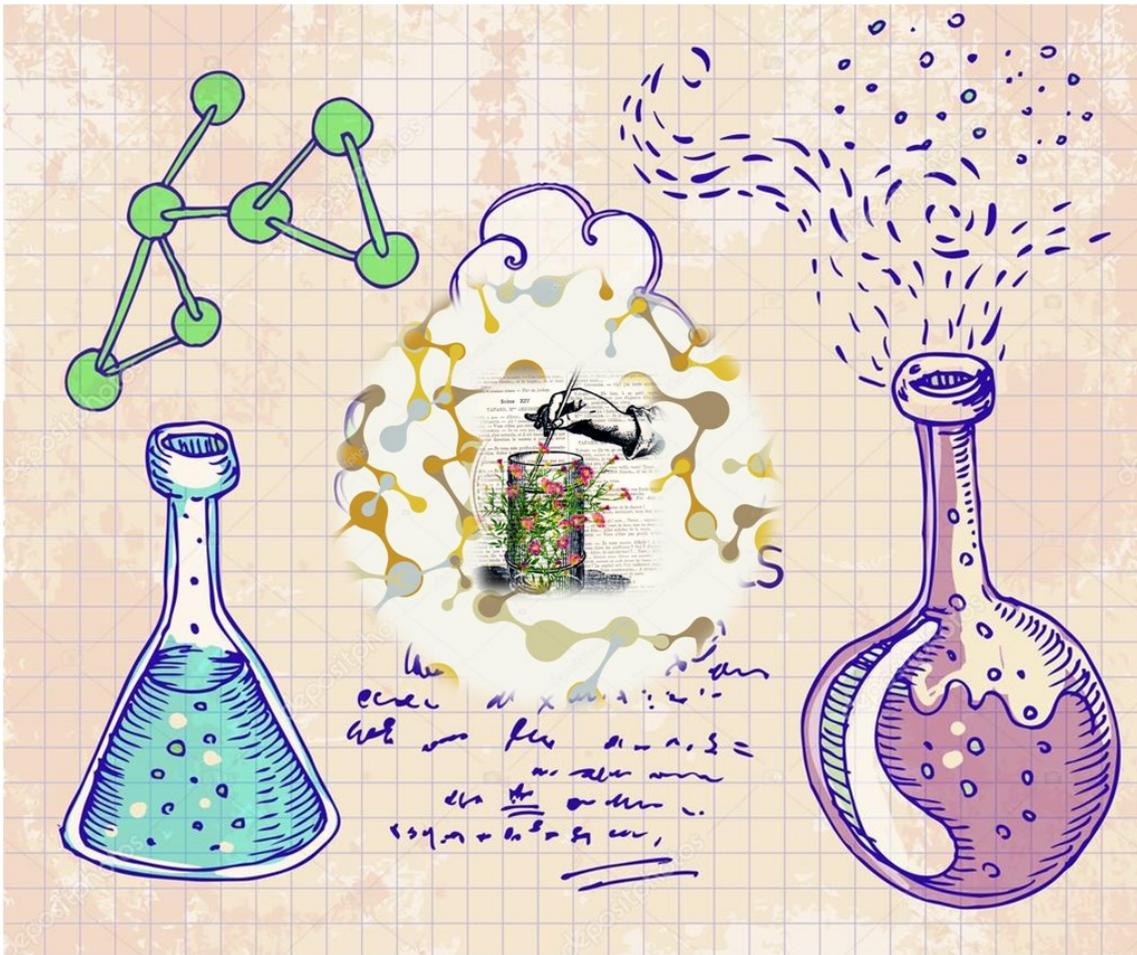
In the present thesis, 4 different series of 5-amino-1*H*-1-arylpyrazoles were synthesized in order to look for analogues of the commercial insecticide Fipronil® to evaluate its possible phytosanitary activity in different biological models.

For the chemical synthesis, the 5-amino-1-*H*-1-arylpyrazoles-4-carbonitriles family was obtained and characterized, which was subsequently modified by acid hydrolysis of the 4-position of the pyrazole ring to 5-amino-1*H*-1-acylpyrazoles-4-carboxamides. On the other hand the synthesis of 5-amino-1*H*-1-aryl-4-sulfinylpyrazoles is shown prior to synthesis of the 5-amino-1*H*-1-arylpyrazoles series. Synthesis products were isolated and subsequently characterized using nuclear magnetic resonance (NMR) techniques, mass spectrometry, melting point, quantified by gas chromatography.

The active ingredient (i.a.) Fipronil® from the CLAP commercial 20% was also isolated by successive extractions and column chromatography to be used as a control in bioactivity tests.

The insecticidal activity assays of the synthesized pyrazoles and selections, were carried out on the lepidóptera *Spodoptera frugiperda* or the crownworm; and in the tomato microlepidóptero *Tuta absoluta* or tomato miner, finding insecticidal activity of interest by two of the compounds synthesized and selected and tested against both biological models. Regarding the fungicidal activity in strains of phytopathogenic fungi and a species of saprophytic fungus, all the synthesized compounds were tested without showing fungicidal activity.

Introducción General



Introducción al concepto de Seguridad Alimentaria

En el presente capítulo se pretende introducir al lector en la temática desarrollada durante la tesis doctoral, desde la perspectiva de la sustentabilidad alimentaria y el aporte fitosanitario a partir de la síntesis química de compuestos alternativos.

El desarrollo del concepto de seguridad alimentaria comenzó a mediados de los años '70, cuando la Cumbre sobre la Alimentación en 1974 la definió desde el punto de vista del suministro de alimentos, estableciendo que se debe asegurar la disponibilidad de los alimentos básicos y la estabilidad nacional e internacional de sus precios[1]. En 1996 dicha cumbre extiende el concepto y define que “Existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana”. De esta manera, se abarca desde una perspectiva multidimensional incluyendo la disponibilidad, el acceso, la estabilidad del suministro y el uso de los alimentos[2].

Así, la definición plantea cuatro dimensiones primordiales sobre los alimentos: 1) disponibilidad física, 2) acceso económico y físico; 3) utilización y 4) estabilidad en el tiempo; ya que las condiciones climáticas adversas (la sequía, las inundaciones), la inestabilidad política (el descontento social), o los factores económicos (el desempleo, los aumentos de los precios de los alimentos) pueden incidir en la condición de seguridad alimentaria de las personas[2].

Se estima que la población mundial en 2050 será de alrededor de 9000 millones de personas, por lo cual, se necesitará elevar la producción de alimentos actual en, al menos, un 50 %. Esto, es un gran desafío dado que se considera que el cambio climático podría reducir el rendimiento de los cultivos en más de un 25 % y que el capital natural (suelo, biodiversidad, océanos, bosques, etc.) se está agotando a un ritmo sin precedentes. Por esto, si no se modifica la forma de producir los alimentos y gestionar los recursos naturales, se pone en riesgo la seguridad alimentaria.

Para evitarlo, se deberá trabajar con soluciones sustentables, adaptando los recursos, fomentar técnicas agrícolas acertadas en relación con el clima, recuperar tierras agrícolas degradadas, y mejorar los sistemas de almacenamiento y las cadenas de suministro para

reducir el desperdicio de alimentos. Por esto, actualmente se plantea una modalidad de agricultura sustentable, donde la actividad agropecuaria sea sostenible a largo plazo, promoviendo un equilibrio entre la productividad, la rentabilidad y el cuidado del ambiente[3]. Esto se logrará combinando elementos del conocimiento científico tradicional y moderno contemplando a su vez el marco socioeconómico común. La complementación del uso de insumos y variedades de cultivos convencionales con las nuevas tecnologías asegurará una producción agrícola más permisible y sustentable [4].

El desafío actual, donde se incluye nuestro aporte, se centra en la capacidad de innovación en busca de sustentabilidad a largo plazo, incorporando tecnologías a partir de recursos renovables, uso de agentes químicos específicos y menos tóxicos para el medio ambiente. Los intereses durante el desarrollo de la presente tesis se enfocan al uso de la síntesis química para el desarrollo de nuevos compuestos con actividad insecticida como herramienta a incorporar a futuro en el desarrollo de producciones más intensas, sostenibles a largo plazo y rentables.

El empleo de agentes químicos en la producción de alimentos incluye diversos pesticidas, ya sea de origen químico, biológico o naturales. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define a los plaguicidas como: "cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales"[5].

A nivel internacional existe una clasificación de plaguicidas de acuerdo a la toxicidad aguda según los criterios de la Organización mundial de la Salud (OMS), desarrollada en el marco del Programa Internacional sobre Seguridad de Químicos[1], tal como se observa a continuación en la tabla 1.

Tabla 1: Clasificación toxicológica y etiquetado de plaguicidas según la OMS.

Clase Toxicológica	Frase de Advertencia	DL ₅₀ de ratas (mg/kg peso vivo)	
		Oral	Dermal
Ia	Extremadamente peligroso	<5	<50
Ib	Altamente peligroso	5-50	50-200
II	Moderadamente peligroso	50-2000	200-2000
III	Ligeramente peligroso	>2000	>2000
IV	Productos que normalmente no presentan peligro en el uso	5000 o mayor	

Considerando estos antecedentes y dado el interés por buscar nuevas alternativas más inclusivas, es necesario describir la situación de los fitosanitarios y porqué se sigue sosteniendo y apoyando su uso a pesar de las dudas que también dejan al descubierto.

Uso de Fitosanitarios

Existen corrientes de pensamiento orientadas a la aplicación de la agroecología, considerando que aplicando estrategias agroecológicas incrementará la resiliencia ecológica de los sistemas agrícolas siendo esenciales pero no suficientes para alcanzar la sostenibilidad [6]. Dado que el mundo es cada vez más dependiente de agroecosistemas industriales, el paradigma actual puede representar la única ruta viable y sólida para incrementar la productividad, la sostenibilidad y la resiliencia de la producción agrícola. Un claro ejemplo es la situación de muchos campesinos y agricultores familiares que lidian con la variación climática, la pérdida del rendimiento de los cultivos, lo cual es de gran relevancia para el futuro de la seguridad alimentaria global [7].

El ser humano considero diferentes alternativas de subsistencia históricamente, las cuales evolucionan constantemente, la aplicación de plaguicidas con el objetivo de disminuir las pérdidas de los cultivos, se inició con principios activos naturales y luego se prosiguió con la búsqueda de compuestos de síntesis. A nivel global, la utilización de agroquímicos se incrementó notablemente a partir de la Segunda Guerra Mundial y se relaciona a los cambios instaurados en los modelos de producción y cultivo para duplicar la producción de alimentos agrícolas y minimizar los riesgos de pérdida por acciones de plagas.

En el balance de beneficios y perjuicios, los plaguicidas fueron mundialmente aceptados, porque incrementaron la productividad agrícola debido a la protección contra

enfermedades más frecuentes y recuperación de plantaciones. En los últimos años han tomado mayor relevancia aún, con la aparición en el mercado de semillas con modificaciones genéticas en cultivos como la soja, maíz, y algodón entre otros, que justamente requieren de fitosanitarios específicos para combatir plagas que amenacen o pongan en peligro el rendimiento de los cultivos.

Los productos fitosanitarios tienen diferente grado de selectividad sobre los organismos que se quieren destruir y también pueden afectar a otras especies, consideradas organismos no blancos, incluido el hombre. Es por eso que el producto fitosanitario ideal sería aquel que fuera altamente tóxico para la plaga a controlar y de muy baja toxicidad para los demás organismos no blanco (selectivo).

En la República Argentina, el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Seguridad Alimentaria) es el organismo de control que regula la clasificación y etiquetado de los productos fitosanitarios de acuerdo a los estudios toxicológicos presentados por los registrantes. Esta clasificación toma como referencia a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA).

En cuanto al mercado argentino específicamente, de acuerdo a lo reportado en el Informe del Mercado Fitosanitario de 2012, el principal segmento de ventas corresponde a los herbicidas, con un 64% de la facturación, donde el glifosato ocupa un lugar primordial. El segundo segmento en importancia por su facturación, es el de los insecticidas con un 16% del total del mercado, siendo el clorpirifós el principal activo. En tercer, cuarto y quinto lugar se encuentran los fungicidas curasemillas y acaricidas respectivamente. En cuanto a éstos, se observa una tendencia creciente en las ventas de los curasemillas (10% interanual); y una dependencia de las condiciones climáticas se ve asociada a la comercialización de fungicidas y acaricidas. No es un dato menor que el mercado argentino de plaguicidas culminó en 2012 con 2.381,16 millones de dólares de facturación de acuerdo a lo informado por el Ministerio de Agroindustria argentino.

Respecto la estructura química, los primeros plaguicidas se remitían a organoclorados, organofosforados y carbámicos; actualmente las estructuras químicas a las que pertenecen los agroquímicos son muy variadas. Los diversos plaguicidas aplicados tienen su base en las diferencias de las moléculas a modo estructural, entre los plaguicidas orgánicos utilizados encontramos diversos heterociclos en las estructuras de base. Habitualmente los insecticidas

se clasificaban por su estructura química (clorados, fosforados, etc.), los fungicidas en función de su movilidad en el vegetal (no sistémicos o de contacto, mesostémicos y sistémicos), y los herbicidas en función de su modo de acción (los que afectan la fotosíntesis, los que inhiben la producción de aminoácidos).

Actualmente se clasifican por el proceso metabólico en el que actúan; en insecticidas y acaricidas se utiliza la clasificación correspondiente al Comité de Acción de Resistencia a insecticida (IRAC), en fungicidas la de Comité de Resistencia de Acción Fungicida (FRAC) y en herbicidas la del Comité de Resistencia de Acción a Herbicidas (HRAC) y Sociedad de Ciencia de Semillas de América (WSSA). Los criterios de clasificación de plaguicidas de esta manera a nivel internacional, facilita la comprensión y permite vincular la actividad de los diferentes grupos de productos[8].

Por ejemplo, los compuestos heterociclos y derivados se encuentran en una variedad de insecticidas, como en el caso del grupo de inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), antagonistas y agonistas de canales de cloro modulado por ácido gamma aminobutírico (GABA), activadores de canales de cloro, moduladores de órganos cordotonaes, entre otros [8]. Dentro de los heterociclos encontramos los pirazoles como estructuras claves en el grupo de los antagonistas del GABA, que son justamente las estructuras que se involucran en el desarrollo de la tesis.

Pirazoles y sus aplicaciones

Los pirazoles, son heterociclos aromáticos de cinco miembros con dos átomos de nitrógeno adyacentes como se observa en la figura 1. Estos, forman parte de la base estructural frecuentemente encontrada en un número de pequeñas moléculas que poseen un amplio rango de interés por sus aplicaciones en las áreas de agroquímica, industria química y farmacéutica[9], [10].



Figura 1. Estructura del anillo pirazol

Los derivados pirazólicos, poseen un amplio rango de actividades biológicas incluyendo actividad antiinflamatorias, anticonvulsivos, anticáncer, antivirales y antifúngicos. Se ha reportado que los análogos fluorados de esta familia son capaces de inhibir selectivamente el factor inducible de hipoxia, la propilhidropoxilasa[8]. Ciertos derivados de pirazoles han sido descritos como antagonistas/agonistas del neurotransmisor GABA con selectividad hacia los insectos como el caso de fenilpirazoles; algunos exhiben actividad antifúngica, mientras que otros han sido reportados como potentes agentes antibacteriales[11].

Los pirazoles también son ampliamente utilizados en química supramolecular y de polímeros, en la industria alimentaria, colorantes cosméticos y estabilizantes UV; mientras que otros presentan propiedades de cristales líquidos. A diferencia de los amplios usos encontrados en la actividad humana, los derivados pirazólicos, raramente se encuentran en productos naturales, debido a la dificultad de formar enlaces N-N por los organismos vivos[12].

Durante la última década, se han reportado un gran número de publicaciones respecto a las propiedades físicoquímicas y aplicaciones tecnológicas de los pirazoles, entre los cuales podemos ejemplificar agentes de brillo óptico, estructuras de sistemas fotoinducidas de transferencia de electrones; fluoróforos como materiales fotocromáticos de estado sólido, como así también aplicaciones como ligandos en química de metales[10]; asimismo muchos surfactantes catiónicos y sus complejos con cobre derivan del anillo pirazólico [11].

Muchos pirazoles también son útiles como sintones, bases estructurales para muchos heterociclos actuando como binucleófilos. Por ejemplo, a partir de estos y mediante ciclo condensaciones se pueden obtener heterociclos nitrogenados bicíclicos, tales como pirazolopirimidinas, pirazolopiridinas,etc[10].

Por otro lado, los N-aril-5-aminopirazoles son una base estructural de referencia, usada para el diseño de moléculas capaces de actuar sobre distintos tipos de receptores o enzimas en los procesos de los seres vivos[11] como el caso de Fipronil, un arilpirazol ampliamente utilizado a nivel mundial como insecticida, conocido por su acción en los receptores GABA de los insectos afectando el sistema nervioso central.

Fipronil: un arilpirazol con actividad insecticida

Dentro de la familia de los Fiproles (arilpirazoles) se encuentra una amplia variedad como los ejemplificados en la figura 2, casualmente presentan la parte 1-aryl con la hidracina que corresponde a Fipronil, el producto comercial de referencia en este trabajo de tesis. Es importante mencionar que existen una gran variedad de arilpirazoles con diferentes grupos funcionales y potencial actividad, que en nuestra tesis justamente se varía la estructura del anillo aromático (entre otras) de los pirazoles respecto al comercial.

Otros fiproles de importancia comercial son: Ethiprole® (fig. 2) lanzado como insecticida por Bayer CropScience® en 2005 que ha mejorado la sistematicidad y control en plantas, con un control más amplio en plagas de succión, pero presenta mucho menos actividad en insectos lepidópteros. Pyriprole® ha sido recientemente introducido por Novartis Animal Health como un ectoparasiticida para pulgas y garrapatas en perros. Otros tres fenilpirazoles han sido desarrollados como insecticidas de cultivos como se observa en la fig. 2 a continuación.

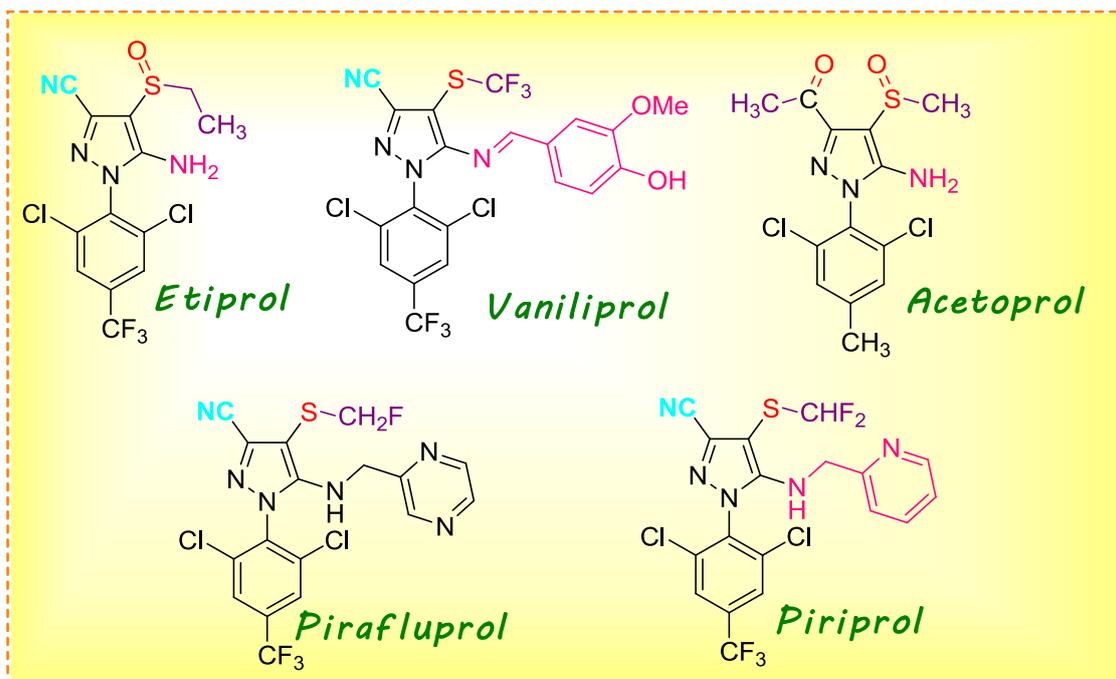


Figura 2. Fiproles con actividad biológica.

Específicamente Fipronil, como se observa en la figura 3, es un insecticida arilpirazólico de la familia de los Fiproles de amplio espectro que actúa por contacto e ingestión. Fue desarrollado por la compañía Rhône-Poulenc en 1985 y lanzado al mercado en 1993. Tras la fusión de Rhône-Poulenc con Hoechst en Aventis, el Fipronil pasó en 2002 a Bayer AG. Posteriormente Bayer vendió los derechos de Fipronil y otros fungicidas en 2003 a BASF[13].

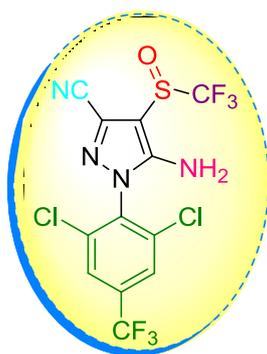


Figura 3. Estructura química de Fipronil

El nombre químico es 5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-(trifluorometilsulfinil)pirazol-3-carbonitrilo o bien 5-amino-1-(2,6-dicloro- α,α,α -trifluoro-p-tolil)-4-trifluorometilsulfinilpirazol-3-carbonitrilo. El número de registro o servicio de abstract químicos (CAS) es 120068-37-3. Su fórmula molecular es $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ y su peso molecular es 437.141g/mol. En cuanto a sus propiedades físicas y químicas, es un polvo blanco, muy poco soluble en agua, 1,9 mg/L (pH5); 2,4mg/L (pH9) a 20°C y estable al calentamiento, aire y condiciones ácidas. Es sensible a la fotodegradación y descomposición en condiciones básicas.

En cuanto a la *relación estructura-actividad* de la molécula de Fipronil, los derivados que poseen el grupo 2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil en la posición 1 del anillo, han demostrado la mejor actividad insecticida, mientras que los otros grupos no presentaron actividad comparable a este grupo, y por eso el mismo comenzó a denominarse “*Parnellophore*” o grupo aril mágico.; esto referencia su utilidad como sitio de unión de pro-druga[13].

Fipronil es uno de los insecticidas más eficiente aún en dosis bajas, es por ello que agricultores de más de 70 países lo aplican en más de 100 cultivos para diferentes plagas. Por ejemplo, insectos del orden *Ortóptera* (cucaracha, langosta), *Isóptera* (termitas) y *Díptera* (moscas) pueden controlarse utilizando dosis a campo de 1 g a 25 g de i.a./ha[13].

Insectos del orden *Coleóptera* (escarabajos y gorgojos), *Tisanóptera* (trips o arañuelas), *Hemíptera* (chinchas) y algunas familias dentro de *Lepidóptera* (polillas, larvas) muestran alta susceptibilidad a Fipronil y son controlados con 25-75 g i.a. /ha. *Homópteras* (áfidos y mosca blanca) y *Noctuidae* (dentro de *Lepidóptera*) muestran baja susceptibilidad a Fipronil requiriendo utilizar más de 200 g/ha; incluso se utiliza para el control de hormigas, pulgas, garrapatas y otros insectos[13] con los nombres comerciales que incluyen Frontline®, Combat®,

Regent®, MaxForce®, Chipco®, CLAP®, GelTek® entre otros. Asimismo se ha utilizado en el tratamiento de semillas para la protección de cultivos, como el ejemplo del comercial Goldor® Bait en la Unión Europea para el control de las polillas de la papa.

Respecto al *modo de acción*, Fipronil actúa bloqueando los canales de cloro del GABA_A (complejos de proteína transmembrana pentaméricos), lo que lo hacen responsable de la inhibición del sistema nervioso central. Esta disrupción de los receptores GABA_A lleva a un exceso de estimulación neuronal resultando en la muerte del insecto. Otras subunidades en los complejos GABA_A modifican las afinidades de unión de acuerdo a las especies; particularmente Fipronil, tiene mayor afinidad por los complejos de receptores de invertebrados en comparación con los complejos de receptores de vertebrados.

Fipronil y su metabolito sulfona[-SO(O)CF₃ o (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-(trifluorometilsulfonyl)pirazol-3-carbonitrilo)] son únicos en cuanto a tres sitios target de alta actividad, tres canales de ligando de cloro que median la mayor transmisión inhibitoria en el sistema nervioso del insecto: receptores GABA y dos subtipos de receptores GluCl_s. Ciertos niveles de inhibición están siempre presentes en el sistema nervioso central y esta disrupción lleva a la hiperexcitación y convulsiones, por eso los bloqueadores de canales de cloro GABA se refieren como convulsivos. Tan pronto se desarrolló Fipronil, se determinó su modo de acción como antagonista no competitivo (NCA) dado que se observó que junto a otros insecticidas arilpirazólicos causaban síntomas en mosca doméstica y ratones, similares a los causados por otros antagonistas del GABA como el insecticida Dieldrin [12].

Es de amplio conocimiento que, conforme se incorporen plaguicidas, dado que las plagas en sí adquieren mecanismos de resistencia para convivir en el ambiente con los productos químicos para combatirlas. Se exige constantemente el desarrollo de productos más efectivos a razón de la evolución de las plagas y se relaciona directamente con el fenómeno de resistencia de éstas.

Resistencia a Plaguicidas

La *resistencia* es un proceso evolutivo básico que involucra a todos los seres vivos sin excepción y puede definirse como la habilidad de una población de tolerar cierta dosis de un tóxico, la que para el resto de la especie o población normal sería letal. Es un fenómeno

preadaptativo que surge como consecuencia de la presión de selección con el tóxico, es una característica codificada genéticamente y es heredable [14], [15].

Considerando algunos conceptos, se establece a la *tolerancia* como un fenómeno natural de la especie y refiere a las diferencias de susceptibilidad a un determinado tóxico entre diferentes especies. La *resistencia cruzada* se manifiesta cuando una población es resistente a diferentes familias de insecticidas a través del mismo mecanismo, mientras que la *resistencia múltiple* lo hace cuando es inafectado por diferentes familias de insecticidas con diversos modos de acción y entre las diferentes clases de agroquímicos. Los insectos y otros organismos han desarrollado elevados niveles de resistencia al ser expuestos a masivas y periódicas aplicaciones de plaguicidas modernos, como clorados, organofosforados, carbonatos y piretroides. Plagas que inicialmente fueron susceptibles a dosis bajas de un producto, luego de sucesivas aplicaciones, requirieron dosis cada vez mayores y eventualmente terminaron por no ser afectadas [15].

Los genotipos menos susceptibles a la aplicación de insecticidas, dan origen a la población inicial de especies resistentes. En una población normal, sin tratamientos con insecticidas, los genes de resistencia están presentes en baja frecuencia. El uso prolongado de insecticidas conduce a la selección de insectos resistentes por la pérdida de susceptibilidad en la población. Una vez establecida la resistencia, solo pueden utilizarse insecticidas alternativos. Asimismo, la introducción secuencial de compuestos similares puede conducir a una amplia distribución de resistencia cruzada y a la rápida eliminación de posibles pesticidas alternativos. La resistencia generalmente se manifiesta en las plagas claves del cultivo, por ser las que más insecticidas reciben; sin embargo, las plagas secundarias también pueden desarrollarla tornándose en plagas claves complicando su control [15].

Los mecanismos de resistencia se clasifican en tres tipos: comportamiento, morfología y fisiología. En cuanto a la *Resistencia por Comportamiento*: es cuando los insectos no entran en contacto con el insecticida debido a un comportamiento de escape; pueden ser hábitos de preferencia a descansar en áreas no tratadas, o bien la detección del insecticida y la tendencia a evitarlo; como también el esconderse en lugares tales como los puntos de crecimiento terminales de la planta, las cuales son difíciles de penetrar para los insecticidas. La *Resistencia Morfológica*, ocurre cuando alguna característica morfológica de los insectos ocasiona la resistencia, por ejemplo una menor superficie de exposición al tóxico o impermeabilidad en la cutícula lo que disminuye la afeción [13], [14].

La *Resistencia Fisiológica* sucede por adición de un mecanismo de protección o bien por insensibilidad en el sitio de acción. Estos se agrupan en mecanismos de resistencia metabólica y no metabólica. Se consideran mecanismos metabólicos cuando involucran modificaciones enzimáticas y no metabólicas cuando involucran cambios de sensibilidad en el sitio activo, en la tasa de penetración, almacenamiento o excreción, así como en el comportamiento o la forma de los insectos [13].

Además de la resistencia propia de los insectos, existe el problema de que en general la aplicación de un biocida suele presentar baja eficiencia, ya que de lo aplicado sobre una planta sólo el 30% permanece en el follaje, el resto se pierde en los procesos de degradación, retención en el suelo y deriva de la zona de cultivo. Por otro lado, del porcentaje aplicado en el follaje, la absorción de las plantas puede representarse sólo del 10 al 1%. La absorción en general depende del tamaño y cobertura vegetal, formulación, propiedades químicas y aditivos de los formulados agroquímicos, eficiencia de los equipos de aplicación, y materiales remanentes de aplicaciones anteriores en la superficie de las hojas [16], [17].

La baja eficiencia, provocó el uso masivo de insecticidas lo que ha ocasionado efectos perjudiciales sobre el agrosistema tales como: adquisición de resistencia, resurgimiento de plagas secundarias y contaminación del ambiente. A pesar de estos problemas, en la producción moderna de alimentos no se considera prescindir del control químico, sino de realizarlo racionalmente para disminuir los efectos nocivos y la aparición de resistencia.

Considerando estas problemáticas de absorción, resistencia, toxicidad de los compuestos utilizados, entre otras, es que en el desarrollo de la tesis doctoral se pretende seleccionar derivados de arilpirazoles, sintetizados en el laboratorio. Se busca evaluar su posible actividad en modelos biológicos seleccionados que hoy presentan resistencia a los plaguicidas utilizados para combatirlos. Se trabajó con la oruga militar *Spodoptera frugiperda*, que afecta los cultivos agrícolas principalmente; y con hongos fitopatógenos seleccionados. Por otro lado, se realizaron pruebas con el minador del tomate o microlepidóptero *Tuta absoluta*, también presente en otras hortalizas y verduras que pone en peligro la calidad de la producción.

Objetivos



Objetivo general

- ◆ Diseñar y sintetizar una librería de derivados 1-arylpirazólicos conservando el grupo amino (-NH₂) en posición 5 del anillo y orientando la similitud estructural al líder comercial de referencia al *Fipronil*[®] (fig.4).

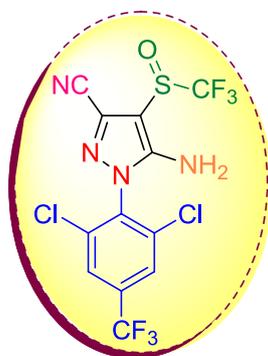
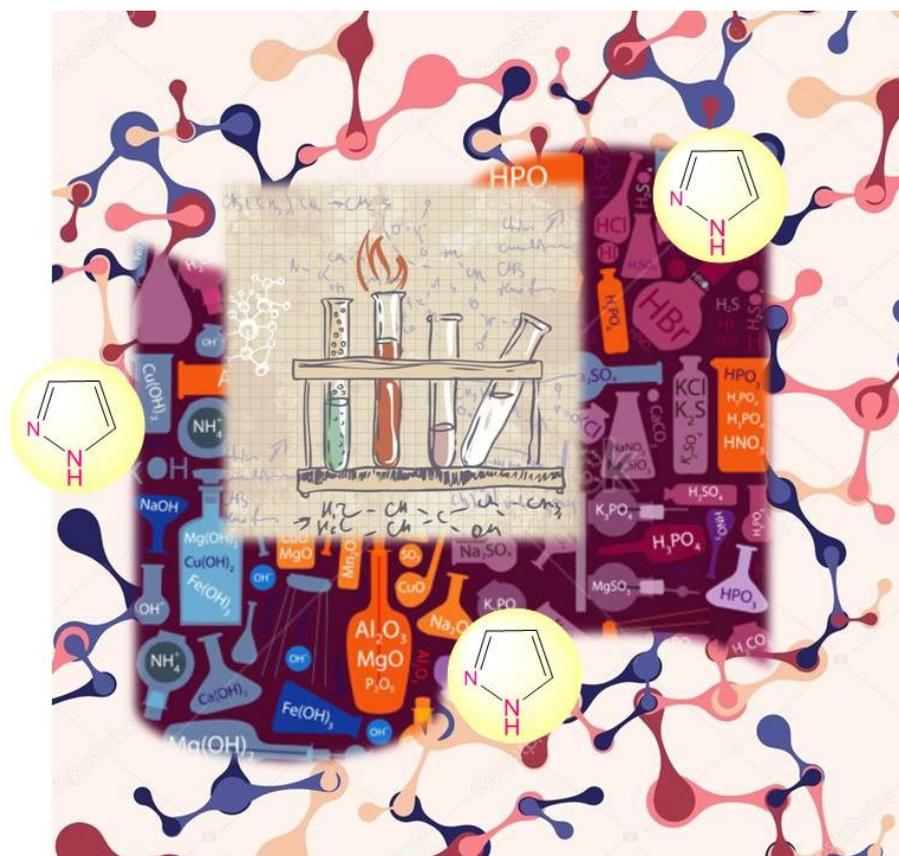


Figura 4. Fipronil.

Objetivos Específicos

- ✚ Sintetizar diversos derivados 1-arylpirazólicos para obtener las series: etil-5-amino-1*H*-1-arylpirazoles-3-carboxilato (serie **5a-f**); 5-amino-1*H*-1-arylpirazoles-4-carbonitrilo (serie **7a-f**); 5-amino-1*H*-1-arylpirazoles (serie **9a-f**).
- ✚ Modificar estructuralmente los derivados pirazólicos selectivamente; específicamente modificar el grupo nitrilo (-CN) de la posición 4 del anillo al grupo amida [-C(O)NH₂]
- ✚ Sustituir de la posición 4 del anillo de los derivados mencionados por el grupo sulfinilo [-S(O)CF₃]
- ✚ Determinar la actividad biológica de 5-amino-1*H*-1-arylpirazoles seleccionados desde las series sintetizadas, en modelos biológicos relacionados al ámbito agropecuario/agroalimentario.

Capítulo 1: Síntesis de 5-amino-1H-1-arylpirazoles



Introducción: Síntesis de 5-amino-1H-1-arilpirazoles

La síntesis y aplicación de aril y alquil pirazoles ha sido ampliamente estudiada en los últimos años [18], [19], [20] dado que su síntesis es accesible y muestran diversas propiedades[10], [21],[22],[23],[24]. La unidad 1-alquil y/o 1-aril, han sido patentados y reportados en estudios para el tratamiento de infecciones antibacterianas, enfermedades inflamatorias, y cáncer[25],[26].

Los compuestos heterocíclicos conteniendo nitrógeno en su estructura, juegan un rol clave en la industria de plaguicidas moderna; se ha reportado que más del 85% de los pesticidas con alta actividad y baja toxicidad contienen este tipo de subunidad estructural [27]. Los pirazoles son un prototipo importante de ello, ya que son muy útiles como sintones y unidades estructurales básicas para muchos compuestos biológicamente activos como por ejemplo, precursores de herbicidas, insecticidas y fungicidas en protección de cultivos y agentes de control de plagas[12],[28], [29].

Se pueden encontrar ejemplos de 1- arilpirazoles en la industria de plaguicidas en el caso de los herbicidas pyraflufen-ethyl® (Idametsu), Nipyraclofen® (Bayer CropScience), y JV485® (Monsanto), como así también en Tebufenpyrad®, un acaricida, y Etiprole®, para insectos lepidópteros[30], [31] los cuales pueden observarse a continuación en la figura6. Los ensayos de 1-arilpirazoles como insecticidas comenzaron en los años '80 y condujo al desarrollo del comercial Regent® (BASF) un insecticida basado en Fipronil, que fue el primero de esta clase en introducirse en el mercado y es actualmente ampliamente utilizado [8],[32],[33],[34].

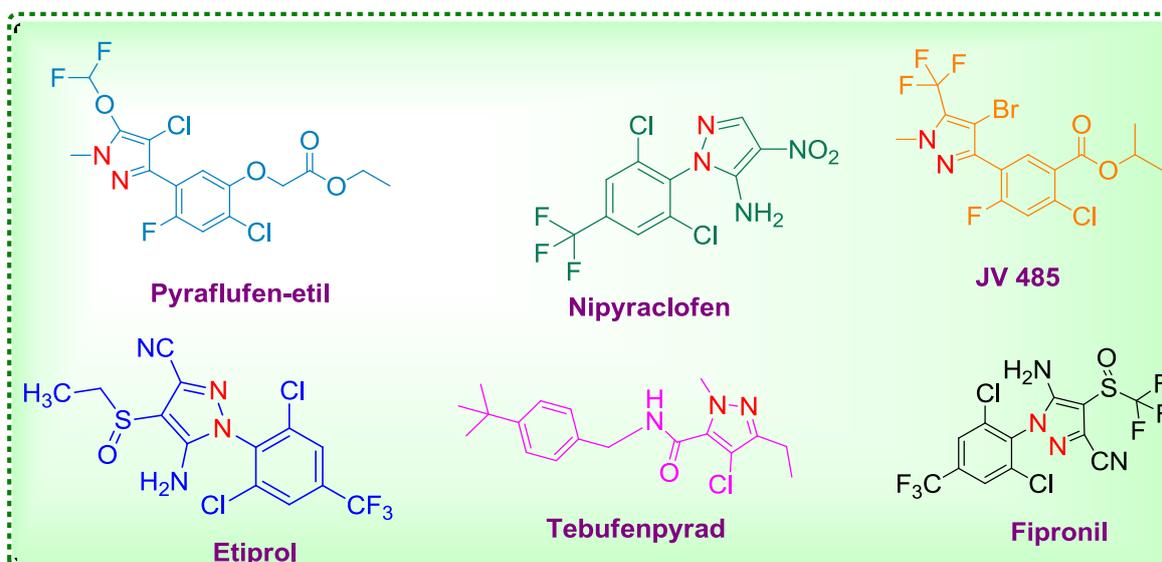
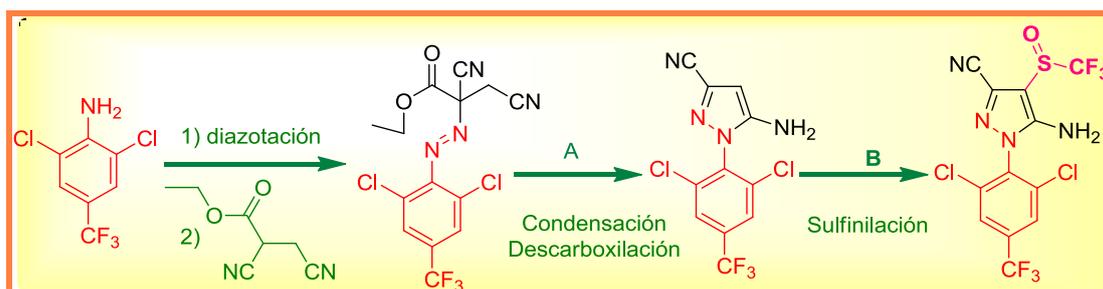


Figura 6. Ejemplos de 5-aminopirazoles comercializados.

Fipronil es altamente eficaz y ha comenzado a implementarse en programas de control de insectos; como son los sistemas con cebos en agricultura, huertas y cultivos de frutas; pudiendo ser aplicado en planta, en suelo o en semillas. Al poseer baja toxicidad para mamíferos, es uno de los agentes químicos más usados para el control de plagas urbanas como así también está difundido para su uso en hogares en cuidado de animales domésticos, y en aplicaciones veterinarias (soluciones pour-on, Ectoline® y también soluciones spot-on, Frontline®) [35].

La alta eficacia del Fipronil y otros derivados 5-aminopirazólicos (fig. 6) ha promovido muchas investigaciones con el objetivo de desarrollar rutas sintéticas más sencillas y sustentables ya que estos derivados suelen ser pensados como precursores de otras estructuras con potenciales bioactividades. Por esto, muchos métodos sintéticos se han descrito y desarrollado, siendo los más utilizados los que involucran reacciones de condensación entre β -cetonitrilos, malononitrilos, alquilidenmalononitrilos y sus derivados, con las correspondientes arilhidracinas [10],[36].

A modo ilustrativo, la síntesis del Fipronil (esq. 1) es llevada a cabo por inserción de una sal de diazonio al compuesto diciano carbonilo, seguida de una condensación intramolecular y descarboxilación que llevan a la generación del anillo pirazólico correspondiente (paso A). La etapa final de la síntesis de este derivado es la sulfinilación en la posición 4 del anillo (paso B) donde el grupo 4-trifluorometilsulfinil puede ser introducido directamente por cloruro de trifluorometilsulfinil (Ver esq. 1)



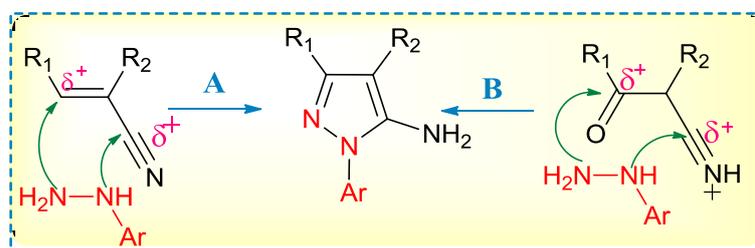
Esquema 1. Síntesis de Fipronil.

Justamente la desventaja que presenta la obtención de Fipronil desde esta metodología, es que por un lado la diazotación es un proceso muy drástico, ya que las sales de diazonio se forman a partir de aminas aromáticas primarias, anilinas en este caso, en presencia de un ácido mineral como el HCl. Las mismas son inestables a temperaturas mayores a 5°C por

lo que se utiliza un baño de hielo en la síntesis y deben utilizarse "in situ", ya que no se aíslan, son sensibles a la luz y descomponen a la UV [37].

Sumado a lo expuesto anteriormente y no menor, se debe considerar que el intermediario 2 (ver esq. 1) no es comercial y su síntesis es compleja, y en el último paso, el cloruro de trifluorometilo utilizado para la obtención del producto final, es muy tóxico y difícil de preparar, no es un reactivo a manipular en forma tradicional ya que es un sustrato gaseoso, altamente volátil y poco estable, resultando peligroso para las personas que los manipulen o se encuentren en contacto indirecto [37].

Por ello, a diferencia de la síntesis de Fipronil, usualmente los derivados 1-aryl-5-aminopirazólicos son preparados por condensación de arilhidracinas, que actúan como doble nucleófilo, con unidades 1,3-dielectrofilicas [22]. Estas aproximaciones implican la construcción de dos enlaces carbono-nitrógeno, a través de una adición 1,4 (vía A) o ataque nucleofílico al carbonilo (vía B) por parte del nitrógeno más nucleofílico de la hidracina y posterior reacción del nitrógeno restante con el carbono del grupo ciano como se observa en el esquema 2.



Esquema 2. Vías de síntesis de 5-amino-1H-1-arylpirazoles.

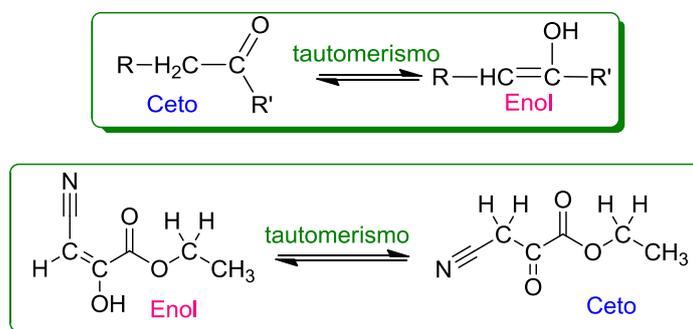
Por muchos años, los N-arylpirazoles eran sintetizados por condensación de arilhidracinas con 1,3-dicetonas; cuando dichas dicetonas son asimétricas, generalmente dan como resultado una mezcla de dos regioisómeros en una relación que depende tanto de la naturaleza electrónica como estérica de las 1,3 dicetonas, a su vez las características del disolvente y el pH del medio de reacción son factores a considerar[38]. Los precursores dicarbonilos, pueden ser generados a partir de la reacción de enolatos con derivados de acilos.

En nuestro caso, se propuso la obtención de 5-amino-1H-1-arylpirazoles por diferentes vías para obtener análogos a Fipronil que es el objetivo central, la alternativa propuesta es a partir

de 1,3 dielectrófilos con arilhidracinas. En la mayoría de los casos es necesario que los dielectrófilos posean un grupo CN y un carbonilo para que reaccionen regioselectivamente a partir de la condensación con arilhidracina. Se puede partir de reactivos comerciales o bien sintetizar el reactivo para luego hacer reaccionar con la arilhidracina.

En muchos casos para la obtención del dielectrófilo que reaccione se parte de un enolato para que sea más selectiva la síntesis del pirazol; aliviando el problema del uso de ésteres y siendo selectiva en presencia de electrófilos débiles como nitrilos. Particularmente en nuestro caso requerimos de la formación del enolato para posteriormente condensar con la arilhidracina y obtener el producto deseado, por ello nos detenemos en la formación del enolato ya que en una de las síntesis de pirazol, nuestro reactivo es la sal del enolato que “*in situ*” se protona y se transforma a β-cetonitrilo para reaccionar con la arilhidracina correspondiente.

Los enoles se relacionan a aldehídos o a cetonas por el equilibrio de transferencia de protones conocido como *tautomerismo* [39] *ceto-enol*¹ tal como se muestra en el Esquema 3 a continuación.



Esquema 3. Tautomerismo ceto-enólico.

Objetivo

Sintetizar tres series de 5-amino-1-*H*-1-arilpirazoles análogos a Fipronil, por diferentes vías y caracterizar los productos obtenidos.

¹Tautomerismo refiere a la interconversión entre dos estructuras que difieren por el reemplazo de un átomo o grupo

Metodología

Metodología General para las síntesis

Los disolventes utilizados fueron de grado analítico y fueron purificados para cada caso de acuerdo a métodos estandarizados. La pureza y estructura química de los compuestos sintetizados fue demostrada por cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía gaseosa (CG), cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masa (UPLC-MS), espectrometría de masa de alta resolución (HRMS) (en el caso de compuestos desconocidos), espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), punto de fusión (P.F).

Las TLC fueron realizadas en placas de sílicagel 60 (F₂₅₄) de Merck. Los análisis de cromatografía gaseosa se realizaron en un CG DANI Master equipado con una columna de 5% difenil y 95% polisiloxanos (30 m x 0.53 mm, 0.5 µm espesor) y detector de ionización de llama (FID). La columna cromatográfica se realizó con silicagel (malla 70-230 ASTM) grado alta pureza, tamaño 60 Å. Los compuestos aislados y caracterizados fueron utilizados como estándares internos para realizar análisis cuantitativos de CG. Los análisis de UPLC-MS fueron realizados con un detector H-CLASS SQD2 (Waters). Los análisis de HRMS se realizaron en un espectrómetro Bruker MicrOTof-II equipado con ionización por electrospray (ESI).

Los experimentos de ¹H NMR (300Mhz), ¹³C NMR (75Mhz), ¹⁹F NMR (300 Mhz), COSY (correlación espectroscópica), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence/ correlación espectroscópica heteronuclear cuántica simple); HMBC (heteronuclear multiple bond correlationspectroscopy/correlación espectroscópica heteronuclear de múltiple enlaces) se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance 300 usando TMS como estándar interno y los disolventes calidad deuterado para cada muestra. Las constantes de acoplamiento están dadas en Hz y los corrimientos químicos en valores δ en ppm. Los datos se registraron como: chemicalshift (corrimiento químico), multiplicity/multiplicidad (s = singlet, s br = broadsinglet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet) constantes de acoplamiento (Hz) e integración. Los puntos de fusión (Mp) se registraron en un fusiómetro Büchi b-540 micro previamente calibrados y corregidos (*Ver en ANEXO: caracterización de los compuestos sintetizados*).

Síntesis de Etil-5-amino-1-aryl-1H-pirazol-3-carboxilato (5)

Oxalato de dietilo (4,30 g, 4ml, 0,029mol) fue adicionado a una solución de 18-Crown-6 (0,63g; 0,0024 mol) y *ter*-butóxido de potasio (t-BuOK) (3,25g; 0,029mol) en THF anhidro (27

ml) a 0°C. La mezcla fue calentada a 60°C mientras el acetonitrilo (ACN) (1,19g; 1,51ml; 0,029 mol) se adiciona gota a gota. Luego la reacción se mantiene a 60°C por 30 minutos. Después de enfriar la reacción, el sólido se lava y filtra con éter dietílico para obtener el etilcianopiruvato de potasio (**3**) como se observa en el esquema 4 de resultados [40], [41].

Esta obtención del intermediario **3** es esencial para continuar con la condensación de las arilhidracinas comerciales (**4a-f**; ver figura 7)[fenil hidracina**4a**, 4-fluorofenilhidracina **4b**, (perfluorofenil)hidracina **4c**, 4-(trifluorometil)fenilhidracina**4d**, [2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil] hidracina **4e** y clorhidrato de 4-metoxifenilhidracina **4f**]; para la obtención de etil-5-amino-1-*H*-pirazol-3-carboxilato (**5a-f**), tal como se observa en el esquema 5 en el apartado siguiente.

*Síntesis de 5-amino-1-*H*-pirazol-4-carbonitrilos (7a-f)*

El equipo de reacción Schlenk utilizado, se secó previamente en atmósfera de nitrógeno con vacío. A una solución de 1.2mmol de arilhidracina (**4a-f**) en 2 ml de etanol absoluto con agitación, se le adiciona etoximetilmalononitrilo 1.0mmol (**6**). La mezcla de reacción fue refluja por 4 h excepto para **7a** (0,5h); finalizada la reacción de síntesis, el crudo se diluye con AcOEt (50ml) y lava con H₂O (30 ml). La fase orgánica es secada sobre Na₂SO₄, filtrada y el disolvente orgánico evaporado bajo presión. El crudo de reacción es purificado por columna cromatográfica de absorción de silicagel con un gradiente hexano/acetato de etilo como eluyente.

Se realiza el procedimiento descrito, excepto en el caso de clorhidratos de arilhidracinas, **2b** y **2f**, requiere un paso previo de neutralización con Et₃N (1,0 mmol) a 0°C en etanol y se prosiguió con la metodología detallada anteriormente [46], [47].

*Síntesis de 5-amino-1-*H*-arilpirazoles (9a-f)*

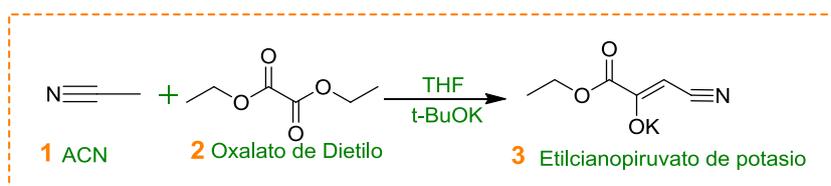
Como se observa en el esquema 7a partir de las arilhidracinas correspondientes (**4 a-f**) y etil-2-ciano-3-etoxiacrilato (**8**) en etanol a reflujo con la misma forma de reacción que se menciona anteriormente (atmosfera inerte, en Schlenk) se obtiene 5-amino-1-*H*-arilpirazol [42], [43]cuyos productos **9 a-f**; que justamente coincide con el sustrato que se sulfonará en el próximo capítulo se observan en la figura 11. Estos productos de síntesis se purifican por cromatografía en silicagel con Hexano/AcOEt.

Se realiza el procedimiento descrito, excepto en el caso de clorhidratos de arilhidracinas, **2b** y **2f**, requiere un paso previo de neutralización con Et₃N (1,0 mmol) a 0°C en etanol y se prosiguió con la metodología detallada anteriormente [46],[47].

Resultados y Discusión

En primera instancia se planteó como primera aproximación a análogos a Fipronil, la síntesis del 5-amino-1H-1-arylpirazol-3-carboxilato[40], [44] a partir de arilhidracina y de un 1,3-dielectrófilo previamente formado. Partiendo de este pirazol formado, posteriormente el grupo carboxilato en posición 3 del anillo pirazólico se modificaría a nitrilo, éste a amida y luego a sulfinilo para lograr un análogo con la posición del sulfinilo en 3 del anillo pirazólico, a diferencia de fipronil que posee ese grupo en posición 4 del anillo pirazólico.

La formación del 1,3-dielectrófilo sucede por sustitución nucleofílica, hay un ataque del anión del acetonitrilo al éster oxalato de dietilo en tetrahidrofurano (THF) anhidro (esquema 4).



Esquema 4. Formación de Etilcianopiruvato de potasio (3).

Posteriormente para la obtención de etil-5-amino-1-aryl-1H-pirazol-3-carboxilato (**5a-f**), se plantea la síntesis mediante la condensación de las arilhidracinas comerciales (**4a-f**) y el etilcianopiruvato de potasio (**3**) tal como se observa en el esquema 5.



Esquema 5. Síntesis de etil-5-amino-1-aryl-1H-pirazol-3-carboxilato (5a-f).

Respecto a la formación del etilcianopiruvato de potasio, se intentó la síntesis y excepto una oportunidad, se intentó reproducir la misma reacción y no se pudo obtener el enolato de partida. Se intentaron modificaciones en las condiciones de reacción: 1) cambio de temperaturas 2) orden de agregado de reactivos, 3) trabajar en la condición óptima de cada

sustrato, y 4) considerar si el grado de pureza de disolventes influía (ejemplo: calidad analítica o calidad masa) tal como se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Optimización de síntesis del etilcianopiruvato de potasio (3).

Entrada	1 <i>t</i> - BuOK	2 OD	3 ACN	Orden Adición	T °C	t	Rendimiento ^b
1 ^a	L1	L1	p.a.	2-1-3	60	30'	50
2 ^a	L1	L1	p.a.	2-1-3	60	30'	0
3 ^a	L1	L1	p.a.	2-1-3	60	30'	0
4	L1	L1	p.a.	2-1	60	60'	0
5	L1	L1	p.a.	2-3-1	60	60'	40
6	L1	L1	p.a.	3-2-1	60	60'	50
7	L1	L1	p.a.	3-2-1	60	30'	40
8	L1	L2	p.a.	3-2-1	25	2h	40
9	L1	L2	c.m.	3-2-1	25	2h	35
10	L2	L2	c.m.	3-2-1	25	2h	40
11	L2	L2	c.m.	3-2-1	25	2h	30
12	L2	L2	c.m.	3-1-2	25	2h	0
13	L2	L2	c.m.	3-1-2	60	30'	50
14	L1	L1	p.a.	3-1-2	60	60'	100
15	L2	L2	c.m.	1-3-2	0-25	4h	0
16	L2	L2	c.m.	1-3-2	0-25	16h	20
17	L2	L2	c.m.	1-(3-2)	0-25	2h	20
18	L2	L2	c.m.	1-(3-2)	0-25	4h	20
19	L2	L2	c.m.	1-(3-2)	0-25	5h	20
20	L2	L2	c.m.	1-(3-2)	0-25	24h	20

THF anhidro excepto: Entrada 1-8: calidad p.a.;

a: Síntesis con el agregado de 18-Crown-6 (0.000297mmol); **b:** Rendimientodeterminada en % por análisis de resonancia magnética nuclear . **L1:**Lote 1; **L2:** Lote; **OD:** Oxalato de dietilo; ACN calidad MS excepto: Entrada 1-8 y 14: calidad p.a.

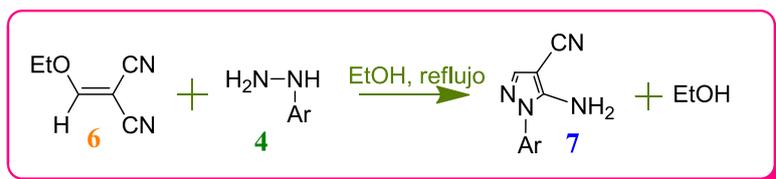
Se empleó 0.0036 mmol OD; 0.0036 mmolt-BuOK y 0.0036 mmol ACN en la reacción de formación de etilcianopiruvato de potasio.

Con estas experiencias se pudo verificar que la presencia de Crown-Eter no prosperó el rendimiento de la síntesis ni la formación del producto de interés (Tabla 2: entrada 1-3^a), tal como algunas referencias bibliográficas prescindían de su uso [26]. Se comprobó que los diferentes lotes de *t*-BuOK y Oxalato de Dietilo no mostraban diferencias en el resultado final de la síntesis; como así también que trabajando a temperatura ambiente no había diferencias. Se comprobó que incorporando el ACN al THF y posteriormente *t*-BuOK y Oxalato de Dietilo

(Tabla 2: entrada 6-11) era el orden más adecuado, ya que se obtuvo un rendimiento bueno y el producto de interés de la síntesis. En la entrada 14 se puede observar que se obtuvo el producto de interés, pero en ningún otro caso se pudo reproducir. Modificando el orden de agregado en ACN y oxalato de dietilo al THF con *t*-BuOK, incrementando los tiempos de reacción, no mejoró sustancialmente el rendimiento (Tabla 2: entrada 15-16) incorporando oxalato de dietilo y ACN juntos, incrementando el tiempo de reacción, tampoco mejoró la síntesis propuesta (Tabla 2: entrada 17-20).

Sin encontrar las causas de esta dificultad en obtener el producto de la síntesis planteada, motivó a buscar una alternativa y se propuso la síntesis de pirazoles por una vía a partir de un dielectrófilo comercial y arilhidracinas correspondientes para obtener análogos a fipronil y mediante modificaciones de grupos funcionales, que se detallan en el próximo capítulo, lograr un análogo al comercial de referencia.

Es conocido que el etoximetilmalononitrilo puede, junto a hidracinas, dar lugar a la formación selectiva de 5-aminopirazoles [40] [45] [46] [47]. Las adiciones de arilhidracinas fluoradas o no (**4a-f**) a etoximetilmalononitrilo (**6**) en disolvente a reflujo resultaron en el producto de ciclación 5-amino-1-*Ar*-1*H*-pirazol-4-carbonitrilo (**7a-f**) como único producto de la síntesis (esquema 6) en un paso de reacción con alta regioselectividad por una adición de tipo Michael [48].



*Esquema 6. Síntesis de 5-amino-1-*Ar*-1*H*-pirazol-4-carbonitrilo.*

Las arilhidracinas utilizadas son las que se observan en la siguiente figura 7.

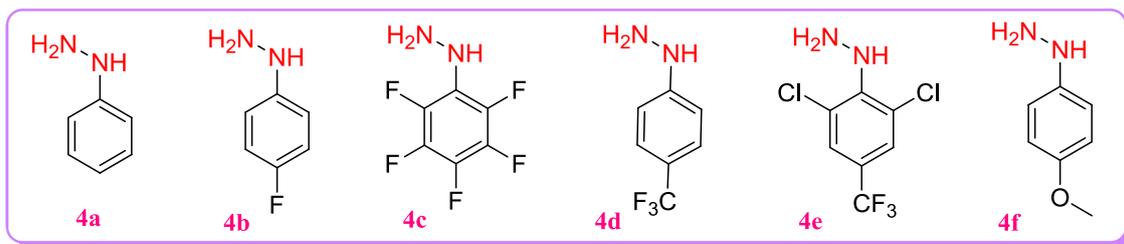


Figura 7. Arilhidracinas utilizadas para las síntesis.

En primera instancia para esta nueva serie de 5-amino-1*H*-1arilpirazoles se evaluaron distintos disolventes como el trifluoroetanol, etanol, metanol y tetrahidrofurano (TFE; EtOH; MeOH; THF) para evaluar en cual disolvente se lograba un mayor rendimiento y era el más apropiado. En este estudio se utilizó la fenilhidracina o sustrato **4** junto a etoximetilmalononitrilo (**6**), a continuación en la tabla 3 se observan los resultados obtenidos.

*Tabla 3. Evaluación de la influencia del disolvente en la síntesis de 5-amino-1*H*-1arilpirazol-4-carbonitrilo.*

Entrada	Disolventes ^a	Tiempo (h)	Producto	Rendimiento ^b (%)
1	TFE	0.5	7a	100
2	EtOH	0.5	7a	93(84) ^c
3	THF	0.5	7a	33
4	MeOH	0.5	7a	60

a. TFE: Trifluoroetanol; EtOH: Etanol; THF: Tetrahidrofurano; MeOH: Metanol.
 b. Rendimientos determinados por GC (método de estándar interno).
 c. Rendimiento aislados.

Los mayores rendimientos de 5-amino-1*H*-1-fenilpirazol-4-carbonitrilo, se obtuvieron con disolventes polares próticos como el TFE (100%) y el MeOH (60%) como disolventes (tabla 3, entrada 1 y 4), además del EtOH (93%) (tabla 3, entrada 2). Cuando se ensayó un disolvente polar aprótico como el THF el rendimiento de la reacción decae notablemente (tabla 3, entrada 3). Por esto, se eligió al TFE como disolventes para llevar a cabo la síntesis de los diferentes pirazoles utilizando las distintas arilhidracinas sustituidas. Lo que se observó, es que a diferencia de la fenilhidracina, las arilhidracinas sustituidas (**4 b-f**) reaccionaron lentamente bajo las mismas condiciones de reacción dando moderados a bajos rendimientos de los productos deseados (entradas 2-5, tabla 4).

Tabla 4. Rendimientos de diferentes arilhidracinas para la síntesis de pirazol.

Entrada	Tiempo (h)	Producto	Rendimiento ^a (%)
1	0,5	7a	100 ^b
2	4	7b	30(29) ^b
3	4	7c	20
4	4	7d	30(28) ^b
5	4	7f	43(46) ^b

a. Cuantificados por GC (método de estándar interno). b. Rendimientos aislados.

Los bajos a moderados rendimientos obtenidos en TFE en la síntesis de diferentes arilpirazoles determinaron la decisión de continuar la síntesis con EtOH como disolvente, ya que permitió obtener rendimientos de buenos a excelentes. Por otro lado, esta elección se fundamentó considerando que EtOH es más económico que TFE, está disponible comercialmente y se obtiene de una fuente de energía renovable.

La síntesis en EtOH de los 5-amino-1H-1-arylpirazol-4-carbonitrilo (**7a-f**) mostraron rendimientos de buenos a excelentes (46-93%). Partiendo de la síntesis del anillo pirazol desde la hidracina sin sustituyentes (fenilhidracina o **4a**) una hidracina neutra como se observa en la figura 8, en 30 min. se obtuvo el mayor rendimiento ya que no había impedimentos estéricos.

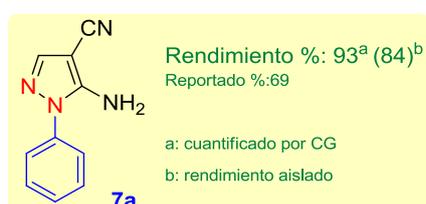


Figura 8. 5-amino-1H-1-fenilpirazol-4-carbonitrilo.

En el caso de las arilhidracinas que presentaban sustituyentes del anillo aromático a grupos aceptores o tomadores de electrones tales como 4-fluorofenil (**4b**), pentafluorofenil (**4c**), 4-trifluorometilfenil (**4d**), 2,6-dicloro-4-trifluorometilfenil (**4e**) como se observa a continuación en la fig. 9 los productos de síntesis presentaron un rendimiento menor comparado a **7a**.

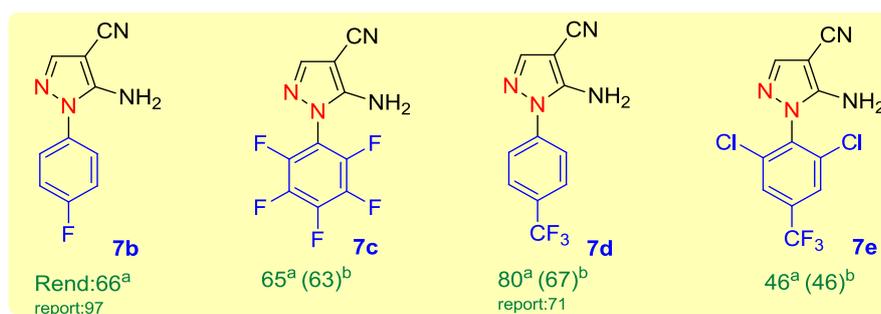


Figura 9. 5-amino-1H-1-arylpirazoles-4-carbonitrilo con sus rendimientos.

Además, el menor rendimiento se observa cuando se usó la 2,6-dicloro-4-trifluorometilfenil hidracina (47%), por lo que podría inferirse que los factores estéricos influyen negativamente en la etapa de ciclación, dado que sumado a que presenta grupos tomadores, posee en las posición orto sustituyentes clorados, este último producto de síntesis es el más similar en cuanto al anillo aromático, similar a fipronil.

En la siguiente figura (fig. 10) se observa el producto de síntesis con un anillo aromático con un grupo dador de electrones, a partir de la arilhidracina 4-metoxifenil (**4f**), el cual presentó un rendimiento bueno coincidente con lo reportado en la bibliografía.

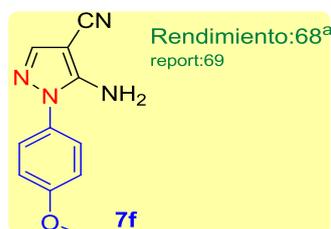


Figura 10. 5-amino-1-(4-metoxifenil)-1H-pirazol-4-carbonitrilo.

De esta serie de pirazoles se seleccionaron algunas moléculas y se ensayaron frente a diversos modelos biológicos como se explicará en capítulo 4 de bioensayos. Posteriormente a esta serie de pirazoles se le realizó una transformación química del grupo nitrilo (CN) en posición 4 del anillo pirazol a amida(C(O)NH₂) la cual se detallará en el capítulo 3 de modificaciones químicas.

A continuación (fig 11) se presenta otra serie de 5-amino-1H-1-arilpirazoles sintetizada, debido a que para sulfenilar la posición 4 del anillo pirazólico y asemejarse a fipronil, de acuerdo a la bibliografía se necesitaba que justamente la posición 4 del anillo pirazólico estuviera libre y ya que la primera serie a partir del etilcianopiruvato de potasio no progresó como se esperaba, se planteó otra serie de 5-amino-1H-1-arilpirazoles alternativa a sumar a la serie mencionada anteriormente (**7a**).



Esquema 7. Síntesis de 5-amino-1H-1-arilpirazoles.

En esta oportunidad se obtuvieron los productos a partir de las arilhidracinas correspondientes (**4a-f**) y etil-2-ciano-3-etoxiacrilato (**8**) en etanol a reflujo obteniendo 5-amino-1H-1-arilpirazol(**9a-f**); que justamente coincide con el sustrato que se sulfenilará en el próximo capítulo. En la Figura 11 se observan los diferentes 5-amino-1H-1-arilpirazoles con los correspondientes porcentajes de rendimiento en cada caso, de buenos a muy buenos, los cuales son coincidentes con los reportados en la bibliografía[42],[43].

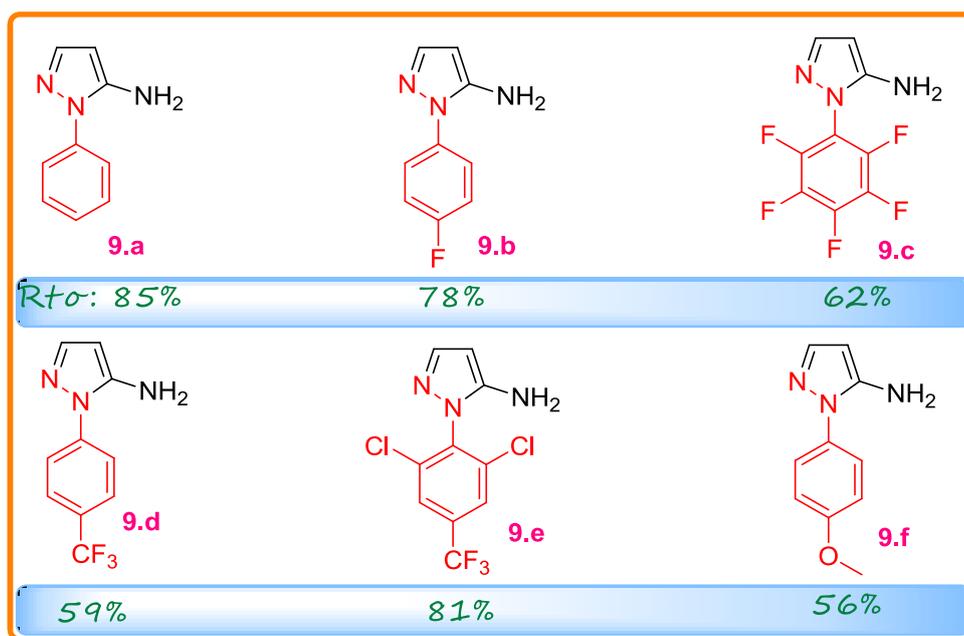


Figura 11. 5-amino-1*H*-1-arylpirazoles y rendimientos correspondientes.

La síntesis de estos es esencial para acercarnos a la estructura análoga a fipronil, como se desarrollara en los capítulos posteriores.

Conclusiones

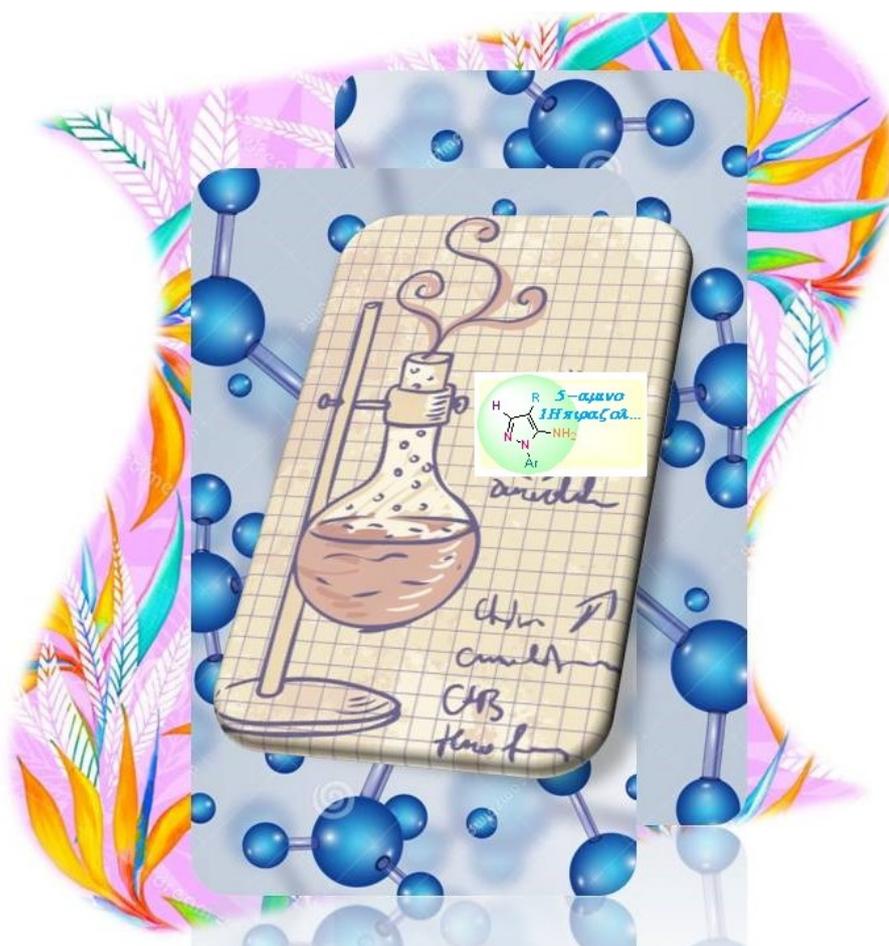
Se intentaron diversas síntesis de series de 5-amino-1*H*-1-arylpirazoles; la primera vía propuesta a partir de arilhidracinas (**4a-f**) y etilcianopiruvato de potasio (**3**) para obtener etil-5-amino-1-aryl-1*H*-pirazol-3-carboxilato (**5a-f**), no prosperó como se planteó inicialmente. Se presentaron dificultades en la síntesis de sustrato 3 (etilcianopiruvato de potasio) [49], se intentaron modificaciones y alternativas para obtener el producto deseado pero no se obtuvo la sal del enolato ni se pudieron reproducir la única oportunidad que si se logró, por lo cual se intentaron otras vías de síntesis de pirazoles como alternativas a análogos a fipronil.

Como vía alternativa, se sintetizaron, aislaron y caracterizaron seis moléculas (**7a-f**) (5-amino-1-aryl-1*H*-pirazol-4-carbonitrilo) a partir de etoximetilenmalononitrilo (**6**) y diferentes hidracinas (**4a-f**). Previamente se optimizó el disolvente de reacción, concluyendo que el disolvente ideal en este caso fue EtOH. Las reacciones presentaron alta regioselectividad y rendimientos de buenos a muy buenos cuantificados por CG y rendimiento aislado por cromatografía en columna de silicagel. Se registró la ausencia de isómeros por análisis de RMN. En el caso de moléculas reportadas, los rendimientos obtenidos fueron coincidentes con la literatura.

La otra alternativa de serie de pirazol con el objetivo de lograr un producto sin sustituyentes en la posición 4 del anillo pirazólico y que sea más sencillo de intentar a posteriori la sulfinilación y asemejarse a Fipronil; se realizó desde arilhidracinas comerciales (**4a-f**) y etil-2-ciano etoxiacrilato (**8**) para obtener la serie de 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles (**9a-f**). Estos pirazoles se pudieron obtener en un solo paso de reacción a reflujo de los reactantes en etanol como disolvente siendo una metodología versátil e ideal por su simplicidad y practicidad, al igual que la serie **7a-f**. Asimismo los productos obtenidos fueron aislados por cromatografía en columna de silicagel y caracterizados por RMN presentando, como en el caso anterior, rendimientos de buenos a muy buenos, coincidentes con la literatura.

Las series obtenidas (**7a-f** y **9a-f**) continuaron estudiándose en los capítulos a continuación, dado que las mismas sufrieron modificaciones químicas en la posición 4 del anillo, a la vez que se seleccionaron para ser evaluados en diversos modelos biológicos en busca de actividad insecticida y/o fungicida.

Capítulo 2: Modificaciones químicas
en la posición 4 del anillo pirazol y
purificación de un formulado
comercial

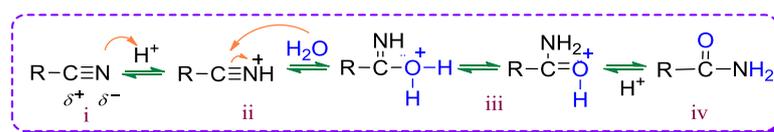


Introducción

En el capítulo 1 se detalló la síntesis de 5-amino-1*H*-1-arilpirazol-4-carbonitrilo (compuestos **7a-f**), a partir de esos compuestos es que se realiza la modificación estructural en la posición 4 del anillo pirazólico del -CN al grupo -C(O)NH₂. Esta elección se decide dada la necesidad de evaluar la influencia de distintos grupos funcionales en una misma posición del anillo, para estudiar cómo se ve afectada la actividad biológica. Determinar de esta manera una relación estructura actividad, ya futuro mediante modificaciones estructurales generar nuevas moléculas que nos permitan modular su actividad. A su vez, se ha reportado que muchos pirazoles- carboxamida se utilizan actualmente como fungicidas[50], [51] lo cual alentó a realizar esta modificación química para luego determinar si los mismos poseen actividad antifúngica o insecticida.

La transformación de nitrilo (-CN) a amida (-C(O)NH₂), se puede efectuar ya sea por hidrólisis ácida o básica. El grupo nitrilo está fuertemente polarizado y vuelve electrofílico al átomo de carbono. Consecuentemente los nucleófilos atacan a los nitrilos generando iones imina en una reacción análoga a la adición nucleofílica a un grupo carbonilo. Los nitrilos se hidrolizan con soluciones ácidas o básicas y producen ácidos carboxílicos; pero en condiciones moderadas se puede obtener la amida intermedia[39],[52].

En nuestro caso se decidió realizar la hidrólisis ácida de acuerdo a la bibliografía: en primer lugar ocurre una reacción ácido base (protonación del grupo nitrógeno) que activa el nitrilo haciéndolo más electrofílico (i). Luego el oxígeno del H₂O actúa como nucleófilo atacando al carbono del-CN (ii). Posteriormente ocurre una **tautomerización** entre los centros N y O y luego se protona el Nitrógeno dando el -NH₂ (iii). El último paso es una reacción ácido-base donde la desprotonación del ión oxonio revela el carbonilo en la amida (iv) como se observa en el esq. 8:

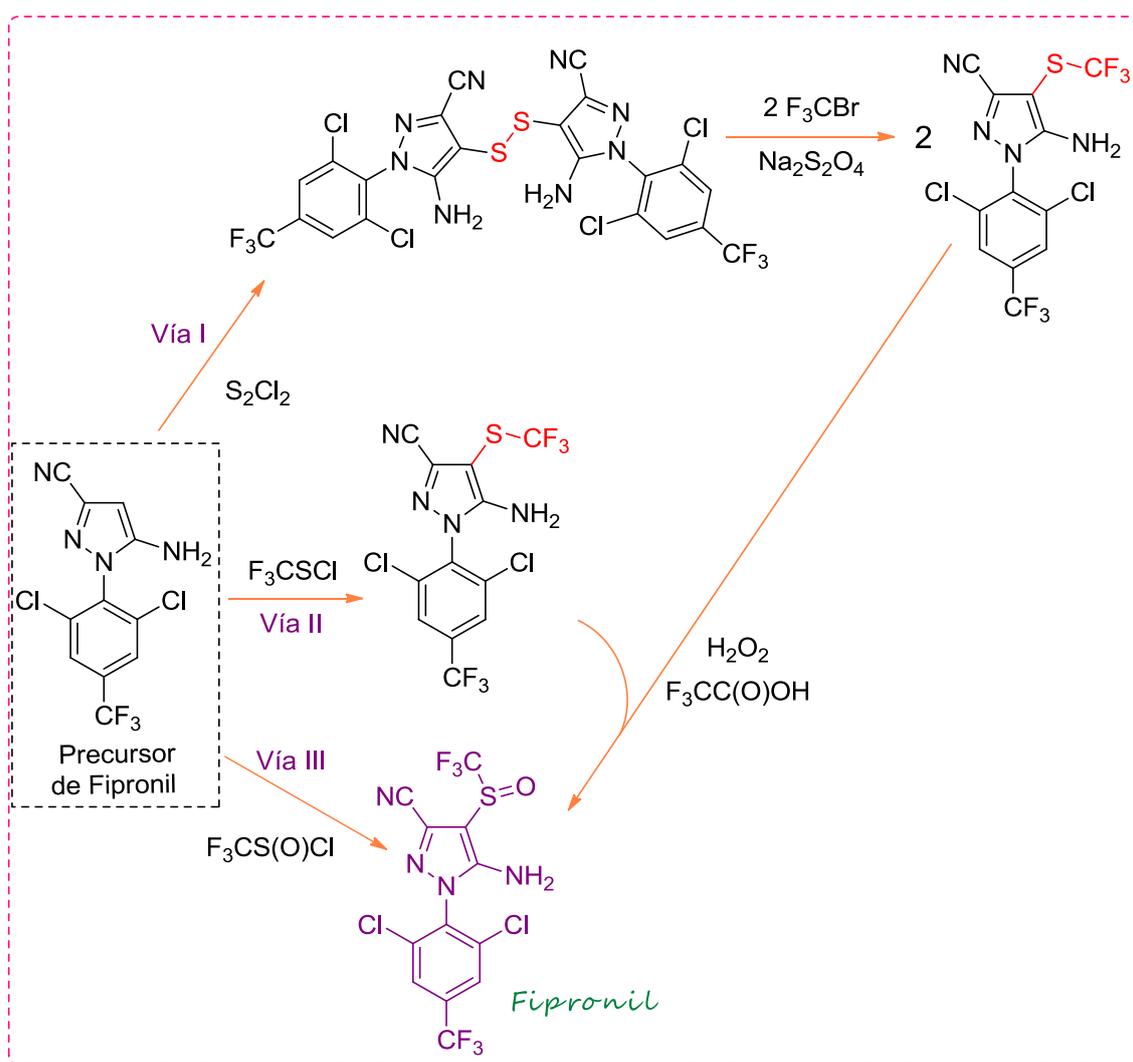


Esquema 8. Mecanismo de Hidrólisis ácida.

Por otro lado, como parte del estudio de actividad biológica de análogos de fipronil, la sulfinilación o incorporación del grupo trifluorometilsulfinil [-S(O)CF₃] en la posición 4 del anillo de 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles. Como objetivo se planteó la síntesis de estos análogos

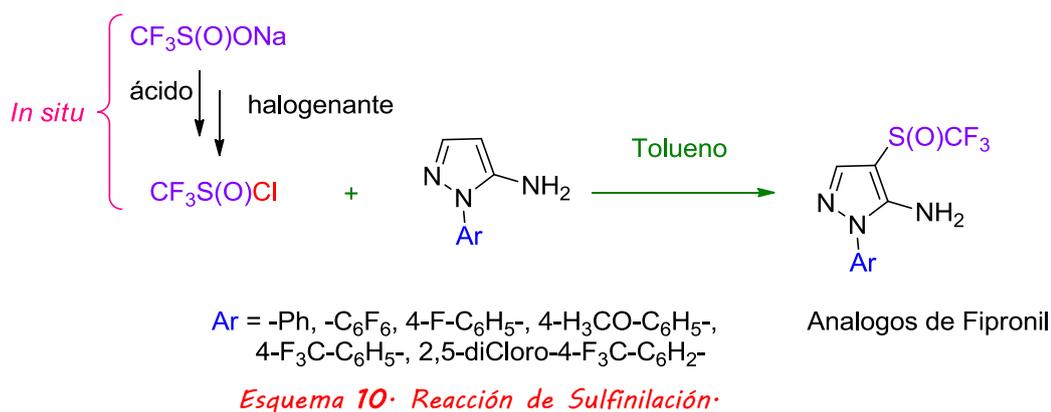
estructurales por vías alternativas a las industriales utilizando reactivos menos tóxicos y más accesibles comercialmente. Normalmente en la industria, el paso final en la obtención de Fipronil, es la sulfinilación del carbono 4 del anillo pirazólico por alguna de las vías detalladas en el esq. 9.

Como se observa en el esq. 9, el grupo 4-trifluorometilsulfinilo puede introducirse de manera indirecta a través de la oxidación del grupo sulfenilo (vías I y II) o de manera directa utilizando cloruro de trifluorometilsulfinilo como reactivo (vía III). Del análisis de las distintas vías puede concluirse que las mismas resultan poco viables de realizarse en un laboratorio convencional dado que las 3 requieren reactivos gaseosos, peligrosos y tóxicos. En el caso de la vía I el bromotrifluorometano es un gas que daña la capa de ozono, por lo que, en muchos países está prohibida su comercialización. En cuanto a las vías II y III las mismas utilizan respectivamente cloruro de trifluorometil sulfenilo (F_3CSCl) y cloruro de trifluorometil sulfinilo ($F_3CS(O)Cl$) los cuales son gaseosos, tóxicos, corrosivos y costosos [53].



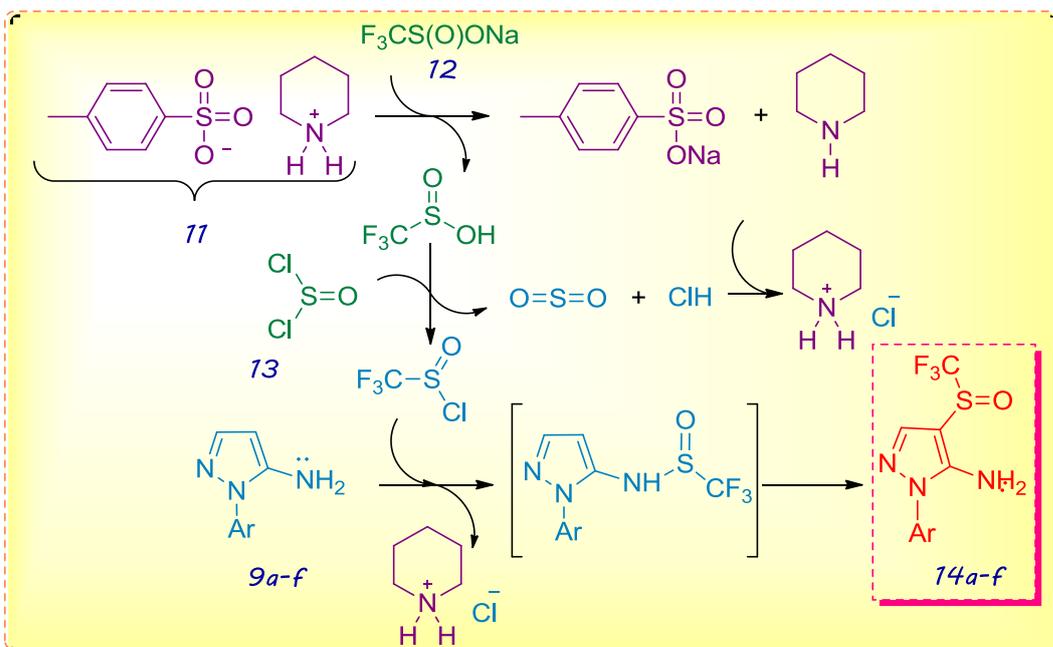
Esquema 9. Vías de incorporación del grupo sulfinilo para la obtención de Fipronil[13].

Para evaluar alternativas de sulfinilación en posición 4 del anillo pirazólico con reactivos menos tóxicos y económicamente más accesibles se decidió explorar reacciones utilizando al trifluorometil sulfinato de sodio ($\text{CF}_3\text{SO}_2\text{Na}$) (**12**) comúnmente llamado *triflinato de sodio* como reactivo sulfinilante. Este reactivo fue elegido dado que es sólido, estable, fácilmente manejable y económico. Estas reacciones de SEAr se exploraran siguiendo literatura de patentes [54] y variando: temperatura, tiempo y proporción de reactantes (pirazol, complejo ácido-amina, agente halogenante, $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{Na}$) (esq. 10).



Como bien se observa en el esq. 10, es imprescindible la presencia de un ácido acomplejado con una amina secundaria cíclica [54] ya que de lo contrario el ácido sería muy fuerte, y protonaría el grupo amino de anillo pirazólico y se disociaría, entonces el contra ión (Cl^- o SO_4^-) se uniría al triflinato de sodio y no se formaría el ácido triflico. La función del complejo aminoacídico (sal entre un ácido y una amina) es doble, por un lado generar el ácido sulfínico ($\text{F}_3\text{CS(O)OH}$), y por el otro acelerar el rearrreglo de Thía-Fries [53], [54], [55], [56], [57].

En el esquema 11 tenemos diferenciados por color las diferentes etapas de la formación de esta reacción, en violeta observamos la sal amino-ácido [ejemplificado con piperidina(PIP) y ácido *p*-toluensulfónico (PTS)], que es lo primero a incorporar en el equipo de reacción. Posteriormente, se agrega el triflinato de sodio (**12**), el cual se protona y da lugar a la formación del ácido triflico. A continuación, con el cloruro de tionilo (**13**) (agente halogenante) se genera *in situ* el cloruro de trifluorometilsulfinilo (agente sulfinilante) el cual reaccionará con el grupo amino del arilpirazol (**9a-f**). Finalmente, éste intermediario así formado se reordena (rearrreglo de Thía-Fries) para dar el arilpirazol sulfinilado en la posición 4 deseado. Con esta metodología se solucionaría el problema de trabajar con el cloruro de trifluorometil sulfinilo directamente, ya que el mismo se genera "*in situ*".



Esquema 11. Etapas del mecanismo de la reacción de sulfonilación.

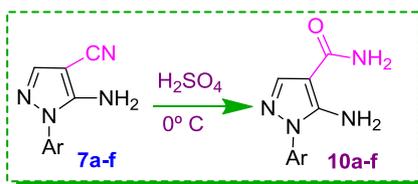
Objetivos

- ◆ Modificación estructural de la posición 4 del anillo pirazol de los compuestos 5-amino-1-aryl-1H-pirazol-4-carbonitrilo y 1-aryl-1H-pirazol-5-amino. Las modificaciones incluyen la hidrólisis del grupo nitrilo (ciano) a la correspondiente amida y la sulfonilación directa de la posición 4 del anillo.
- ◆ Purificar del formulado comercial CLAP, el principio activo de Fipronil.

Metodología

Modificación química de $-CN$ a $-C(O)NH_2$ en la posición 4 del anillo de pirazol

A partir de **7a-f** se prosigue con la hidrólisis a amida como se observa a continuación en el esq. 12:



Esquema 12: Hidrólisis para obtención de amidas en la posición 4 del anillo pirazólico.

La reacción se realiza con ácido sulfúrico concentrado y el reactor durante la reacción se mantiene en baño de hielo. Concluida la reacción, se neutraliza con NaOH para obtener el crudo con el pirazol 5-amino-1H-1-arylpirazol-4-carboxamida (**10a-f**). Los productos de síntesis se purifican por cromatografía en columna de sílicagel (fig. 12 y 13) empleando como disolventes de elución AcOEt/Hexano.

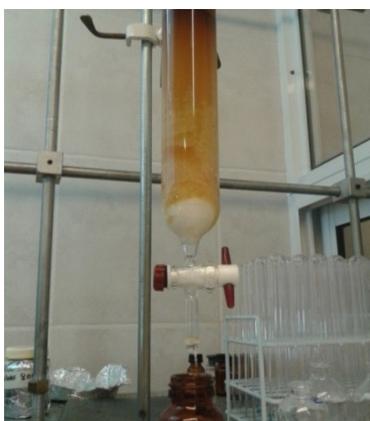


Figura 12 Cromatografía en columna de sílicagel.

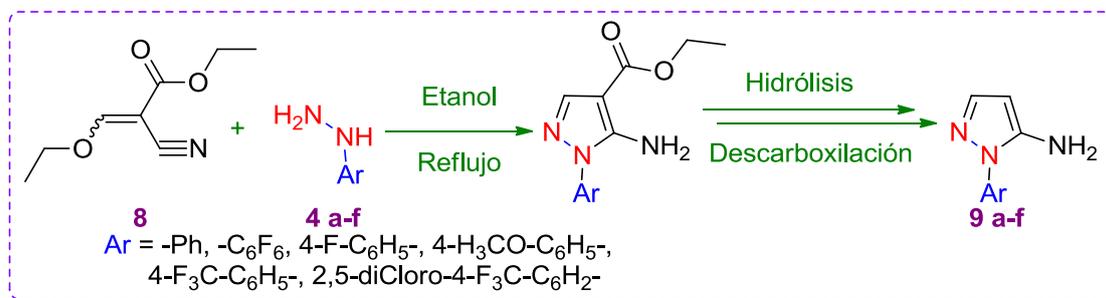


Figura 13 Fracciones de elución de columna de purificación.

Sulfinilación en la posición 4 del anillo pirazólico

Para la obtención de los compuestos sulfinilados se partió de 5-amino-1H-1-arylpirazoles sin sustituyentes en la posición 4 los cuales se obtuvieron como se detalló en el capítulo anterior, por medio de una secuencia sintética en tres etapas (esq. 12). La misma

comienza con la condensación de las arilhidracinas correspondientes (**4a-f**) y etil-2-ciano-3-etoxiacrilato (**8**) en etanol a reflujo con lo cual se obtienen los etil-5-amino-1-aril-1H-pirazol-4-carboxilatos. Estos, mediante hidrólisis y descarboxilación en medio ácido brindan los sustratos de partida **9a-f** [42], [43], [58].

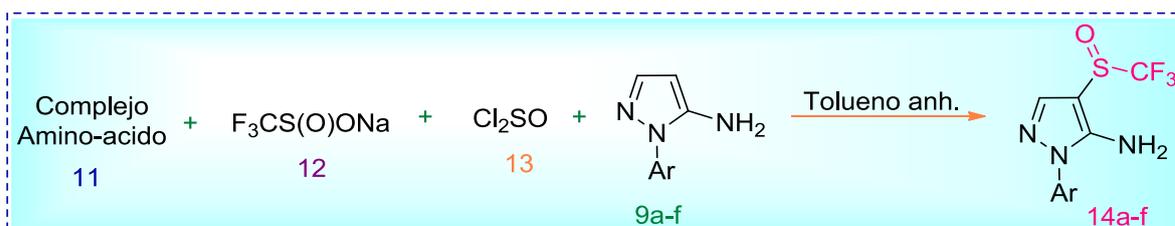


Esquema 12: Síntesis de 5-amino-1H-1-arilpirazoles.

A partir de lo reportado en la bibliografía [37], [55], [54],[57] se procedió a la selección de reactivos e intentos de sulfinilación. Como se mencionó con anterioridad (ver esq. 11), para realizar la sulfinilación utilizando como agente sulfinilante el trifluorometilsulfinato de sodio (**12**) se requiere un ácido que lo protone ($\text{pK}_a < 2$) y un agente halogenante que en nuestro estudio será el cloruro de tionilo (**13**). Además, como nuestro sustrato (**9a-f**) posee un grupo funcional amino, el cual es susceptible de protonación en las condiciones ácidas del medio, inhibiría la reacción.

Por lo mencionado anteriormente, se requiere una base no nucleofílica que neutralice el ácido clorhídrico generado pero no reaccione con el cloruro de trifluorometilsulfinilo intermediario (esq. 11). Para esto, suelen usarse diversos ácidos orgánicos e inorgánicos como ser HCl, H₂SO₄, y distintas aminas secundarias preferentemente alquílicas como piridina, piperidina, morfolina para la formación del complejo amino-acido (**11**). Por esto, inicialmente se generaron diversas sales entre aminas y ácidos con la intención de evaluar su eficacia en la reacción.

El complejo amino-ácido o sal (**11**) se forma al hacer reaccionar el ácido anhídrido junto a la amina a temperatura ambiente, en un balón de reacción previamente secado en atmósfera de nitrógeno para eliminar la humedad. Como se observa en el esquema 13, la reacción se realiza en un Schlenk en atmósfera de nitrógeno, en primer lugar se incorpora el complejo amino-acido (**11**) (formado y secado previamente) luego se incorpora el triflinato de sodio (**12**), el agente halogenante (**13**), y por último el pirazol **9a-f** en tolueno como solvente para dar lugar a la formación del 5-amino-1H-1-arilpirazol sulfinilado (**13a-f**)



Esquema 13. Síntesis de arilpirazol sulfinilado en posición 4 del anillo pirazólico.

La referencia bibliográfica recomienda emplear 1-1,35 eq de F₃CS(O)ONa; de 1,4 a 2,2 eq. de complejo aminoacídico, y tiempos desde 5 minutos hasta 15 h [54], lo cual se evaluará en la síntesis.

Purificación del testigo comercial

Para comparar la actividad biológica de nuestros compuestos de síntesis frente a una referencia positiva, fue necesario disponer de Fipronil puro como testigo. Por esto, se plantea la obtención del componente activo Fipronil desde el formulado, CLAP® al 20% que se comercializa en nuestro país.

La metodología de purificación consta de una primera fase de extracción a partir de 5ml de CLAP formulado como una suspensión concentrada al 20%. Se diluye la muestra con agua y se extrae 3 veces con H₂O (50 ml), AcOEt (50 ml), DCM (50 ml) y nuevamente con AcOEt (50 ml). A continuación las fases orgánicas se combinan y concentran por evaporación a presión reducida en un evaporador rotatorio. El concentrado se purifica por cromatografía en columna de silicagel y los disolvente de elución utilizados fueron Hexano/AcOEt.

Resultados

Modificación química de -CN a -C(O)NH₂ en la posición 4 del anillo de pirazol

Los productos de síntesis se purificaron por cromatografía en silicagel utilizando como disolvente de elución AcOEt/Hexano 5/1 y se caracterizaron por RMN(¹H, ¹³C, ¹⁹F; COSY, HSQC; HMBC), las moléculas obtenidas con buenos rendimientos, coincidieron con las reportadas en la bibliografía[59] y se observan en la fig.14.

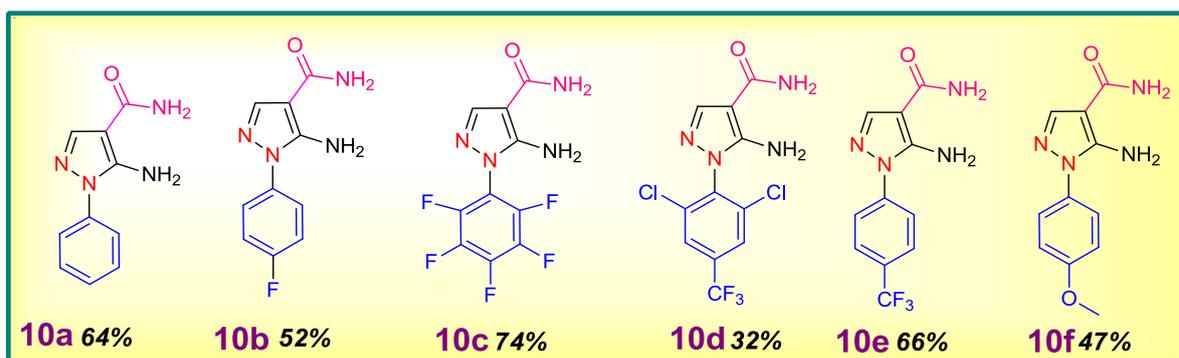


Figura 14. Rendimientos de 5-amino-1-aryl-1H-pirazol-4-carboxamidas (10a-f).

La síntesis procedió de manera selectiva ya que se originó un solo isómero, fácilmente de purificar. La obtención de estos productos de síntesis nos permite una estructura previa a siguientes funcionalizaciones con notable actividad biológica [59], [60].

Sulfinilación en la posición 4 del anillo pirazólico

En primera instancia para la síntesis del pirazol sulfinilado, se emplearon diversos complejos amino-ácidos como se observa en la tabla 5. Se trabajó a 60°C durante 20h de reacción, utilizando tolueno anhidro como disolvente de reacción y 5-amino-1H-1-fenilpirazol (9a) como referencia en estas pruebas, dado que es el pirazol más económico y sencillo de sintetizar.

Tabla 5. Evaluación de sal aminoácida en reacción de sulfinilación.

Entrada	Complejo aminoácido	Resultado
1	HCl.Morfolina	No se obtuvo el producto de interés
2	HCl.Trietilamina	No se obtuvo el producto de interés
3	HCl.Piperidina	No se obtuvo el producto de interés
4	ác. <i>p</i> -toluensulfónico (PTS).Trietilamina	No se obtuvo el producto de interés
5	PTS.Piperidina	25%
6	PTS.Morfolina	No se obtuvo el producto de interés
7	PTS.4-Metilmorfolina	2%
8	PTS.Piperidina*	2%
9	PTS.Piperidina*	21%
10	PTS.Piperidina*	20%
11	PTS.Piperidina*	18%
12	PTS.Piperidina* @	21%

*: diferente proporción de complejo aminoácido; @: modificación del tiempo de reacción (4,5h).

Las entradas 1 a 9 se emplearon 1,5eq.de sal aminoacídica (**11**), 1 eq.de pirazol (14), 1,1 eq.de triflinato de sodio (**12**) y 1,2 eq.de agente halogenante (**13**). Se puede destacar que el HCl como ácido para la formación de la sal no fue el indicado, ya que evaluando diferentes aminas (terciaria y secundarias) combinadas con este ácido,y por ende diferentes complejos, en ningún caso se obtuvo el producto de reacción sulfinilado (tabla 5 entrada 1-3). Cuando se empleó el ácido *p*-toluensulfónico para la formación de la sal aminoacídica correspondiente, se observó que al combinarse con trietilamina (TEA) una amina terciaria no prospero la reacción (tabla 5 entrada 4), al igual que en el caso de la 4-metilmorfolina (tabla 5 entrada 6) que se obtuvo en trazas, lo cual coincide con la bibliografía que prefiere aminas cíclicas secundarias para esta reacción [54].

En las entradas 1-7 de la tabla 5 se empleó 1,5 eq de complejo aminoacídico, con los resultados mencionados en el párrafo anterior; ahora bien otra bibliografía recomendaba un rango de 1,4 a 2,2 eq; por lo cual se evaluó en la entrada 8 (*) incrementar a 2 eq el complejo aminoacídico lo cual disminuyó a trazas el producto de interés.

La otra prueba manteniendo 1,5 eq de complejo aminoacídico o sal en la entrada 9 tabla 5 fue modificar el orden de agregado de los reactivos colocando el arilpirazol (14) en segundo lugar; y se observó que el rendimiento en esas condiciones no se alteraba y que el producto sulfinilado de interés se obtenía sin inconveniente; aun así se decidió, por lo explicado anteriormente en la metodología, mantener el orden establecido en el esquema 13 de acuerdo a lo interpretado y mencionado en las referencias[56], [55].

En las entradas 10 y 11 se trabajó con 2,76 eq y 2,5 eq de sal y se incrementó las proporciones de los restantes reactivos, en el primer caso (entrada 10) a [5,3 eq (**12**); 2,7 eq (**13**)] y en el segundo caso (entrada 11) a [4,8 eq (**12**); 1,2 eq (**13**)]. En el primer caso, con las proporciones mencionadas, el producto de interés se obtuvo en un 20%, con lo cual no hubo diferencias en relación al rendimiento que se obtuvo anteriormente y el desperdicio de reactivos. En el segundo caso, al evaluar en mayor cantidad el triflinato de sodio y menor de cloruro de tionilo(**13**) se observó una leve disminución del rendimiento (18%), que puede deberse a una pérdida en la purificación, pero aun así el rendimiento es aproximado y por tanto comparable con el obtenido en la entrada 10 tabla 5, por lo que es innecesario y contraproducente elevar las proporciones de todos los reactivos por igual ya que no se observan mejoras.

En la entrada 12 se evaluó la reacción de sulfinilación empleando 5,5 eq de complejo aminoácido, y el resto de las proporciones se mantuvieron al igual que en la entrada 10 [5.3 eq (**12**); 2,7 eq (**13**)]variando a diferencia de la entrada 10 el tiempo de reacción, que paso a 4h obteniendo un rendimiento del 21% con lo cual se demostró que con menor tiempo de reacción se obtenía el producto sulfinilado en igual rendimiento que las pruebas anteriores con 20h de reacción y obtención del producto de reacción.

Considerando la entrada 5 de la tabla 5 con el mejor rendimiento (25%) y la entrada 12 donde se intentó la reacción satisfactoriamente en un tiempo de 4,5 h; es que se decidió ajustar las variables o definir, como se observa en la tabla 6 a 4h de reacción y 70°C.

Tabla 6• Reacción de sulfinilación a 4h y temperatura ambiente•

<i>Entrada</i>	<i>Complejo amino-ácido (11)</i>	<i>F₃CS(O)ONa (12)</i>	<i>Cl₂SO (13)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
<i>1</i>	<i>1,5 eq</i>	<i>1,1 eq</i>	<i>1,2 eq</i>	<i>25</i>
<i>2</i>	<i>1,5 eq</i>	<i>3,8 eq</i>	<i>1,4 eq</i>	<i>53</i>
<i>3</i>	<i>1,7 eq</i>	<i>3,68 eq</i>	<i>1,7 eq</i>	<i>60</i>

La entrada 1 de la tabla 6 nos muestra que repitiendo la reacción de la tabla 5 entrada 5 pero variando el tiempo a 4h de reacción no hubo modificación del rendimiento (25%); por ello se decidió evaluar si el incremento de triflinato de sodio (**12**) mejoraba el rendimiento del producto, (tabla 6 entrada 2) donde se observa que manteniendo la proporción de complejo amina-ácido (**11**) e incrementando a 1,4 eq de Cl₂SO y a 3,8 eq (3,5 eq. más respecto entrada 1) la reacción mejoraba notablemente, elevándose al doble el rendimiento mencionado; este incremento de triflinato de sodio se decidió ya que era el mayor mencionado en la literatura [51].

En vistas de este resultado, se decidió una nueva reacción incrementando aún más los eq de Cl₂SO (1,7 eq) e igual proporción de complejo amino-ácido (1,7 eq) con lo cual como se observa en la entrada 3 tabla 6, la reacción mejoró aún más el rendimiento a 60% de 5-amino-[4-(trifluorometil)sulfinil]-1H-1-fenilpirazol empleando tan sólo 4h de reacción a 70°C empleando el complejo aminoácido: PTS.piperidina.

En la tabla 7 se observan las últimas modificaciones trabajando a temperatura ambiente, y modificando las proporciones de los reactivos.

Tabla 7 Reacción de sulfinilación a T°C ambiente.

Entrada	Complejo amino-ácido (11)	F ₃ CS(O)ONa (12)	Cl ₂ SO (13)	Rendimiento (%)
A	1,55 eq	3,0 eq	1,5 eq	66
B	1,5 eq	3,78 eq	1,5 eq	62
C	1,9 eq	3,2 eq	1,8 eq	70
D	2,5 eq	3,78 eq	2,5 eq	77
E	3,0 eq	3,6 eq	3,0 eq	67

En la tabla 7 entrada A se puede observar que manteniendo las proporciones iguales de complejo amina-ácido (**11**) y Cl₂SO (**13**) a 1,5 eq y elevando al doble de ello las proporciones de F₃CS(O)Na (**12**) durante 4h de reacción y a temperatura ambiente en esta serie de reacciones, se mejora el rendimiento a 66% ; aún mucho más que calentando en las proporciones evaluadas anteriormente. En la entrada B tabla 7 se realizó la comparación de las mismas proporciones de complejo amina-ácido y cloruro de tionilo (**11** y **13**) y un leve incremento respecto entrada A de triflinato de sodio (**12**) con la variación de que el tiempo de reacción fue de 22 h, obteniendo un 62% de rendimiento, con lo cual destacamos que no hubo mejoras de rendimiento respecto la entrada A y por ello se decidió trabajar a continuación con 4h de reacción a temperatura ambiente por el resto de las reacciones.

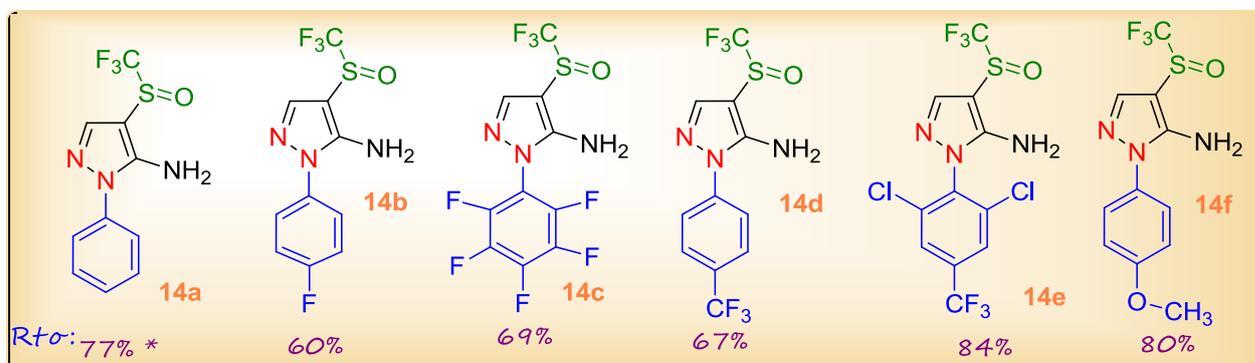
En la entrada C tabla 7 se incrementaron a 1,9 y 1,8 eq los reactivos **11** y **13** respectivamente, asimismo la proporción de triflinato de sodio (**12**) se disminuyó levemente y se observó que el producto de interés sulfinilado se obtuvo en un 70% mejorando la reacción notablemente; por ello en la entrada D tabla 7 se decidió elevar aún más las proporciones de todos los reactivos, manteniendo la relación de proporción de **11** y **13** respectivamente; se incrementó a 1,2 cada reactivo; entonces se empleó 2,5 eq de **11** y **13** y 3,78 eq de **12** obteniendo un 77% de rendimiento de 5-amino-4-(trifluorometil)sulfinil-1H-1-fenilpirazol (**14a**).

En la entrada última y E de la tabla 7 se observa que al incrementar a un máximo de 3 eq de **11** y **13** manteniendo su relación de proporciones, la reacción disminuye su rendimiento respecto la entrada D, pero aun así se logra un buen rendimiento. Se infiere que incrementado las proporciones de los reactivos **11** y **13** en estas condiciones es de esperar que los resultados sigan sin mejorar, como se mostró en la primer tabla donde se utilizaron hasta 5eq de complejo amino-ácido y no mejoró el rendimiento.

Resumiendo lo expuesto, se determinó que la reacción prosigue utilizando el complejo amino-acido a partir de ácido *p*-toluensulfónico y piperidina como se detalla en la tabla 5. Asimismo se determinó que la reacción de sulfinilación ocurre a sin modificación durante 4h de reacción y a temperatura ambiente (tabla 7).

Por otro lado los rendimientos de reacción no mejoraron al aumentar la proporción de complejo amina-ácido a 4, 8 y 5,3eq respectivamente; sí mejoraron cuando se incrementó a 2,5eq **11** y **13** manteniendo la relación igual entre estos y cuanto se empleó 3,78eq de triflinato de sodio (**12**), es decir un exceso del doble de triflinato para la proporción de cloruro de tionilo y complejo amina-ácido siempre respecto 1eq del sustrato pirazólico a sulfinilar, (5-amino-1*H*-1-fenilpirazol) [**9a**] lo cual son proporciones mayores a las mencionadas en las referencias[56], [54], [55]. Todas las reacciones presentadas hasta aquí corresponden siempre al empleo del (5-amino-1*H*-1-fenilpirazol) [**9a**] como sustrato a sulfinilar.

A continuación se observa los productos de la sulfinilación (**14a-f**) a partir de los diferentes sustratos de la serie **9a-f** y sus rendimientos (fig.15). Estos productos fueron obtenidos empleando las condiciones de la bibliografía[54], es decir calentando a 70°C, empleando las proporciones de: 1,5 eq de complejo amino-ácido de PTS. piperidina, 3,9 eq de CF₃S(O)ONa, 1,5eq de Cl₂SO con la excepción de 4h de tiempo de reacción. No se ha extrapolado las condiciones de reacción optimizadas que se detallaron en las tablas precedentes a los demás sustratos de síntesis (**9b-f**), dado que por cuestiones de tiempo, en el momento de síntesis de la serie **14a-f**, aún no se había realizado la evaluación de otras variables para mejorar el rendimiento y era necesario tener la serie sintetizada para los ensayos en fitopatógenos.



*Figura 15. Rendimientos de 5-amino-[4-(trifluorometil) sulfinil]-1*H*-1-arylpirazoles según proporciones [54]. (*Excepto 14a, según proporciones tabla 7: entrada D).*

Todos los productos sintetizados fueron purificados por cromatografía en columna de silicagel con Hexano/AcOEt 4/1, caracterizados por experimentos de RMN, tal como ^1H , ^{13}C , ^{19}F , COSY, HSQC, HMBC y HRMS.

Purificación de CLAP®: obtención del i.a. Fipronil.

Se obtuvo el Fipronil® (5-amino-1-(2,6-dicloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolil)-4-trifluoro-3-carbonitrilo) desde el formulado comercial **CLAP®**. Luego de las extracciones, se purificó por cromatografía en columna de silicagel siendo el gradiente de disolvente de elución utilizado Hexano/ AcOEt 7/1 hasta Hexano/AcOEt 3/1, obteniendo el 52% de rendimiento.

Al compuesto aislado se lo caracterizó por HPLC; CG; RMN coincidiendo con los datos proporcionados por la bibliografía [61] y se utilizó como control positivo en los bioensayos con diferentes modelos biológicos. Estos resultados se compararon con los obtenidos con nuestros compuestos de síntesis para determinar la actividad biológica de los mismos.

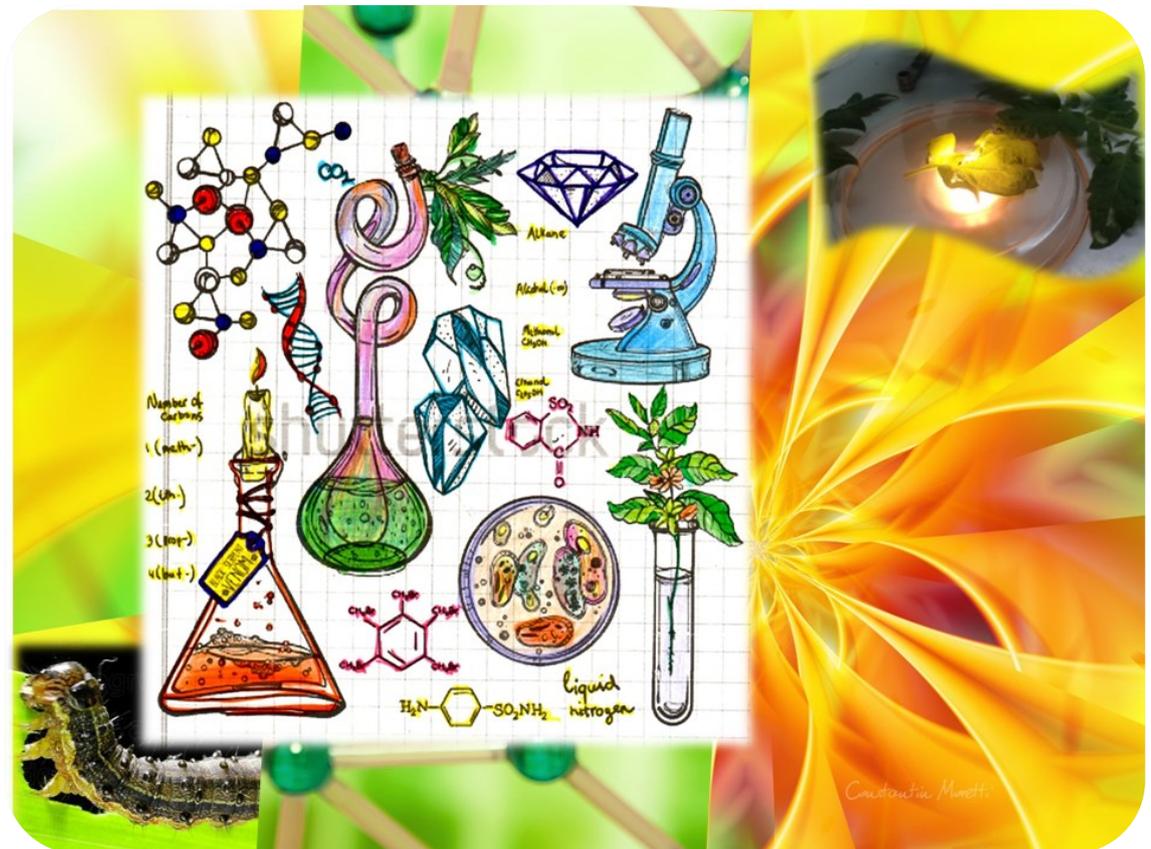
Conclusiones

La conversión del grupo nitrilo a amida; se realizó con rendimientos desde buenos a muy buenos por una metodología clásica y simple obteniendo la serie **10a-f**.

Se logró la sulfinilación regioselectiva en la posición 4 del anillo pirazol a partir de las moléculas de la serie **9a-f** (5-amino-1*H*-1-arilpirazol) para obtener la serie **14a-f** (5-amino-4(trifluorometilsulfinil)-1*H*-1-arilpirazol). El producto se obtuvo a partir de trifluorometilsulfinato de sodio como reactivo sulfinilante y cloruro de sulfinilo como halogenante, reactivos no tóxicos y sencillos de manipular a diferencia de la vía utilizada para la obtención de fipronil. En este estudio pudo determinarse al complejo amino-ácido o sal más favorable, a partir de ácido *p*-toluensulfónico y piperidina; a su vez se hicieron modificaciones de proporciones determinando un buen rendimiento tanto en el producto de síntesis **14a** (introduciendo variables a la síntesis para mejorarla) a temperatura ambiente y 4h de reacción a las proporciones ajustadas, como empleando las proporciones que incrementan la concentración del triflinato de sodio en el resto de la serie.

Asimismo la purificación de Fipronil desde el formulado comercial resultó con excelentes resultados, obteniendo un buen rendimiento (52%) del principio activo de interés (pureza del 100%) caracterizado por resonancia magnética nuclear para posteriormente emplearse en los bioensayos.

Capítulo 3: Ensayos de actividad
insecticida y fungicida en diferentes
modelos biológicos



Introducción

En los capítulos anteriores, describimos la síntesis de diversas series de 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles, correspondientes a **7a-f**; **9a-f**; **10a-f** y **14a-f**; con el objetivo de seleccionarlos posteriormente y evaluar su actividad biológica en diversos modelos. La síntesis de moléculas análogas a fipronil se fundamenta en su posible actividad insecticida, ya que al pertenecer al grupo de los fiproles se caracterizan por ser antagonistas de los canales de cloro modulados por GABA (ácido γ -amino butírico) [62].

El GABA es un neurotransmisor inhibitorio que se encuentra en las neuronas y las células β pancreáticas; se forma a partir del glutamato por intermedio de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), e ingresa dentro de vesículas por las que se transporta hasta la membrana de la neurona presináptica [62].

Los aumentos de los niveles de Ca^{+2} (2^{do} mensajero intracelular) produce la liberación del GABA hacia el espacio extracelular. En condiciones normales, éste se une a un receptor postsináptico y abre los canales de Cl^- de la membrana celular lo que provoca la inhibición o apagado del impulso nervioso o transmisión sináptica. El ingreso en la célula de iones cloruros, por los canales de Na^+ y K^+ , equilibra la entrada de cargas positivas atenuando el efecto excitador de los otros canales. Luego de actuar, el GABA se libera y reingresa a la neurona pre-sináptica a través de un transportador de membrana (fig. 16).

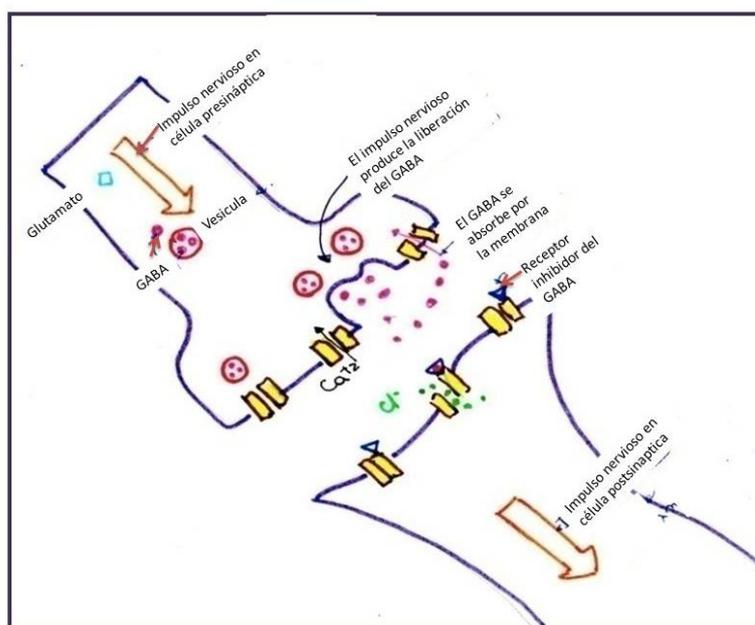


Figura 16. Representación de la transmisión del GABA, modificado de [8].

Los fiproles actúan bloqueando tanto los canales de Cl^- activados por GABA como los mediados por glutamato; ambos canales intervienen en la inhibición de la transmisión del impulso nervioso. Fipronil se caracteriza por actuar en el insecto por contacto y en la planta de modo sistémico [8] como se presenta en la fig. 17 mostrando el bloqueo del canal por el fipronil.

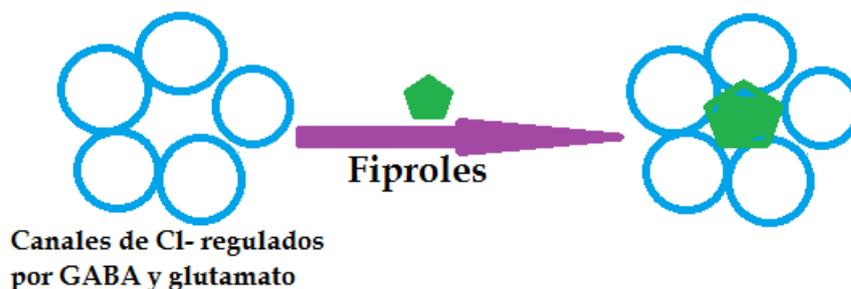


Figura 17. Bloqueo de fipronil en los canales de Cl^- .

Los insecticidas, como su nombre lo indica, son compuestos de origen natural o sintético que se utilizan para matar o combatir insectos. Se ha reportado que de más de 1.000.000 de especies de insectos son conocidas a nivel mundial, de las cuales 10.000 se alimentan de cultivos, y de ellas, aproximadamente 700 especies causan la mayor parte del daño a los cultivos, tanto en el campo como en condiciones de almacenamiento [8].

Es importante considerar el modo en cómo ingresan las sustancias insecticidas en los insectos plagas, ya que en nuestro caso que sintetizamos análogos a fipronil, se espera que nuestros compuestos actúen de manera similar; en relación a esto se destacan tres vías de ingreso al insecto:

Ingestión: vía aparato digestivo; **Inhalación:** los insecticidas que presentan alta presión de vapor pueden ingresar por los espiráculos respiratorios; y de **Contacto:** a través de la cutícula.

Por otro lado, en cuanto a las vías de ingreso de los insecticidas a las plantas, podemos mencionar tres predominantes:

De contacto: no hay penetración, el insecticida queda sobre la superficie de la planta;

Translaminar: los insecticidas ingresan en el mesófilo de la hoja por los espacios intracelulares, formando un reservorio de ingrediente activo dentro de la hoja, sin ingresar a los tejidos conductores de la planta. De esta manera se garantiza cierta acción residual contra algunos insectos, como por ejemplo las larvas de insectos minadores que toman su alimento por debajo de la cutícula y hasta a veces por debajo del mesófilo.

Sistémico: se aplican al follaje o son absorbidos por las raíces dado que son solubles en agua. El ingrediente activo cuando se transloca con el flujo de transpiración hasta los vasos del xilema, puede moverse del xilema al floema y viceversa debido a la permeabilidad de las membranas.

Hay diversos modos y mecanismos de acción que explican el accionar de diversos insecticidas y como se relacionan con los sitios de acción. Fipronil se caracteriza por poseer vía de ingreso sistémica en plantas y de contacto en el insecto [8] con lo cual es esperable que nuestros compuestos posean también este tipo de ingreso o uno similar.

Entre las plagas que causan daños importantes en cultivos producidos en Argentina, y fueron elegidos como modelos biológicos, se hallan *Spodoptera frugiperda*, correspondiente a un lepidóptero de la familia Noctuidae y *Tuta absoluta*, un microlepidóptero de familia Gelechiidae.

Spodoptera frugiperda (Familia Noctuidae)

Noctuidae representa la familia más numerosa del orden Lepidópteros, agrupa a polillas de tamaño medio, en general miden entre 20 a 50 mm de expansión alar, presentan cabeza pequeña y el cuerpo cubierto por abundante pilosidad y colores poco vistosos. Las alas tienen una expansión de 30 a 38mm, las anteriores son grisáceas u oscuras (en el macho más claras y con máculas más contrastantes)[63], [64], [65](Fig. 18).



Figura 18: a) (izq) macho de *S. frugiperda* · b) (der) hembra de *S. frugiperda*

Oviponen directamente sobre los vegetales, generalmente la hoja y tallo y en ocasiones en el suelo. Las larvas son polífagas, es decir que se alimentan de diversos huéspedes. En general, la resistencia invernal, al estadio de pupa transcurre protegido por las partes aéreas de las plantas o en camaritas en el suelo [64].

El gusano cogollero *S. frugiperda* (FAW) (J. E. Smith, 1797) es una extendida plaga que ataca el maíz (*Z. mays* L.) [66]. El cultivo de maíz en Argentina ocupa estimativamente 5 millones de hectáreas, con tendencia cada vez más acentuada a sembrar tarde, entre noviembre y principios de enero, por una mayor disponibilidad hídrica al momento de mayores requerimientos (15 días alrededor de la floración). La superficie estimada bajo esta nueva modalidad de fecha de siembra se estima en 45-50% del total sembrada. Pero la nueva modalidad de siembra trae aparejadas algunas desventajas para el cultivo por mayor incidencia de plagas, al menos para dos especies clave, la oruga militar *S. frugiperda* y la isoca de la espiga *Heliothis zea* [67].

S. frugiperda es una especie americana en zonas tropicales y subtropicales, pudiendo encontrarse en el sur de Estados Unidos, México, América Central y Sudamérica [68], [69]. Evoluciona en forma continua durante todo el año, mientras que en regiones templadas y más bien frías tiene un comportamiento estacional. Es una plaga altamente migratoria y polífaga con marcada preferencia por las plantas herbáceas, principalmente las gramíneas [65] (fig. 19). Tiene un amplio rango de hospederos, con más de 80 plantas registradas. Las malezas juegan un rol esencial como reservorio de la plaga; ataca preferentemente maíz y sorgo, también alfalfa y soja entre otros [64], [70].



Figura 19. Daño causado en la planta de maíz

La oruga cogollera afecta la calidad de las plantas ya que las larvas se alimentan de los bordes y márgenes, constituye un factor limitante del cultivo en diversas etapas fenológicas de desarrollo, incluso, próximas a la floración ya que reduce el vigor de la planta. El mayor daño, es causado cuando muerden la corona de las plantas, causando debilidad, pobre desarrollo y eventualmente, la muerte de la planta [71].

Respecto al ciclo de vida, a los dos o tres días posteriores a la cópula, la hembra inicia la oviposición; coloca normalmente 1000 huevos en total, en grupos de 300 o más huevos blancuzcos en forma de banda o cintas cubiertas de pelos proveniente del cuerpo de ella, preferentemente en el envés de las hojas. Las mariposas prefieren ovipositar en las hojas con menor daño ocasionado por larvas de la misma especie. Cuando las larvas están por nacer, los huevos toman una coloración grisácea [64],[66]. Cada hembra deposita durante su vida, de aproximadamente 10 días, entre 500 a 2000 huevos, en grupos. Luego de 48 h eclosionan las larvas (fig. 20).



Figura 20. Larvas de S. frugiperda recientemente eclosionadas.

Posteriormente se dispersan, responden positivamente a la luz y roen las láminas de las hojas jóvenes, respetando la epidermis opuesta. Son activas tanto de día como de noche, a partir del cuarto estadio perforan las hojas o las destruyen desde sus bordes. El periodo larval dura un promedio de 25 días, pasando generalmente por seis o siete estadios, mudando por larva neonata, L1, L2, L3, L4, L5 y pupa (fig 21).



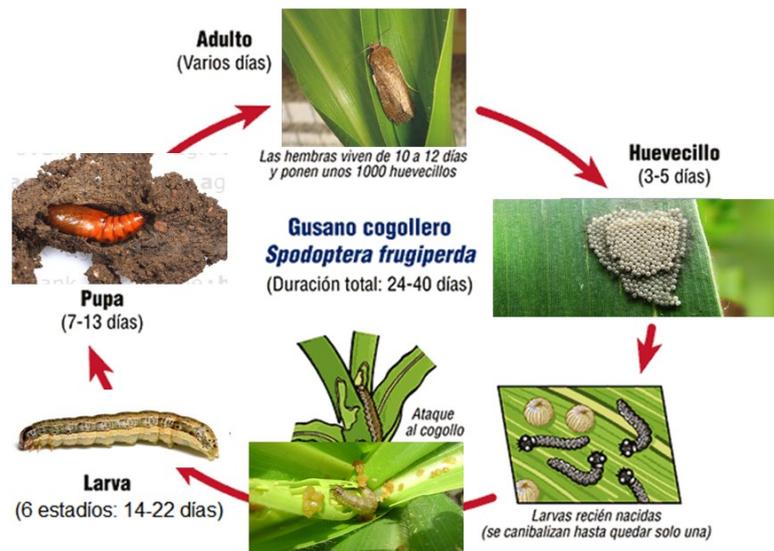
Figura 21. Estadios larvales de S. frugiperda.

Cuando son pequeñas son color claro, y en la medida que van pasando por los diferentes estadios de crecimiento, su color es más amarronado; hacia el final del desarrollo, su voracidad es importante, ya que luego de destruir el cultivo, migran en grupo hacia otro cultivo. La larva adulta alcanza los 4 cm de longitud, como se observa en la fig. 22.



*Figura 22. Larva de *S. frugiperda* en estadio 5.*

Para completar su desarrollo las larvas consumen en promedio, 180 cm² de superficie foliar de hojas de maíz y dejan de alimentarse justo antes de alcanzar el último estadio larval. Estas pasan inadvertidas hasta que alcanzan 20-25 mm cuando son detectadas por sus daños, expresados en hojas que ya están perforadas al momento de desplegarse. Para pupar, se entierran en el suelo unos pocos centímetros bajo la superficie, para posteriormente emerger como adulto [65]. En resumen, podemos visualizar el ciclo de vida tal como lo representa la siguiente figura 23.



*Figura 23. Ciclo de vida de *S. frugiperda**

Tuta absoluta (Familia Gelechiidae)

Gelechiidae está integrada por microlepidópteros de 8 a 18 mm de longitud, los cuales poseen alas anteriores largas y estrechas y un segundo par de alas de forma trapezoidal. Se las conoce como “polillas de las casas y depósitos”, abarcando aproximadamente 4000 especies; poseen hábitos variados y atacan diferentes estructuras vegetales[64].

T. absoluta es un microlepidóptero de importancia, dado el daño que causa en el cultivo de tomate, solanácea de alto consumo y producción en nuestro país. Esta especie fue reportada inicialmente por Meyrick en 1917 en Perú, pero se extendió por todo el Sur de América. Uno de los primeros reportes la sitúa en Brasil en Septiembre de 1979 en el estado de Paraná, desde donde se propagó hasta ser considerada un serio problema para la producción de tomate desde entonces[72].

El cultivo de tomate ocupa el cuarto lugar en la producción mundial de hortalizas luego de la papa, batata y mandioca, con una superficie cultivada aproximada de 3.700.000 ha y producción de 125 millones de toneladas (tn) anuales. En nuestro país, de acuerdo a lo reportado por la FAO (2010), el consumo per cápita alcanza los 16 kg/persona/año. Argentina es el segundo país productor de *Solanum lycopersicum* después de Brasil, se cultivan 22.000 ha de las cuales 1185 ha corresponden al cultivo bajo cubierta, con una producción anual de 750.000 tn, del cual un 60% se consume fresco y el resto se industrializa. Mendoza es la principal provincia productora, le siguen en orden de importancia Salta, Jujuy, Río Negro, San Juan y Buenos Aires[73].

La distribución mundial de *T. absoluta* ha estado restringida al sur del continente americano hasta hace pocos años; debido a la gravedad de sus daños y a lo limitado de su área de distribución, es un insecto incluido en los programas de cuarentena de otras áreas del mundo, como Estados Unidos y en la Unión Europea (UE). Desde 2006 se detectó y confirmó la presencia en cultivos de tomate de varios puntos de la franja mediterránea, donde los daños provocados fueron de seria importancia [74]. Podemos observar cómo se extendió esta plaga cuarentenaria a todo el mundo desde América en la fig. 24.

La peste que infesto los cultivos de tomate

Desde 2008, *T. absoluta* se ha propagado por 15 países africanos elevando los costos tanto para productores como consumidores

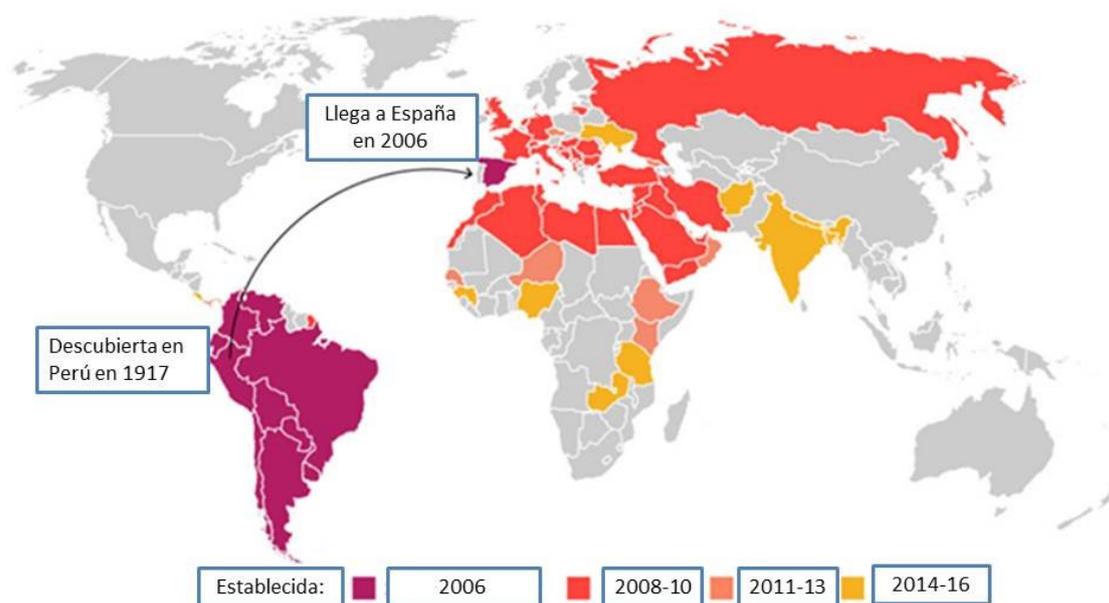


Figura 24. Invasión de *Tuta* en cultivos de Tomate. (Modificado de <http://www.desdemonadespair.net/2016/06/africa-has-tomato-problem-miner-grubs.html>).

Esta plaga en la planta de tomate provoca el barrenado de brotes que conlleva a la pérdida del ramillete floral de la planta de tomate y otras solanáceas, luego realiza galerías lacunares en las hojas (es decir que consumen el mesófilo dejando intacta la epidermis) que externamente se evidencia por la acumulación de excrementos de color negro; también ataca los frutos perforándolos hasta el punto de putrefacción [64],[74].

Esto último mencionado es de suma importancia y es por ello que al comienzo del presente capítulo se mencionaban las vías de ingreso a la planta y al insecto por parte del insecticida, ya que en el caso de *T. absoluta*, es esencial que los compuestos aplicados para ser ensayados posean actividad sistémica o bien translaminar, para que justamente el compuesto con actividad biológica quede retenido en el mesófilo, asegurando un efecto residual y contacto con el microlepidóptero.

Respecto el ciclo de vida, *T. absoluta* transcurre cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto que se resume en la siguiente fig. 25.

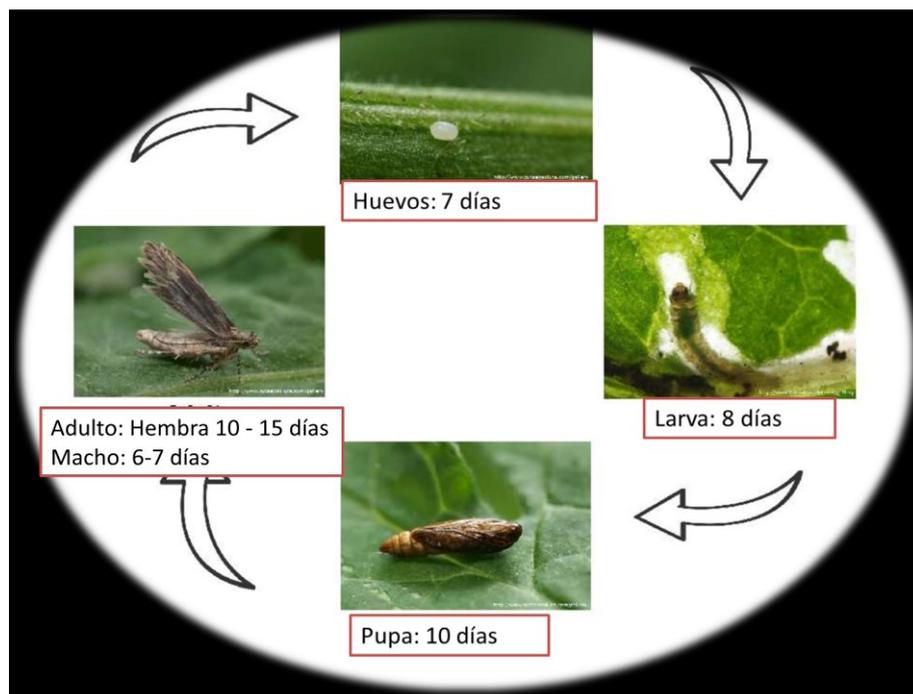


Figura 25. Ciclo de vida de T. absoluta

La hembra ovípara deposita aprox. 100 huevos aislados en las partes menos pilosas de la planta. Los huevos son de forma ovalada y miden aprox. 0,5mm, de coloración amarillenta recién depositados y al final del desarrollo toman un color pardo claro. La larva neonata mide 1mm, el cuerpo tiene color blanco amarillento con cabeza pardo oscura. A partir del segundo estadio, presenta un color verdoso que mantiene hasta el final de su desarrollo. Cumplido éste, comienza a construir un capullo sedoso para empupar, en los repliegues de las hojas en la base de las plantas, la hojarasca, debajo del cáliz de los frutos e incluso debajo de tierra y a los 7 a 9 días emergen los adultos [64].

Teniendo en cuenta que el comercial fipronil es un insecticida de amplio espectro, que se aplica en plantas, en suelo o en semillas; y que nuestros compuestos presentan una estructura base similar a éste, se consideró viable la opción de evaluar su potencial actividad biológica a través de un *screening* mediante al microlepidóptero *T. absoluta*. Esta decisión se fundamenta en que justamente si bien fipronil se ensayó en una gran cantidad de insectos, no hay antecedentes, de acuerdo a nuestras búsquedas, de su actividad insecticida en *T. absoluta*. Esto motivó a evaluar nuestras estructuras químicas sintetizadas previamente, similares estructuralmente a fipronil y determinar su efecto insecticida en organismos plagas de interés.

Por ello, es preciso remarcar que tanto *S. frugiperda* y *T. absoluta* son conocidos por su utilidad para estudiar nuevos compuestos [63], [75] habiéndose utilizados para muchos bioensayos con *N*-fenilpirazoles [34], [76], [77]. Dado que las sustancias que pertenecen a la familia de los fenilpirazoles suelen poseer actividad insecticida similar a fipronil [78], es que se seleccionaron compuestos sintetizados y testearon utilizando la oruga militar *S. frugiperda* y a *T. absoluta* como modelos biológicos de lepidóptero, y microlepidóptero respectivamente. Se eligió a *Tuta absoluta*; justamente para evaluar familias con características estructurales similares y a su vez diferentes en cuanto al comportamiento, considerando que unas afectan cultivos agropecuarios principalmente y este último modelo involucra hortalizas y verduras en general, es decir, relacionado a la cadena agroalimentaria pero en diferentes eslabones de productividad y uso por parte del consumidor.

Hasta aquí se presentaron los modelos biológicos correspondientes a la búsqueda de actividad insecticida por parte de nuestros compuestos de síntesis. Por otra parte, y en relación a los objetivos planteados en el presente trabajo, se evaluó también si los compuestos de síntesis presentan actividad antifúngica. Entre los causantes de enfermedades que afecten la producción de soja, maíz y trigo se encuentran los hongos fitopatógenos, como contraparte a saprófitos. Se presenta una breve reseña de la importancia de los fitopatógenos en el desarrollo de la producción y por ello la evaluación de nuestros compuestos, ya que algunos pirazoles son utilizados como fungicidas, lo cual alentó nuestro interés a considerarlos.

Hongos fitopatógenos

Con el incremento creciente que ha tenido la agricultura en nuestro país y a nivel mundial los últimos años, que ha incorporado nuevas técnicas agropecuarias, formas de trabajo y adaptación de suelos, se han modificado las formas de labranza. Esto sumado a los cambios climáticos y sus secuelas, hace que las prácticas agrícolas requieran una atención constante y un aseguramiento del rendimiento para el productor de su producción utilizando diversos plaguicidas para ello.

La introducción de técnicas agrícolas del tipo “siembra directa” en los cuales el suelo no recibe una remoción y aireación antes de introducir la semilla, hace que sea un reservorio de micelios y protección de patógenos que habitan el suelo o que no fueron combatidos en el cultivo anterior. Estas características hacen que los cultivos estén más propensos a ser

infectados con algún patógeno del suelo, ya sea en la semilla, en el crecimiento de la planta o antes de la cosecha [79], [80].

En los últimos años se observó un incremento en los sembrados, no sólo de las enfermedades provocadas por patógenos que afectan hojas, tallos, vainas y semillas de cultivos sino también las ocasionadas por aquellos que habitan en el suelo. Entre los patógenos que afectan los cultivos agropecuarios en nuestro país, podemos mencionar los hongos que se llevan o transmiten por lotes de semillas, por ejemplo *Colletotrichum truncatum*, causante de la antracnosis; *Peronospora manshurica*, causante del mildiu; *Corynespora cassicola*, causante de la mancha anillada; *Myrothecium roridum*, causante de la mancha foliar y *Sclerotinia sclerotiorum*, causante de la podredumbre húmeda del tallo [5], [79].

Entre los hongos que habitan el suelo, podemos encontrar especies de *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium sp.* Y *Phytophthora sojae* que provocan podredumbre de raíces y base del tallo [5], [79].

Las especies patógenas de hongos que afectan la simiente pueden causar la disminución del poder germinativo, la producción de micotoxinas, facilitar el ingreso de otros patógenos, disminución de la calidad de nutrientes y por ende la calidad comercial; como así también la muerte o enfermedad de la planta y por ende, disminuir el rendimiento global del cultivo.

Como ejemplo de enfermedades a cultivos producidas por fitopatógenos, en la tabla 8 se pueden resumir las principales enfermedades y los agentes causales involucrados en el deterioro de la calidad sanitaria de la semilla de soja en Argentina [81].

Tabla 8: Principales enfermedades fúngicas en Argentina.

Enfermedad	Patógeno Causante
Tizón del tallo y la vaina	<i>Phomopsissojae</i>
Mancha púrpura	<i>Cercosporakikuchii</i>
Mancha ojo de rana	<i>Cercosporasojina</i>
Cancro del tallo	<i>Phomopsisphaseolivar. Meridionalis</i>
Mildiu	<i>Peronosporamanshurica</i>
Antracnosis	<i>Colletotrichumtruncatum</i>
Mosaico	<i>Soybeanmosaic virus</i>
Deterioro por cosecha demorada	<i>Fusarium sp – Alternariasp</i>
Deterioro en almacenaje	<i>Penicillumsp – Aspergillus sp</i>

Dentro de los fitopatógenos que afectan la semilla de los cultivos, podemos destacar a los géneros *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *C.kikuchii*, *C. sojina* y *A. niger*; particularmente estas cuatro variedades de hongos fitopatógenos y *Trichoderma sp.*, como saprófito, fueron los considerados para el desarrollo de los ensayos de la tesis.

Alternaria sp.: la enfermedad que provoca es conocida como “podredumbre de la semilla”. Es frecuente encontrarla presente en todas las partes de la planta, aunque suelen asociarse a vainas y semillas; ingresa fácilmente por heridas y aberturas naturales de la semilla como el hilo, poros, micrófila. Es por eso que es uno de los patógenos involucrados en el deterioro a campo, en plantas que llegada a la madurez, no pueden ser cosechadas a tiempo en condiciones ideales, por excesivas precipitaciones. Predisponen su infección, las heridas hechas por insectos (picaduras de chinches), las heladas tempranas, las lesiones por daño mecánico durante la cosecha y condiciones ambientales de humedad [81].

Los daños en el campo aparecen en manchas foliares alargadas, color marrón y con anillos concéntricos; estas hojas infectadas se secan y caen precozmente. En la semilla presentan un micelio adherido a la cubierta seminal, pueden ser más pequeñas, arrugadas, con lesiones oscuras, y su germinación se ve disminuida por asociación con otros tipos de daños, los cuales se ilustran fig. 26:



Figura 26-Efecto de Alternaria en hoja de soja, Modificada de [82]

Alternaria sp. presenta un alto impacto epidemiológico ya que puede producir micotoxinas afectando la calidad del grano y por ende disminuir el valor de su producción además de sufrir restricciones en cuanto a la exportación. Los efectos toxicológicos de las micotoxinas incluyen los productos finales de la cadena de alimentos como en vinos, tomate, entre otros, ya que puede producir hasta 14 especies diferentes de toxinas [81].

Fusarium sp.: En la región sojera núcleo o centro de nuestro país, que incluye las provincias de Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y Entre Ríos, fue el patógeno registrado con mayor frecuencia en las últimas campañas agrícolas. Es el causante del marchitamiento, tizón, podredumbre radicular, pudrición de la vaina, desde la invasión de semillas, restos de cultivos y suelo. Entre los factores de riesgo involucrados, se postulan: el monocultivo, por su alta fertilidad en materia orgánica, fósforo y magnesio, suelos mal drenados, semillas contaminadas, estrés térmico o hídrico de los cultivos, o bien el hecho de postergar la cosecha por altas precipitaciones que favorecen la proliferación[83].

En el campo las plántulas en estado emergente, muestran lesiones de color crema, en la medida que maduran las áreas se tornan marrón oscuras a negras, evolucionando a la necrosis internerval y la consiguiente caída de folíolos. Las vainas pueden secarse y en el caso de las semillas, las infectadas no germinan; en otros estadios las plántulas desarrollan la podredumbre de la raíz tornándose estas quebradizas y destruyendo el sistema radical secundario[84](fig. 27).



Figura 27. Efecto de Fusarium en semilla de algodón extraída de [85].

Cercospora sp.

Las enfermedades de fin de ciclo (EFC) de los cultivos, son aquellas que se presentan en los estadios reproductivos intermedios-avanzados ocasionando defoliación prematura y madurez anticipada del cultivo que se relaciona directamente con presencia de *Cercospora sp.* Las EFC son las responsables de severas reducciones en el rendimiento y la calidad con el consecuente impacto negativo en la producción y rentabilidad del cultivo[86]. Su incidencia, al igual que en otros tipos de hongos, se ha incrementado por la modificación de las prácticas agrícolas, la carencia de rotaciones, y condiciones climáticas especiales como extrema sequía, o excesos de lluvias, entre otros.

Las especies del género *Cercospora* causan mayoritariamente lesión en las hojas; de acuerdo a la prevalencia, son responsables del tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla (*C. kikuchii*) y la mancha de ojo de rana (*C. sojina*). El tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla esta globalmente muy difundida, la primera vez que se describió fue en Corea en 1921 por Matsumoto y Tomoyasu. En nuestro país en la región central de la provincia de Santa Fe desde el año 2000, el incremento de la prevalencia del tizón fue motivo de gran preocupación[86].

C. kikuchii permanece en los restos de plantas afectadas y en las semillas, las que aun siendo asintomáticas se transforman en portadoras constituyendo reservorios de este patógeno. La infección ocurre en el periodo de floración, aunque se puede iniciar en el estado de emergencia; el viento y el salpicado de lluvia son agentes de diseminación del hongo, iniciando infecciones secundarias, a su vez, prolongados periodos con temperaturas de 28-30°C y alta humedad, favorecen el desarrollo de la enfermedad. A continuación se observa (fig. 28) los efectos descriptos.



Figura 28 a y b: Tizón de la hoja. c: mancha púrpura de la semilla ocasionada por C. kikuchii. Extraídas de: a y b: adaptado de [86] y c: Adadptado de [87].

La mancha de ojo de rana (MOR) causada por *C. sojina* fue descripta inicialmente en Japón en 1915; es una enfermedad de ubicación foliar pudiéndose presentar además en tallos, semillas y vainas observando pequeñas manchas color castaño rojizo o gris oscuro que forman áreas necróticas. Los síntomas se observan mejor después de la floración y se hacen más evidentes a partir del inicio de formación de vainas [81], [86] (fig. 29).



Figura 29. Mancha de ojo de rana ocasionada por C. Sojina extraída de [86].

Aspergillus sp.

Este género fue descrito por primera vez en 1729, los hongos pertenecientes a este género se multiplican rápidamente sobre materia vegetal almacenada o en descomposición en un amplio rango de temperatura, humedad y aerobiosis contaminando así muchos sustratos, como por ejemplo el maní, por ello su interés agroalimentario. Asimismo, una característica importante es su capacidad de producir toxinas, las principales micotoxinas producidas por *Aspergillus sp.* Son aflatoxinas y ocratoxinas; si éstas se producen sobre alimentos de consumo, conlleva un riesgo para la salud [88].

Conocida como moho negro o podredumbre negra de la corona, esta especie es habitual encontrarla en el suelo, lo cual es favorecido por las malas condiciones de almacenamiento. Puede observarse moho en las vainas, lesiones en las inflorescencias y hojas, putrefacción de raíces y en semillas cuando se desarrolla el micelio color negro, se observa putrefacción, deformación y decoloración. En plantas jóvenes, la muerte ocurre con mucha rapidez, mientras que en plantas adultas, la senescencia ocurre lentamente, iniciándose con el marchitamiento del follaje [89].

Trichoderma sp.

Este hongo es un habitante natural del suelo y puede desempeñarse como saprófito o parásito de los hongos. Conocido por su conducta antagonista y utilizado para biocontrol, debido a su ubicuidad, facilidad para ser aislado, rápido crecimiento y desarrollo en una amplia gama de sustratos, lo que facilita la producción masiva para uso en agricultura. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma sp.* desplazan al fitopatógeno, están principalmente asociados a competición directa por el espacio o los nutrientes, producción de

metabolitos antibióticos, y parasitismo directo sobre hongos fitopatógenos. Su tolerancia a condiciones ambientales extremas y a hábitats donde los hongos causan enfermedad, le permiten ser un eficiente agente de control [88].

Nuestro interés en la búsqueda de actividad fungicida se fundamentó en que una gran variedad de pirazoles están siendo utilizados como antifúngicos en cultivos, específicamente elFRAC (comité de acción de resistencia a fungicida) detalla ciertos pirazoles carboxamidas que son utilizados por su inhibición del complejo II, succinato deshidrogenasa (SDHI) actuando a nivel de la cadena respiratoria de la mitocondria en hongos [50], [90].

Como ejemplos, algunos de los que se muestran en la fig. 30, como bixafen, furametpyr, y fluxapyroxad han sido empleados en la producción de frutas, vegetales, y cereales, también en la industria del vino. Estos pirazoles conforman la categoría de SDHI de FARC ya que presentan otro modo de acción y se resalta que la presencia del grupo amida en la estructura y los sustituyentes en el caso del anillo son importantes para la actividad. También pirazoles carboxamida como rabenazole, sedaxane, fentiopirad, penflufen, iopyrazam, benzovindiflupir, son autorizados por FARC para su uso en agricultura [50], [90].

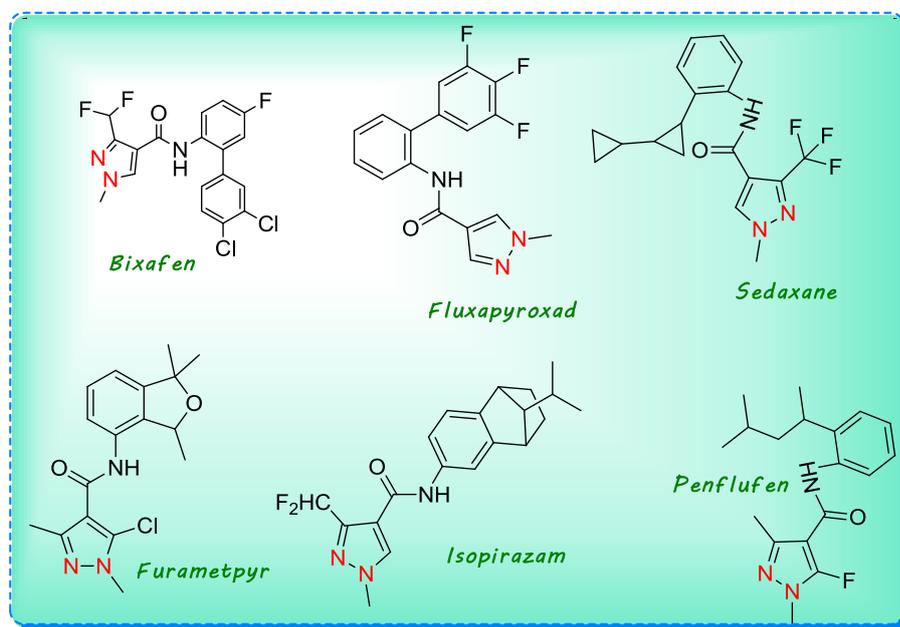
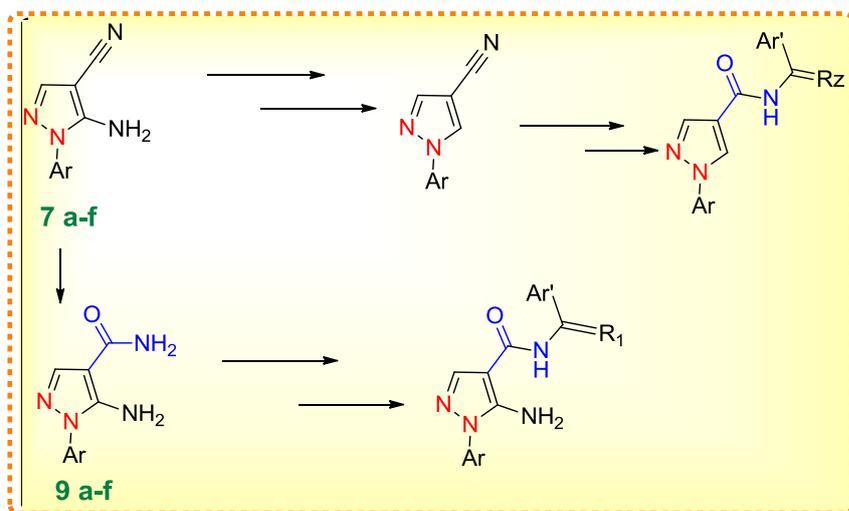


Figura 30. Pirazoles carboxamidas utilizados como fungicidas comerciales.

Como se menciona anteriormente muchos son derivados de pirazoles carboxamida; justamente nuestros pirazoles con grupo CN en posición 4 (serie 7a-f) se transformaron en carboxamida, en la serie 9a-f, con el fin de evaluar su actividad fúngica con ambos grupos

funcionales y proseguir las transformaciones químicas a futuro en el caso de que no presenten actividad esperada. En el esq. 14 podemos visualizar proyecciones a desarrollar para continuar esta línea de investigación.



Esquema 14. Proyecciones de síntesis desde las series sintetizadas.

Objetivo

Evaluar la actividad biológica de moléculas seleccionadas de las series sintetizadas como insecticidas en los modelos biológicos *S. frugiperda* y *T. absoluta*, y como fungicida en los fitopatógenos *Alternaria sp.*, *C. kikuchii* y *C. Sojina.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.* Y el saprófito *Trichoderma sp.*

Metodología

Bioensayo con *S. frugiperda*

Las larvas de *S. frugiperda* utilizadas para los test provinieron de una colonia criada en el laboratorio del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Castelar, Buenos Aires. La población de estudio no estuvo previamente expuesta a insecticidas. Las larvas fueron alimentadas con una dieta artificial a base de harinas de maíz y soja, germen de trigo y yema de huevo, y mantenidas en condiciones controladas de: temperatura, entre 25±3°C, humedad relativa entre 60-70%, y fotoperíodo artificial de 14/10 (L/D)[91].

De la serie sintetizada **7a-f**, 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrilo, a partir de arilhidrazinas y etoximetilmalononitrilo [48], [47], como se describió en el capítulo 1, se seleccionaron **7e**, **7c**, y **7d**, representando a los tratamientos **A**, **B**, y **C** respectivamente (Fig. 31).

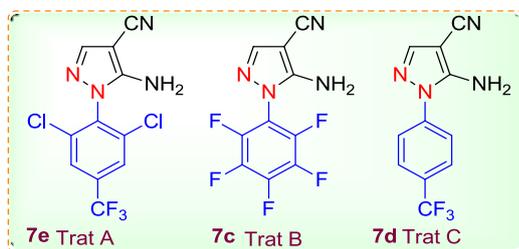


Figura 31. Tratamiento A (7e), B (7c) y C (7d).

Los compuestos fueron disueltos en acetona de grado analítico a 20 ppm de concentración. La actividad insecticida de cada tratamiento fue testada individualmente en larvas de segundo instar o estadio por método de topicación 0,25 µl de solución en el pronotum de la larva. Cada solución (tratamiento) fue aplicada con un microaplicador manual de repetición Burkard y testados en tres repeticiones con diez (10) larvas cada una, es decir 30 larvas por tratamiento, comparando con un tratamiento control en el cual sólo se aplicó acetona.

Las larvas tratadas fueron mantenidas aisladas individualmente en copitas plásticas, alimentadas con dieta artificial bajo las mismas condiciones que en las cámaras de cría. Después de las 24 h de la aplicación fue registrada la sobrevivencia, considerando larva muerta a la que no se mueve, desplaza o no puede realizar movimientos. Cada larva fue chequeada diariamente después del tratamiento hasta terminar el ciclo de vida del lepidóptero.

En cuanto al análisis estadístico, las curvas de supervivencia se compararon utilizando el test de long-rank; el cual propone como hipótesis nula que no hay diferencias entre las poblaciones para la ocurrencia de un evento (ejemplo: supervivencia) a ningún tiempo durante el seguimiento. El análisis se basó en la ocurrencia o calendario de eventos (ejemplo: muerte) de cada grupo, se compararon con el número de eventos esperados si no hubo diferencia entre los grupos [64], [66].

Una vez establecidas las diferencias significativas, la curva fue modelada. La curva de supervivencia fue remodelada empleando el modelo de regresión lineal e incorporando una variable dummy. El modelo propuesto para las observaciones es:

$$y = \alpha + \beta\Delta + \gamma T + \delta\Delta T + \varepsilon$$

Donde: Y: número de larvas que sobrevivieron luego de D días, D: número de días transcurridos; T: tratamiento aplicado para cada compuesto; ε = término de error aleatorio que es asumido es normal para dos nuevos grupos (control y tratamiento) con una matriz varianza-covarianza igual a $\sigma^2 I$ [92]. Los resultados se procesan con el software libre R, y LM (función modelo lineal); el nivel predeterminado de estadístico significativo es 0.05 para todos los casos.

Bioensayo con *T. absoluta*

Las larvas de *T. absoluta* fueron obtenidas de una colonia criada en el laboratorio de PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) CONICET de San Miguel de Tucumán, Tucumán. La colonia fue mantenida en una plantación de tomates en condiciones de temperatura entre $23 \pm 3^\circ\text{C}$, humedad relativa de 70% de y fotoperiodo luz/oscuridad de 14/10 h(L/D).

Dentro de la serie 5-amino-1H-1-irilpirazol-4 carbonitrilos (serie **7**, ver capítulo 1), se seleccionaron para los bioensayos de no preferencia, los correspondientes **7c**:Trat 1; **7e**:Trat 2; **7a**:Trat 3; **7b**:Trat 4, sumado a Fipronil como testigo junto al control (fig.32). Se seleccionaron estos compuestos de síntesis dado que presentan un grupo aril sin sustituyentes, un grupo aril con un átomo de flúor, grupo arilo con cinco átomos de flúor, y el grupo arilo idéntico a Fipronil; para evaluar si la presencia de mayor o menor cantidad de átomos de flúor como átomos de halógeno influye en los resultados.

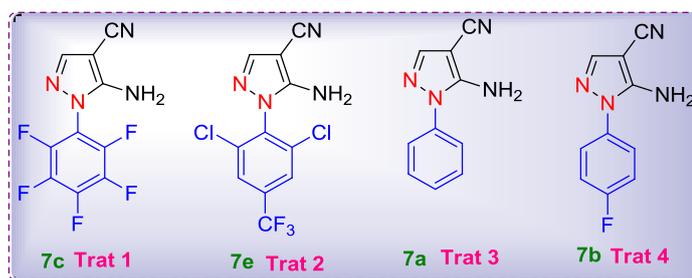


Figura 32. Tratamientos empleados para bioensayos en *T. absoluta*.

Los compuestos seleccionados fueron disueltos en agua/acetona grado analítico (80/20) y 0,01% de Tween (R) 80 contrastando con un control de agua destilada/acetona (80/20) y Tween (R) 80 al 0,01%.

Para el tratamiento se emplearon discos de hojas de *Solanum lycopersicum* variedad *Regina*, cortados con un sacabocado de 2 cm de diámetro. Cada disco fue impregnado por inmersión de cada solución a 500 ppm y se dejó reposar hasta completar la evaporación del disolvente a temperatura ambiente (fig. 33).



Figura 33. A(izq). Hojas de S. lycopersicum inmersa en tratamiento. B(der). secado a temperatura ambiente de hojas tratadas.

Los discos tratados fueron colocados individualmente en cajas de Petri sobre papeles de filtro previamente humedecidos con agua destilada, donde fue colocada una larva de tercer estadio por réplica (30 larvas por tratamiento). Con un programa de análisis de imágenes convencional (CobCal), se midió el área consumida a las 24 h post-tratamiento y se registró el número de larvas muertas a las 24, 48 y 72 h posteriores.

Bioensayo con hongos

Los ensayos se realizaron utilizando los fitopatógenos: *C. kikuchii* NBRC 6711, *C. kikuchii* 19 (aislamiento regional), *C. sojina* NBRC 6715 y *C. sojina* 73 (aislamiento regional), *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. Estas cepas fueron seleccionadas por su importancia fitosanitaria en la región de Santa Fe [16], las cuales fueron obtenidas del cepario de la cátedra de Microbiología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Se realizó la prueba de sensibilidad por difusión en agar de las moléculas sintetizadas en concentración expresada en microgramo por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$), procediendo de acuerdo a los

métodos de referencia aprobados por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) modificados (CLSI: M51-A 2010) [93].

Se plaquean 20 ml de agar papa dextrosa (APD) esterilizado previamente en cada placa de Petri, y una vez solidificado y enfriado, se inocularon por hisopados con los diferentes fitopatógenos a partir de un inóculo concentrado de 10^5 UFC/ml. A cada placa se le realizaron pocillos de 5 mm de diámetro con un sacabocado. Los compuestos de las series **7a-f**; **9a-f** y **14a-f**, sintetizados se ensayaron a 2500 ppm en dimetilsulfóxido (DMSO) con los diferentes fitopatógenos. La incubación se extendió durante cinco días con ciclos de 16/8 h luz/oscuridad a 25°C y se examinó en búsqueda de halos de inhibición de crecimiento.

En la fig. 34 se observa los pocillos donde se distribuyeron los tratamientos a ensayar

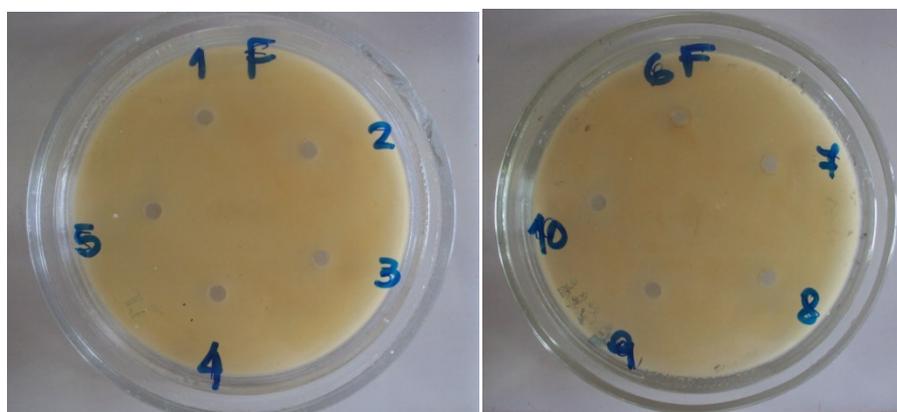


Figura 34. Pocillos a tratar frente a fitopatógenos.

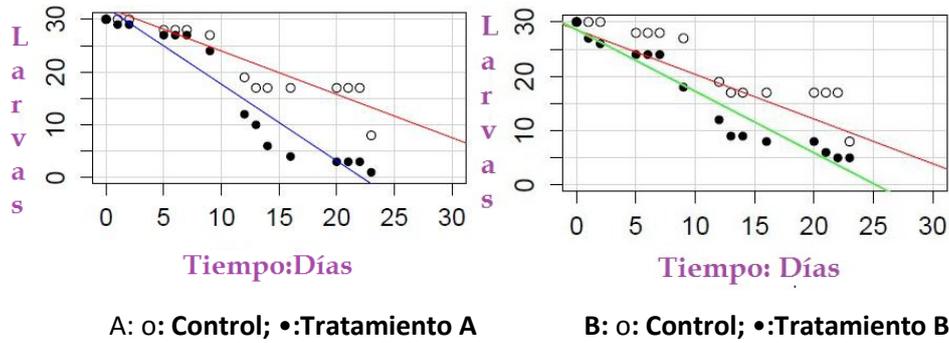
Resultados y Discusión

*Bioensayos con *S. frugiperda**

Con el tratamiento A [(compuesto **7e**) ver apartado de Metodología], los modelos ajustados para ambos grupos fueron: $Y(\text{ajustado, control}) = 32.2 - 0.82D$; $Y(\text{ajustado, tratamiento A}) = 32.2 - 1.45D$. Las diferencias entre las pendientes fueron significativas para los valores $p = 3.3 \times 10^{-4}$ y los valores de $R^2 = 0.91$; lo cual indica un muy buen ajuste lineal al igual que el tratamiento B (**7c**), donde el modelo ajustado para los dos grupos fue: $Y(\text{ajustado, control}) = 28.57 - 0.82D$; $Y(\text{ajustado, tratamiento B}) = 28.57 - 1.13D$; las diferencias entre las pendientes fueron significativas con valores $p = 2.2 \times 10^{-2}$ y el valor de $R^2 = 0.92$.

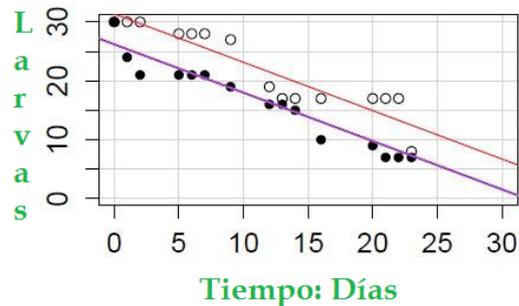
Para el tratamiento C (7d), los modelos ajustados para ambos grupos fueron: Y (ajustado, control) = $31.36 - 0.82D$; Y (ajustado, tratamiento C) = $26.20 - 0.82D$; en este caso las diferencias entre las pendientes no fueron significativas, las líneas resultaron paralelas y los valores de $R^2 = 0.92$

En las graficas 1 a, se muestran los ajustes para cada tratamiento estudiado.



Gráfica 1: Diagrama de escala con ajuste lineal en ambos grupos: (A), Control y tratamiento A y (B): Control y tratamiento B.

La gráfica 2 muestra el ajuste para los datos del control y tratamientos del grupo C, junto con la regresión lineal para cada uno.



Gráfica 2: Diagrama de escala con ajuste lineal en ambos grupos: o Control y • tratamiento C.

Considerando las tres graficas de los tratamientos aplicados, el tratamiento A(7e) fue el más activo respecto a B (7c) y C (7d). Los tratamientos A y B (fig. 35) fueron eficaces, a partir de los 10 días de iniciar el estudio, observándose en el 40 % de los individuos el no poder mudar al siguiente estadio, ni superar el efecto insecticida al ingerir alimento sin tratar provocando la muerte. Por otra parte, los individuos que pudieron continuar con el ciclo, se observó que en la formación de la pupa para la próxima generación se presentaron fallas morfológicas constitutivas.

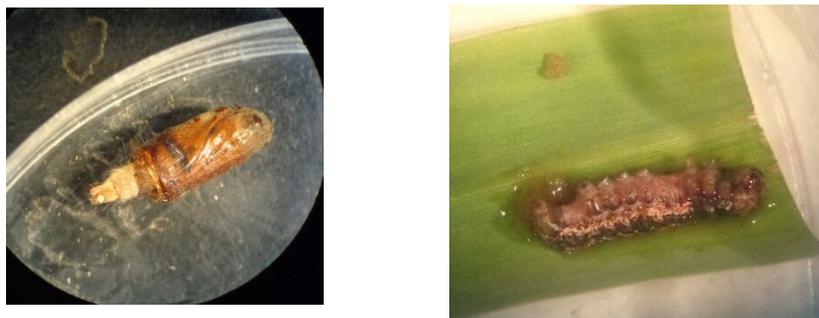


Figura 35. A: pupa deforme, B: Larva muerta por tratamiento.

Estas observaciones de los tratamientos A y B, confirman un patrón esperado en el caso del tratamiento A, ya que la molécula empleada en ese tratamiento es la que más se asemeja estructuralmente a fipronil. En este sentido, presenta el anillo aromático en posición 1 (2,6-dicloro-4-trifluorometil) idéntico a fipronil y coincide en que esta parte de la estructura es la más activareportada con estudios en líneas celulares de *S. frugiperda* con fipronil, donde se estableció su alta letalidad en los ensayos [76] con lo cual si se extrapola al insecto real, encontrar que presentó actividad notoria a 20 ppm, coincide con lo esperado de acuerdo a la literatura.

A su vez, el tratamiento B que emplea la molécula **7c**, demostró gran actividad de interés como insecticida, y puede deberse a que el anillo aromático se encuentra rodeado de sustituyentes halogenados, lo cual coincide con que la presencia de estos átomos incrementa la actividad biológica como se ha reportado en otros estudios que resaltan la incorporación de átomos de flúor u otros halógenos en su estructura [10].

Estos comportamientos se asocian a los reportados de Fipronil que presenta una actividad insecticida de excelencia dada su capacidad de interactuar a nivel del GABA, bloqueando los canales de apertura de Cl^- provocando excitación, convulsión y muerte [13]. Es de suponer que los compuestos ensayados, al presentar grupos farmacofóricos similares a Fipronil, interactúen a nivel de estos moduladores generando una muerte en el insecto, pero más moderada en el tiempo que Fipronil. Si bien, esto debe ampliarse con estudios de modelado molecular y otras concentraciones, a priori es altamente probable que interactúe a nivel del sistema nervioso central el insecto como otros arilpirazoles lo hacen [66], [64], [94].

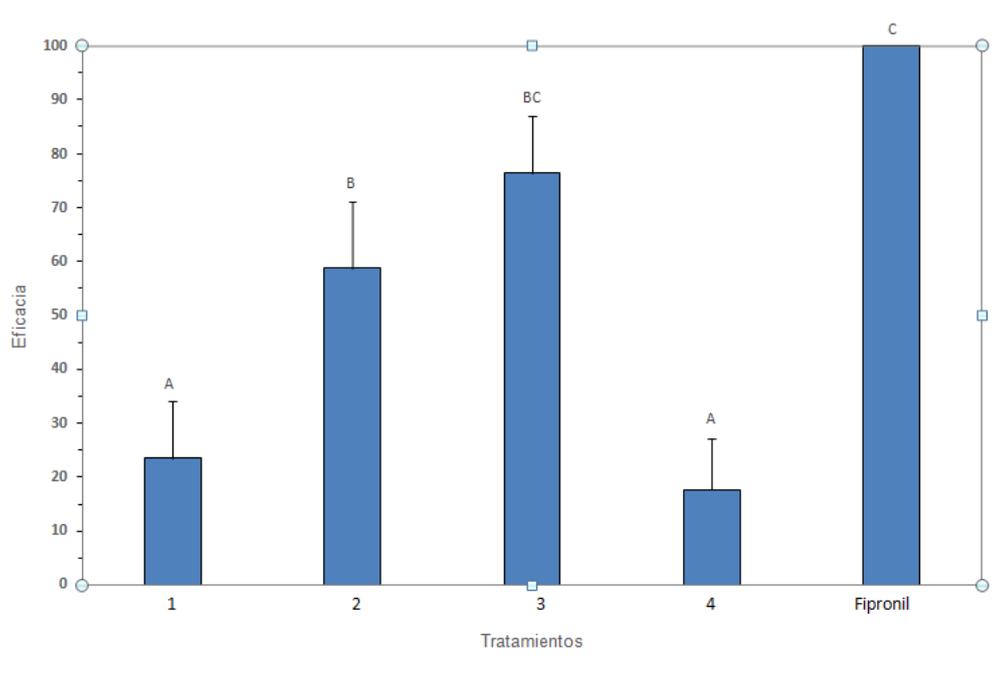
El tratamiento C no mostró efectos significativos en la letalidad, pero un dato relevante es que, durante los ensayos se registró visualmente que las larvas tratadas presentaron un incremento en la ingesta de alimento respecto al control. Los estudios demostraron que difiriendo mínimamente en la estructura química, en el anillo aromático

arilo que solo posee un grupo CF_3 en posición $-p-$ (tratamiento c), respecto los otros dos en los cuales el compuesto ensayado tiene sustituyentes en todo en anillo aromático, influye muy diferente en el comportamiento ya que mientras los tratamientos a y b tiene efectos insecticida, esperable dado su naturaleza fenilpirazólica, fue notorio que la influencia de otro sustituyente aromático con tan mínimas diferencias nos muestra un comportamiento alimentario contrastante.

Particularmente en el caso de *S. frugiperda* no fue posible continuar los ensayos de toxicidad previstos y determinar una concentración letal media (en los casos que fuera posible) dado que los tiempos de trabajo con el grupo de entomólogos de la Universidad de La Plata se vieron interrumpidos. Se acentuaron inconvenientes de crías y adaptación de las larvas contempladas para los bioensayos, generando dificultades para garantizar las condiciones experimentales óptimas. Por ello y sumado a que los tiempos de ambos grupos de trabajo fueron afectados en sus proyectos y dado los altos costos que conllevan tales bioensayos en la Ciudad de la Plata, sumado a los periodos estivales, fue la causa de la falta de datos experimentales para realizar un análisis estadístico más exhaustivo.

Bioensayos con el microlepidóptero T. absoluta

Estadísticamente el modelo lineal generalizado reportó diferencias significativas en cuanto a la eficacia o mortandad de la población ($\chi^2 = 55,57$, gl: 5; 95; $p < 0,01$) y al consumo de hoja ($\chi^2 = 41,37$, gl: 5; 95, $p < 0,01$) entre los distintos tratamientos evaluados. El tratamiento confipronil alcanzó el mayor valor de eficacia seguido por los tratamientos T3 (7a), T2 (7e), T1 (7c) y T4 (7b), difiriendo significativamente con los tres últimos. En cuanto a T3 y T2, los mismos difirieron notablemente con T1 y T4 (graf. 3).



*Gráfica 3: Eficacia de los tratamientos en el control de larvas de *T. absoluta**

Las barras coronadas indican desvío estandar, letras diferentes indican diferencias significativas.

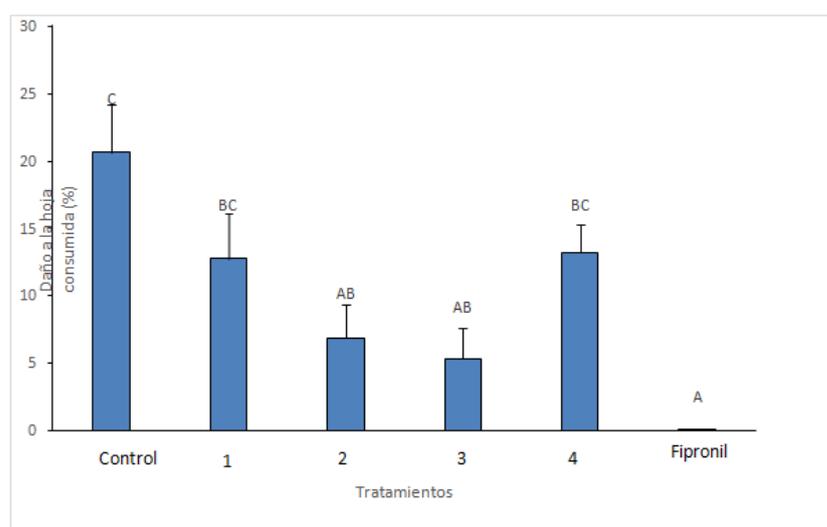
Podemos observar que fipronil registró la mayor eficacia, ya que al cabo de 24h provocó la muerte de toda la población estudiada. Siguieron en eficacia el tratamiento 3 y luego el tratamiento 2. Los tratamientos 1 y 4 mostraron baja eficacia dado que sólo un 25% de la población fue afectada. Estos resultados muestran que el Fipronil, que no tiene antecedentes de aplicación en *T. absoluta*, resultó en un eficaz insecticida con efecto casi inmediato (ya que provocó la muerte de toda la población en 24hs).

Los tratamientos 3 y 2 que le siguen en eficacia a fipronil, son de destacar ya que químicamente son obtenidos por una vía más sencilla que fipronil, no son tan tóxicos y presentan una alta eficacia ya que el T3 exterminó el 75% en la población y T2 el 60% en 48h, reflejando que también presentan un efecto residual de importancia; ya que atraviesan toda el haz de la hoja o el mesófilo donde *T. absoluta* invade.

Los resultados obtenidos se presentan sumamente alentadores al desarrollo y aplicación en los cultivos afectados por *T. absoluta*, considerándose como una alternativa de control y combate a la resistencia de *T. absoluta*, que hasta el momento los insecticidas aplicados no son del todo eficientes. En este sentido, insecticidas como carptap, permetrina, abamectina y metamidofos, suelen utilizarse normalmente para el control de *T. absoluta*,

perohan demostrado que no son lo suficientemente eficaces en los comienzos, ya que esta plaga presenta resistencia [72], [95].

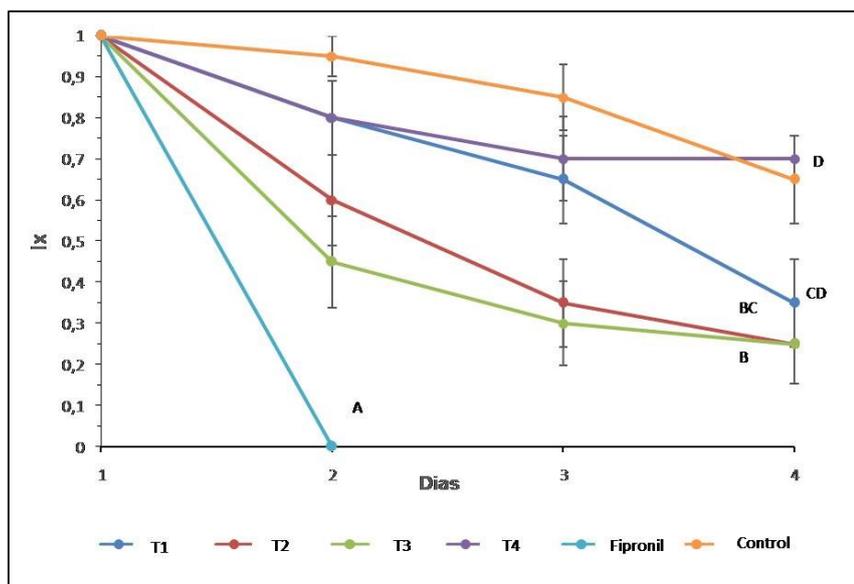
En lo que respecta al consumo de hoja de tomate (*Solanum lycopersicum*), el fipronil impidió el consumo de la lámina del foliolo por las larvas de *T. absoluta*, mientras que en T3 y T2 se redujo notoriamente el daño y/o consumo de dicho foliolo con respecto al control. Los restantes tratamientos (T1 y T4) presentaron daños similares al control (Graf. 4).



*Gráfica 4: Porcentaje de hoja dañada y/o consumida por larvas de *T. absoluta* ensayadas con diferentes tratamientos.*

Esto evidencia el eficaz efecto insecticida de fipronil a las 24 h de aplicado y, considerando que este insecticida actúa por contacto en el insecto y por acción sistémica ingresa a la planta [8], al matar por contacto al insecto, las orugas no alcanzaron a ingerir parte del mesófilo. Es por eso que en la gráfica a continuación de supervivencia de las larvas muestra que disminuyo significativamente el tiempo de supervivencia en los T fipronil, T2y T3 con respecto al tratamiento control. En cuanto a la supervivencia de las larvas en los restantes tratamientos (T4y T1) la misma fue similar al control (graf. 5).

Estadísticamente el análisis de Kaplan-Meier mostró que la supervivencia de la larva fue afectada por el tratamiento ($\chi^2(5, 115) = 52,26, P < 0,01$). La supervivencia promedio de las larvas en días, fue: 2.00 ± 0.00 para TFipronil, 3.00 ± 0.28 para T3, 3.20 ± 0.27 para T2, 3.80 ± 0.25 para T1, 4.20 ± 0.28 para T4 y 4.45 ± 0.19 para el control.



*Gráfica 5: Supervivencia de larvas de *T. absoluta* bajo diferentes tratamientos.*

Los medios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0,05$) (Log Rank (Mantel-Cox) prueba).

Es importante mencionar que el tratamiento 2, compuesto de síntesis **7a**, presenta el anillo pirazólico sin sustituyentes, lo opuesto al tratamiento 1 (**7e**) que presenta en el anillo pirazol dos átomos de cloro en posición orto y en posición para el sustituyente CF_3 (fig.30). Es difícil establecer con estas primeras aproximaciones y ensayos, a qué se debe la actividad biológica de los tratamientos, presentando estructuras tan diferenciada. En estudios a continuar se prevé dilucidar a que deben su diferencia o su similitud.

Se evidencia a partir de los resultados, que el compuesto **7a**, es altamente efectivo y sumamente sencillo de sintetizar a diferencia de fipronil. Resulta esto relevante, en el sentido de que el compuesto **7a** no posee átomos de cloro u otros halógenos en su estructura, siendo menos tóxico, y su síntesis es a partir de reactivos comercial y accesible comercialmente, de bajo costo. Además, el rendimiento como se mencionó en el capítulo 1 es excelente (93%), lo cual procede de una síntesis limpia y eficaz, por ello que presente tal efectividad frente a *T. absoluta* es una llave para, si pensamos a futuro, poder acercarlo a los productores de tomate (y otras solanáceas afectadas por esta plaga), que estén interesados aplicarlos, sería un producto accesible económicamente, poco tóxico y altamente efectivo.

La actividad tan destacada como insecticida del compuesto **7e** (trat 2) coincide con la actividad que mostro en los ensayos como insecticida en *S. frugiperda* (tratamiento

a), alentando ensayos con esta molécula y perfeccionándola, manteniendo la estructura del anillo aromático con átomos de halógenos. El compuesto **7a** no se ensayó en *S. frugiperda*, por lo que se desconoce cómo actúa frente a este lepidóptero.

Bioensayos en hongos

Se ensayaron los compuestos de las series **7a-f**; **9a-f**; **12a-f** y el purificado del formulado comercial: **fipronil**, los resultados fueron en todas las series similares como se observa en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de los bioensayos en fitopatógenos.

Cepa	cc ensayada(μg/ml)	Inhibición
<i>C. kikuchii</i> NBRC 6711	2500	Negativa
<i>C. kikuchii</i> 19 (A.R)	2500	Negativa
<i>C. sojina</i> NBRC 6715	2500	Negativa
<i>C. sojina</i> 73 (A.R.)	2500	Negativa
<i>Fusarium sp.</i>	2500	Negativa
<i>Alternaria sp.</i>	2500	Negativa
<i>Trichoderma sp.</i>	2500	Negativa
<i>A.niger</i> ATCC 16404	2500	Negativa

En las imágenes a continuación (fig. 36) se observan el crecimiento homogéneo de *Fusarium* (a), *C. kikuchii* (b) frente a diferentes compuestos ensayados.

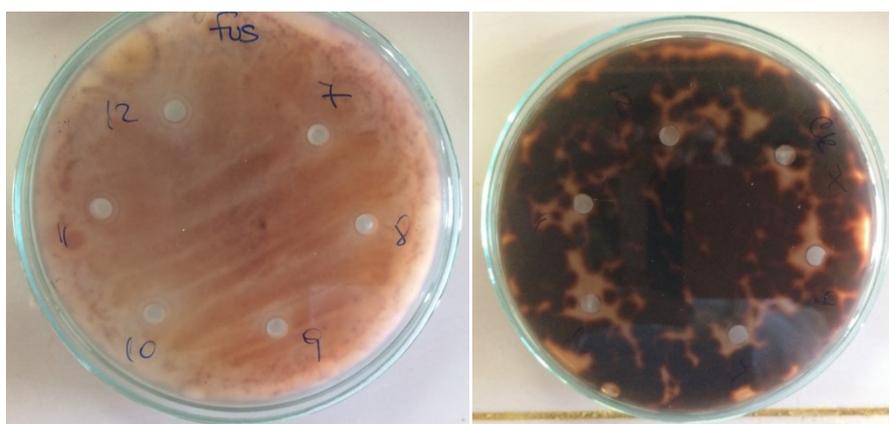


Figura 36. A(Izq). Crecimiento de Fusarium frente a los tratamientos ensayados. B (Der). crecimiento de C. kikuchii frente a los tratamientos ensayados.

Como así también el crecimiento sin inhibición de ningún compuesto a los diferentes fitopatógenos, ejemplificado a continuación en la fig. 37 *C. sojina* (izquierda) y *Alternaria sp.*(derecha)

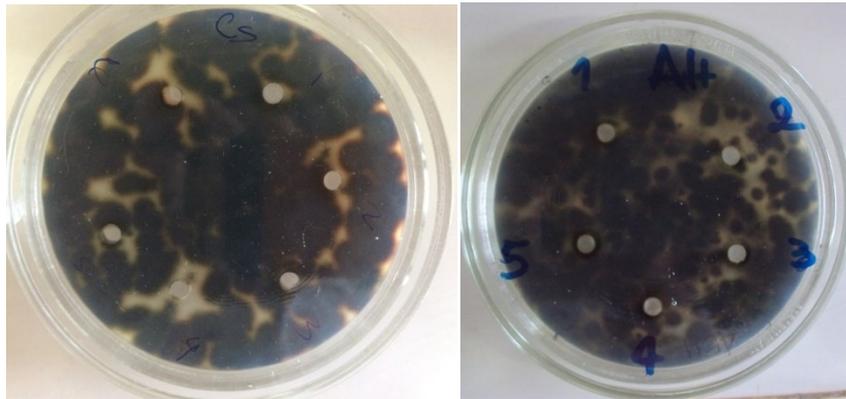


Figura 37. A(Izq)· crecimiento de *C. Sojina* frente a tratamientos aplicados· B (Der)· crecimiento de *Alternaria* frente a los diferentes tratamientos·

Y al ensayar frente a *A. niger* (Izquierda) y *Trichoderma sp.* (derecha) en la fig. 38

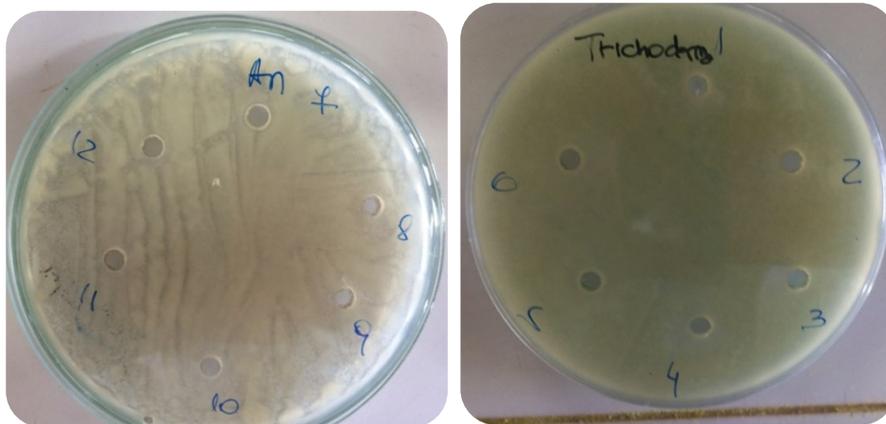


Figura 38. A(Izq)· crecimiento de *Aspergillus* frente a los compuestos ensayados· B (Der)· crecimiento de *Trichoderma sp.* frente a los tratamientos·

S. frugiperda y *T. absoluta*, dependen de estaciones climáticas clave durante el año, donde hay más disponibilidad y su población requiere de semanas para alcanzar el número necesario. Contrariamente, el hecho de poder evaluar la mayoría de los compuestos sintetizados en hongos, se debe a que éstos presentan ventajas, dado a que su evaluación más sencilla a escala laboratorio y la disponibilidad durante todo el año para realizarlos siendo un factor clave.

El resultado de no inhibición de crecimiento con las diversas series sintetizadas y grupos funcionales evaluados, era esperable, dado que si bien muchos arilpirazoles son destacados por su actividad fungicida, debemos especificar que los compuestos que tienen esta actividad frente a fitopatógenos son en su mayoría aquellos que presentan en la posición 4 del anillo pirazólico, grupos carboxamida junto a otros heterociclos, actuando a nivel de la cadena respiratoria en las mitocondrias [76], [77]. Nuestros arilpirazoles no poseen estos grupos funcionales ni esta estructura a diferencia de la serie **10 a-f** que tiene precursores de estos, podría considerarse, ya que tiene el grupo carboxamida en posición 4 pero no poseen heterociclos a continuación, aun así no mostraron inhibición de las cepas ensayadas.

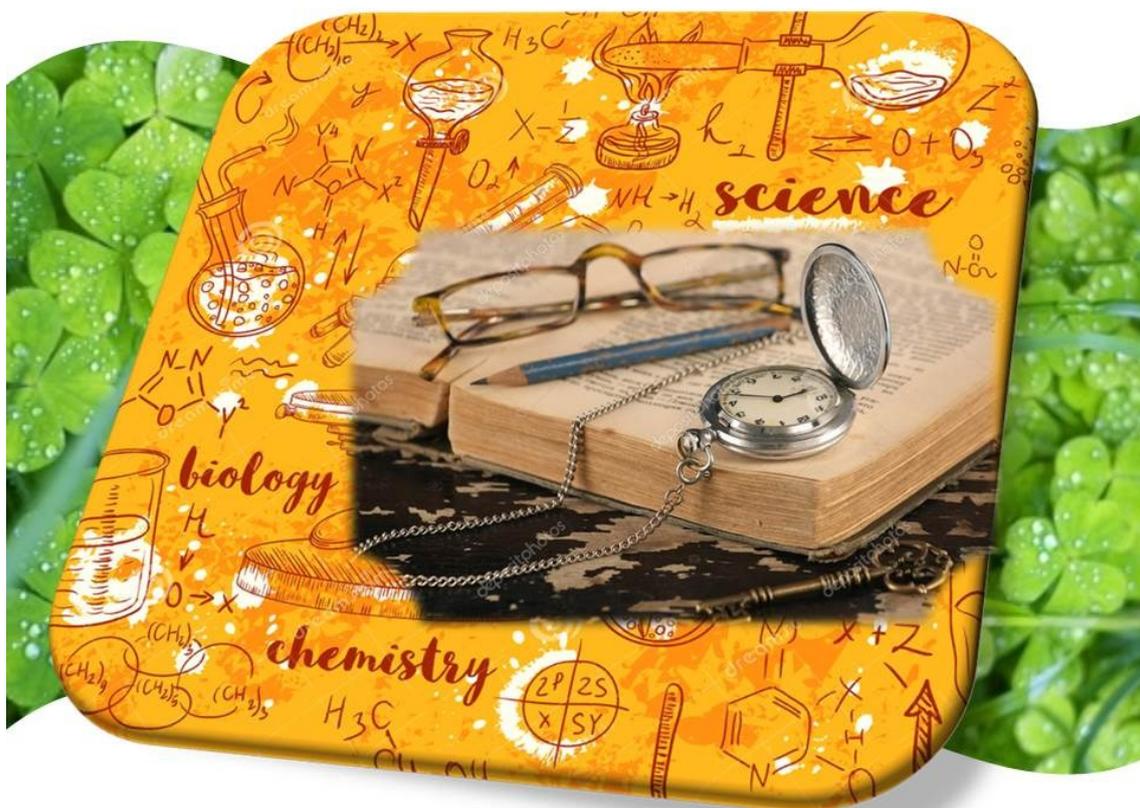
Conclusiones

De los tres compuestos seleccionados (**7a**, **7b**, **7c**) evaluados en su actividad *in vitro* mediante un cribado por aplicación tópica en *S. frugiperda* a 20 ppm, dos de ellos, el tratamiento A (**7e**) [5-amino-1-(2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-pirazol-4-carbonitrilo] y tratamiento B [5-amino-1-(perfluorofenil)-1H-pirazol-4-carbonitrilo](**7c**) mostraron actividad insecticida, principalmente el tratamiento A y luego B, con valores p (3.3×10^{-4} de A, comparado con 2.2×10^{-2} de B).

En referencia a *T. absoluta*, los bioensayos de no preferencia por ingestión demostraron que los tratamientos 2 y 3 correspondientes a los compuestos (**7e** y **7a**) resultaron los derivados activos a 500 ppm frente a este microlepidóptero. El fipronil impidió el consumo de la lámina del foliolo de *Solanum lycopersicum* (tomate) por las larvas de *T. absoluta*, mientras que los T3 y T2 redujeron notoriamente el daño y/o consumo de dicho foliolo con respecto al control. Los restantes tratamientos (T1 y T4) presentaron daños similares al control.

Los compuestos ensayados, correspondientes a las series **7a-f**; **10a-f**; **12a-f** y el comercial fipronil no mostraron actividad frente a los diversos hongos ensayados, los fitopatógenos *Alternaria sp.*, *C. kikuchii*; *C. Sojina*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger*, y al hongo saprófito *Trichoderma sp.*

Capítulo 4: Conclusiones Generales



En el presente trabajo de tesis se realizaron estudios en diversas áreas que incluyen las Ciencias Químicas en cuanto a la síntesis de moléculas de núcleo pirazólico, su purificación, identificación y caracterización; y las Ciencias Biológicas a través de bioensayos de actividad insecticida y fungicida en diferentes modelos biológicos, incluyendo la comprensión del impacto de las moléculas ensayadas en el ciclo de vida de los seres vivos estudiados.

Se logró satisfactoriamente poder alcanzar los objetivos e hitos de evaluación propuestos para la tesis doctoral. En primer lugar, respecto al objetivo central de síntesis de una serie de 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles basados en fipronil, se postuló la síntesis de una serie de pirazoles a partir de arilhidracinas (**4a-f**) y una sal de enolato [etilcianopiruvato de potasio (**3**)] que no se logró sintetizar (serie **5a-f**, capítulo 1); por lo cual se propuso otra vía alternativa para obtener 5-amino pirazoles y continuar con los estudios planteados.

A partir de reactivos comerciales, se sintetizaron y obtuvieron satisfactoriamente dos series **7a-f** y **9a-f** (de siete compuestos químicos cada una, capítulo 1). El grupo **7a-f** (5-amino-1*H*-1-arilpirazol-4-carbonitrilo) posteriormente se transformó a amida en la posición 4 del anillo pirazol originando la serie 5-amino-1*H*-1-arilpirazol-4-carboxamida (**10a-f**, capítulo 2). La otra serie inicial de 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles (grupo **9a-f**) se funcionalizó en la posición 4 del anillo pirazólico, originando la serie 5-amino-[4-(trifluorometil) sulfinil]-1*H*-1-arilpirazoles (**14a-f**, capítulo 2) con el grupo sulfinilo en la posición 4 respectivamente, con 7 compuestos cada una. Esta última serie es la que más se asemeja al principio activo del producto comercial fipronil.

Las reacciones presentaron regioselectividad, las moléculas sintetizadas fueron caracterizadas por espectroscopía de resonancia magnética nuclear, cromatografía gaseosa, espectrometría de masa y demás herramientas analíticas disponibles. Los rendimientos en general, fueron coincidentes con los reportados por la literatura (en el caso de las moléculas ya registradas).

Es de distinguir el desarrollo y la modificación de las variables para lograr poner a punto la técnica de sulfinilación (capítulo 2) incorporando el grupo funcional sulfinilo [-S(O)CF₃] en todas las moléculas de la serie **9a-f**, y lograr rendimientos superiores en varios casos, a los reportados en la literatura y también originar otras moléculas para evaluar y potenciar la actividad biológica buscada.

Por otro lado se logró obtener un testigo de Fipronil a partir de la purificación del comercial CLAP®, lo cual fue esencial para los bioensayos y se logró comparar la eficacia de los compuestos sintetizados respecto al comercial aplicado y tan cuestionado por su toxicidad.

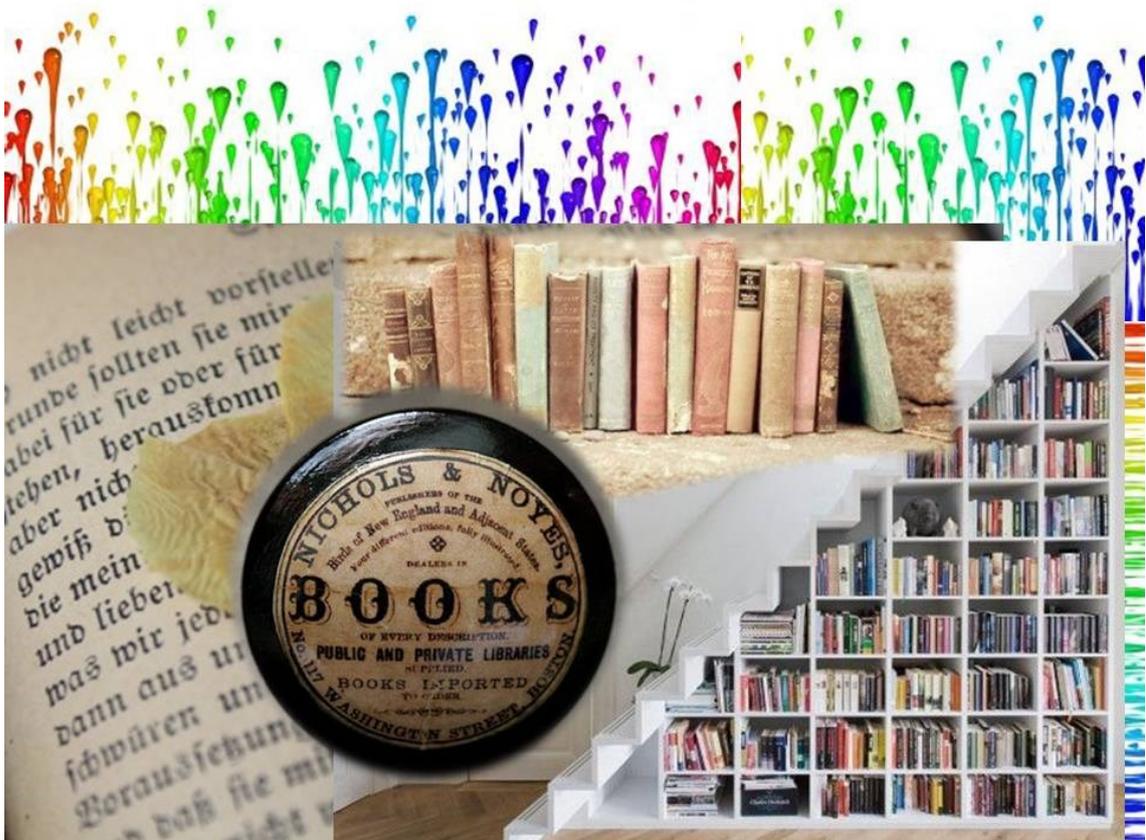
Respecto las series sintetizadas, todas fueron ensayadas para determinar su actividad fungicida junto a fipronil®, en los hongos fitopatógenos *Alternaria sp.*, *C. Kikuchii*, *C. Sojina*, *Fusarium sp.*, *A. niger ATCC*, y el saprófito *Trichoderma sp.* Por otro lado, de la serie **7a-f** sintetizada, se seleccionaron los compuestos **7a**; **7c** y **7e** y se evaluó su actividad insecticida frente al lepidóptero *S. frugiperda*. Asimismo, los compuestos seleccionados **7a**; **7b**; **7c**; **7e** se evaluaron frente a *T. absoluta* como insecticidas. Como resultado de estos bioensayos, se encontró que dos moléculas sintetizadas (**7e** y **7c** para *S. frugiperda*; **7a** y **7e** para *T. absoluta*) en cada caso, presentaron muy buena actividad insecticida comparada con fipronil.

Tal como se mencionó en el capítulo 3, es de destacar, que entre los compuestos activos, resultó más sorprendente la actividad insecticida demostrada por el compuesto **7a**, ya que es altamente efectivo y sumamente sencillo de sintetizar a diferencia de fipronil. Resulta esto relevante, en el sentido de que el compuesto **7a**, que presentó un rendimiento del 93%, no posee átomos de cloro u otros halógenos en su estructura, siendo menos tóxico, y su síntesis es a partir de reactivos comerciales y de bajo costo.

Estos resultados sumados a que los compuestos ensayados presentan actividad translaminar y/o sistémica, asegurando el ingreso en el mesófilo de cultivo a proteger y su efectividad, prometen estudios complementarios de toxicidad y eco-toxicidad para promover su uso como sustituto de Fipronil frente a plagas agrícolas.

Los ensayos biológicos para determinar actividades fungicidas o insecticidas se realizaron de manera satisfactoria, tanto con lepidóptero como con microlepidóptero y hongos fitopatógenos. Asimismo es de destacar el trabajo en conjunto con biólogos y entomólogos del CEPAVE de La Plata, y del PROIMI del CCT de San Miguel del Tucumán. Las tareas interdisciplinarias le permitió a la becaria participar personalmente en los bioensayos, trabajando con los modelos biológicos en forma directa. Fruto de ello, se presentaron posters en congresos y artículos científicos fortaleciendo los vínculos entre las diversas instituciones.

Bibliografía



-
- [1] F Heidhues, A Atsain, H Nyangito, M Padilla, G Ghersi, JC Le Vallée (2004) Development Strategies and Food and Nutrition Security in Africa. *2020 Discuss Pap.*; (38):60.
- [2] Proyecto Food Facility Honduras. (2011) Seguridad Alimentaria y Nutricional: Conceptos Básicos. Vol 3: 1-8.
- [3] J. (Jingxin) Tian, BC Bryksa, RY (2016) *YadaFront Life Sci* 9(3):155-166.
- [4] Altieri, M., (1999). *Agroecology: The science of sustainable agriculture*, 4^o. ed, Agroforestry Systems. Sustainable Agriculture Networking and Extension, New York.
- [5] FAO OMS, (2014), Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas, 1-56.
- [6] Nicholls, C.I., Altieri, M.A., (2013) *Agroecología y cambio climático*, 1^a. ed. Sociedad Científica de Agroecología, Lima.
- [7] Altieri, M., Koohafkan, P., (2008) *Enduring Farms: Climate Change, Smallholders and Traditional Farming Communities*, 1a. ed, Third World Network Penang, Malaysia. Third world network, Penang, Malasia.
- [8] ECJM Puricelli, MC Arregui (2016) *Mecanismo de Acción de Plaguicidas*. 3^a Edición. Rosario, Santa Fé, Argentina.
- [9] S Mert, R Kasimogullari, S Ok (2014) *J Postdr Res* 2(4): 64-72.
- [10] S Fustero, M Sánchez-Roselló, P Barrio, A Simón-Fuentes (2011) *Chem Rev* 111: 6984-7034.
- [11] R Aggarwal, V Kumar, R Kumar, SP Singh (2011) *Beilstein J Org Chem* 7: 179-197.
- [12] M Marinozzi, G Marcelli, A Carotti (2015) *Mini-Reviews Med Chem* 15(4):1-29.
- [13] VL Salgado, S Schnatterer, KA Holmes (2012) Chapter 32.6: Ligand-Gated Chloride Channel Antagonists (Fiproles) Modern Crop Protection Compounds. Second ed. En: (Ed VCH W) Wiley, p 1283-1305
- [14] MH Badii, V Garza Almanza (2007) Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. *CULCyT Impacto Ecol* 18(4): 9-25.
- [15] RA Cloyd, RS Cowles (2010) Manejo de resistencia: principios de resistencia, modo de acción y rotación de insecticidas. *Connect Agric Exp Stn* 1-12.
- [16] MA Sosa (1992) Resistencia de las plagas a los insecticidas. *Misc INTA EEA Reconquista* 5: 5-10.
- [17] MC Montagna (2009) Tesis Doctoral: Toxicidad de agroquímicos sobre especies acuáticas autóctonas: Crustáceos Decápodos. UNL-INALI p 224.
- [18] RE Banks, BE Smart, JC Tatlow (1994) A quick guide to the synthesis of organofluorine compounds en: *Organofluorine Chemistry*. 1- 6.
- [19] M Schlosser (1998) Parametrization of substituents: Effects of Fluorine and Other Heteroatoms on OH, NH, and CH Acidities *Angew Chemie - Int Ed* 110:1496-1513.
- [20] B Baasner, H Hagemann, JC Tatlow (2000) *Organo-fluorine compounds methods index 2*. en: Copyright Thieme Publishing Group, Stuttgart, New York, Rio.
- [21] S Fustero, M Sánchez-Roselló, P Barrio, A Simón-Fuentes (2011) From 2000 to mid-2010: A fruitful decade for the synthesis of pyrazoles. *Chem Rev* 111:6984-7034.
- [22] R Wong, SJ Dolman (2007) Isothiocyanates from tosyl chloride mediated decomposition of in situ generated dithiocarbamic acid salts. *J Org Chem* 72:3969-3971.
- [23] XRLiu, H Wu, ZY He, ZQ Ma, JT Feng, X Zhang (2014) Design, synthesis and fungicidal activities of some novel pyrazole derivatives. *Molecules* 19:14036-14051.
- [24] H Wu, JT Feng, KC Lin, X Zhang (2012) Synthesis and herbicidal activity of substituted pyrazole isothiocyanates. *Molecules* 17: 12187-12196.
- [25] S Fustero, R Román, JF Sanz-Cervera, AS Fuentes, AC Cuñat, S Villanova, M Murguía. (2008) Improved Regioselectivity in Pyrazole Formation through the Use of Fluorinated Alcohols as Solvents: Synthesis and Biological Activity of Fluorinated Tebufenpyrad Analogs. *J Fluor Chem*. 73(9):3523-3529.

- [26] S Fustero, JF Sanz-Cervera, A Simón-Fuentes, R Román, S Catalán, MC Murguía (2009) New fluorinated pyrazol and uracil derivatives: Synthesis and biological activity. en: *ACS Symposium Series*. Vol 1003. C 9: 182-209.
- [27] Z-H Yu, D-Q Shi (2010) Synthesis and Herbicidal Activity of α -Amino Phosphonate Derivatives Containing Thiazole and Pyrazole Moieties. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* 185(8): 1746-1752.
- [28] R Aggarwal, V Kumar, R Kumar, SP Singh. (2011) Approaches towards the synthesis of 5-aminopyrazoles. *Beilstein J Org Chem.* 7:179-197.
- [29] JF Sanz-Cervera, R Blasco, J Piera, et al. (2009) Solution versus fluorous versus solid-phase synthesis of 2,5-disubstituted 1,3-azoles. Preliminary antibacterial activity studies. *J Org Chem.* 74(23): 8988-8996.
- [30] I Okada, S Okui, Y Takahashi, T Fukuchi (1991) Synthesis and acaricidal activity of pyrazole-5-carboxamide derivatives. *J Pestic Sci.* 16:623-629.
- [31] LR Hatton, EW Parnell, DA Roberts (1985) US 4496390.
- [32] L Hatton, E Parnell, D Roberts (1983) WO 83/00331.
- [33] L Hatton, DW Hawkins, E Parnell, CJ Pearson, DA Roberts (1993) US 5232940.
- [34] R Leslie, I Buntain, D Hawkins, E Parnell, C Pearson, D Roberts (1999) US 5961618.
- [35] VL Salgado, S Schnatterer, KA Holmes (2007) Ligand-gated Chloride Channel Antagonists (Fiproles) en *Modern Crop Protection Compounds*, Kräumer; W.; Schirmer, U, Eds.; Wiley-VCH: Weinheim. Vol1, C. 29.5: 1048-1069.
- [36] M Marinozzi, G Marcelli, A Carotti (2015) N-Aryl-5-aminopyrazole: A Versatile Architecture in Medicinal Chemistry, *Mini-Reviews Med Chem* 15(4):1-29.
- [37] T Billard, A Greiner, BR Langlois (1999) A new equivalent of the $\text{CF}_3\text{S}(\text{O})^+$ cation. Synthesis of trifluoromethanesulfinates and trifluoromethanesulfonamides. *Tetrahedron* 55: 7243-7250.
- [38] I Bouabdallah, R Touzani, I Zidane, A Ramdani, S Radi (2006) Synthesis of some 1-aryl-3,5-disubstituted-pyrazoles by N-arylation of 3,5-disubstituted-pyrazoles with 4-fluoro and 2-fluoronitrobenzene under microwave irradiation and classical heating. *Arkivoc* xii:138-144.
- [39] Mc Murry J. (2001) *Química Organica*. 5 th. (S.A PE, 5ª ed.) México, Ed. International Thomson Editores.
- [40] P Rzepecki, H Gallmeier, N Geib, K Cernovska, B König, T Schrader (2004) New heterocyclic b-sheet ligands with peptidic recognition elements. *J Org Chem* 69(16):5168-5178.
- [41] S Gupta, LM Rodrigues, AP Esteves, et al. (2008) Synthesis of N-aryl-5-amino-4-cyanopyrazole derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 43: 771-780.
- [42] R Gehring, O Schalner, JJ Santel, RR Schmidt, KLürsen (1988) US 4787930.
- [43] TB Silva, et al. (2016) Design, synthesis and anti-P falciparum activity of pyrazolopyridine-sulfonamide derivatives. *Bioorg Med Chem.* 24: 4492-4498.
- [44] S Gupta, LM Rodrigues, AP Esteves, et al. (2008) Synthesis of N-aryl-5-amino-4-cyanopyrazole derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 43: 771-780.
- [45] VVNS Rama Rao, BP Lingaiah, G Venkat Reddy, G Ezikiel, R Yadla, P Shanthan Rao (2006) Facile synthesis of fluorinated 2-aryl-5,7-bisalkyl pyrazolopyrimidines from arylalkynenitriles. *ARKIVOC*. xii:51-57.
- [46] EL Moyano, JP Colomer, GI Yranzo (2008) New Application of Heterocyclic Diazonium Salts: Synthesis of New Pyrazolo[3,4-d][1,2,3]triazin-4-ones. *Eur J Org Chem.* 3377-3381.
- [47] JPColomer, EL Moyano (2011) New application of heterocyclic diazonium salts. Synthesis of pyrazolo[3,4-d][1,2,3]triazin-4-ones and imidazo[4,5-d][1,2,3]triazin-4-ones. *Tetrahedron Lett.* 52:1561-1565.
- [48] SC Plem, DM Müller, MC Murguía (2015) Key Intermediates: A Simple and Highly Selective Synthesis of 5-Amino-1-aryl-1H-pyrazole-4-carbonitriles for Applications in the Crop Protection. *Adv in Chem Engin and Sci.* 5:239-261
- [49] W Borsche, R Manteuffel (1934). Über die kondensation von Saureestern mit aliphatischennitrilen. *Ann der Chemie.* 512:97-104.

- [50] H Sierotzki, G Scalliet (2013) A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. *Phytopathology* **103**: 880-887.
- [51] Y Shen (2016). Determination of Six Pyrazole Fungicides in Grape Wine by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **64**: 3901-3907.
- [52] M B Schmit, J March (2013) March's Advanced Organic Chemistry Reactions, mechanisms and Structure. Organic Process Research & Development (John Wiley and Sons).
- [53] T Billard, A Greiner, B R Langlois (1999) A new equivalent of the $\text{CF}_3\text{S}(\text{O})^+$ cation. Synthesis of trifluoromethanesulfinates and trifluoromethanesulfinamides. *Tetrahedron* **55**: 7243-7250.
- [54] (a) Sukopp, M.; Kuhn, O.; Gröning, C.; Keil, M.; Longlet, J. J. US 0093822 A1, 2010. (b) Sukopp, M.; Kuhn, O.; Gröning, C.; Keil, M.; Longlet, J. J. US 8,629,287 B2, 2014.
- [55] X Chen, M Tordeux, J R Desmurs, C Wakselman,. Thia-Fries rearrangement of aryl triflinates to trifluoromethanesulfinylphenols. *J. Fluor. Chem.* **123**, 51-56 (2003).
- [56] M Sukopp, O Kuhn, C Groning, M Keil, JJ Longlet. (2012) US 8263783 B2 - Process for the sulfonylation of a pyrazole derivative.
- [57] T Yang, KWidmer (2011). E. US 2011/0034530 A1. Process for the preparation of the Fipronil and analogues thereof.
- [58] K Nagahara, H Kawano, S Sasaoka, C Ukawa, T Hirama, A Takada. (1994). Reaction of 5-aminopyrazole derivatives with ethoxymethylenemalononitrile and its analogues. *J. of Het. Chem.* **31**:239-243.
- [59] A, El-Mekabaty (2014). Utility of 5-amino-1-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxamide. *Synt. Comm.* **44** (7): 875-896.
- [60] C X Liu, Y Chen, Y X Sun, F H Wu (2013). Crystal structure and mechanistic investigation of the reaction of 5-amino-1-(2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazole-3-carbonitrile with unsaturated carbonyl compounds. *Res. on Chem. Int.* **39** (5)2087- 2093.
- [61] a) AS Gunasekara, T Troung. (2007). Environmental fate of Fipronil. California EPA, Sacramento. 1-28. b) KK Ngi, SA Mabury, DG Crosby (2000). Elucidation of Fipronil photo degradation pathways. *J. Agric. Food. Chem.* **48**: 4661-4665. c) Fipronil Fact sheet NPIC 1-9.
- [62] LM Cole, RA Nicholson, JE Casida (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* **46**:47-54.
- [63] EV Herrera Mayorga (2008). *Spodoptera Frugiperda: Una Plaga Que Está Coevolucionando*. Reynosa, Tamaulipas, México 6p.
- [64] N Urretabizkaya, A Vasicek, E Saini (2010). *Insectos Perjudiciales de Importancia Agronómica: Lepidópteros*. Vol 1. 1-77.
- [65] E Bohnenblust, J Tooker (2012). Fall armyworm as a pest of field corn. *Entomol Notes*.
- [66] MR Campos, TBM Silva, WM Silva, JE Silva, HAA Siqueira (2014). Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae) Brazilian populations to ryanodine receptor. *Pest. Manag. Sci.* 1-8.
- [67] PD Leiva. (2014) Oruga militar tardía *Spodoptera frugiperda*, una plaga de los maíces tardíos. 1-4.
- [68] G Murúa, J Molina-Ochoa, C Coviella (2006). Population dynamics of the fall armyworm, *spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in northw. *Florida Entomol Soc.* **89**(2):175-182.
- [69] PRS Fariás, J Barbosa, A Busoli, W Overal, V Miranda, SM Ribeiro (2008). Spatial Analysis of the Distribution of *S. frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and Losses in Maize Crop Productivity Using Geostatistics. *Neotrop Entomol.* **37**(3):321-327.
- [70] JCC Delgado, JA Hernández, C V Velázquez, et al. (2005). Evaluación Y Validación de La Efectividad Biológica de 14 Insecticidas En Maíz Contra El Gusano Cogollero (*Spodoptera Frugiperda*) En Valle de Santiago, Gto. Guanajuato, México. 1-8.

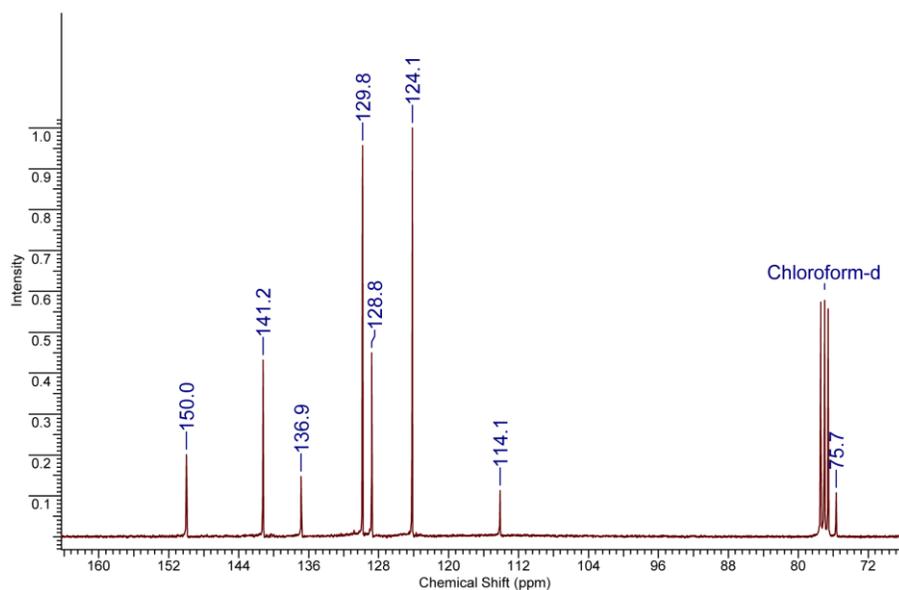
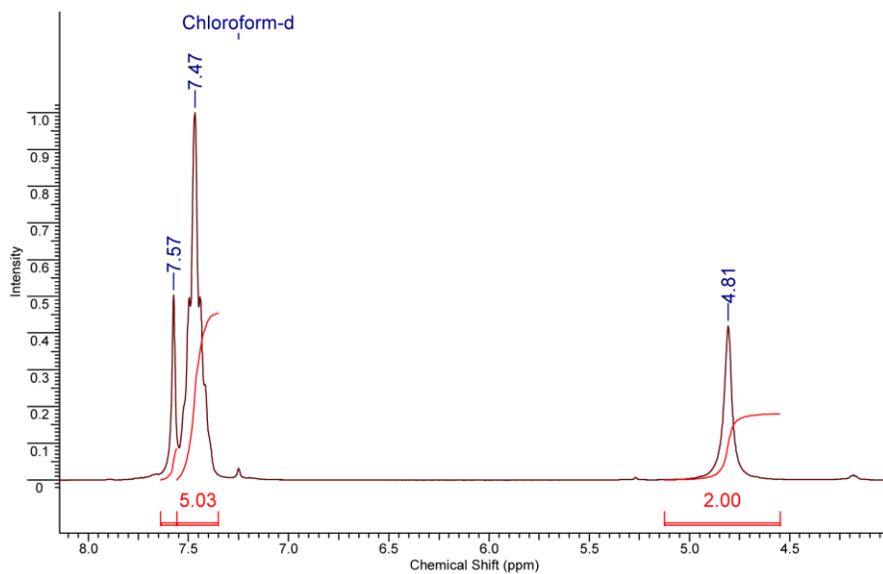
-
- [71] a) H Kumar, JA Mihm. (2002) Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), southwestern corn borer Lepidoptera : Pyralidae) and sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) damage and grain yield of four maize hybrids in relation to four tillage systems. *Crop Prot.* 21:121-128. b) Plagas SNA de V y M de *Spodoptera Frugiperda*. (2008).
- [72] HAASiqueira, RNCGuedes, MCPicano (2000). Insecticide resistance in populations of *T. absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric For Entomol.*2:147-153.
- [73] B Tonelli, S Rothman (2010).El Cultivo de Tomate. Universidad Nacional de Entre Rios. 28p.
- [74] A Urbaneja, R Vercher, V Navarro, MF Garcia, JL Porcuna. (2007). La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma España*.(194):16-23.
- [75] GP Romanelli, EG Virla, PR Duchowicz, et al. (2010). Sustainable synthesis of flavonoid derivatives, QSAR study and insecticidal activity against the fall armyworm, *S. frugiperda* (Lep.: Noctuidae). *J Agric Food Chem.* 58(10):6290-6295.
- [76] X Wang, Y Li, S Zhong, et al. (2013). Oxidative injury is involved in fipronil-induced G2/M phase arrest and apoptosis in *S. frugiperda* (Sf9) cell line. *Pestic Biochem Physiol.*105:122-130.
- [77] U Jensen-Korte, R Gehring, O Schallner, W Behrenz, W Stendel, P Andrews (1990). Pest-combating agents based on pyrazole derivatives.US 4945165.
- [78] N Simon-Delso, V Amaral-Rogers, LP Belzunces, JM Bonmatin, M Chagnon, C Downs. (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and Fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res.*22:5-34.
- [79]MM Scandiani, MA Carmona, AN Formento, AG Luque (2016) Revista Técnica de Soja. *Rev Técnica la Asoc Argentina Prod Siembra Directa*.(9):156.
- [80]FHFuentes,SDistéfano,LLenzi, et al.(2016). SOJA actualización 2016. INTA Ediciones: Informe 6. 1-113p
- [81] a) A Ivancovich, M Lavilla. (2015) *Problemas Sanitarios Relacionados a La Germinación de La Semilla de Soja a Campo*. Pergamino - Buenos Aires. b) M F Sillon (2016). Manual de Reconocimiento de Plagas Y Hongos Del Suelo Y La Semilla En Soja. 1-75. Syngenta.
- [82] UDEL. (2012). Universidad de Delaware.
<https://doi.org/10.1016/j.nuclphysa.2003.11.045>
- [83] HBLee, A Patriarca, N Magan (2015). Alternaria in food: Ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. *Mycobiology.* 43(2):93-106.
- [84] Plagas SNA de V y M de. (2017) *Fusarium Virguliforme*. 2
- [85] Ing. Agr. Maria Cecilia Litardo. (2014).
<http://www.patologiavegetal.unlu.edu.ar/?q=node/46>.
- [86] MG de los M Rapela Latorre. (2013) . Tesis Doctoral: Diversidad morfo-genética de Cercospora en soja. Detección precoz de la infección por *C. kikuchii*. Univ. Nac. Litoral.
- [87]Rural, V. (2016).
<https://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/aaenfermedades/%20cercospora-kikuchii-01.htm>.
- [88] A Gonzalez Salgado (2009).Diagnóstico y control de especies de Aspergillus productoras de Ocratoxina A.
- [89] Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plaga (2017). *A. Niger*. SINAIVIMO.GOV.AR, 2
- [90]Y Shen, Z Li, Q Ma, et al. (2016). Determination of Six Pyrazole Fungicides in Grape Wine by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 64(19):3901-3907.
- [91] Y Chacón Castro, C Garita Rojas, C Vaglio Cedeño (2008). Desarrollo de Una Metodología de Crianza En Laboratorio Del Gusano Cogollero Del Maíz S. *Frugiperda* (Smith) Como Hospedante de Insec. Csartago, Costa Rica.

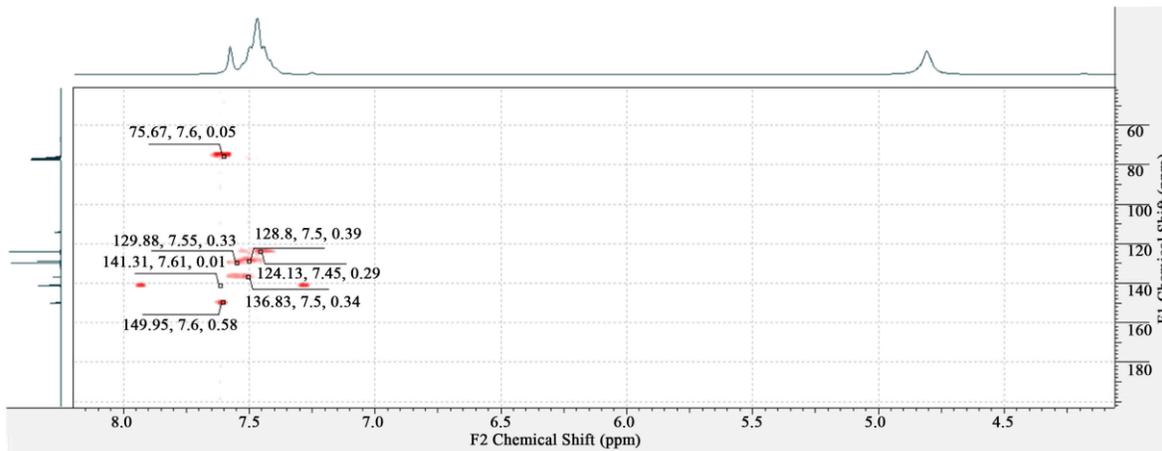
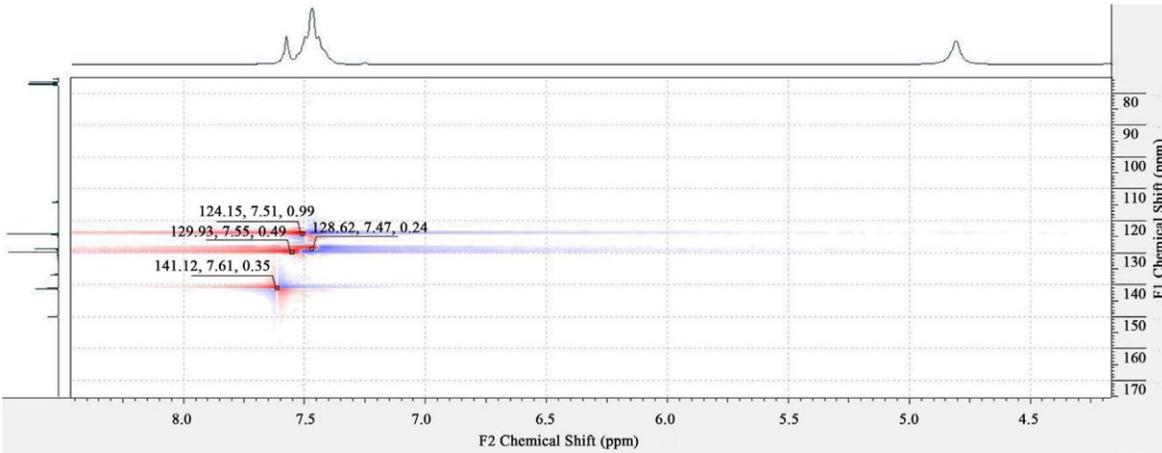
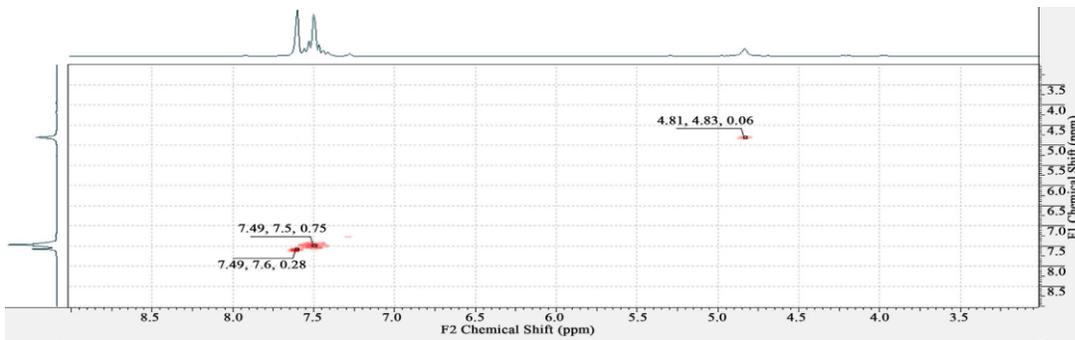
-
- [92] a) D Gujarati. (1970). Use of Dummy Variables in Testing for Equality Between Sets of Coefficients in Two Linear Regressions : A Note. *Am Stat.* 24(1):50-52. b) DB Suits. (1957).Use of Dummy Variables in Regression Equations. *J Am Stat Assoc.* 52(280):548-551.
- [93]Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline.(2010). M51-A.Vol. 30.No. 11.
- [94]Z Xiao hua, J Dingxin, L Zhicheng, X Hanhong (2010). Synthesis, characterization and bioactivity of Fipronil derivatives as a lead for new insecticide. *Indian J Chem Technol.*17(May):215-219.
- [95]MMM Lietti, E Botto, R A Alzogaray. (2005). Insecticide Resistance in Argentine Populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop Entomol.*34(1):113-119.

Anexo:

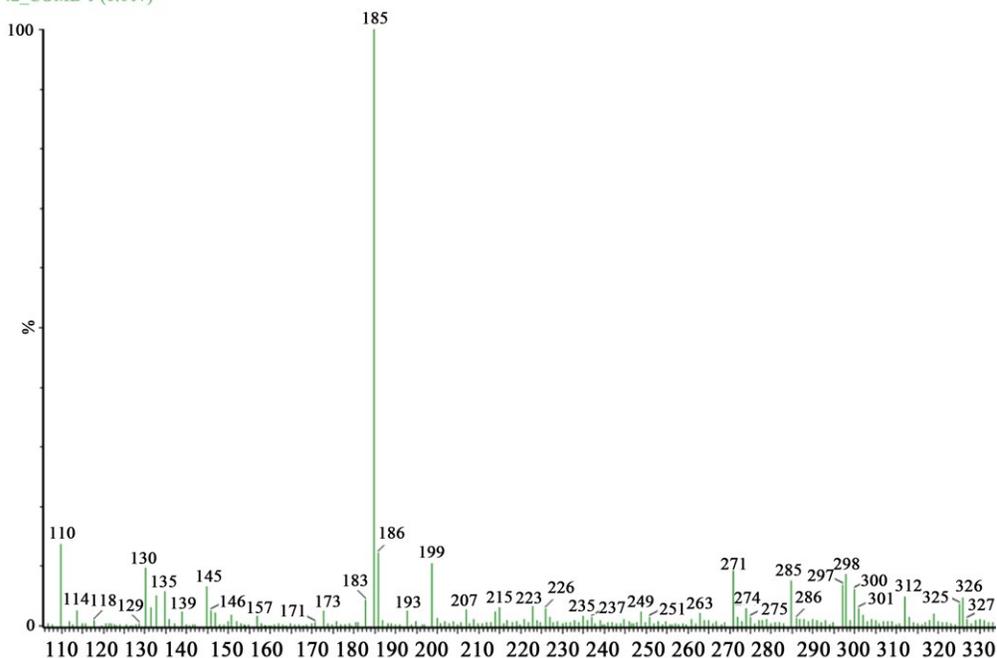
Caracterización de Compuestos de
Síntesis

7a . 5-amino-1-phenil-1H-pirazol-4-carbonitrilo: Cristales blancos (84%); M.p. 138.5°C - 139.6°C (140.0°C - 140.5°C)¹; ¹H NMR [300 MHz (CDCl₃)] δ = 4.81 (s br, 2H, NH₂); 7.40 - 7.55 (m, 5H, CH); 7.57 (s, 1H, CH); ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 75.6 (C); 114.1 (C); 124.1 (CH); 128.8 (CH); 129.8 (CH); 136.9 (C); 141.2 (CH); 150.0 (C). MSm/z (%): Calc. 184.07; encontrada: 185.0 [M+H]⁺.

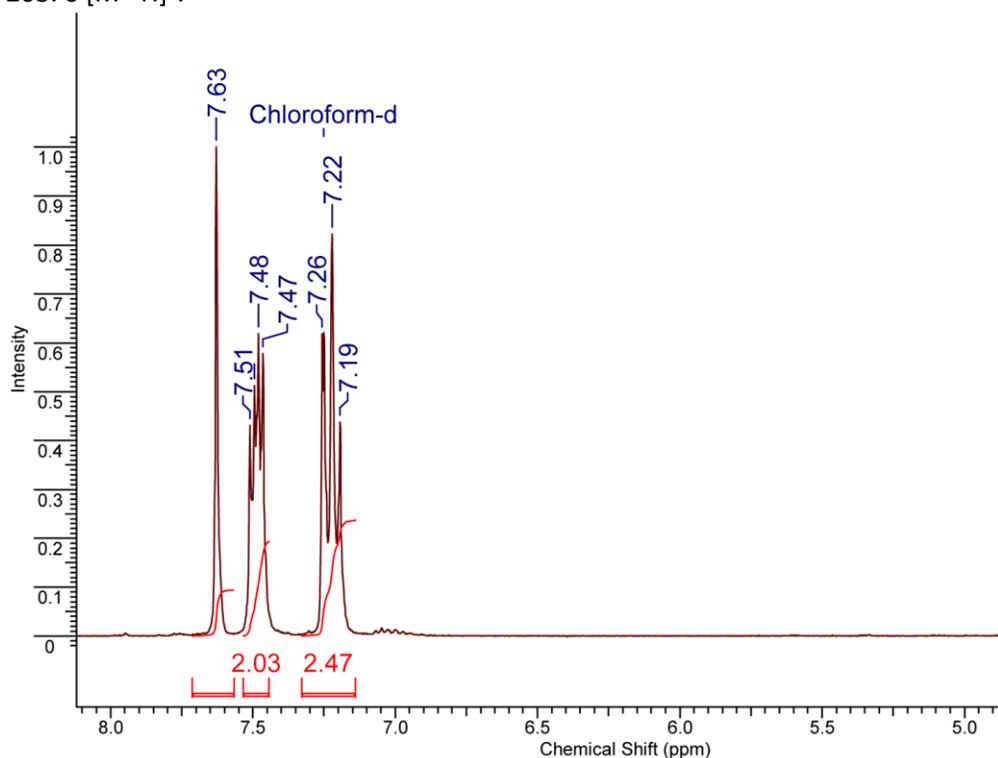
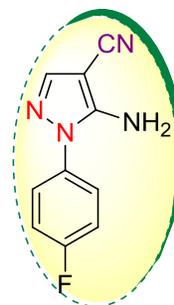


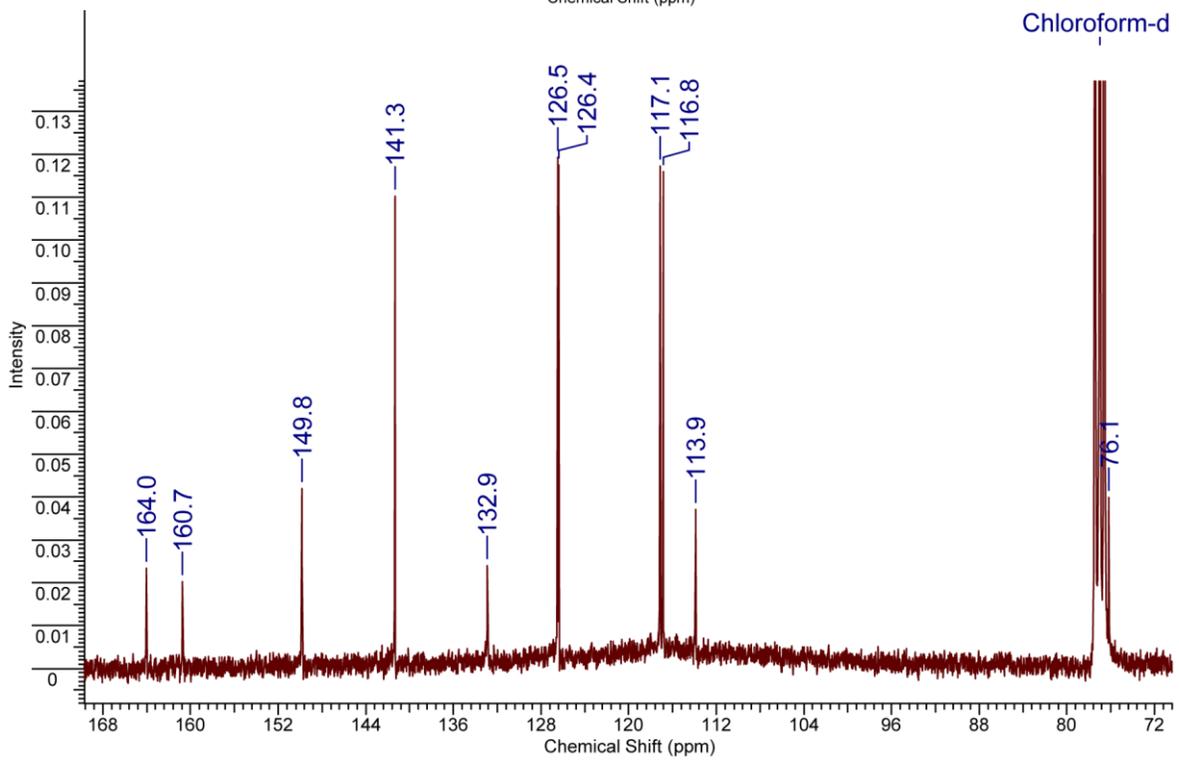
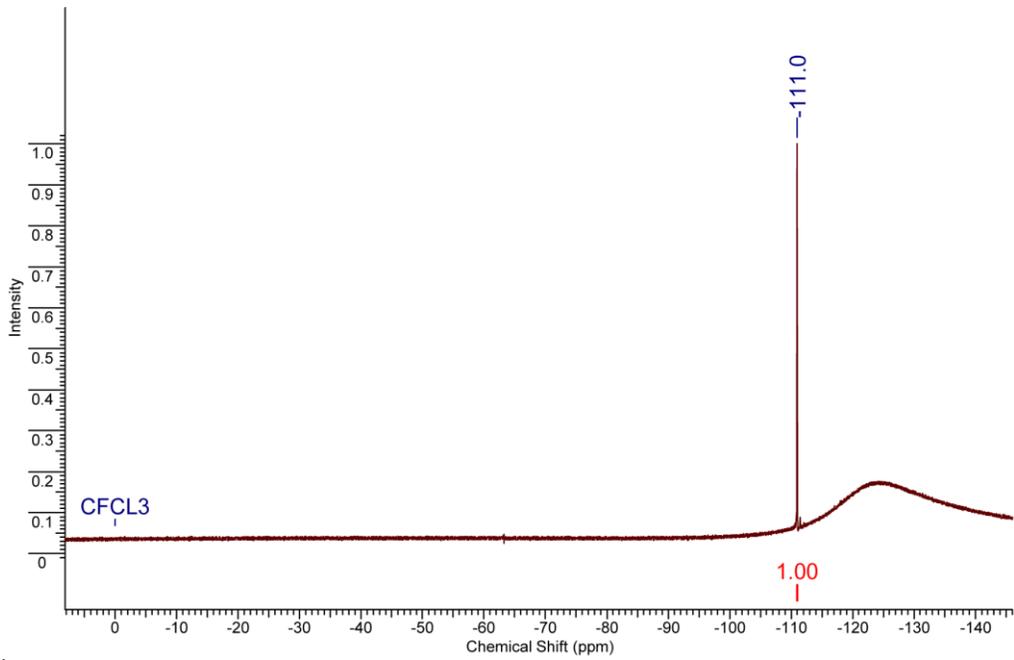


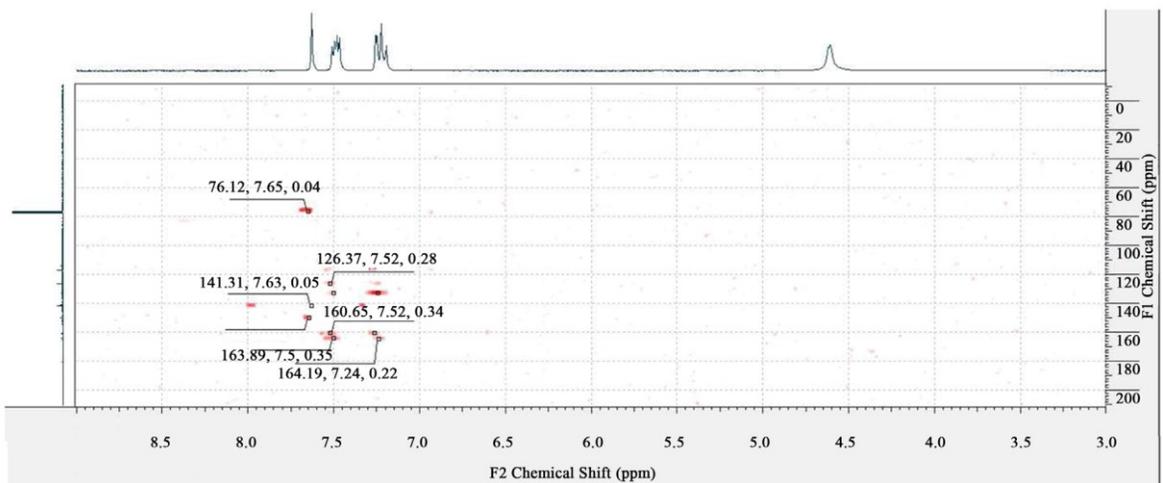
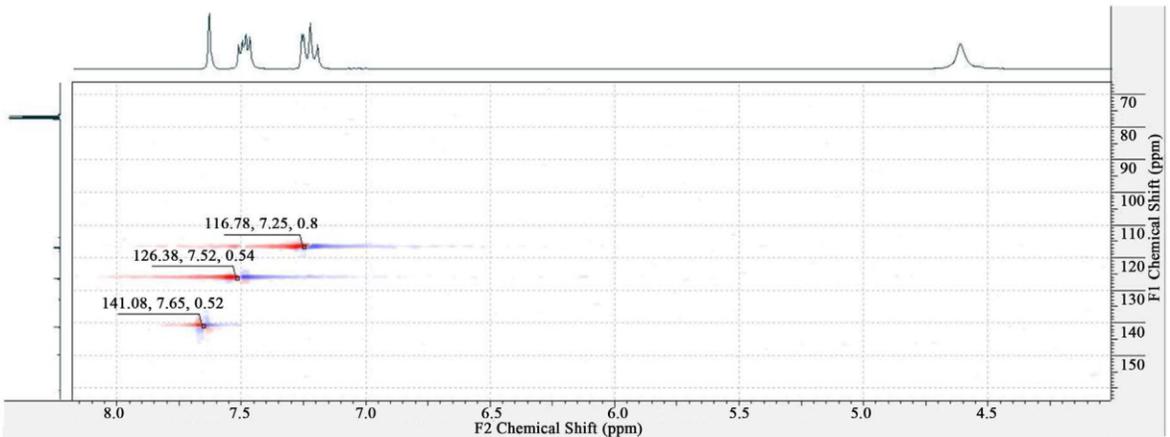
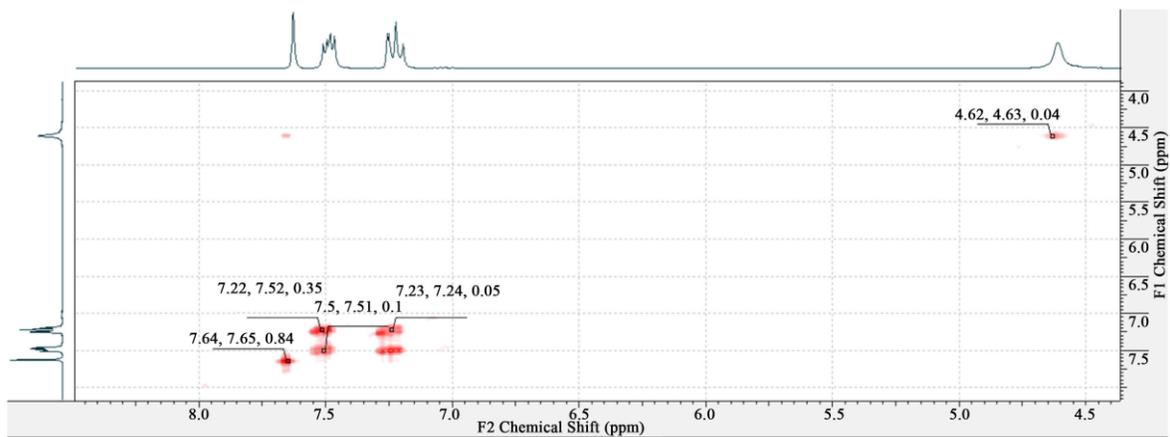
42_COMB 1 (0.017)

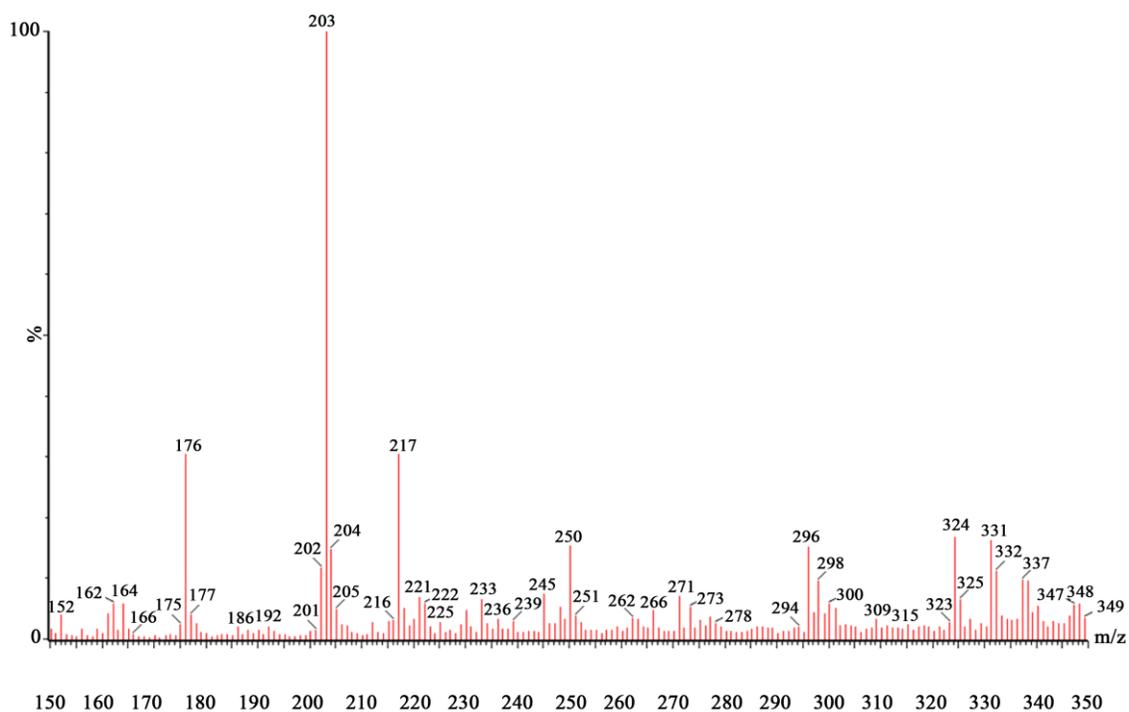


7b. 5-amino-1-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazol-4-carbonitrilo: polvoblanco (47%); M.p. 178.5°C - 179.8°C (177.0°C - 178.0°C)¹; ¹H RMN [300 MHz (CDCl₃)] δ = 4.61 (s br, 2H, NH₂); 7.19 - 7.26 (m, 2H, CH); 7.47 - 7.51 (m, 2H, CH); 7.63 (s, 1H, CH); ¹⁹F RMN [300 MHz] δ = -110.96 (s, 1F) ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 76.1(C); 113.8(C); 116.8 - 117.1 (CH, ¹J = 23.09 Hz); 126.4 - 126.5 (CH, ²J = 9.50 Hz); 132.9 (C); 141.3 (CH); 149.8 (C); 160.7 y 164,0 (C, ²J = 250.34 Hz). MS m/z (%): Calc. 202.6; encontrada: 203.0 [M+ H]⁺.

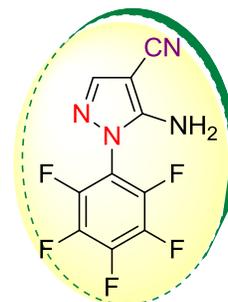


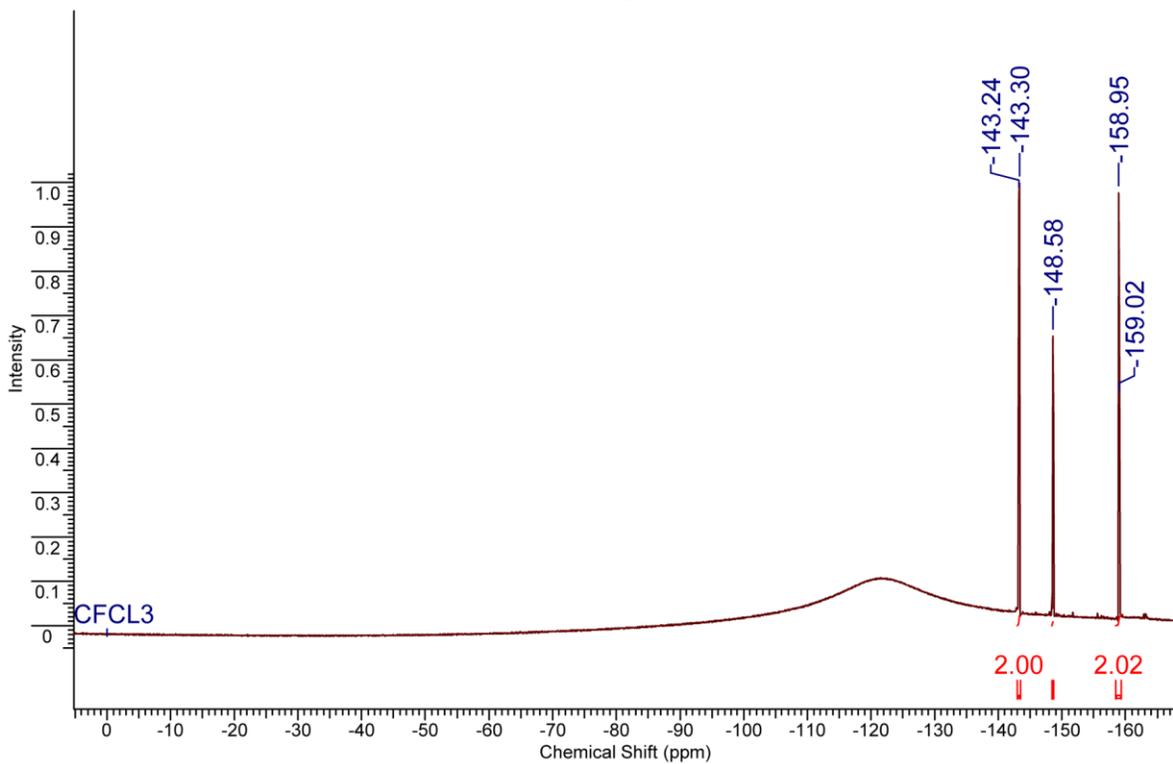
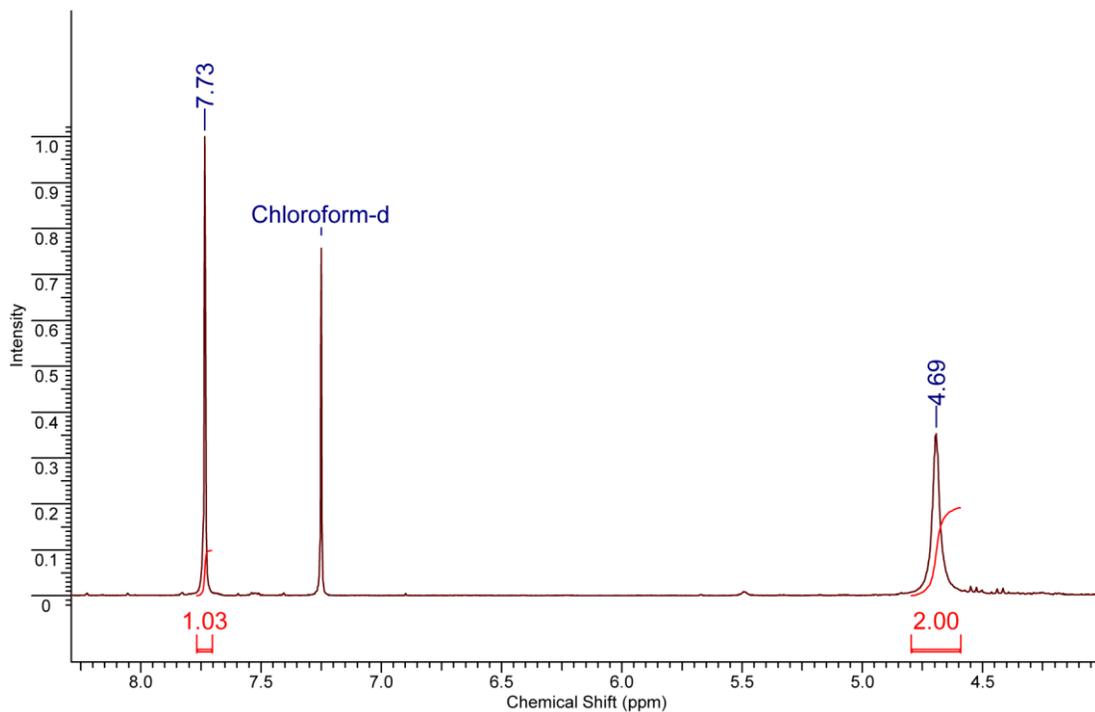


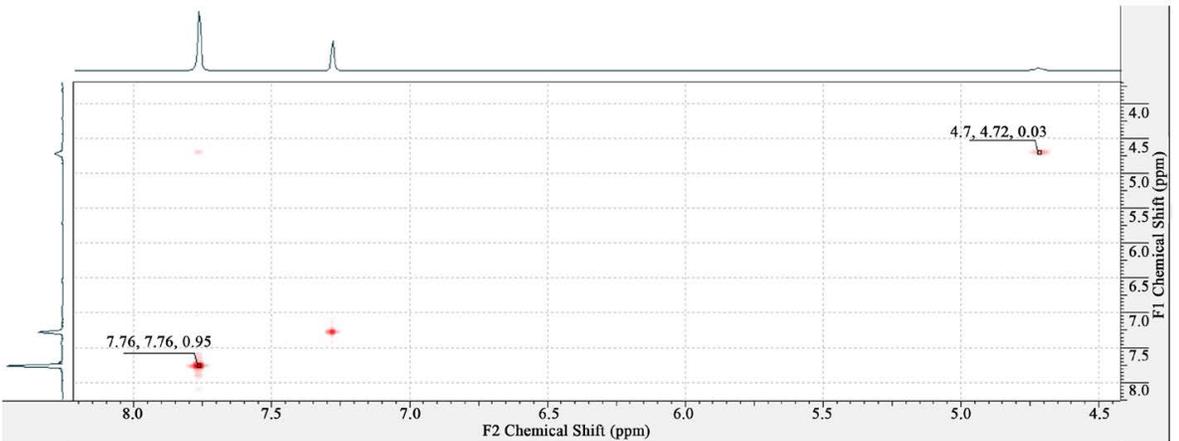
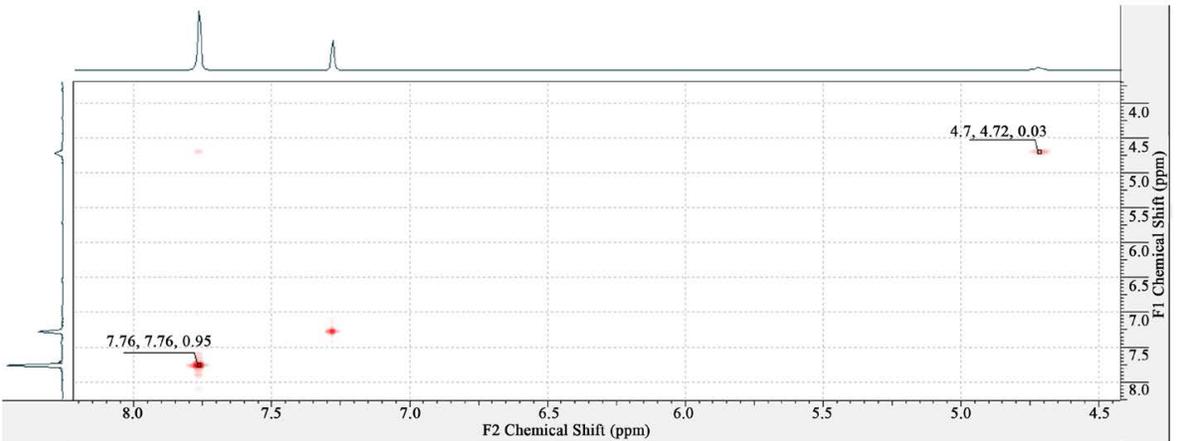
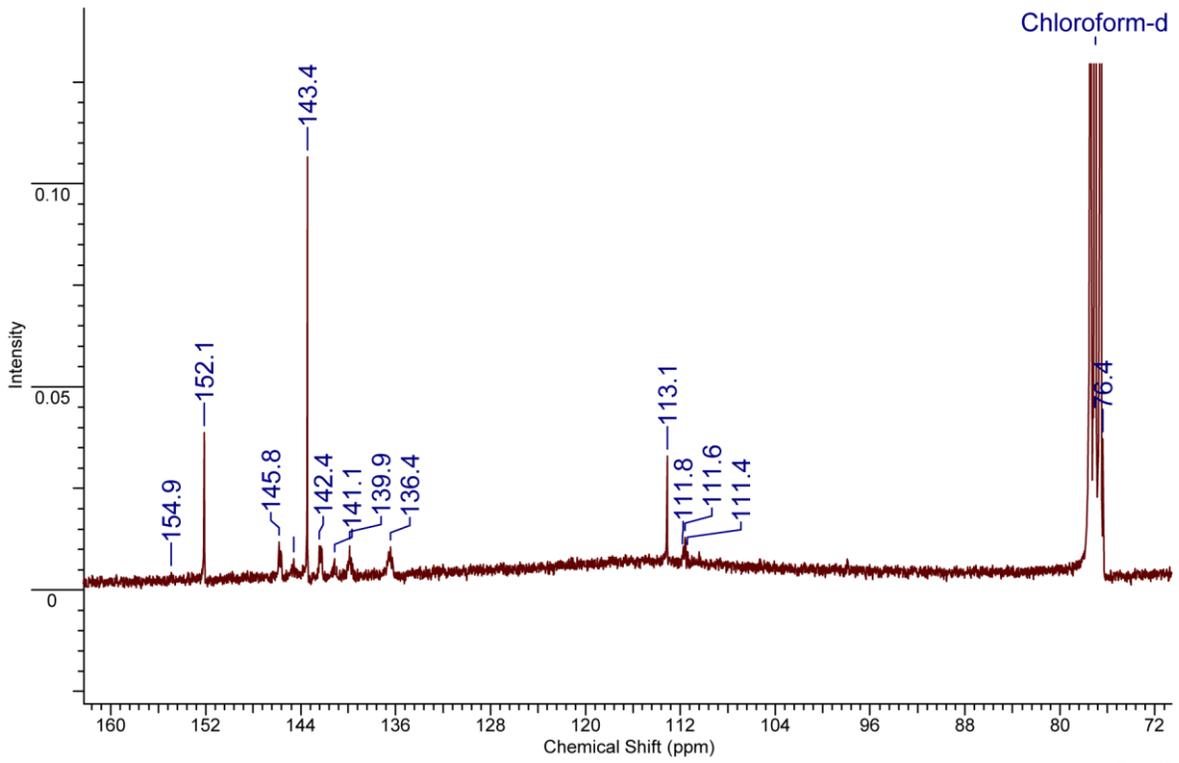


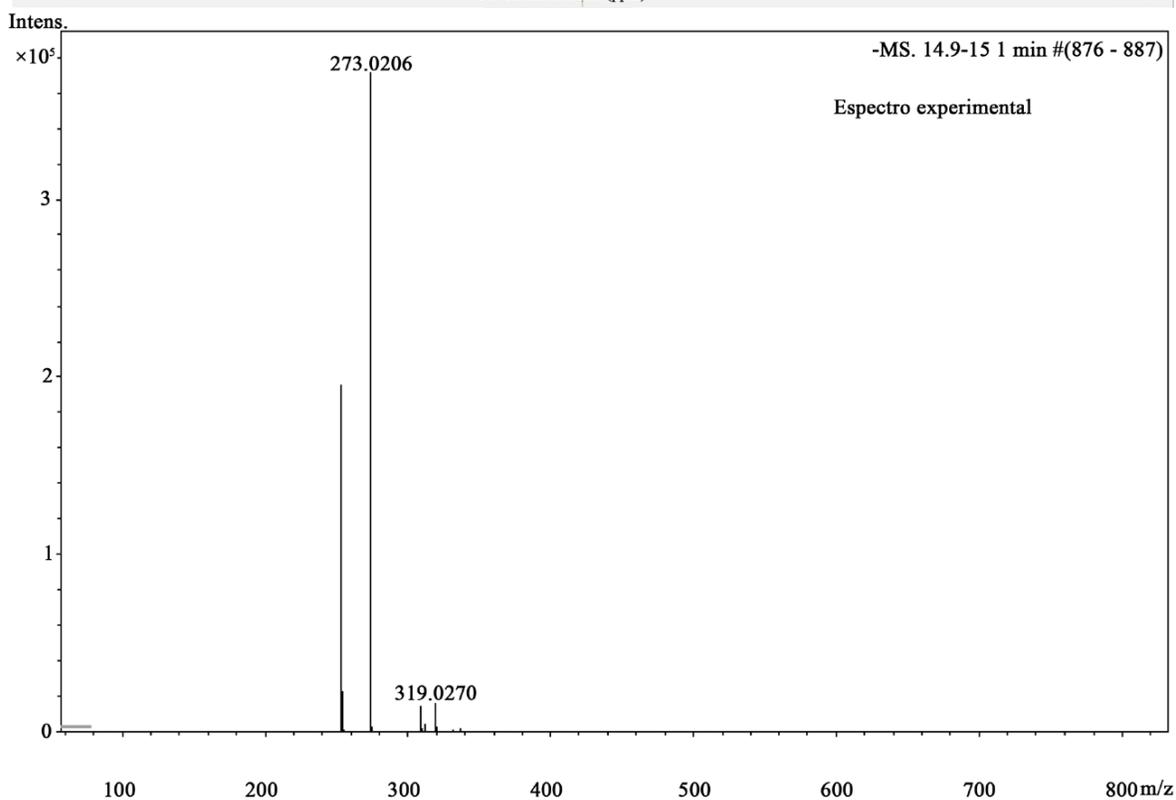
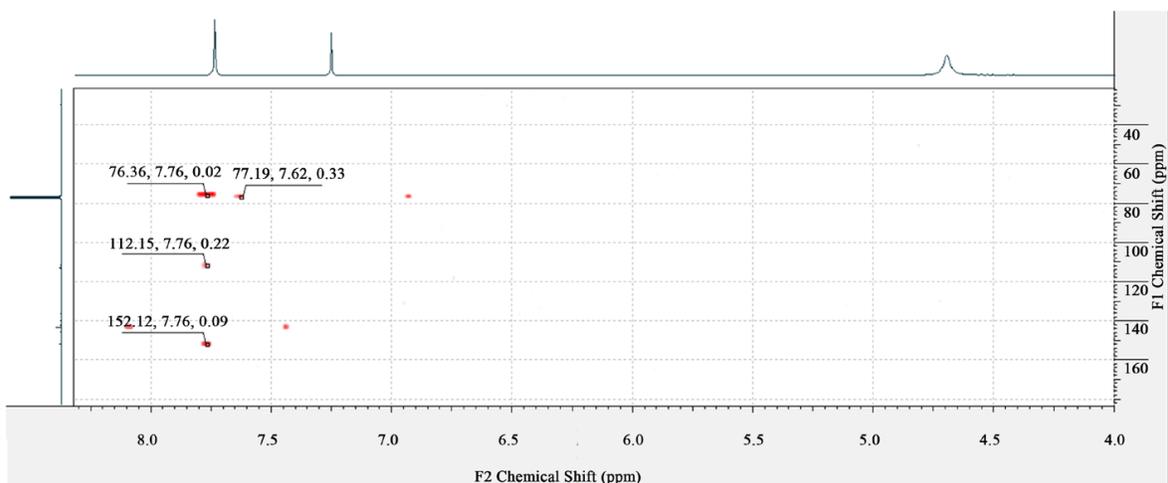


7c. 5-amino-1-(perfluorofenil)-1H-pirazol-4-carbonitrilo: Sólido blanco (63 %); M.p. 135.4°C - 136.4°C; ^1H RMN [300MHz (CDCl_3)] δ = 4.69 (s br, 2H, NH_2); 7.73 (s, 1H, CH); ^{19}F RMN [300 MHz] δ = -158.95 (t, 2F); -148.58 (t, 1F); -143.24 (d, 2F). ^{13}C NMR [75 MHz]: δ = 76.4 (C); 113.1 (C); 143.4 (CH); 152.1 (C). No fue posible asignar los demás carbonos correspondientes a esta molécula. HRMS ESI⁻ [M - H]⁺: Anal. Calcd. para $\text{C}_{10}\text{H}_3\text{F}_5\text{N}_4$: 273.0194; encontrada: 273.0206.

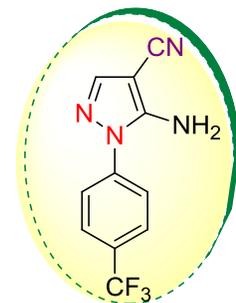


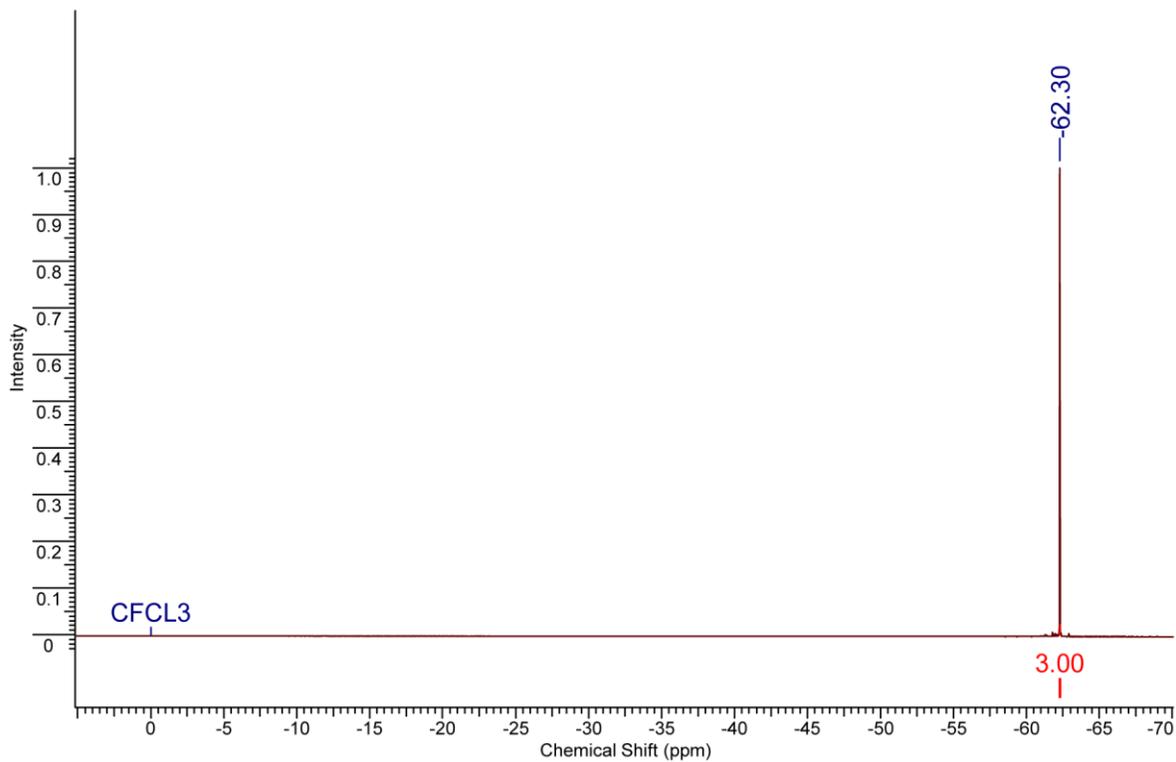
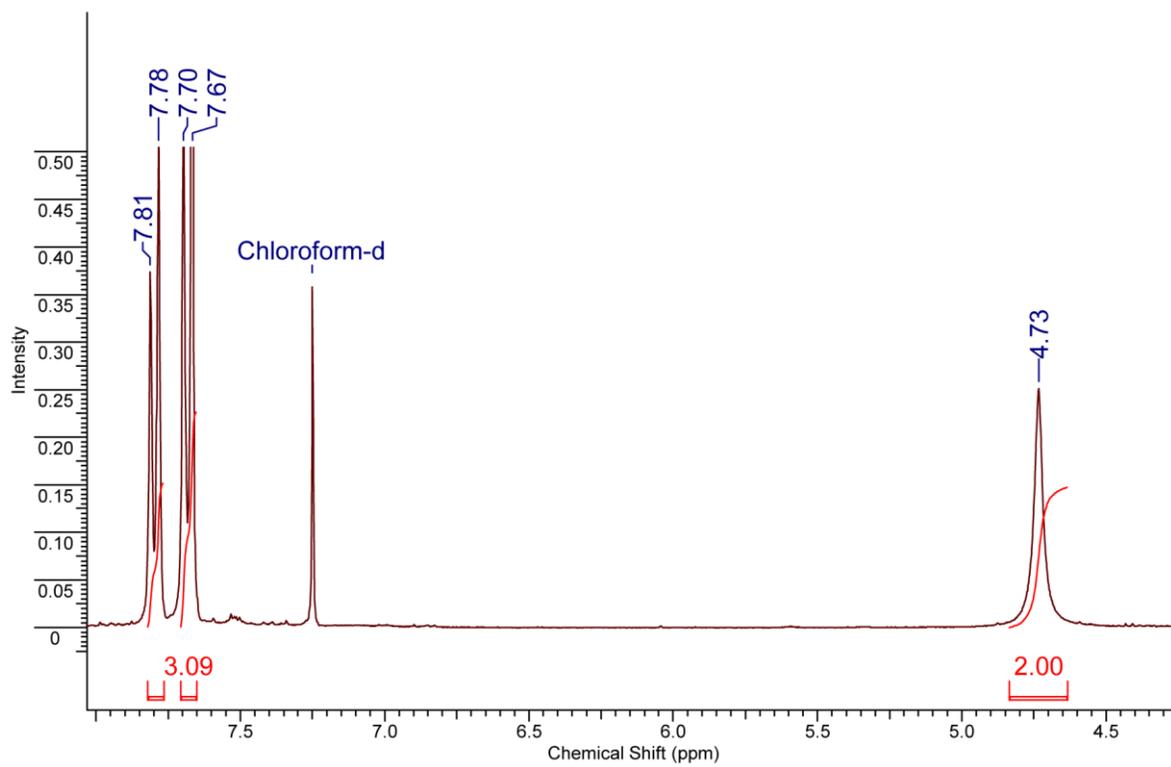


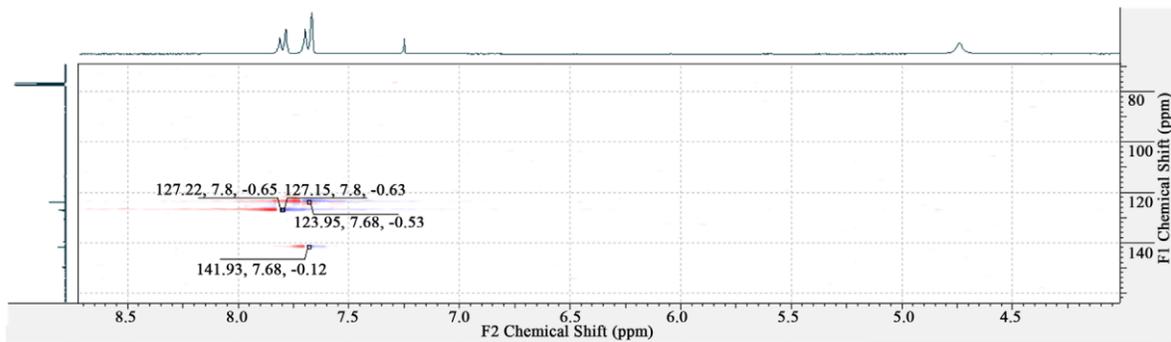
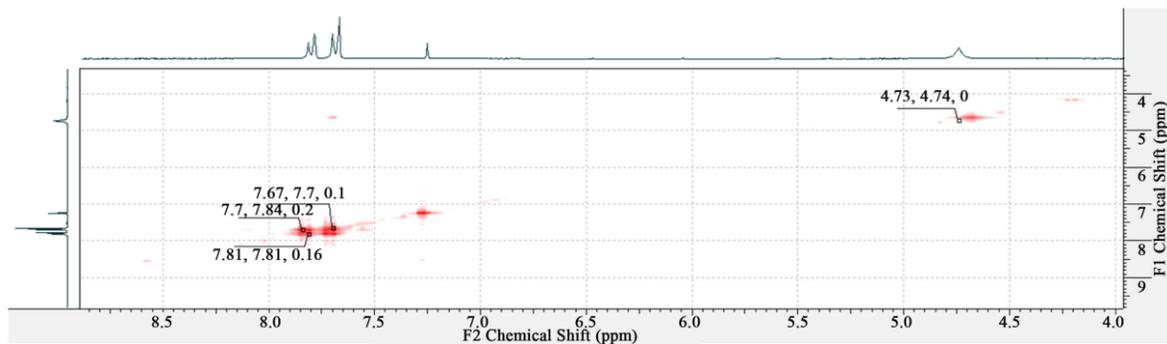
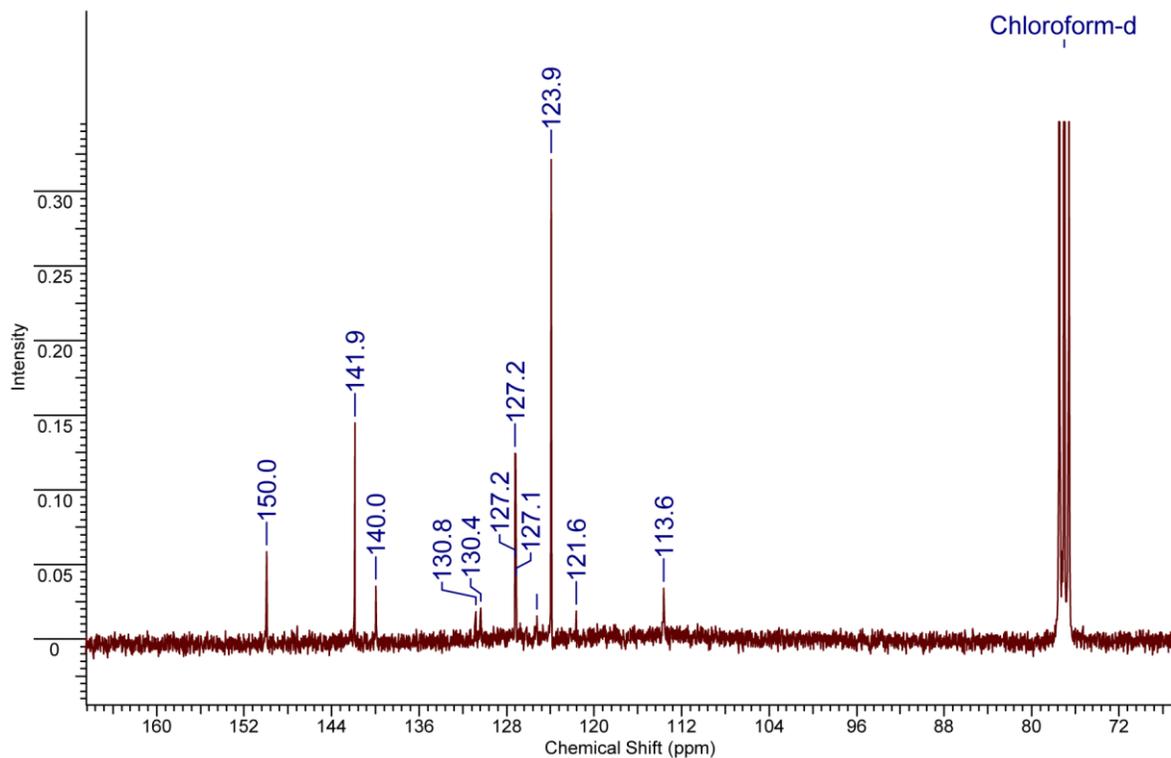


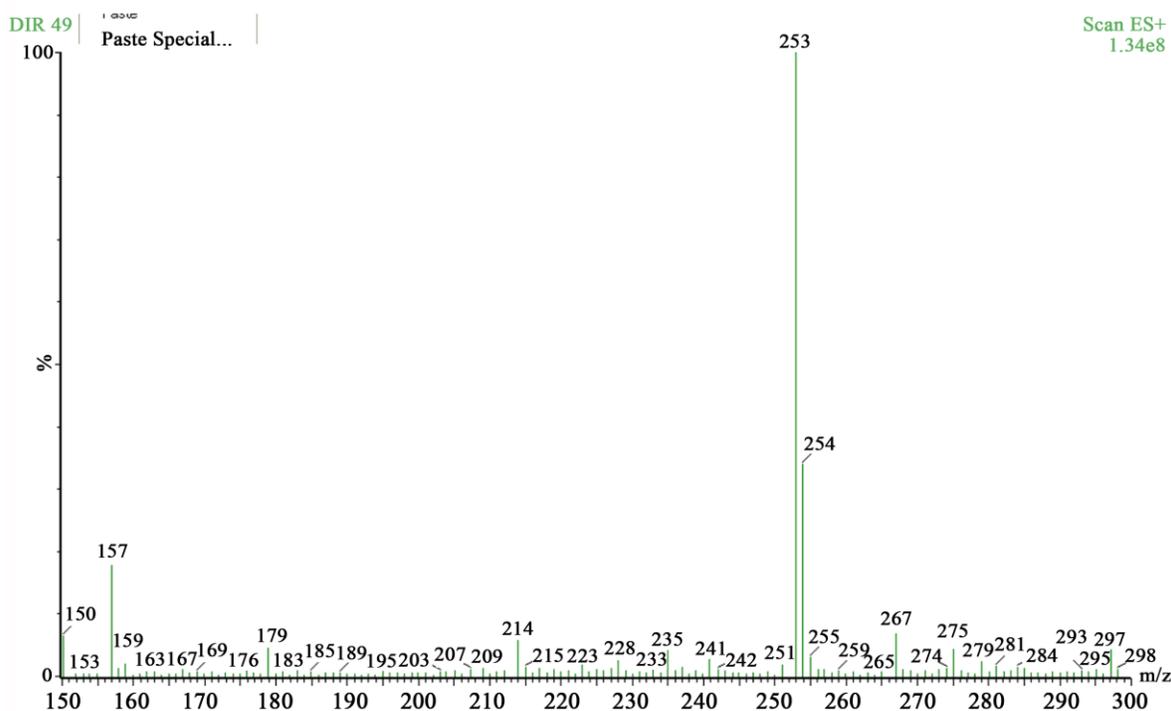
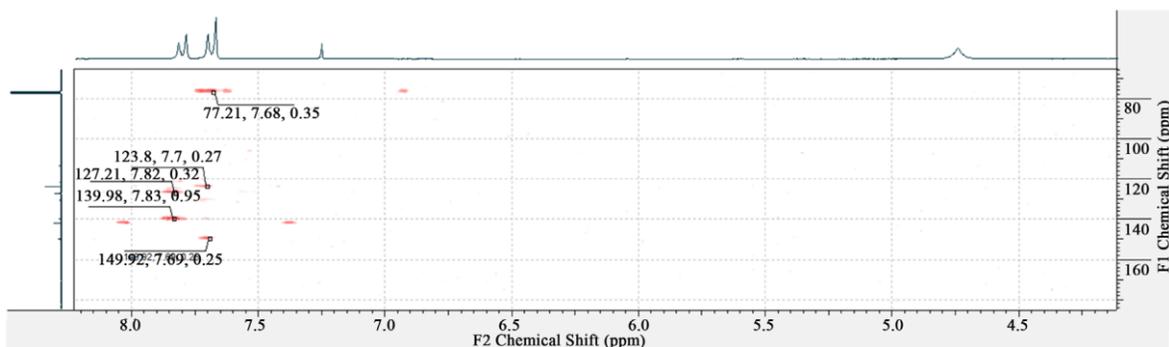


7d. **5-amino-1-(4-(trifluorometil)fenil)-1H-pirazol-4-carbonitrilo:** Sólido amarillo (67%); M.p. 156.9°C - 158.3°C (170.0°C - 171.0°C)²; ¹H RMN [300 MHz (CDCl₃)] δ = 4.73 (s br, 2H, NH₂); 7.67 (d, ¹J = 8.91, 3H, CH); 7.78 (d, ²J = 8.36, 2H, CH). ¹⁹F RMN [300 MHz] δ = -62.30 (s, 3F); ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 77.2 (C); 113.6 (C); 121.6 - 125.2 (q, ¹J = 272.58 Hz, CF₃; no fue posible asignar la otra mitad del cuarteto); 123.9 (CH); 127.2 (CH); 130.4 - 130.8 (q, ²J = 32.0 Hz); 140.0 (C); 141.9 (C); 150.0 (C). MS m/z (%): Calc. 252.0; encontrada: 253.0 [M+ H].



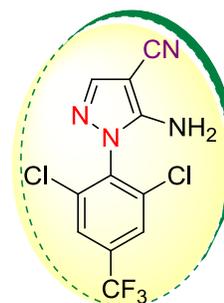


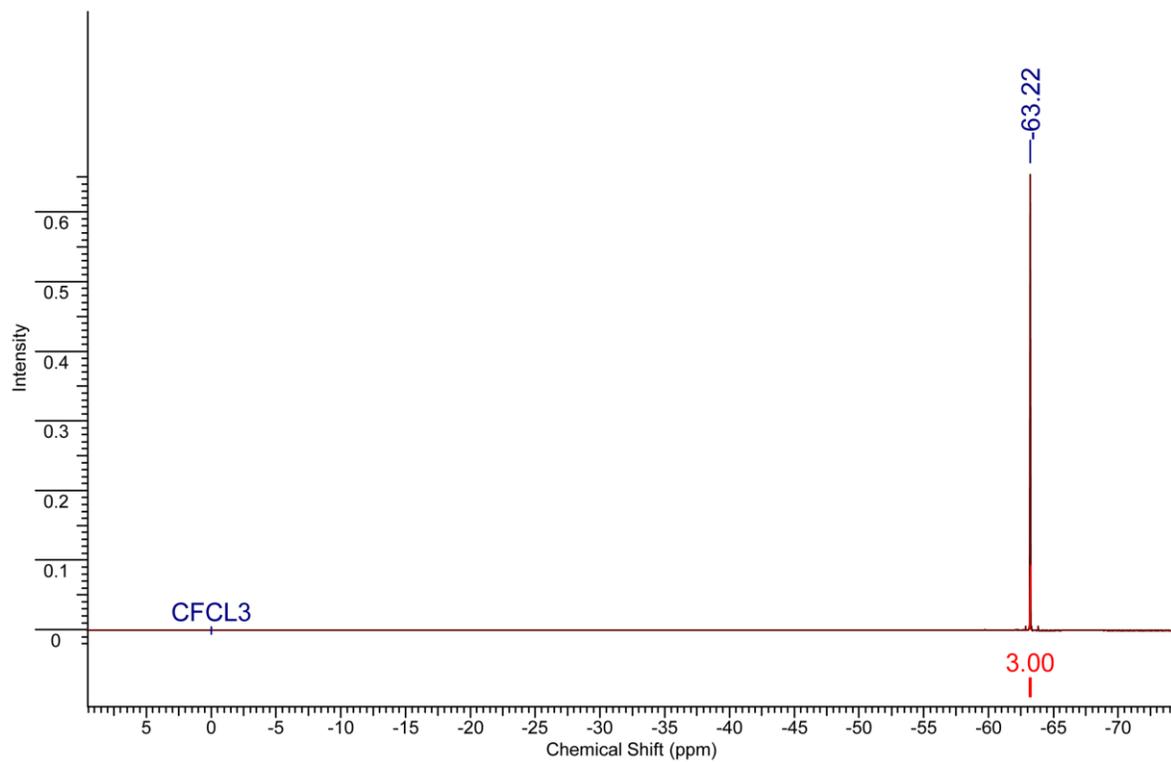
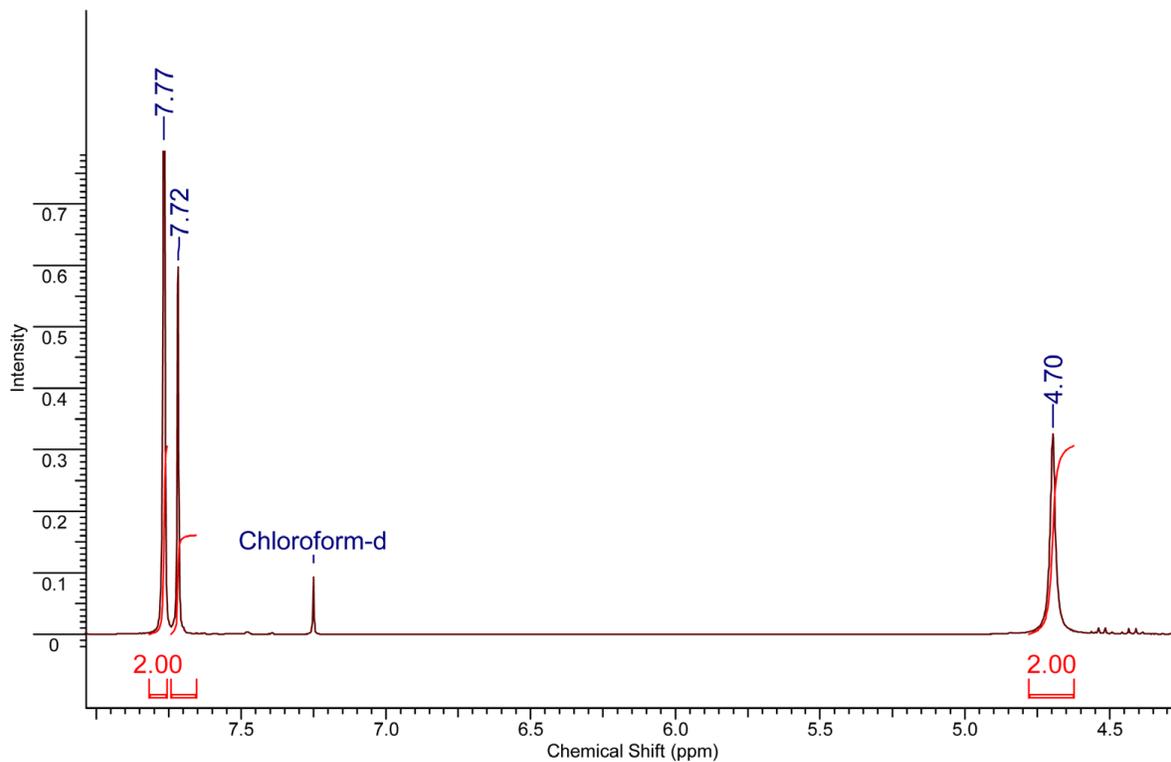




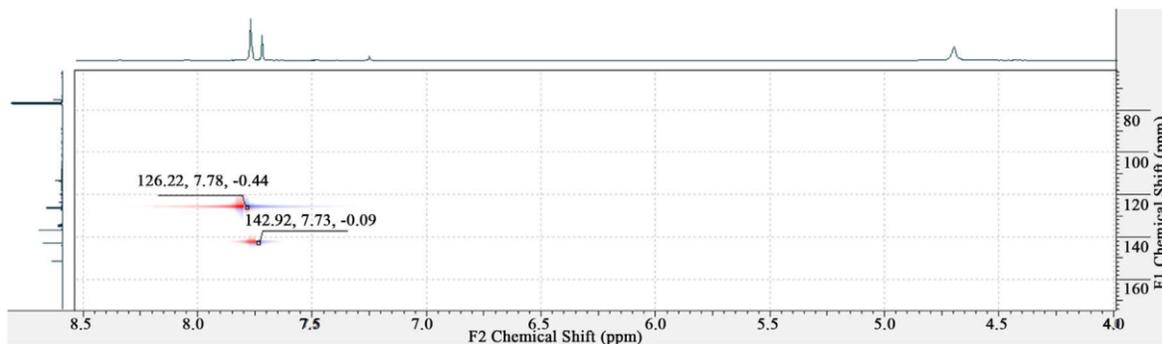
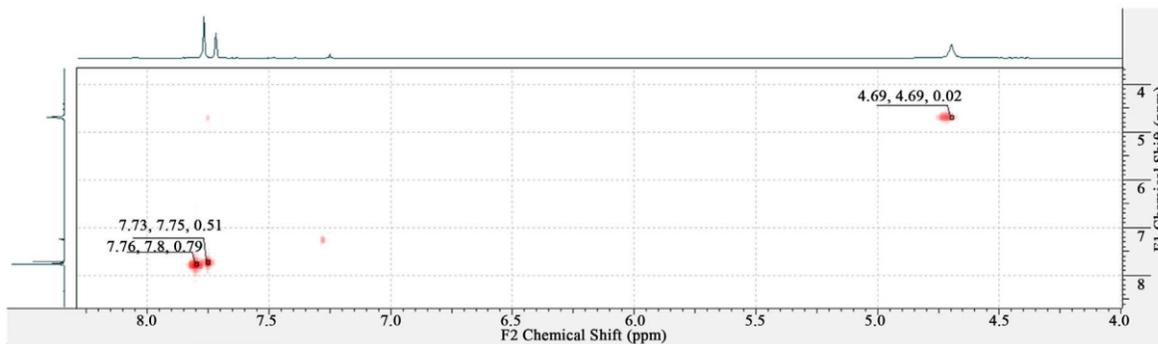
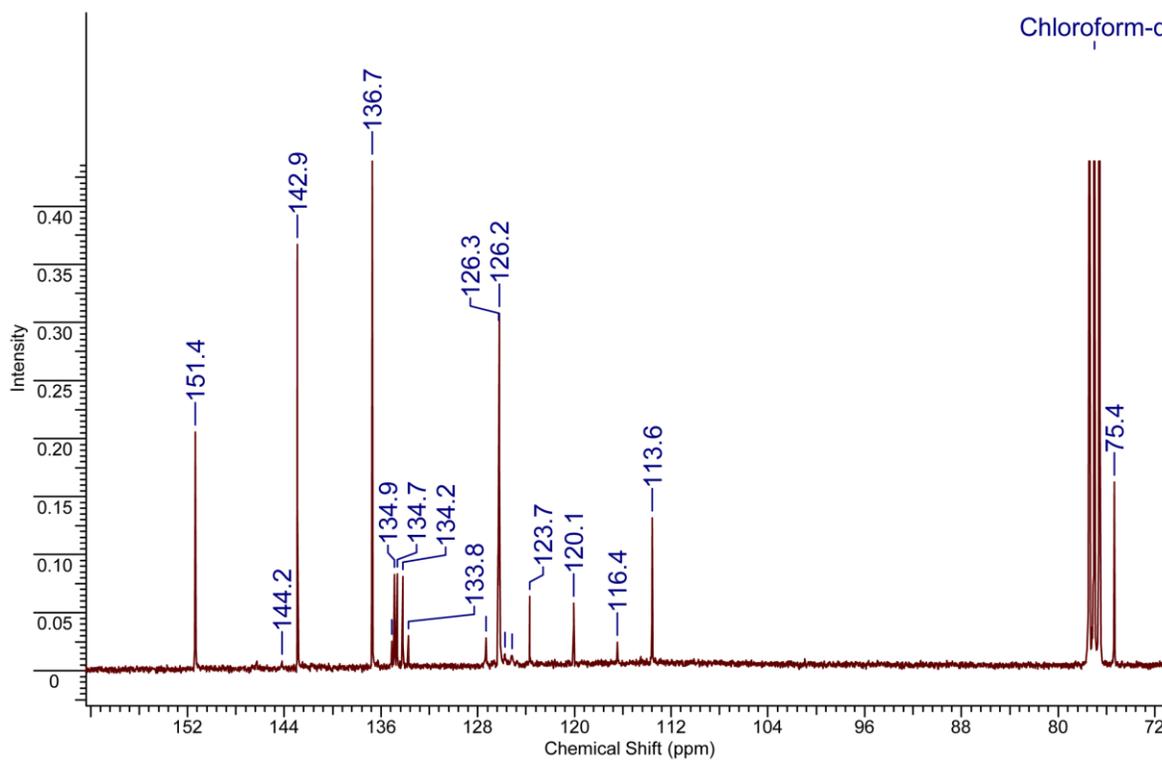
7e. 5-amino-1-(2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-pirazol-4-carbonitrilo:

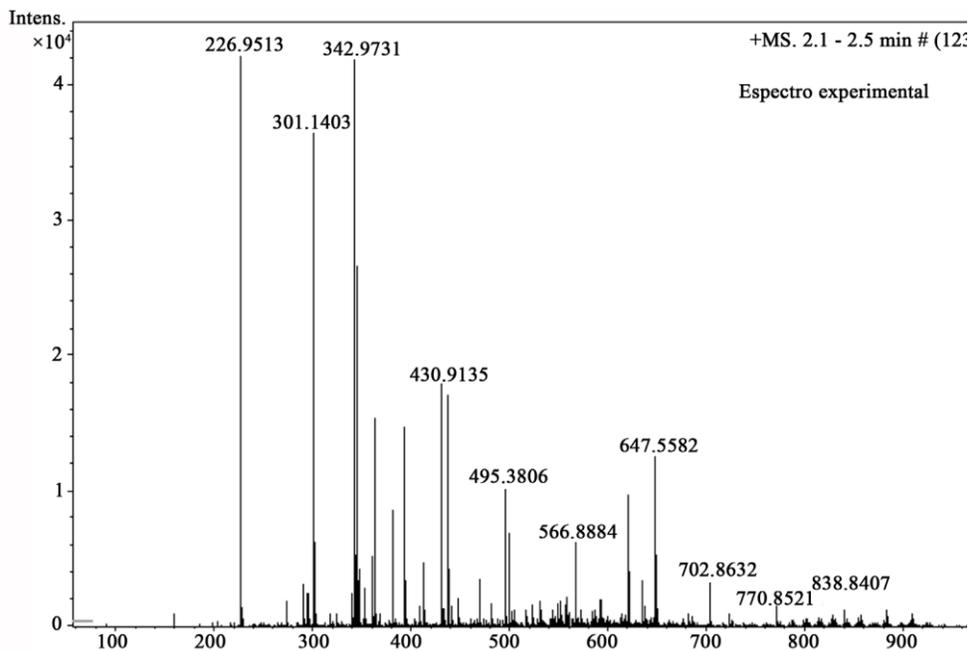
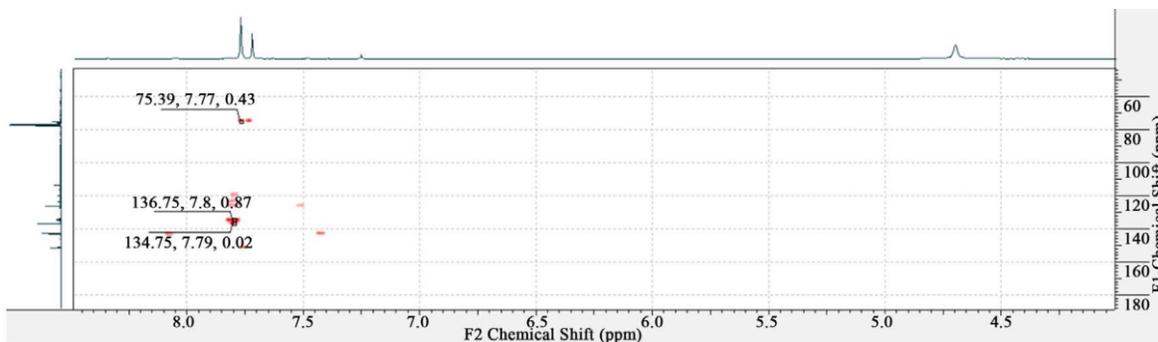
Sólido blanco (47%); M.p. 163.5°C -164.8°C; ^1H RMN [300 MHz (CDCl_3)] δ = 4.70 (s br, 2H, NH_2); 7.72 (s, 1H, CH); 7.77 (s, 2H, CH). ^{19}F RMN[300 MHz] δ = -63.22 (s, 2F). ^{13}C NMR [75 MHz]: δ = 75.4 (C); 113.4 (C); (116.5, 120.1, 123.7, 127.3, q, 1J = 273.58 Hz - CF_3); 126.2 (CH); (133.8, 134.2, 134.7, 134.9, q, 2J = 34.59 Hz - CF_3); 136.7(C); 142.9 (CH); 151.4(C). ^1H - ^1H COSY NMR (300 MHz, CDCl_3) $\delta\text{H}/\delta\text{H}$ 7.77/7.77, 7.72/7.72, 4.69/4.69. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (300 MHz, CDCl_3) $\delta\text{H}/\delta\text{C}$ 7.77/126.2, 7.72/142.9. ^1H - ^{13}C HMBC NMR $\delta\text{H}/\delta\text{C}$ 7.77/75.4, 7.77/134.7, 7.77/136.7. HRMS ESI^+ [M + Na] $^+$: Anal. Calcd. $\text{C}_{11}\text{H}_5\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_4\text{Na}^+$: 342.9736; encontrada: 342.9731.



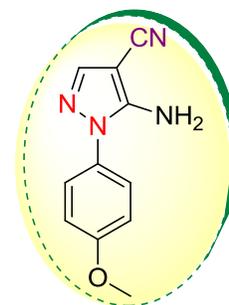


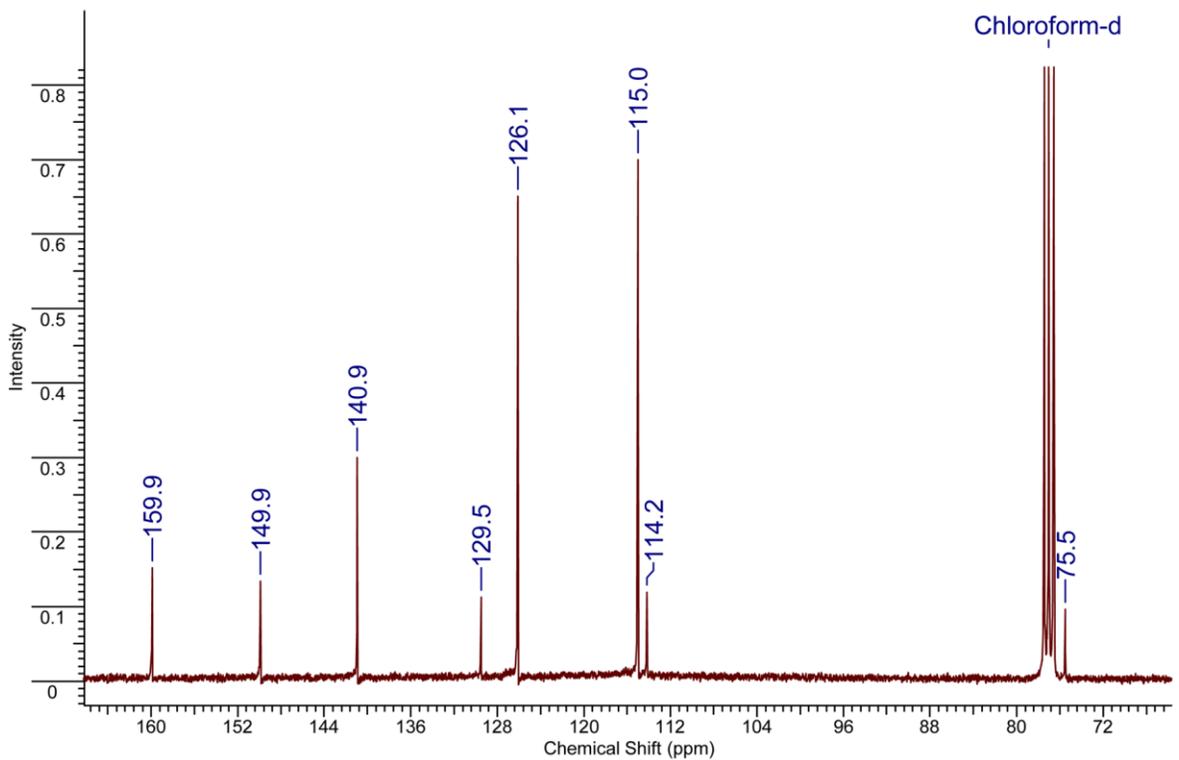
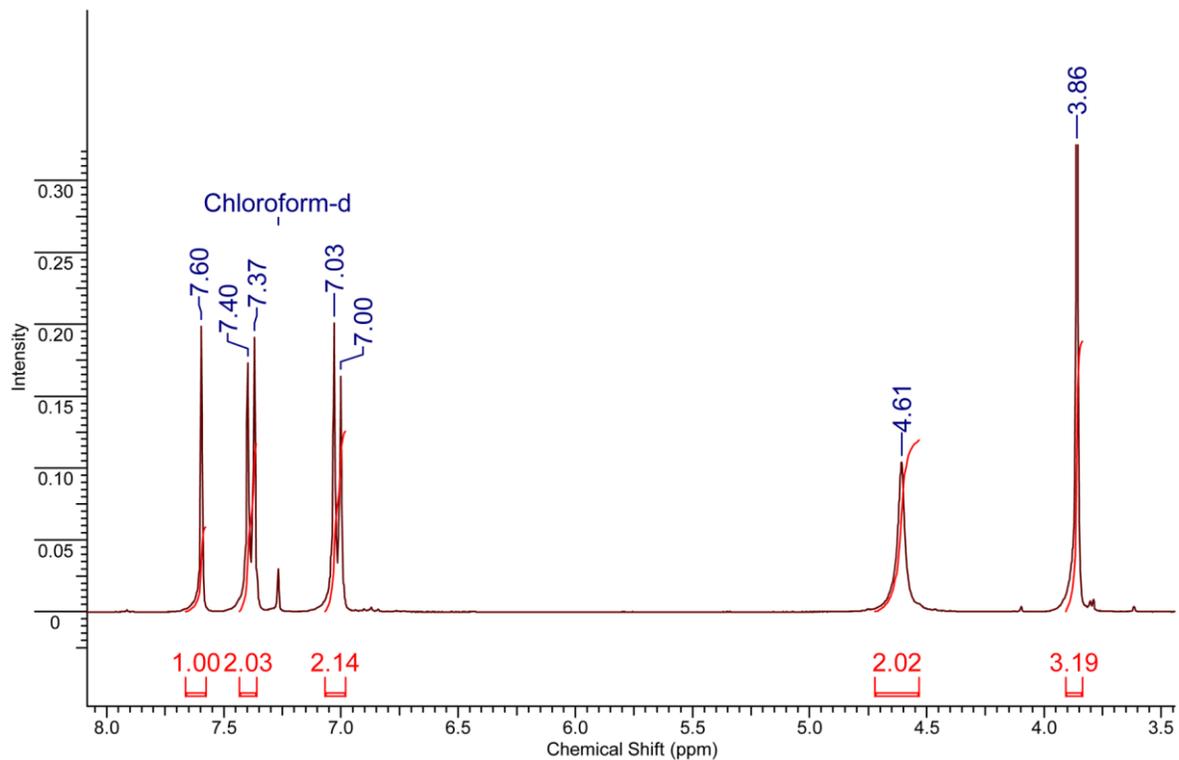
Chloroform-d

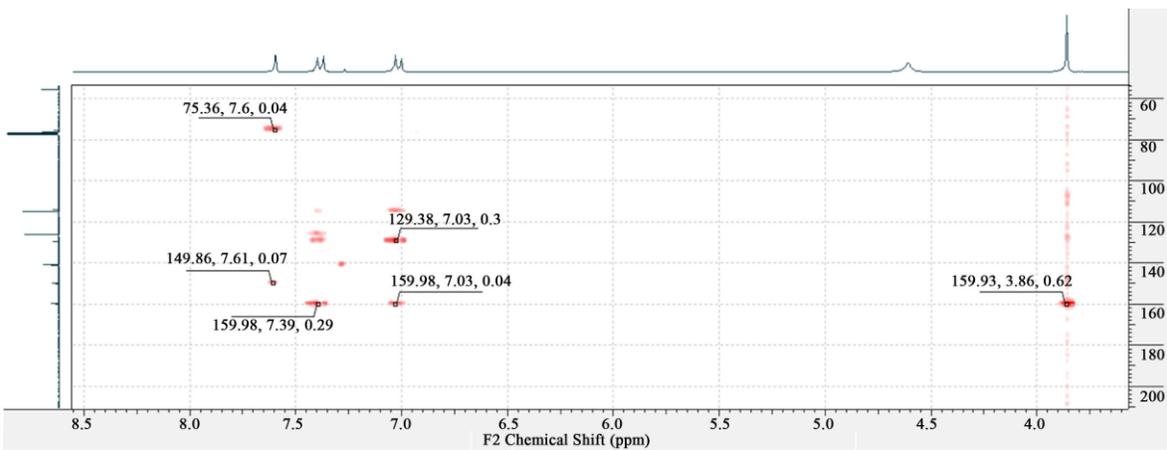
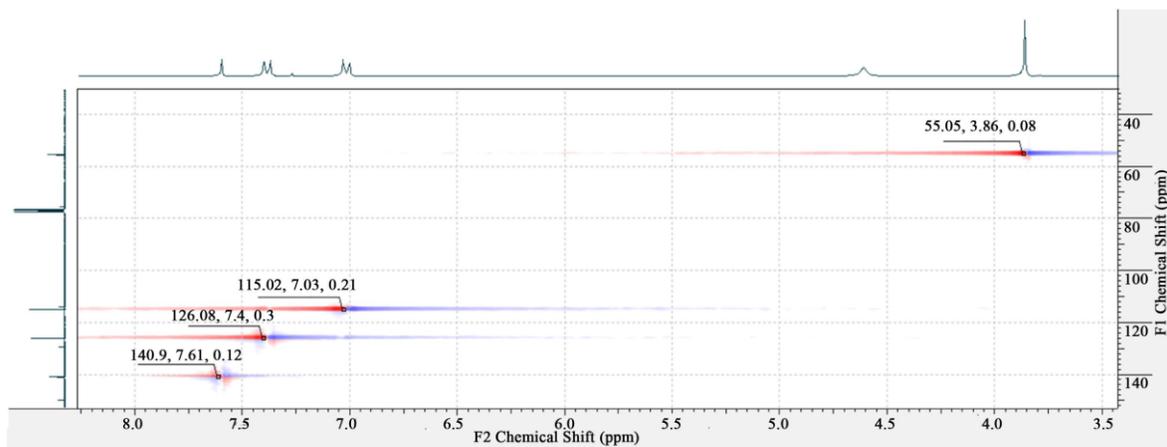
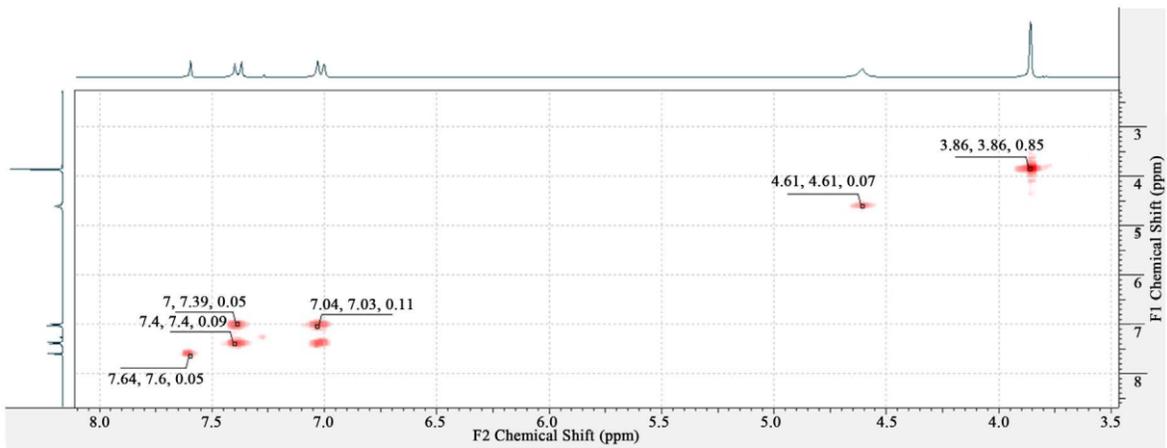




7f. 5-amino-1-(4-metoxifenil)-1H-pirazol-4-carbonitrilo: polvo amarillo oscuro (68%); M.p. 148.4°C - 148.8°C (144.9°C -145.9°C)¹; ¹H RMN [300 MHz (CDCl₃)] δ = 3.86 (s, 3H, CH₃); 4.61(s br, 2H, NH₂); 7.00 - 7.03 (d, ¹J = 8.39Hz, 2H, CH); 7.37 - 7.40 (d, ²J = 9.18Hz, 2H, CH); 7.60 (s, 1H, CH); ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 75.5(C);114.2(C); 115.0 (CH); 126.1(CH); 129.5(C); 140.9 (CH); 149.9 (C); 159.9 (C). MS m/z (%): Calc. 214.08; encontrada: 215.0 [M+H]⁺.

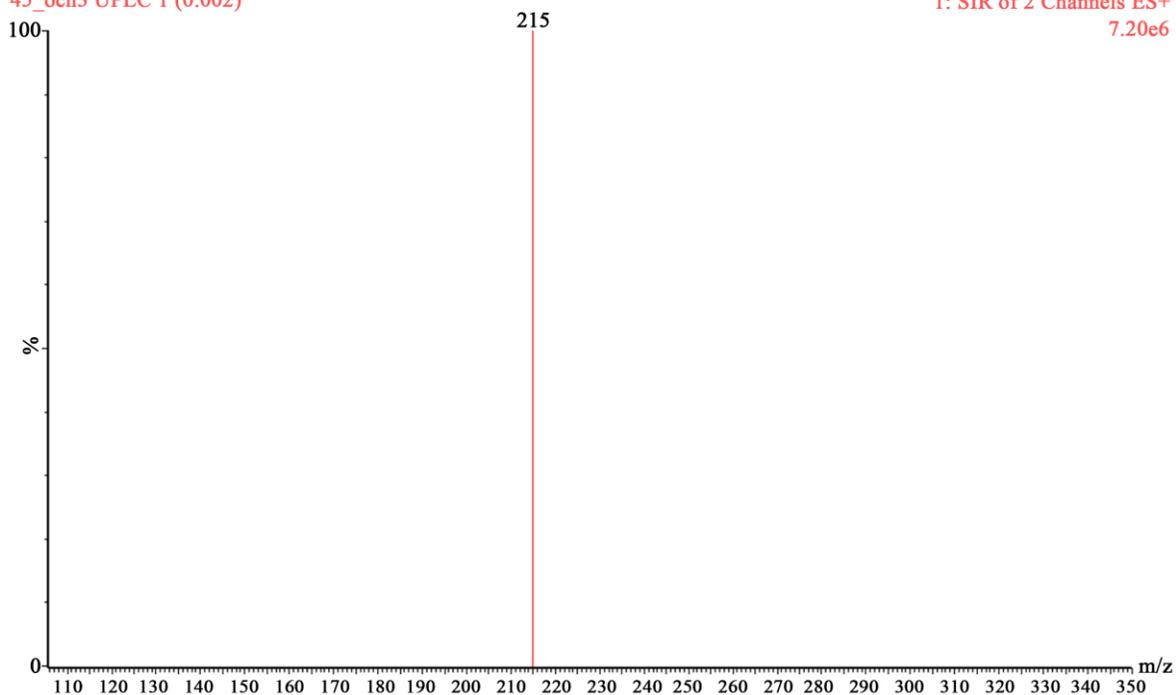




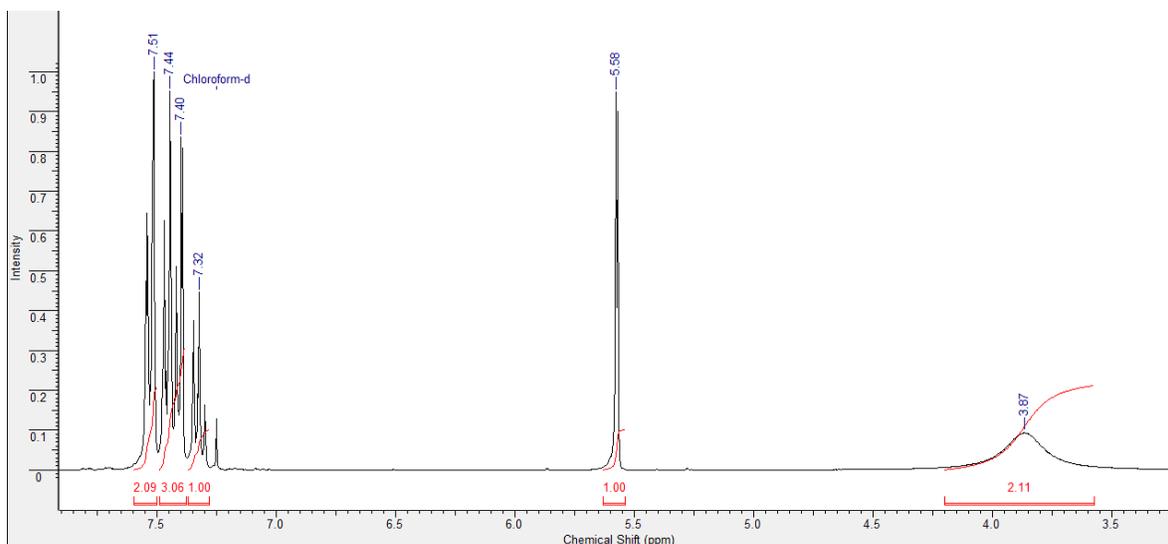


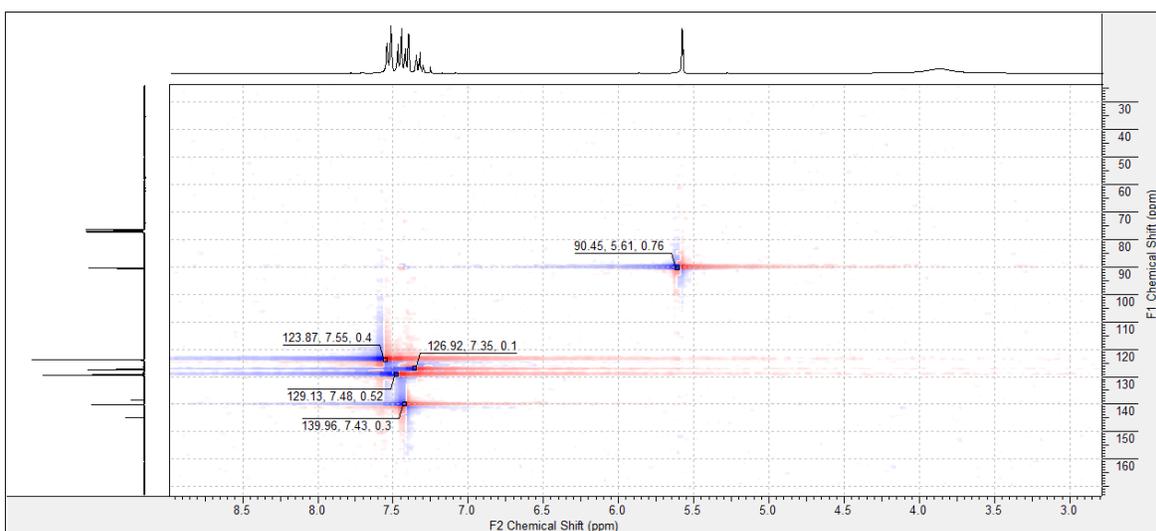
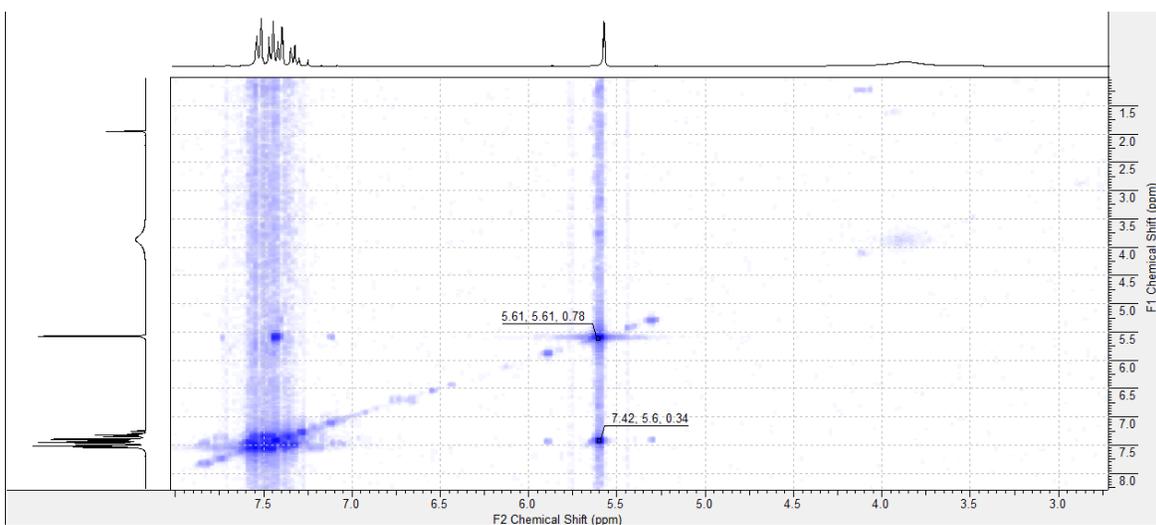
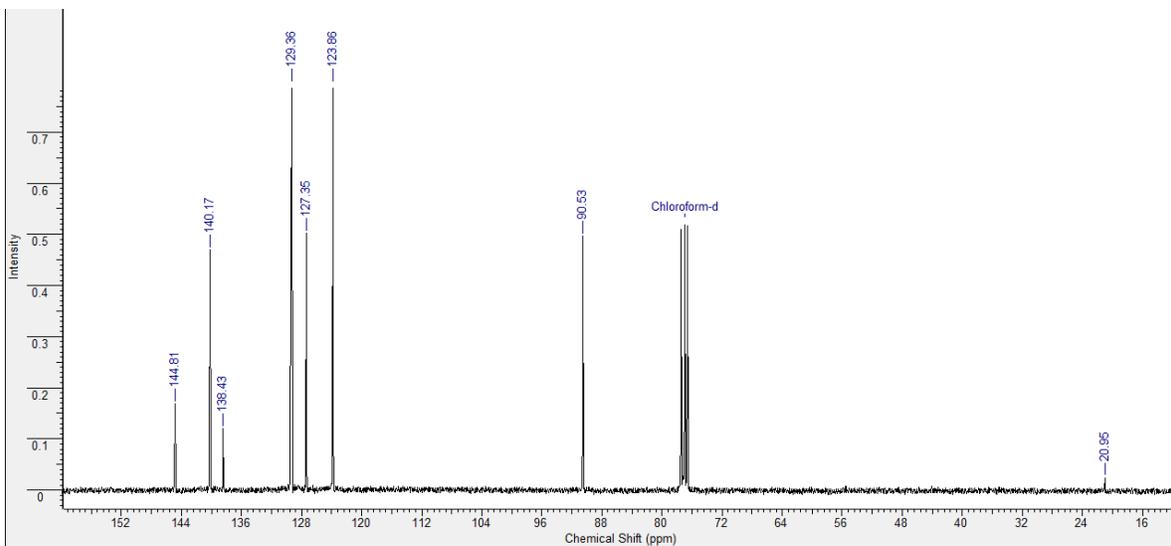
45_och3 UPLC 1 (0.002)

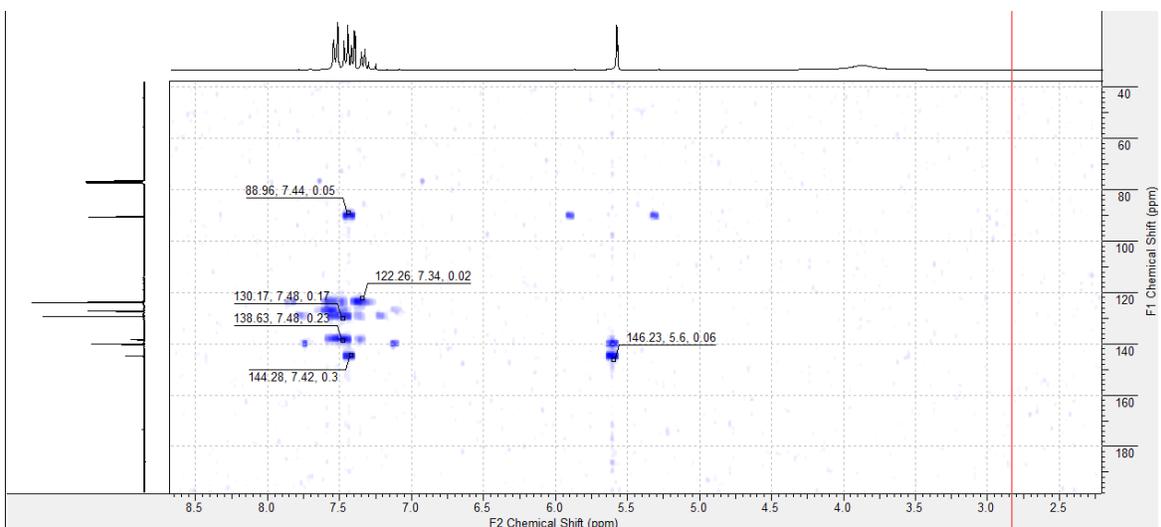
1: SIR of 2 Channels ES+
7.20e6



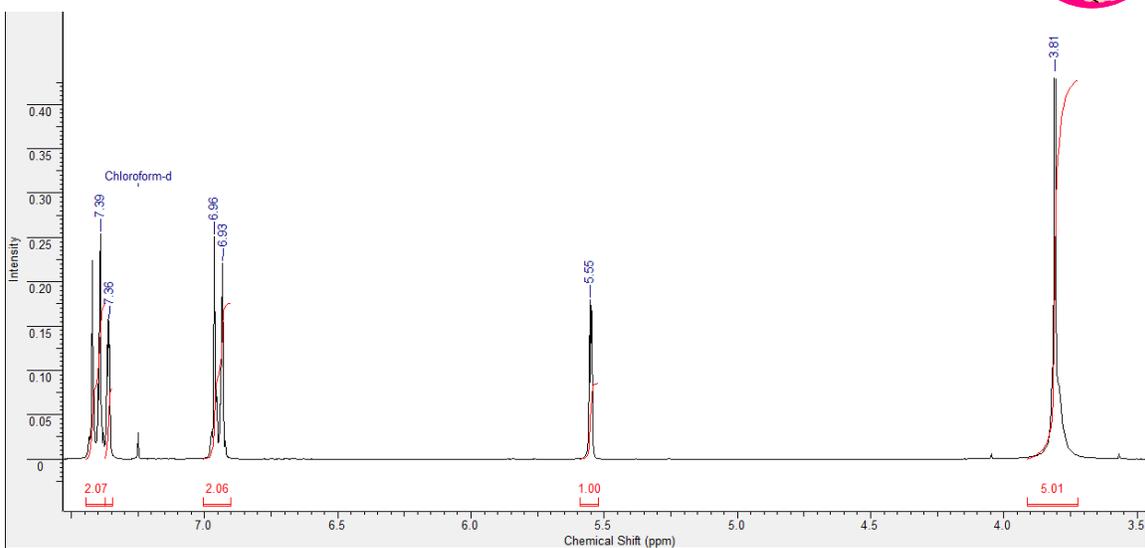
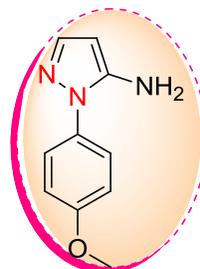
9a 1-phenyl-1H-pirazol-5-amino: C₉H₉N₃ aceite marrón 86%. PM: 159.191g/mol.
Mp: 48 - 50°C ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm) δ: 3.87 (s, 2H, NH₂); 5.58 (d, ¹H, J = 2.0 Hz, H₄); 7.32 (d, ¹H, J = 1.8 Hz, H₃); 7.4-7.51 (m, 5H). ¹³C NMR δ: 90.6; 123.9; 127.4; 129.4; 138.6; 140.3; 144.7. COSY δ: 3.8/3.8; 5.5/5.5; 5.5/7.4; 7.3/7.3; 7.4/7.4; 7.5/7.5. HSQC δ: 90.4/5.5; 123.8/7.5; 127.3/7.3; 129.3/7.4; 140.1/7.4. HMBC δ: 140.1/5.5; 144.8/5.6; 90.5/7.42; 123.8/7.37; 127./7.5; 138.5/7.5; 144.9/7.4^{38,39}.

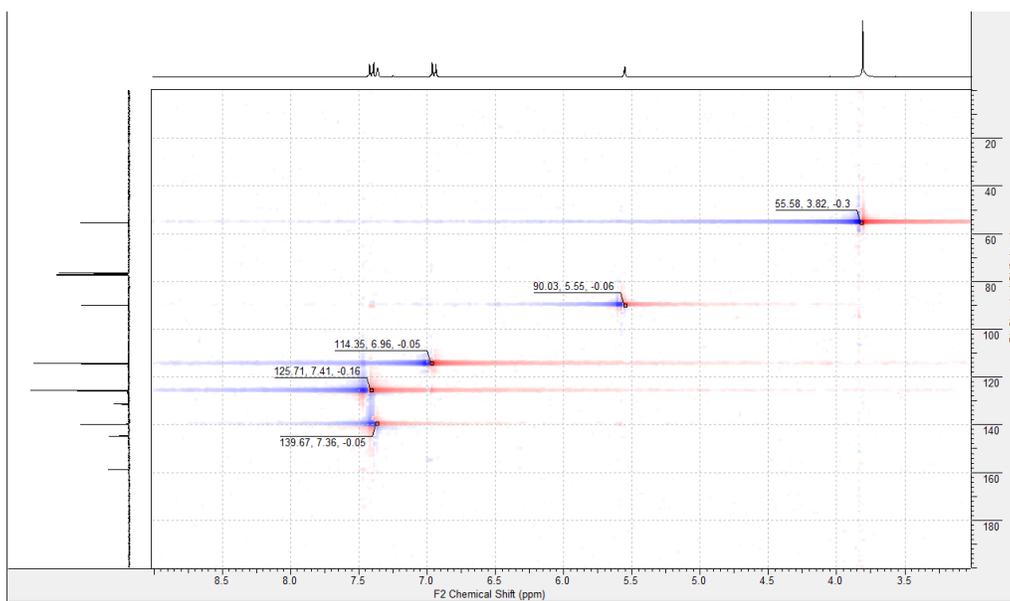
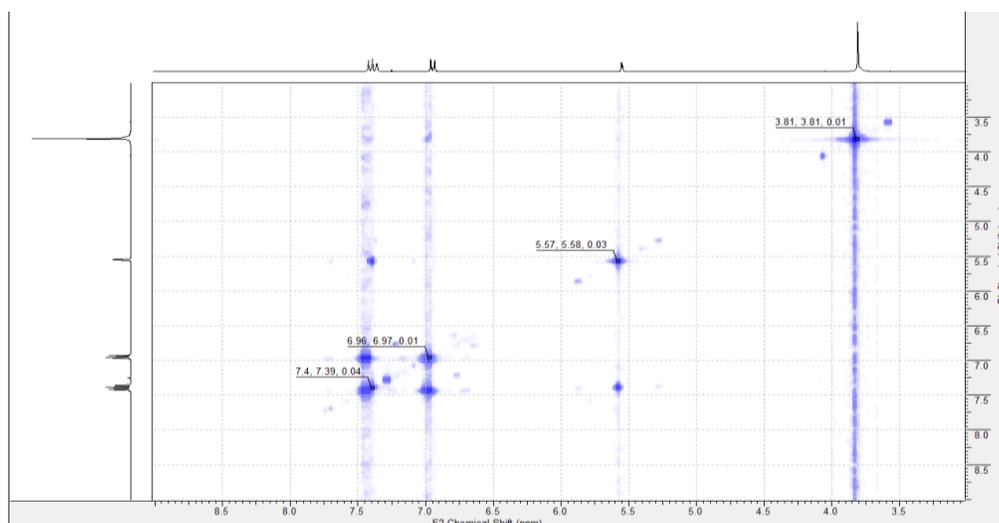
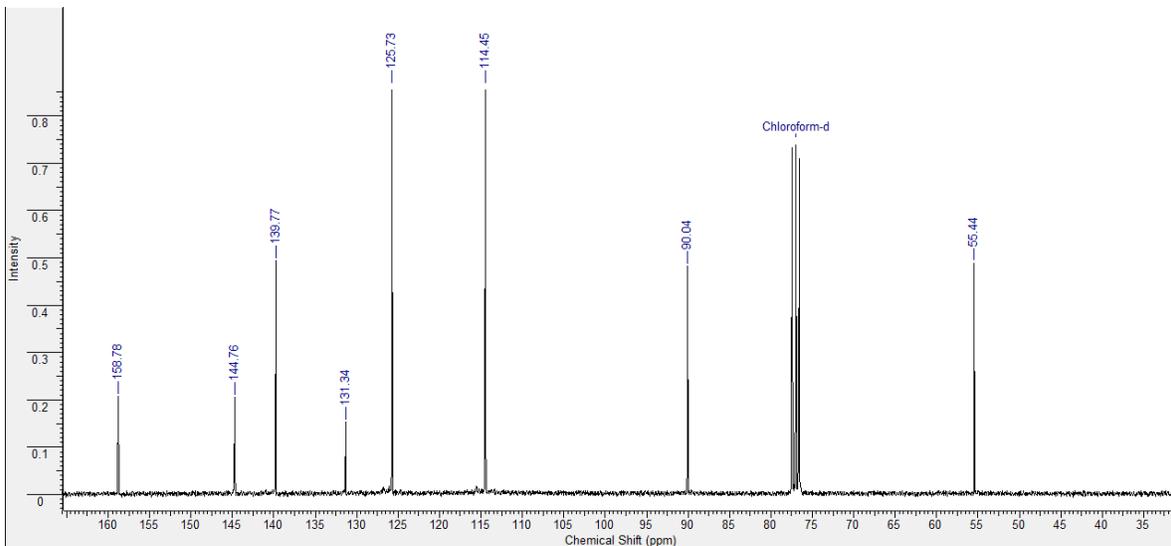






9f-1-(4-metoxifenil)-1H-pirazol-5-amino: $C_{10}H_{11}N_3O$ cristales blancos
 86%.PM: 189.217 g/mol. Mp: 87 - 88°C^{tironi 1989} 1H NMR(300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ : 3.81 (s, 5H, CH y NH_2); 5.55 (d, 1H); 6.96 (dd, 2H); 7.36 (d, 1H); 7.39 (dd, 2H). ^{13}C NMR δ : 55.4(CH); 90.0(CH); 114.4(CH); 125.7(CH); 131.3 (C); 139.7 (CH); 144.7 (C); 158.7 (C). COSY δ : 3.81/3.81; 5.55/5.55; 6.96/6.96; 7.36/7.36; 7.4/7.4. HSQC δ : HMBC δ : 55.5/3.8; 90.0/5.5; 114.4/6.9; 125.7/7.4; 139.7/7.36.

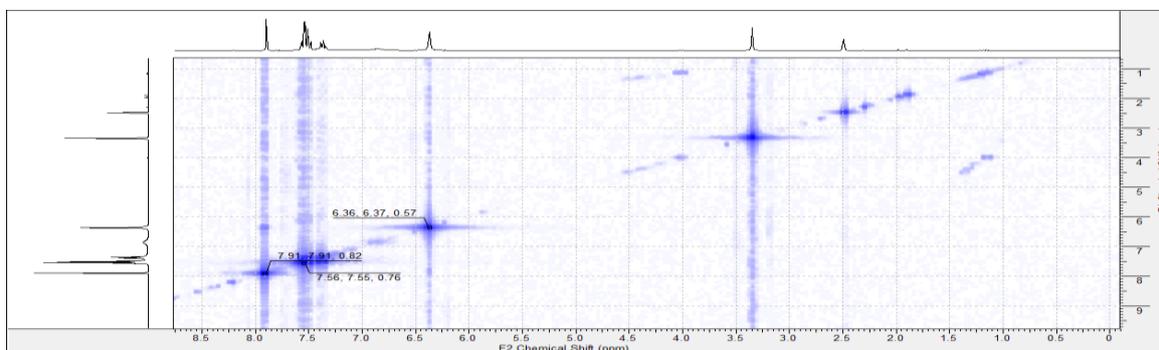
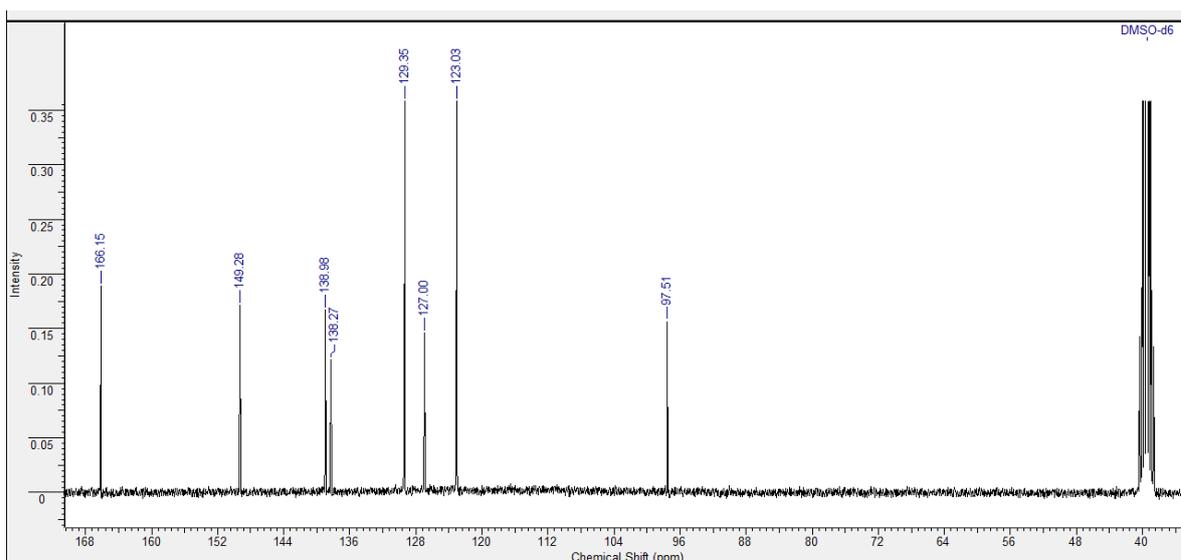
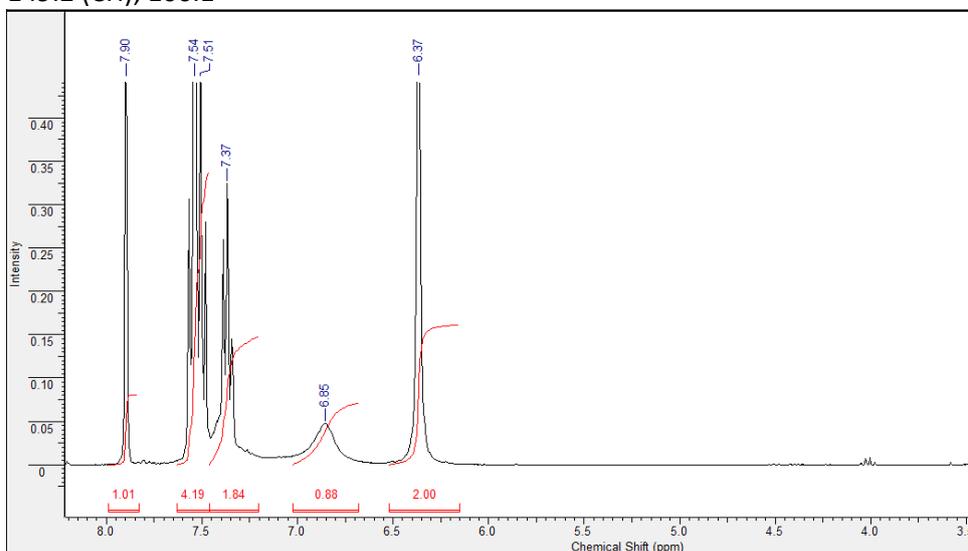
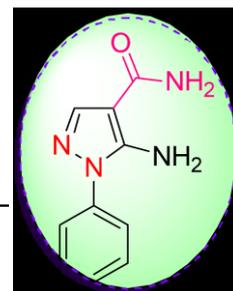


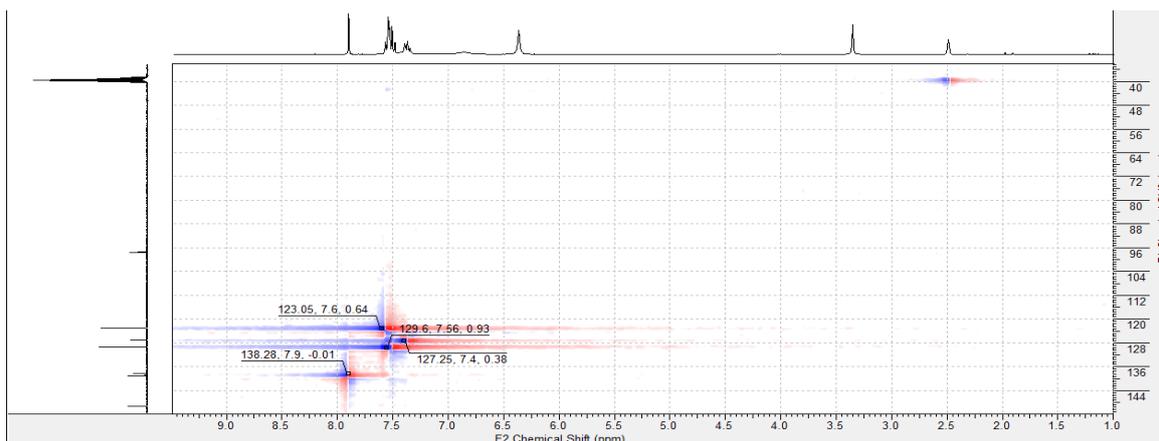
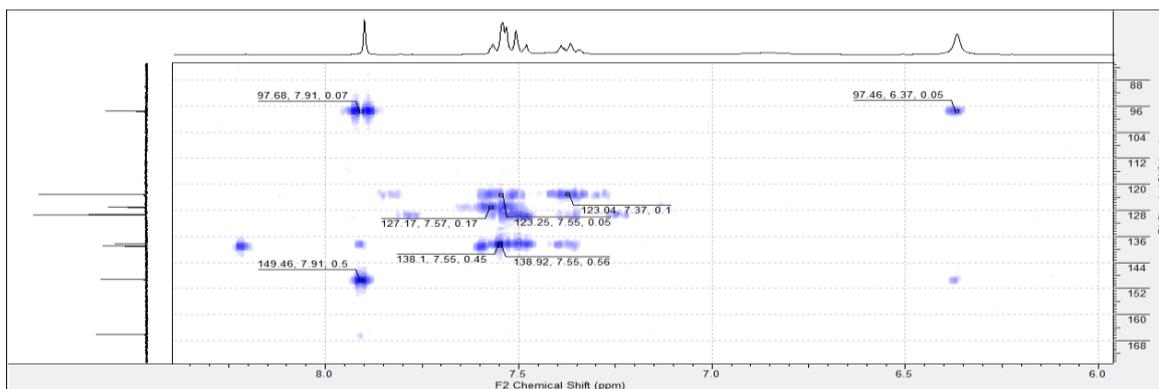


10a: 5-amino-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamida

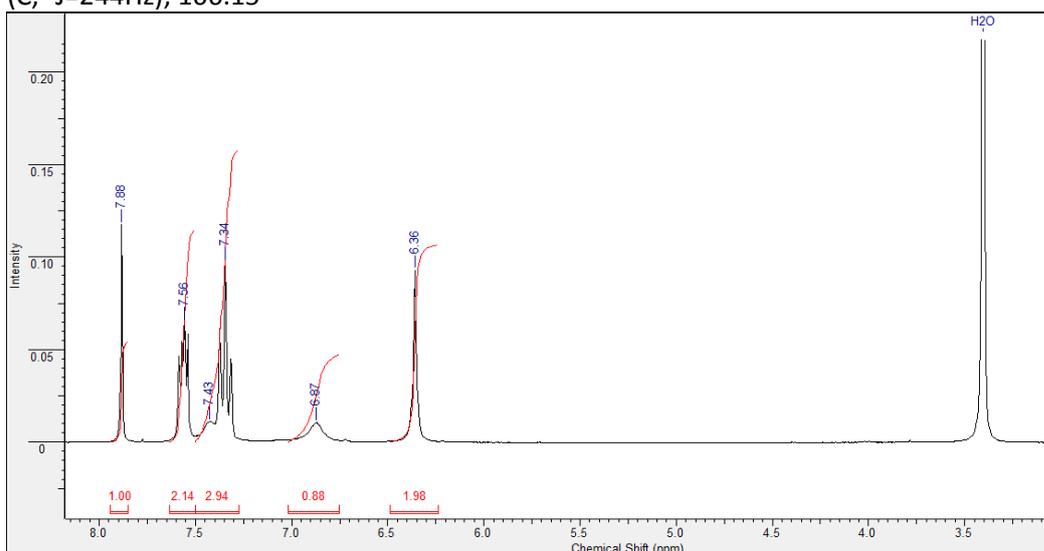
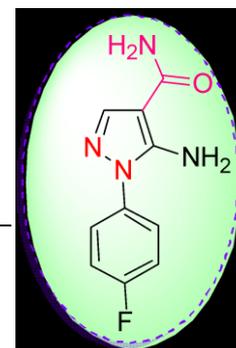
(C₁₀H₁₀N₄O).

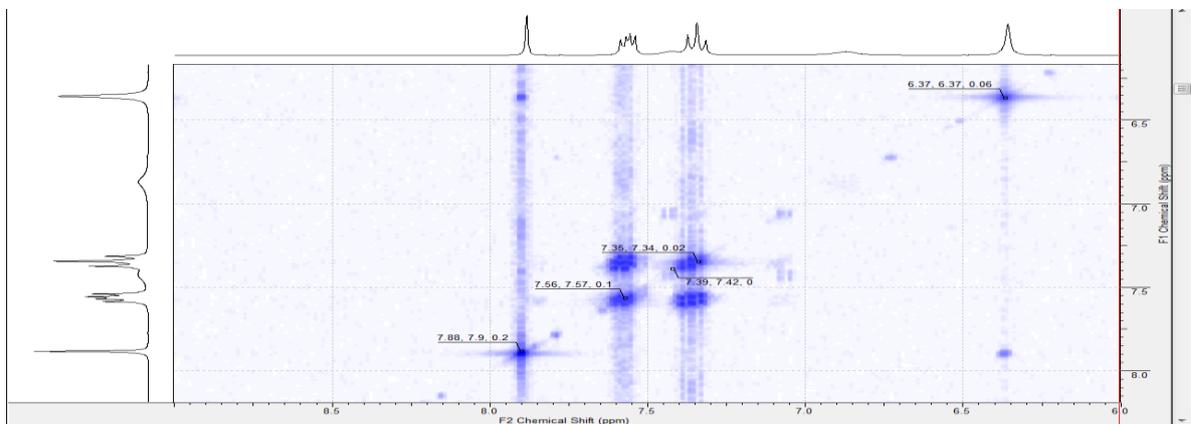
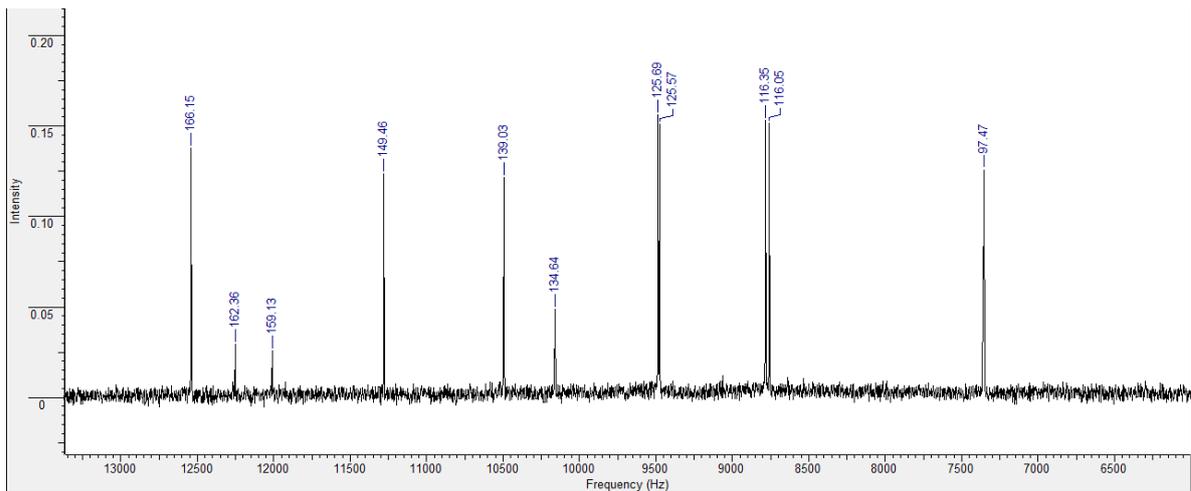
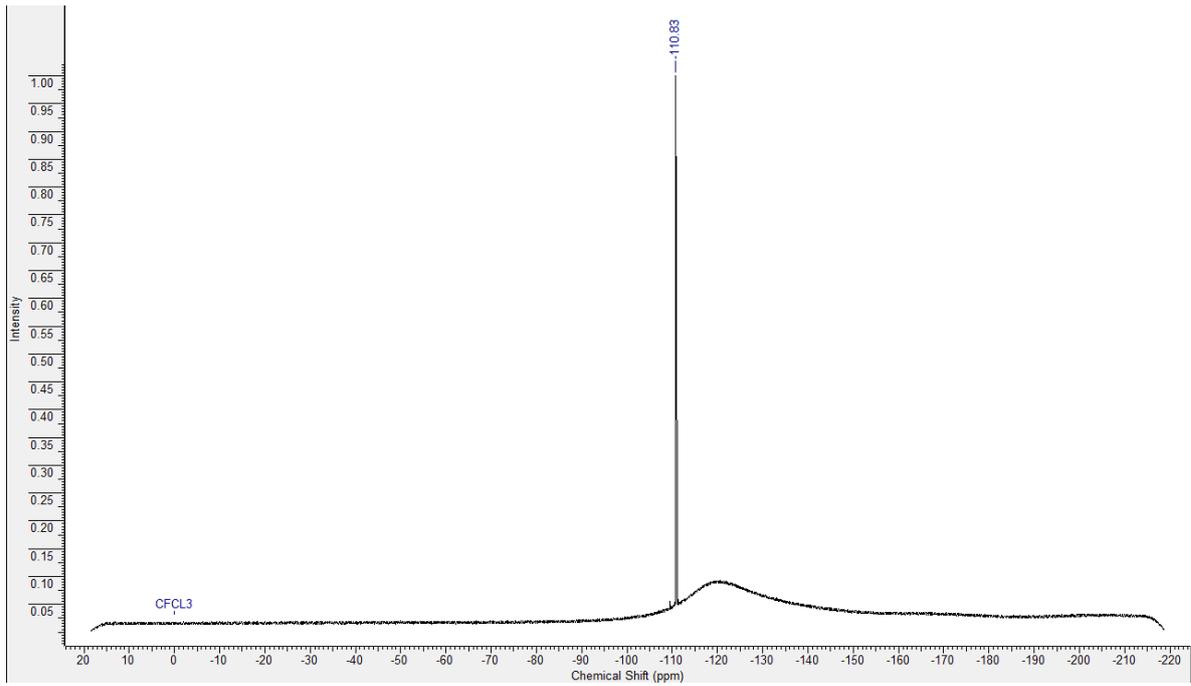
PM:203,0931. M.P= ¹H NMR¹[300 MHz (DMSO-d₆)] δ = 6.37 (s br, 2H, NH₂); 6.85 (s, 2NH₂); 7.37 (m, H, CH); 7.54 (m, 4H, CH); 7.90 (s, H, CH); ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 97.5(C) ; 123.0 (CH) ; 127.0 (C) ; 129.3 (CH) ; 138.2 (C) ; 138.9 (CH) ; 149.2 (CH); 166.1

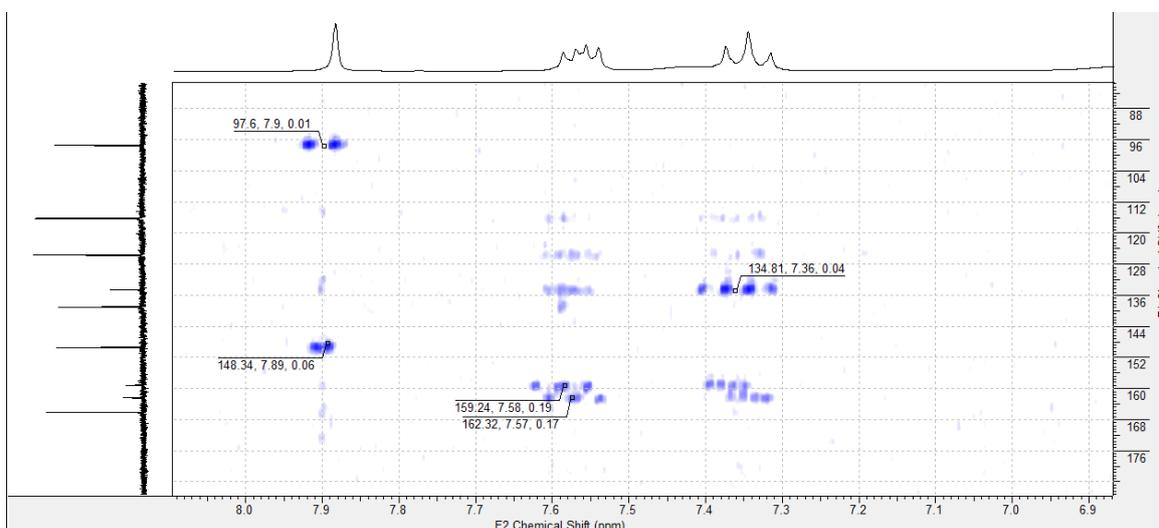
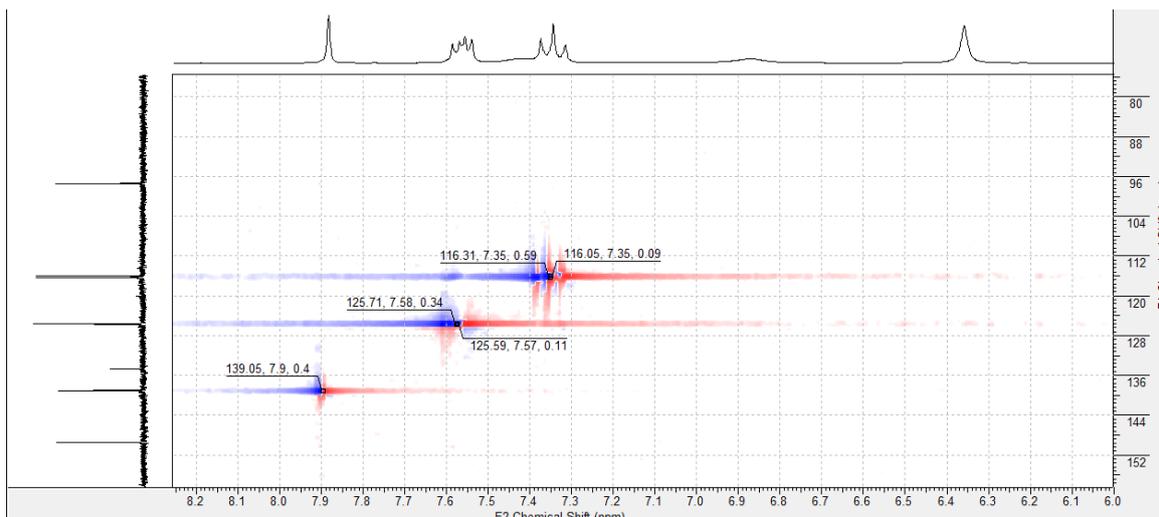




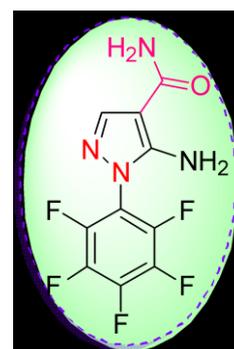
10b. 5-amino-1-(4-fluorophenyl)pirazol-4-carboxamida (C₁₀H₉FN₄O)
 PM:220.207 MP= 242-243.5°C ⁴¹HNMR [300 MHz (DMSO-d₆)] δ = 6.36 (s, 2H, NH₂); 6.87 (sbr, 1H, NH); 7.34 (t, ¹J:0.03; 2H, CH); 7.43 (s br, H, NH); 7.56 (m, 2H, CH); 7.88 (s, 1H, CH) ¹⁹F NMR δ = -110.83. ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 97.4(C); 116.0-116.3 (CH ¹J=23Hz); 125.5-125.6 (CH, ²J=9.15Hz); 134.6 (C); 139.0 (CH); 149.4 (C); 159.1-162.3 (C, ³J=244Hz); 166.15

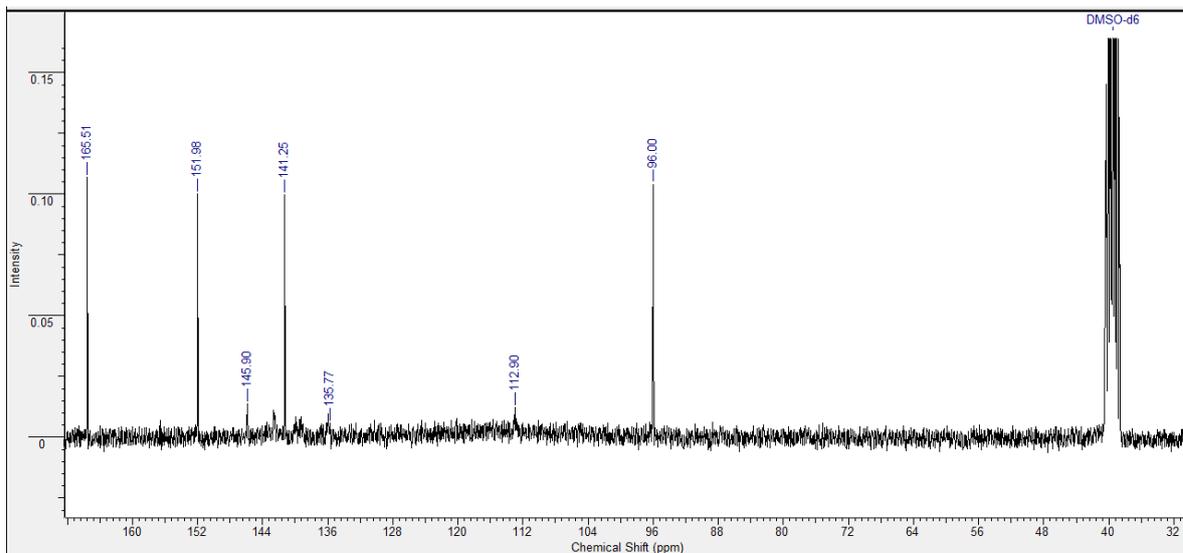
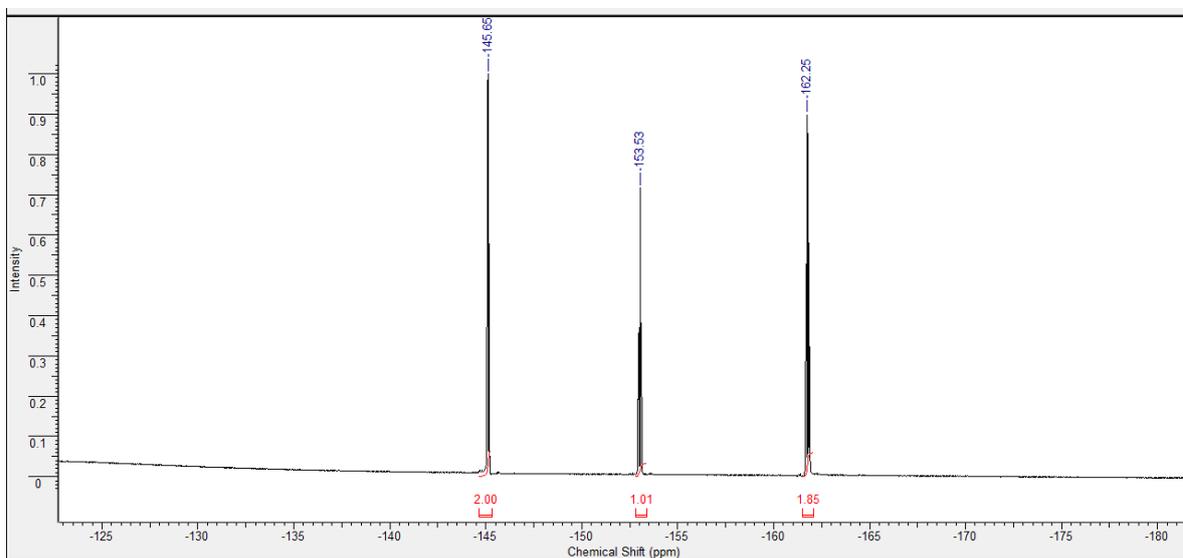
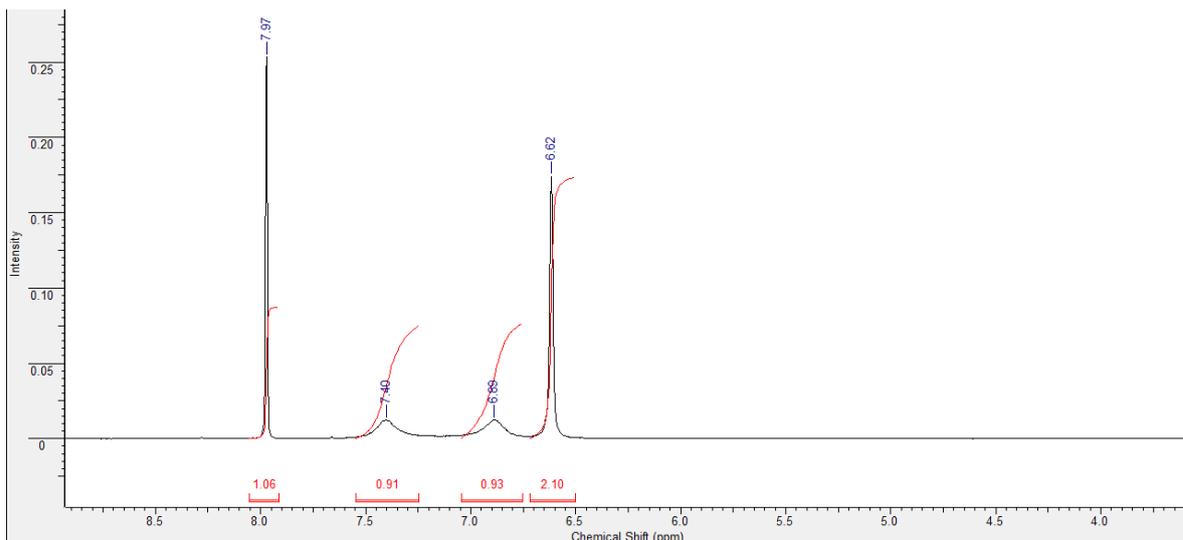


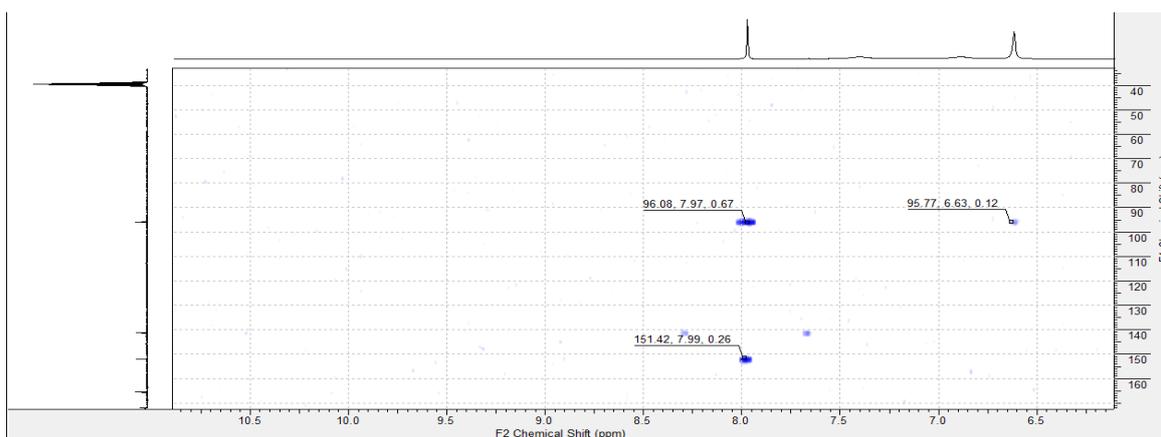
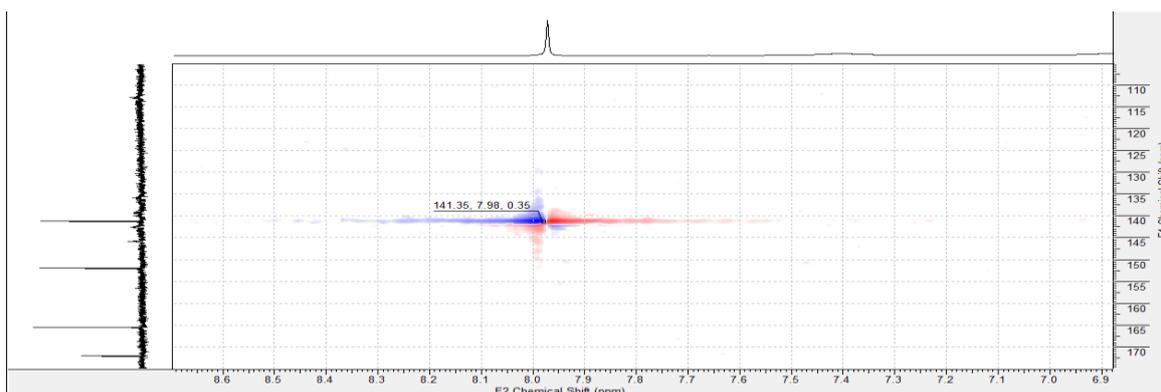
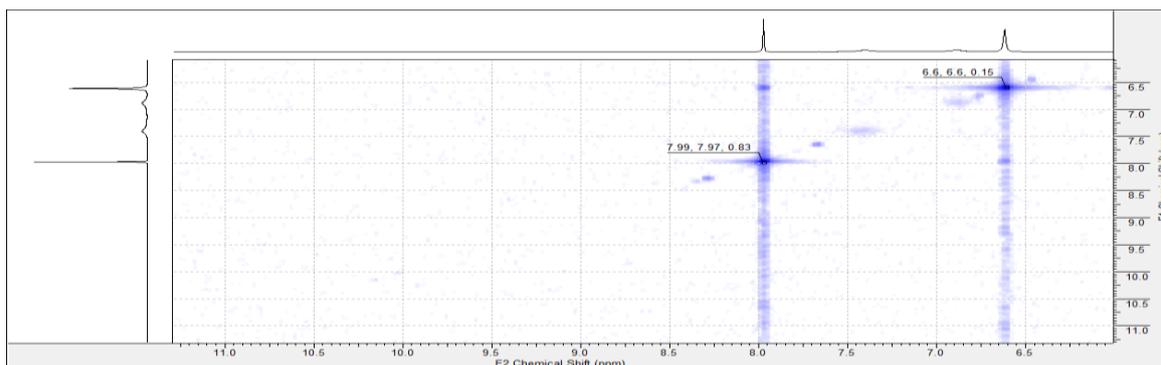




10c: 5-amino-1-(perfluorofenil)-1H-pirazol-4-carboxamida (C₁₀H₅F₅N₄O)
 PM:292.04 ¹H NMR [300 MHz (DMSO-d₆)] δ= 6.62 (s, 2H, NH₂); 6.89 (s br, 1H, NH); 7.40 (s br, H, NH); 7.97 (s, 1H, CH). ¹⁹F NMR δ = -145.6 (d, 2F, J=18.4Hz); -153.5 (t, 1F, J=22.7Hz); -162.25 (t, 2F, J=20.4Hz). ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 96.0 (C); 112.9 (CH); 135.7 (CH); 141.3 (CH); 145.9 (CH); 151.9 (C); 165.5 (C); No fue posible asignar los demás carbonos correspondientes a esta molécula.

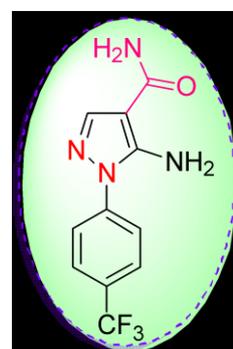


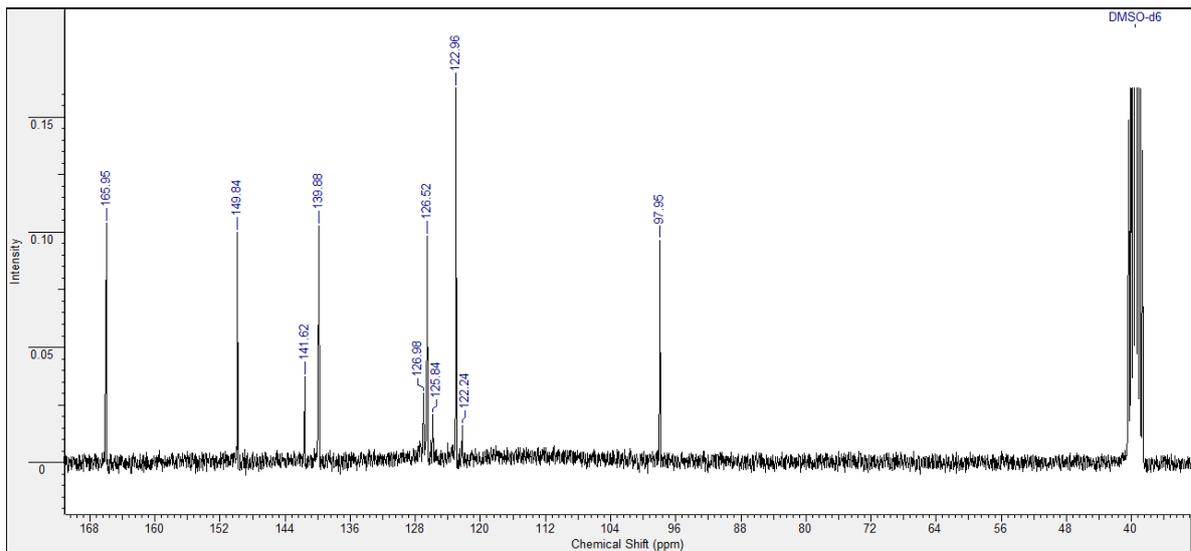
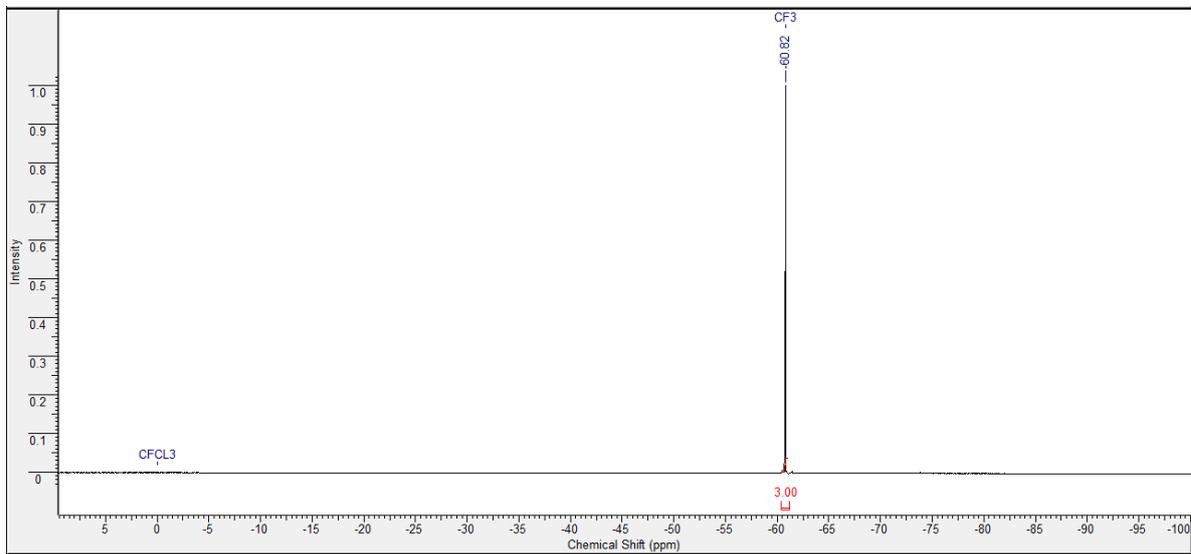
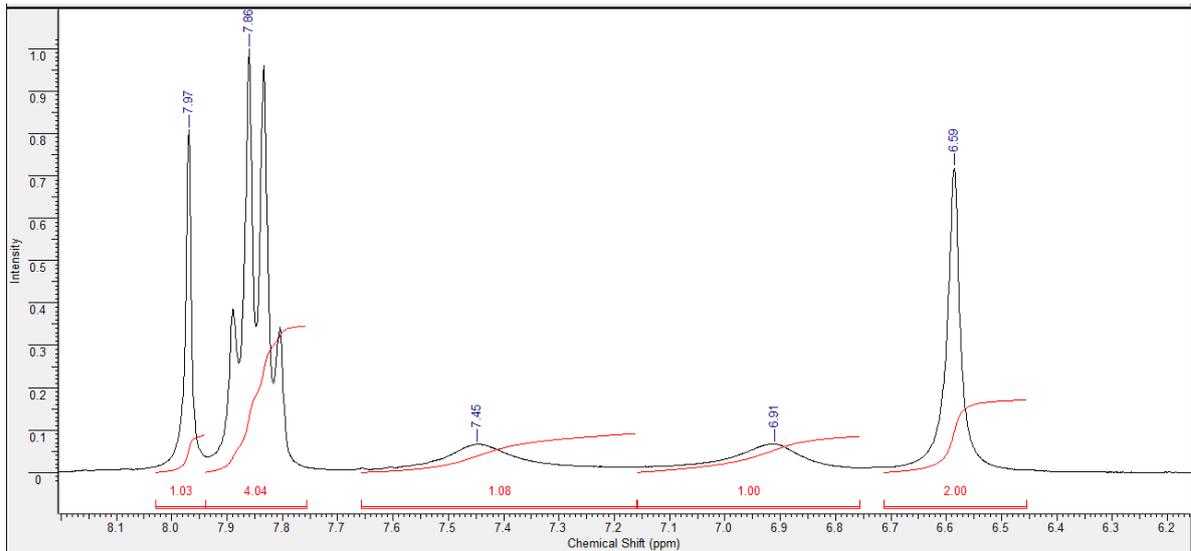


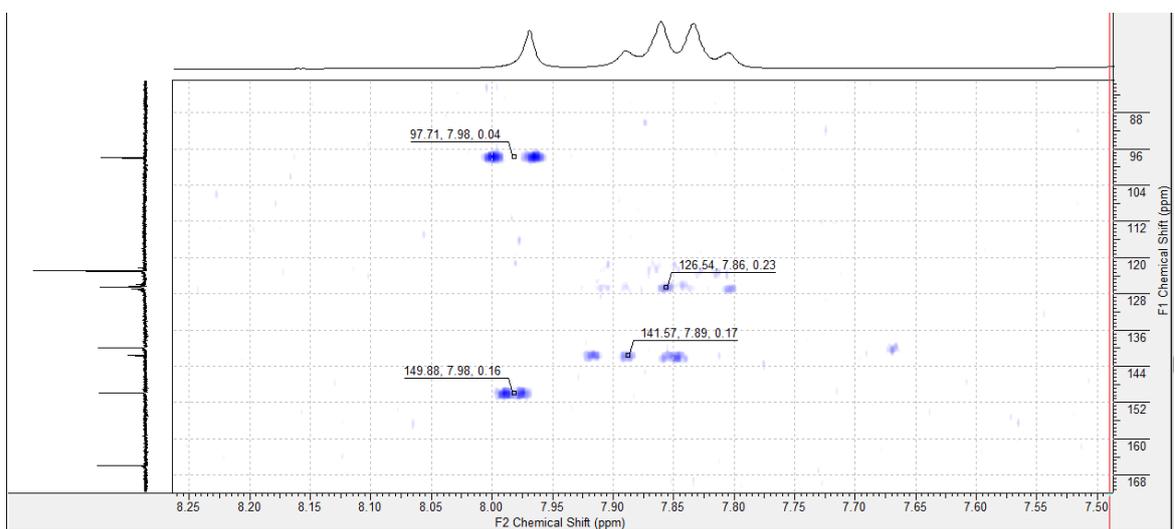
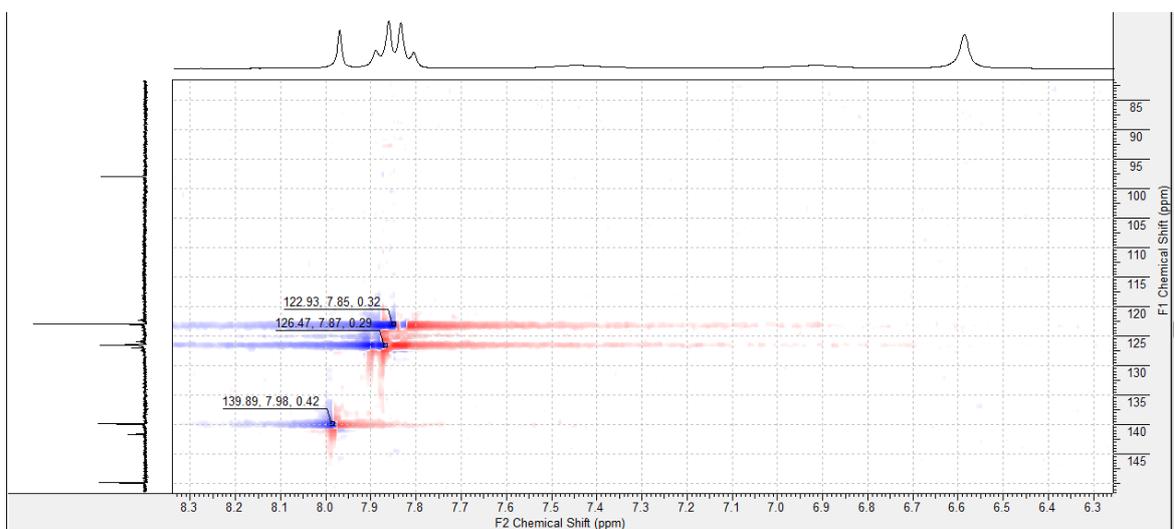
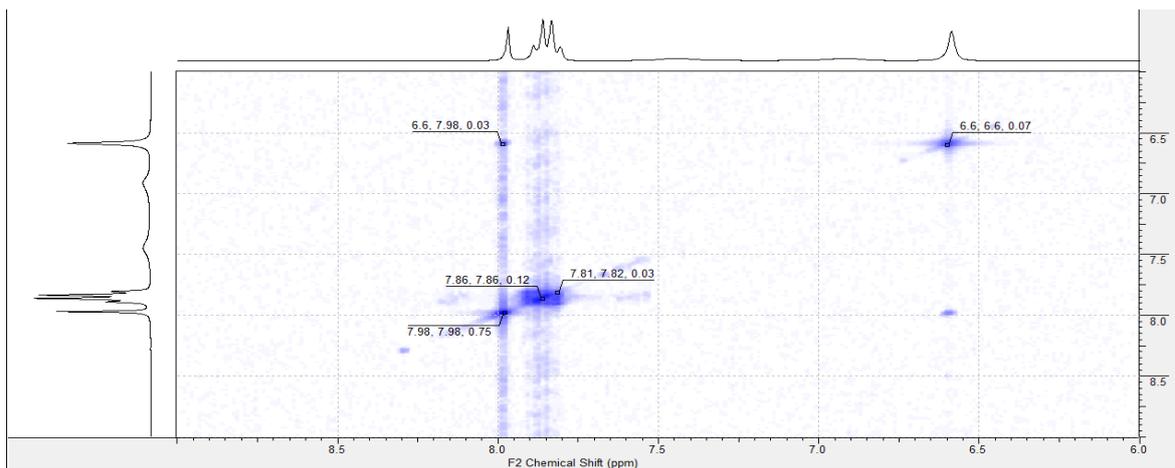


10d *5-amino-1-(4-(trifluorometil)fenil-1H-pirazol-4-carboxamida*

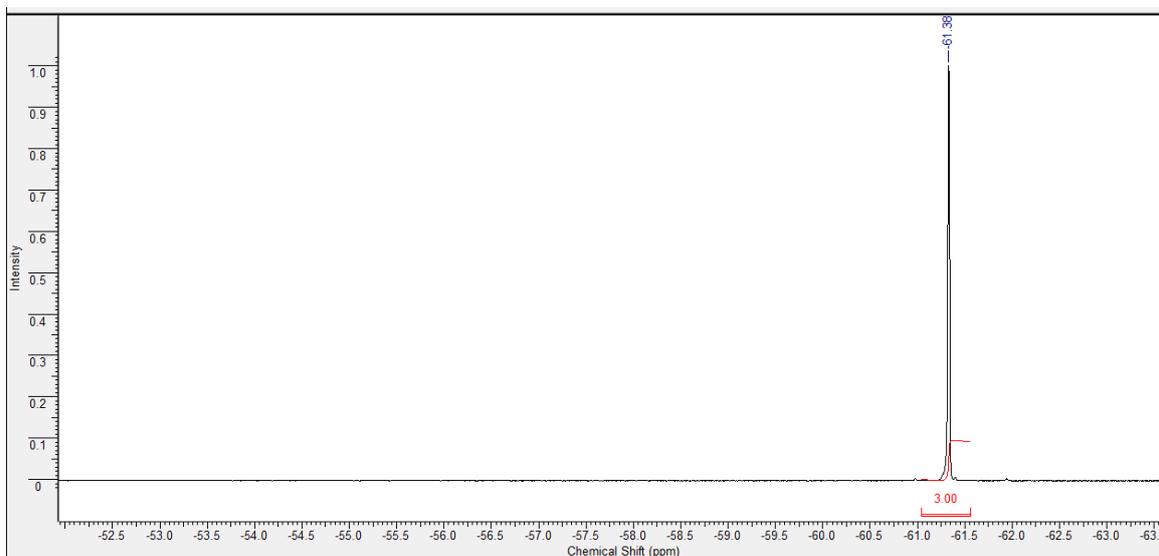
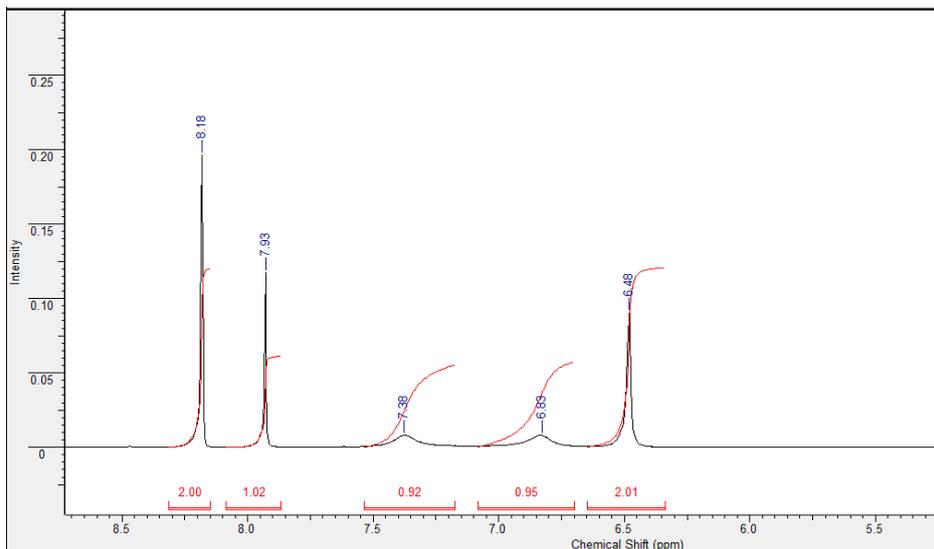
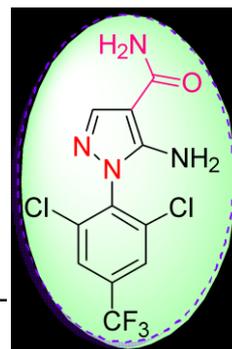
($C_{11}H_9F_3N_4O$) PM: 270.215 gr/mol. 1H NMR [300 MHz (DMSO- d_6)] δ = 6.6 (s, 2H, NH_2); 6.91 (s br, 1H, NH); 7.45 (s br, H, NH); 7.86 (cuat, 4H, CH, $^1J=8.77$ Hz, $^2J=8.43$). ^{19}F NMR δ = -60.82 (s, 3F) ^{13}C NMR [75 MHz]: δ = 97.9 (C); 122.2 (CH); 122.9 (CH); 125.8 (CH); 126.5 (CH); 126.9 (CH); 139.8 (C); 141.6 (C); 149.8 (C); 165.9 (C).

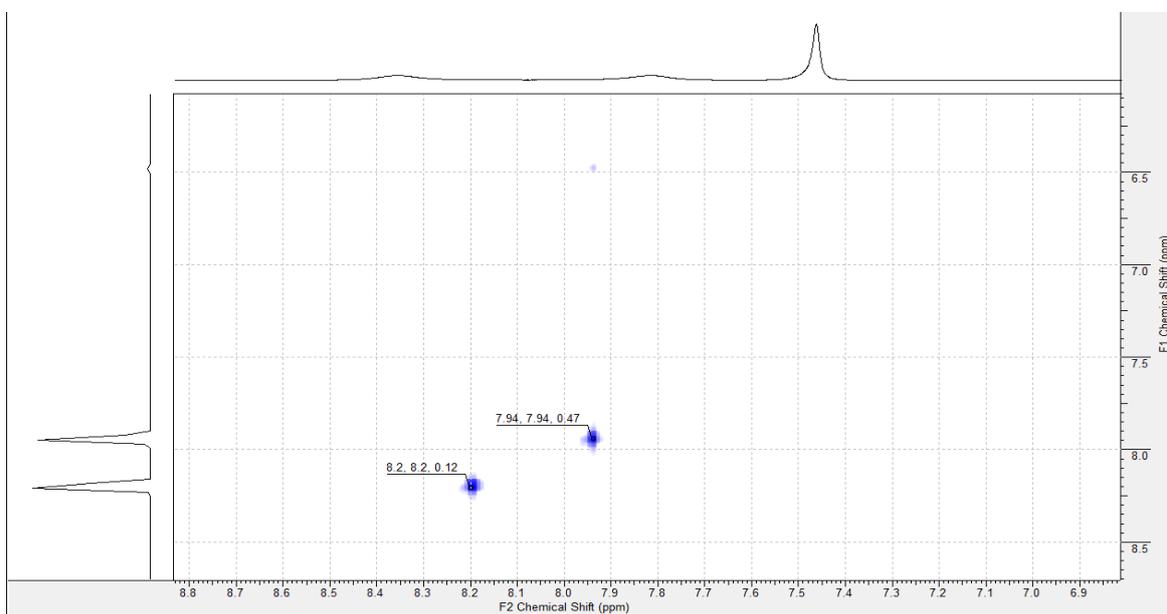
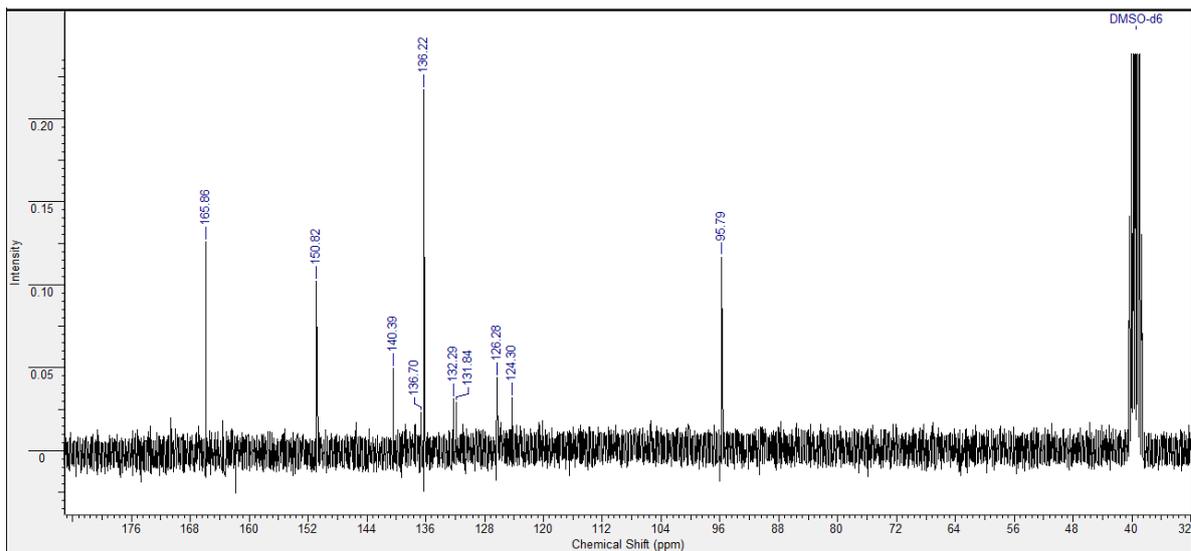


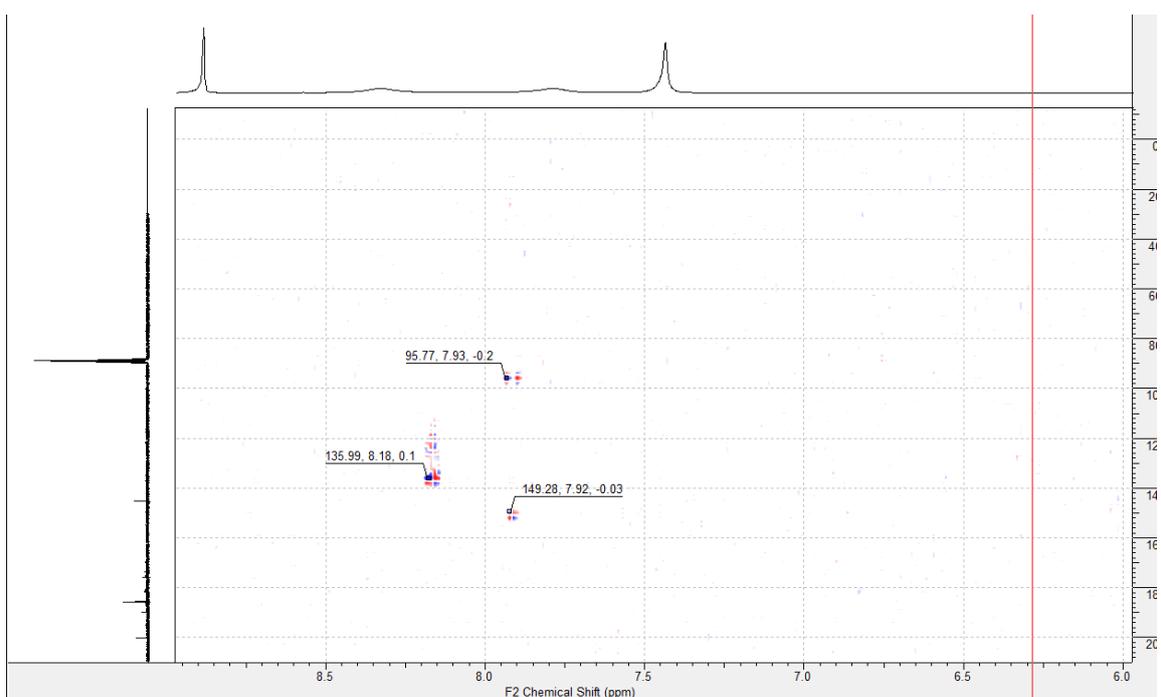
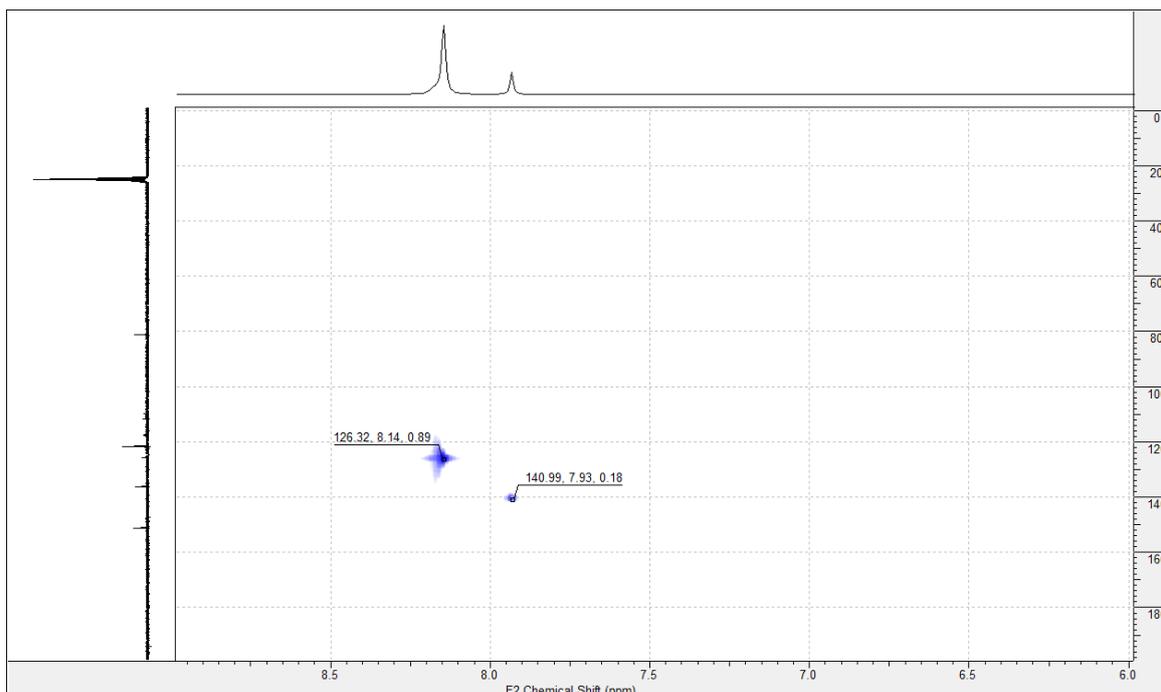




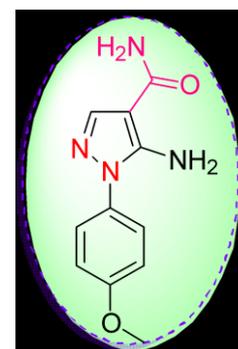
10e 5-amino-1-(2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-pirazol-4-carboxamida (C₁₁H₇Cl₂F₃N₄O) PM: 339.104gr/mol. ¹H NMR [300 MHz (DMSO-d₆)] δ = 6.48(s, 2H, NH₂); 6.83 (s br, 1H, NH); 7.38 (s br, H, NH); 7.93 (s, H, CH); 8.18 (s, 2H, CH). ¹⁹F NMR δ = -61.38 (s, 3F) ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 95.7 (C); 124.3 (C); 126.3 (CH); 131.8 (C); 132.3 (C); 136.2 (CH); 136.7 (C); 140.4 (CH); 150.8 (C); 165.9 (C).

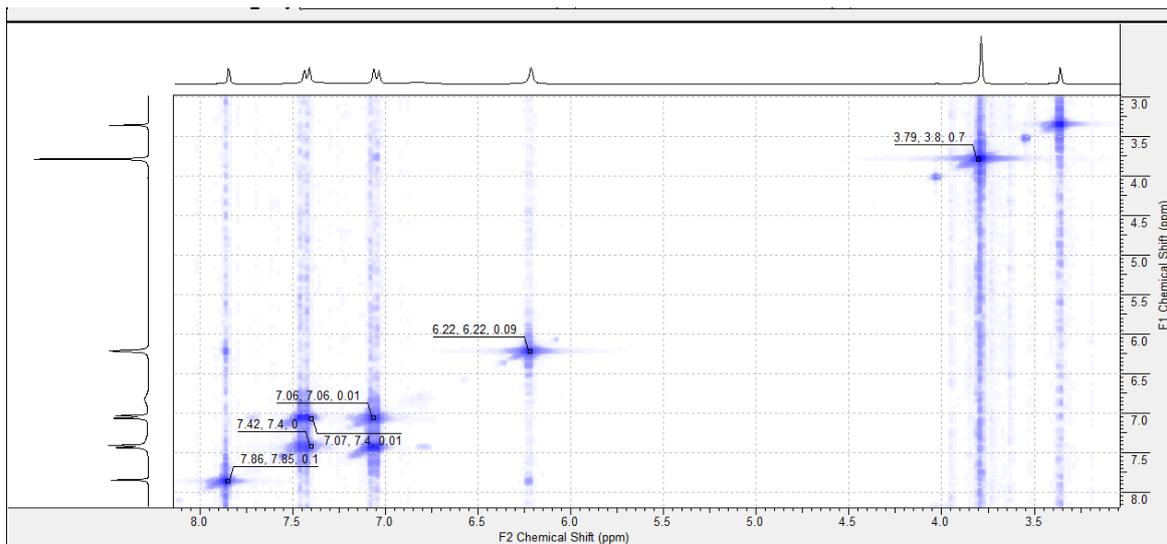
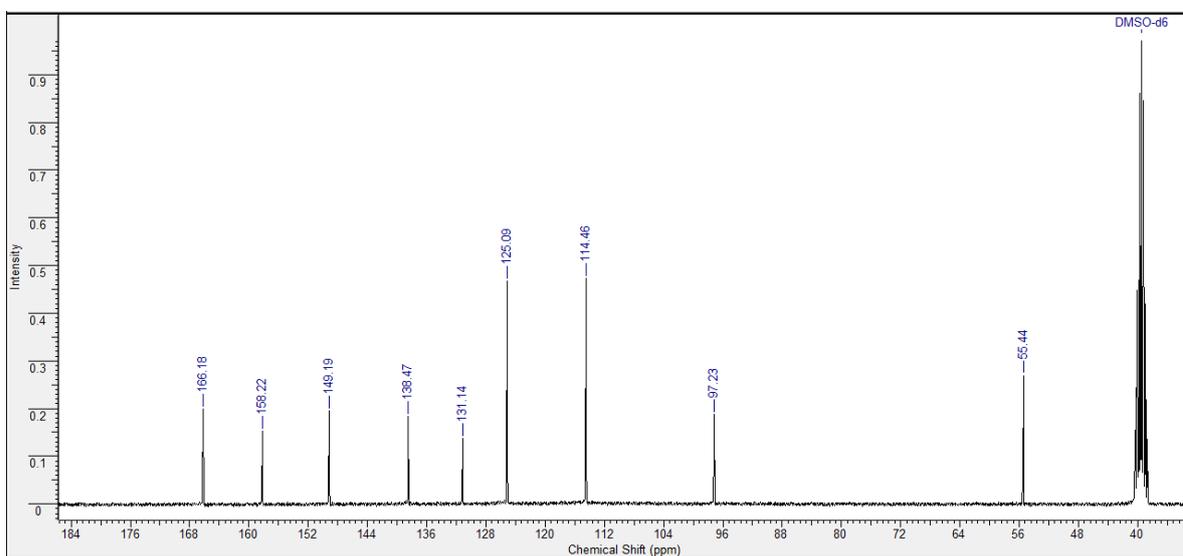
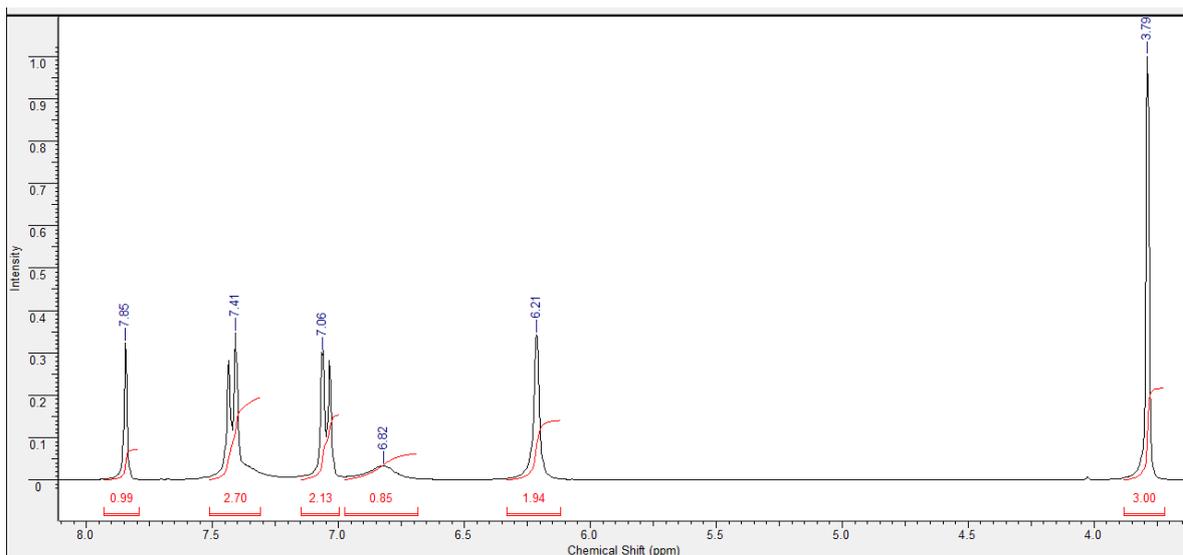


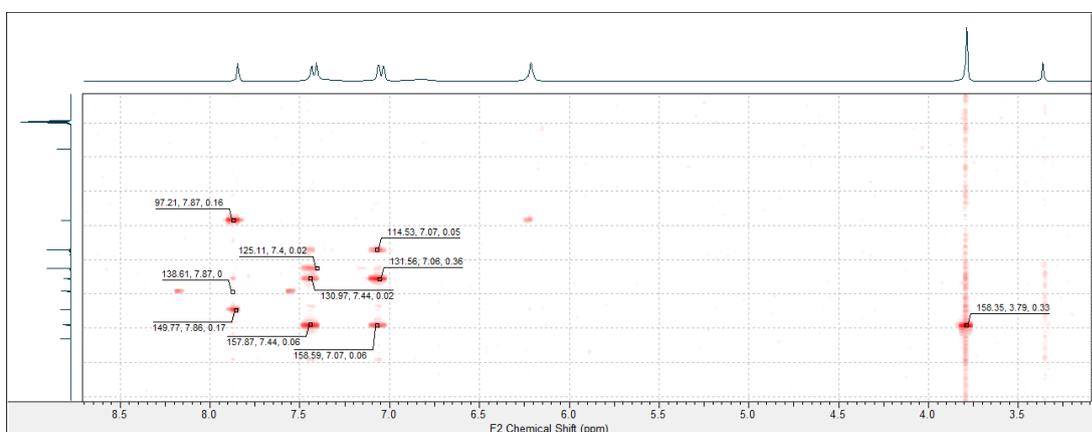
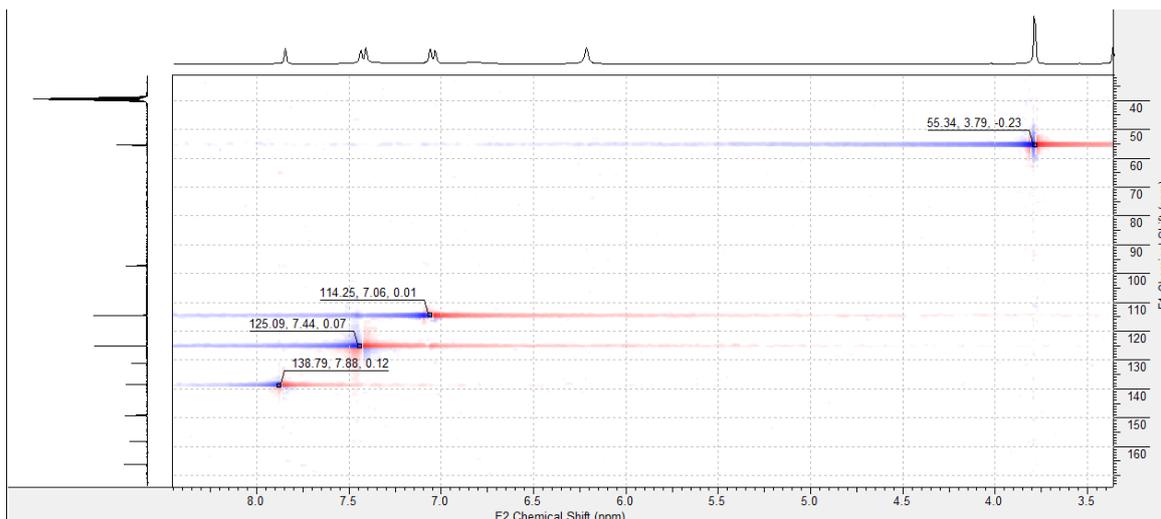




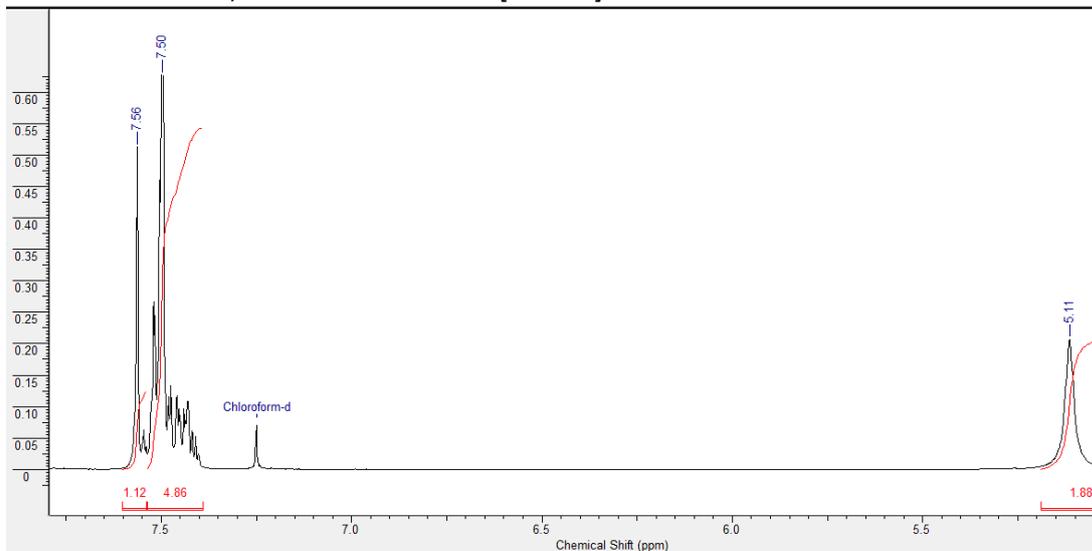
10f *5-amino-1-(4-(metoxifenil)-1H-pirazol-4-carboxamida* (C₁₁H₁₂N₄O) PM: 232.242 gr/mol. ¹H NMR [300 MHz (DMSO-d₆)] δ=3.79 (s,3H,CH₃); 6.21 (s, 2H, NH₂); 6.82 (s br,1H, NH); 7.06 (d, 2H, CH, ¹J= 7.20Hz); 7.40 (d, 3H:2 CH, ²J=7.20Hz,1H,NH). ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 55.4 (CH₃);97.2 (C); 114.5 (CH); 125.1 (CH); 131.1 (C); 138.5 (CH); 149.2 (C); 158.2 (C); 166.2 (C).

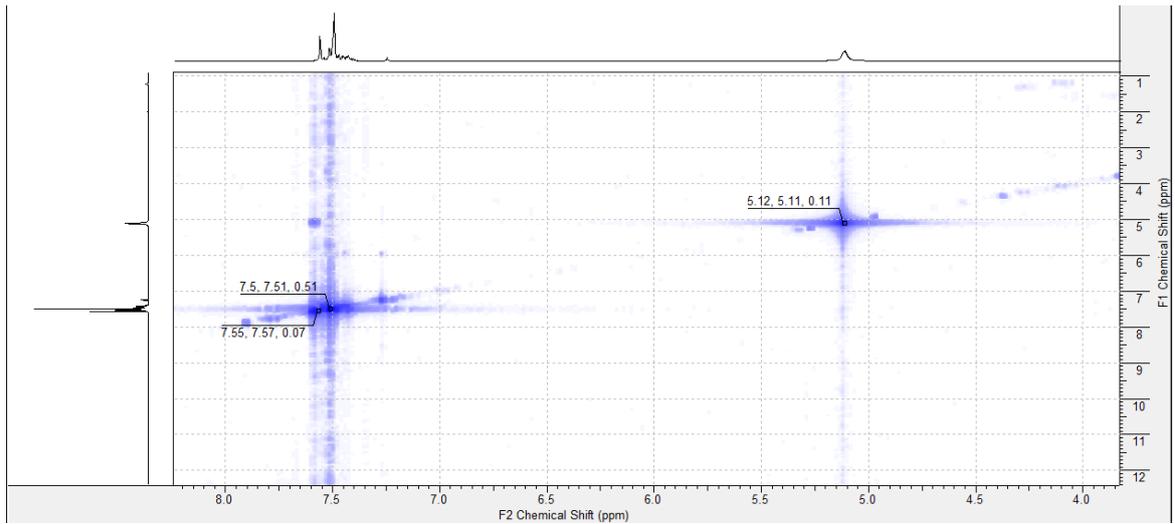
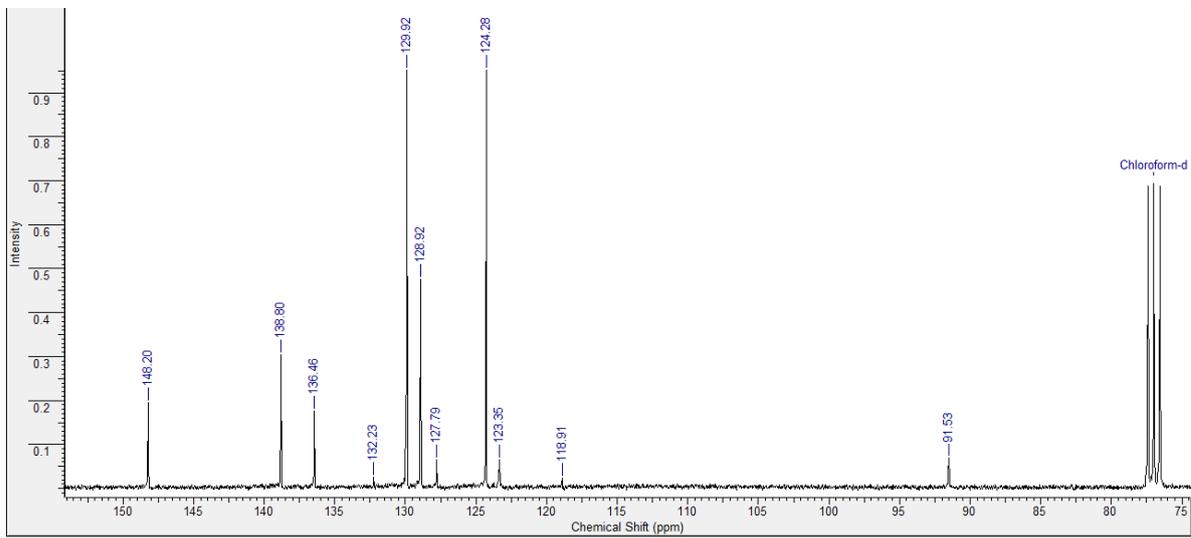
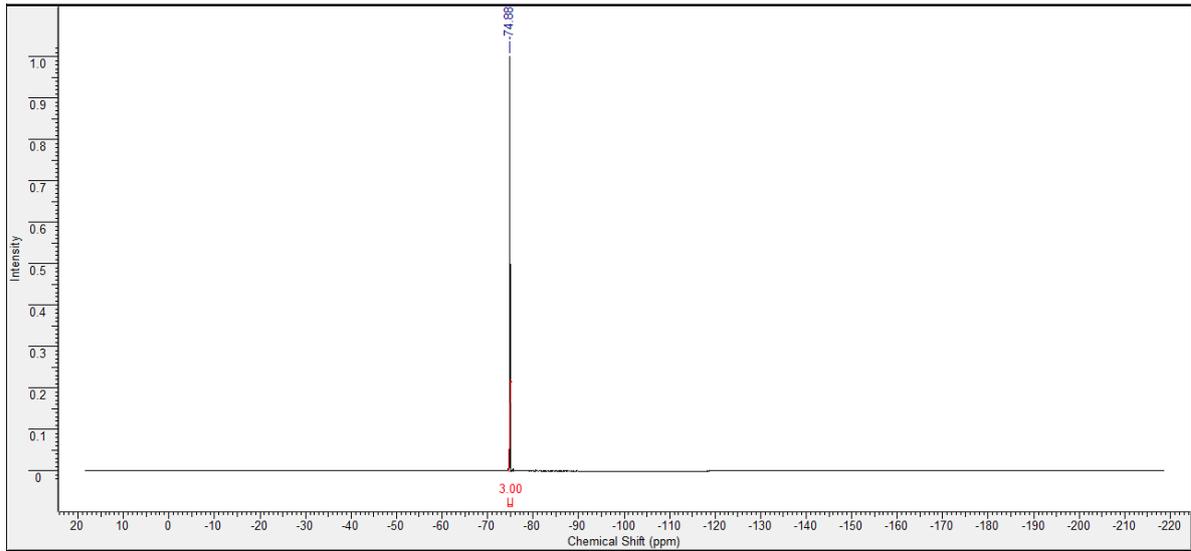


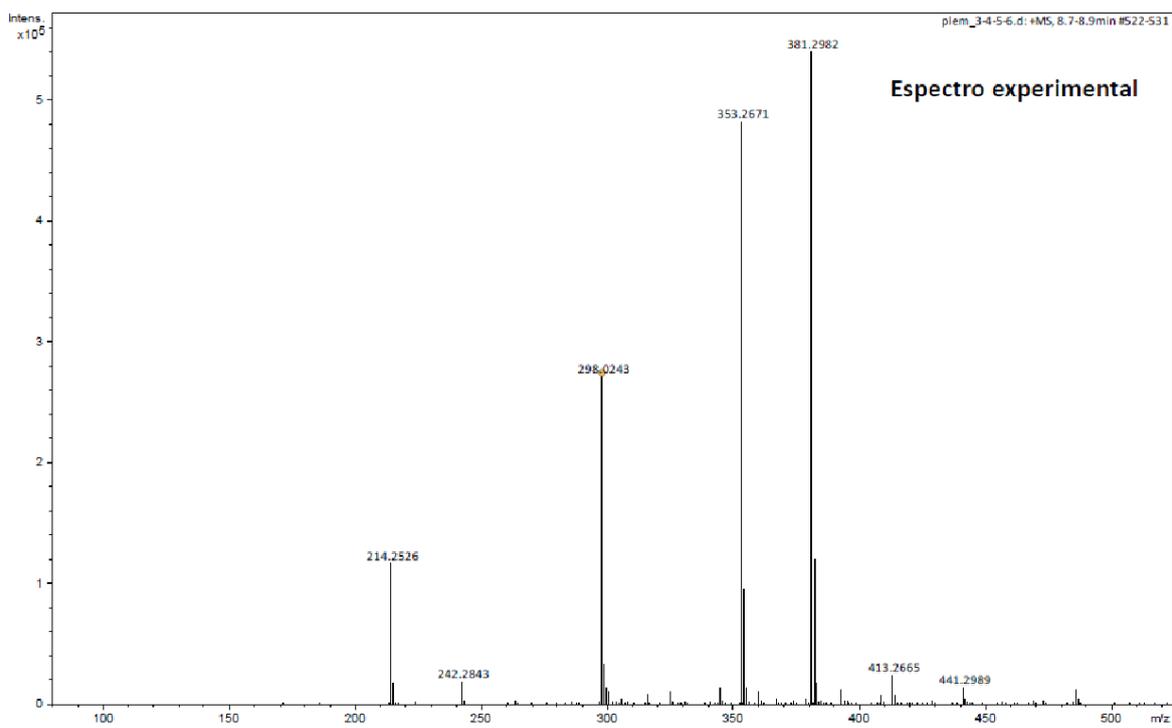
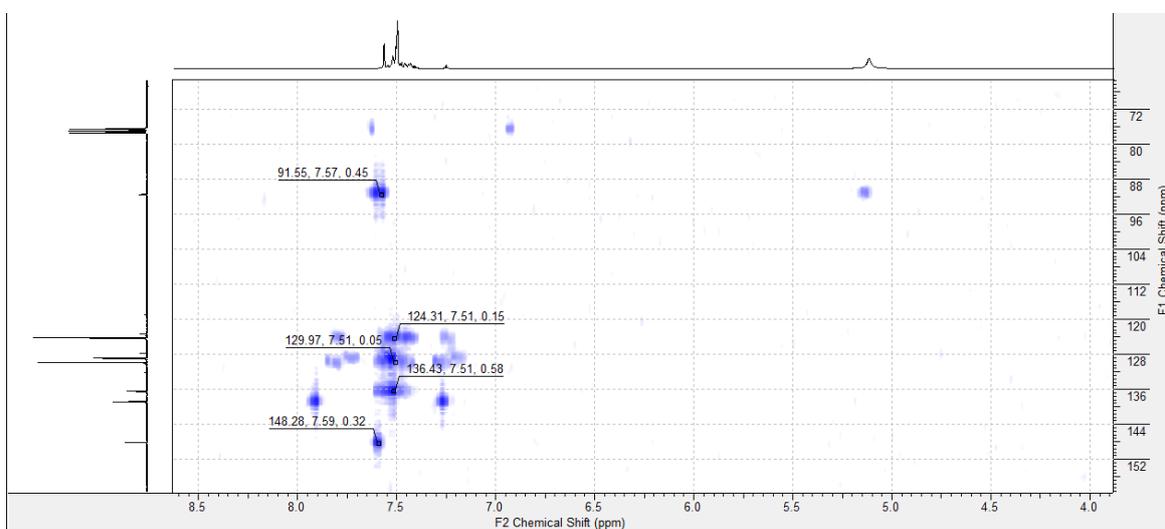
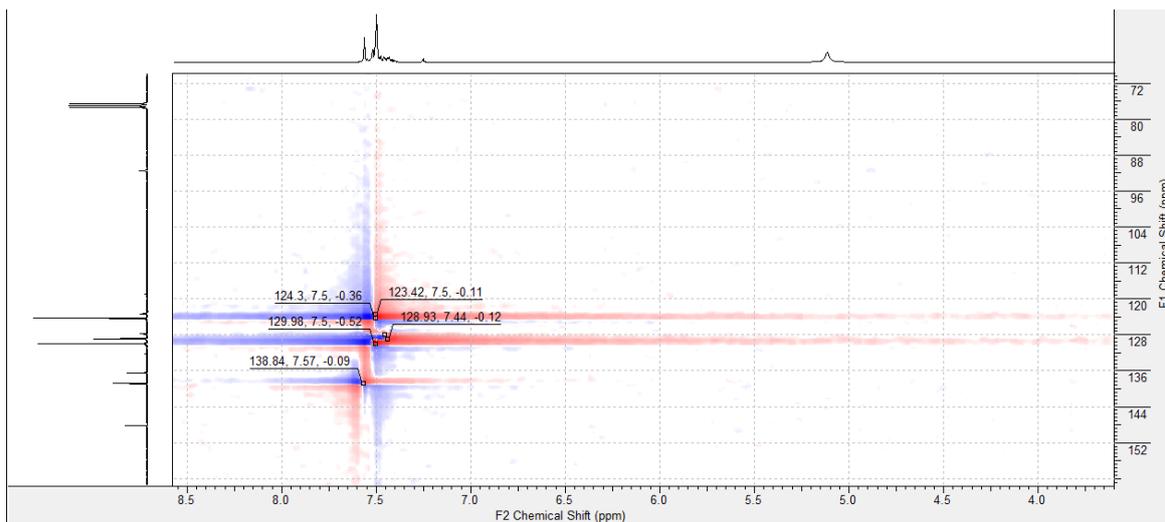


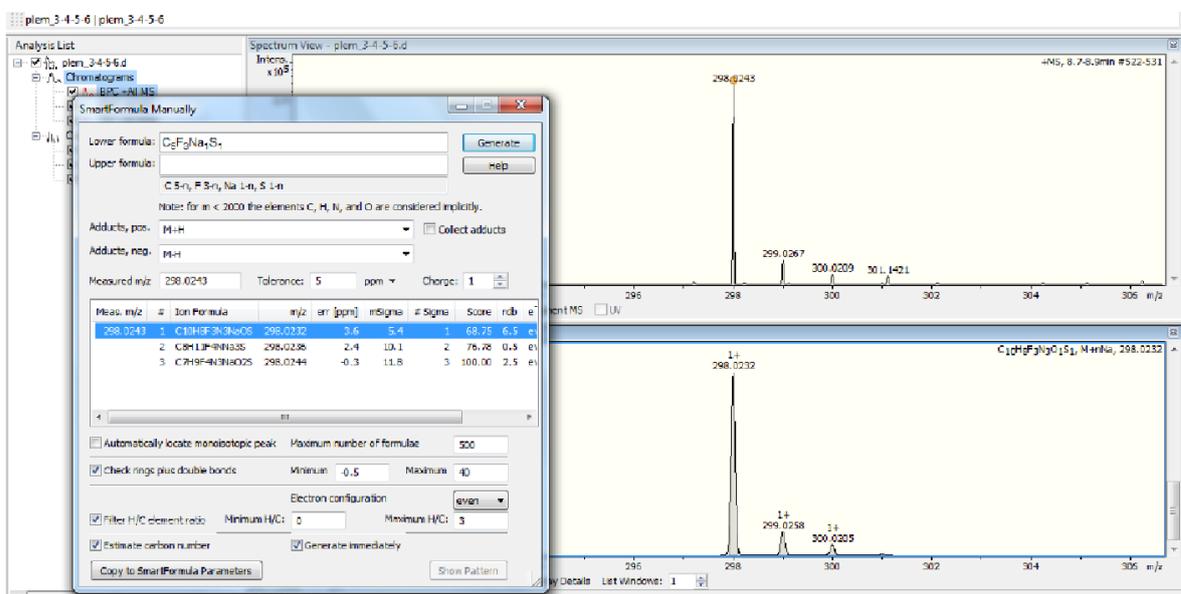
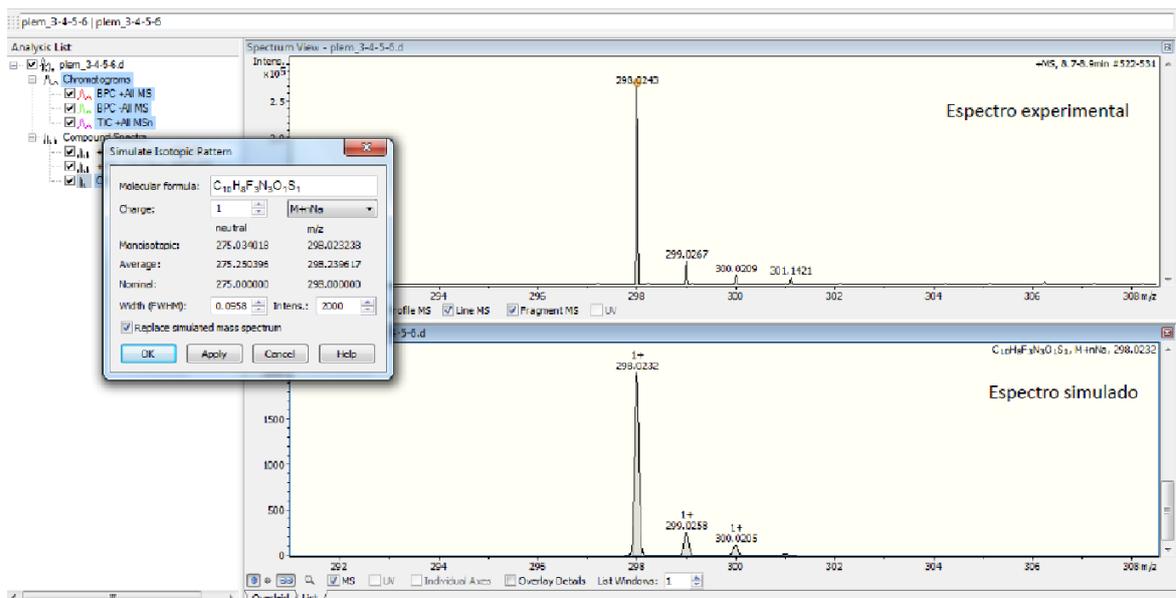


14a: 5-amino-1*H*-1fenil-4-((trifluorometil)sulfinil)pirazol: $C_{10}H_8F_3N_3OS$. 1H NMR [300 MHz ($CDCl_3$)] δ = 5.11 (s br, 2H, NH_2); 7.50 (m, 5H, CH); 7.56 (s, H, CH).; ^{19}F NMR [300 MHz] δ = -74.88 (s, 3F); ^{13}C NMR [75 MHz]: δ = 91.5(C); 118.9 (C); 123.4 (CH); 124.3 (CH); 127.7 (CH); 128.9 (CH); 129.9 (CH); 132.2 (C); 136.4 (C); 138.8 (C) y 148.2 (C). HRMS Calc: 298.0232Na⁺, encontrada: 298.0243 [M + Na]⁺



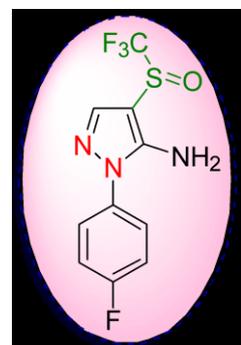


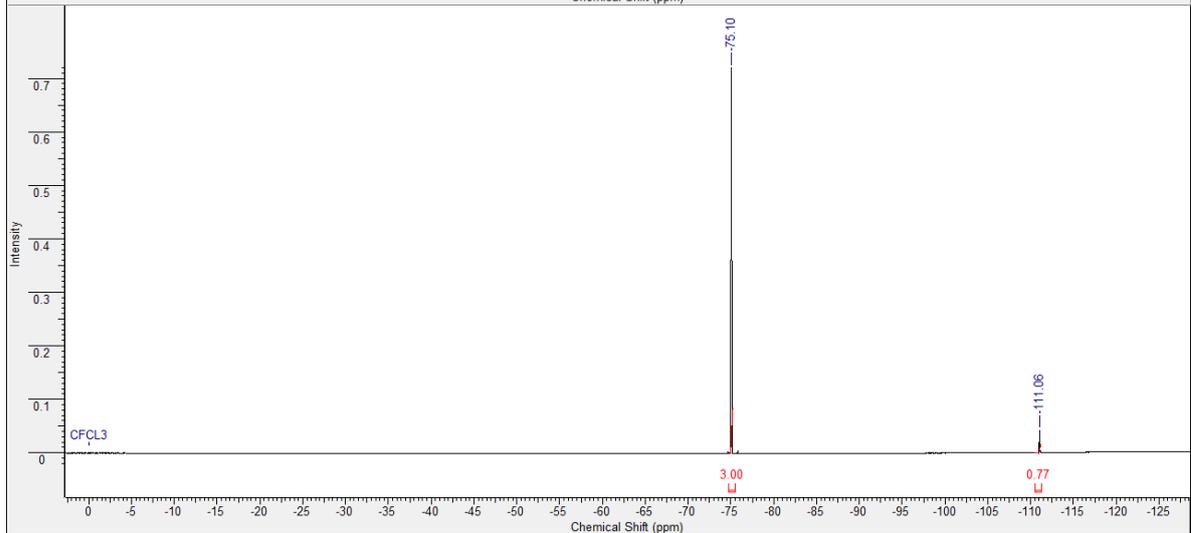
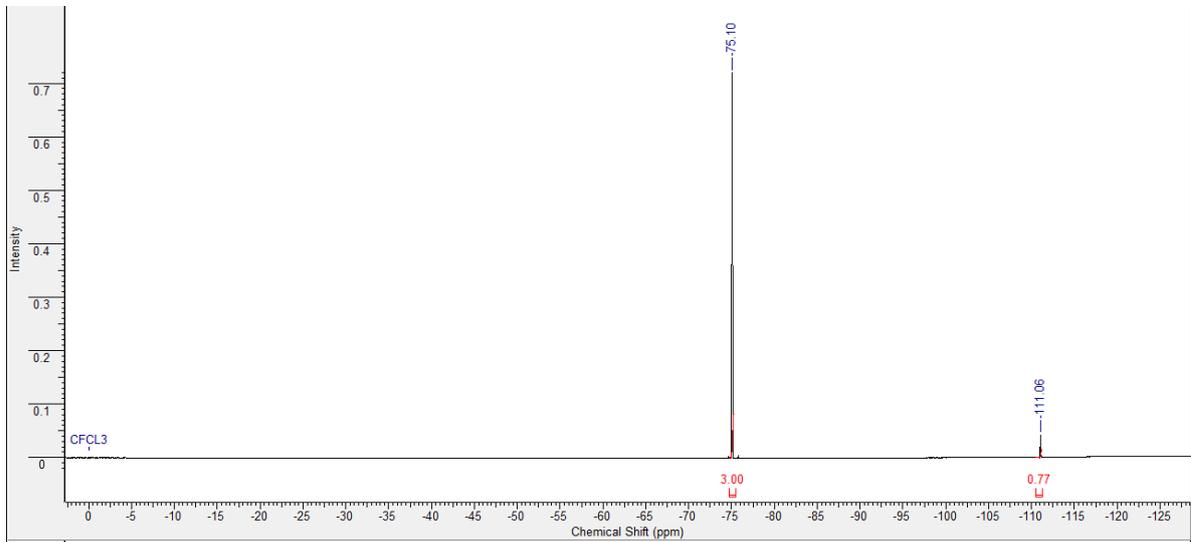
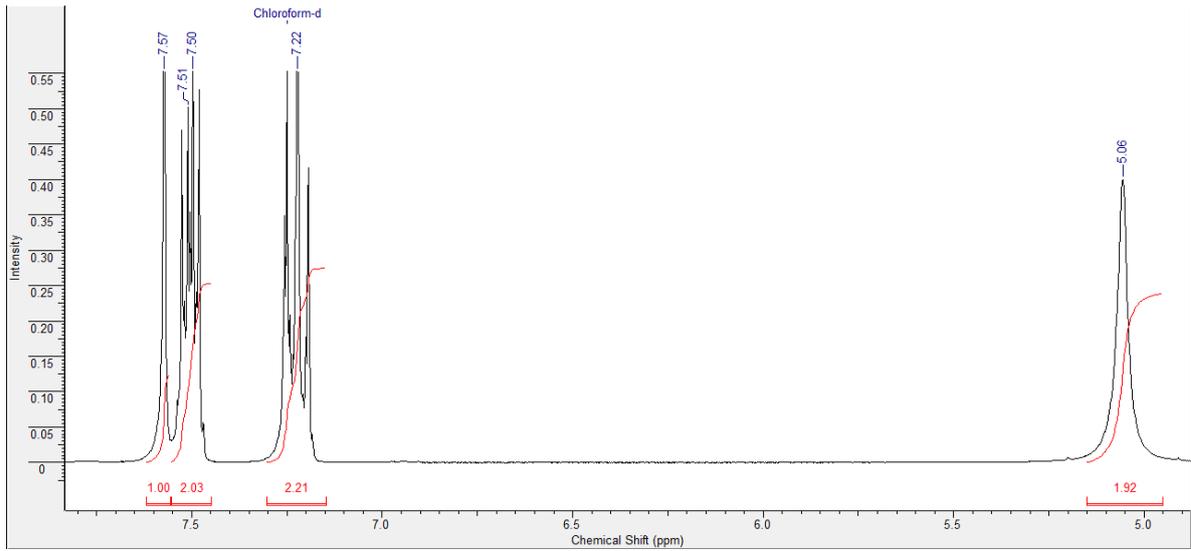


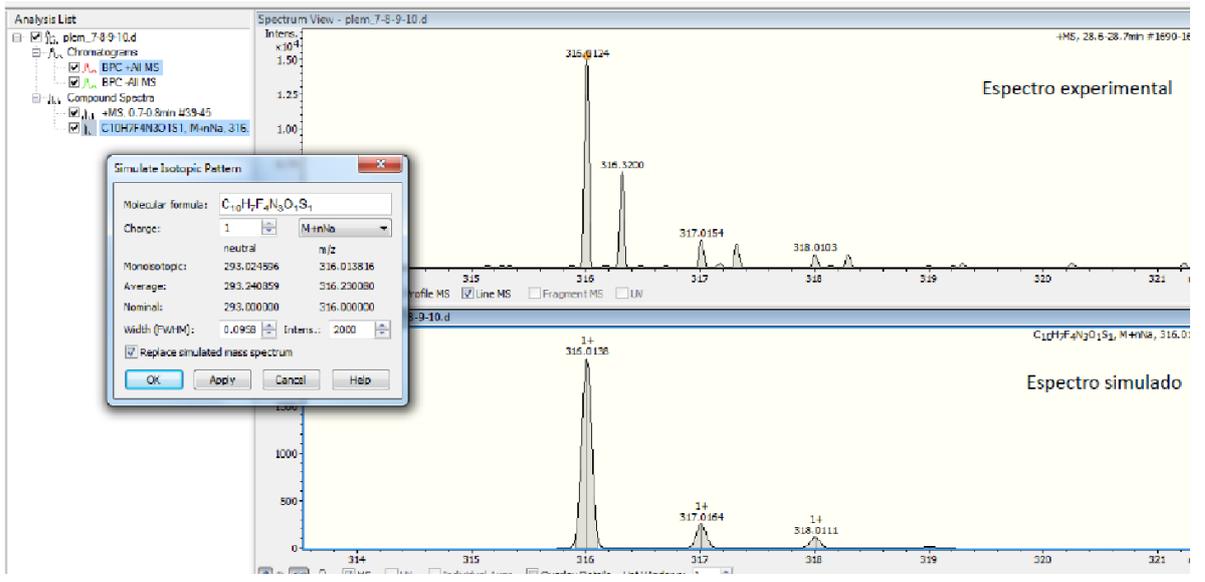
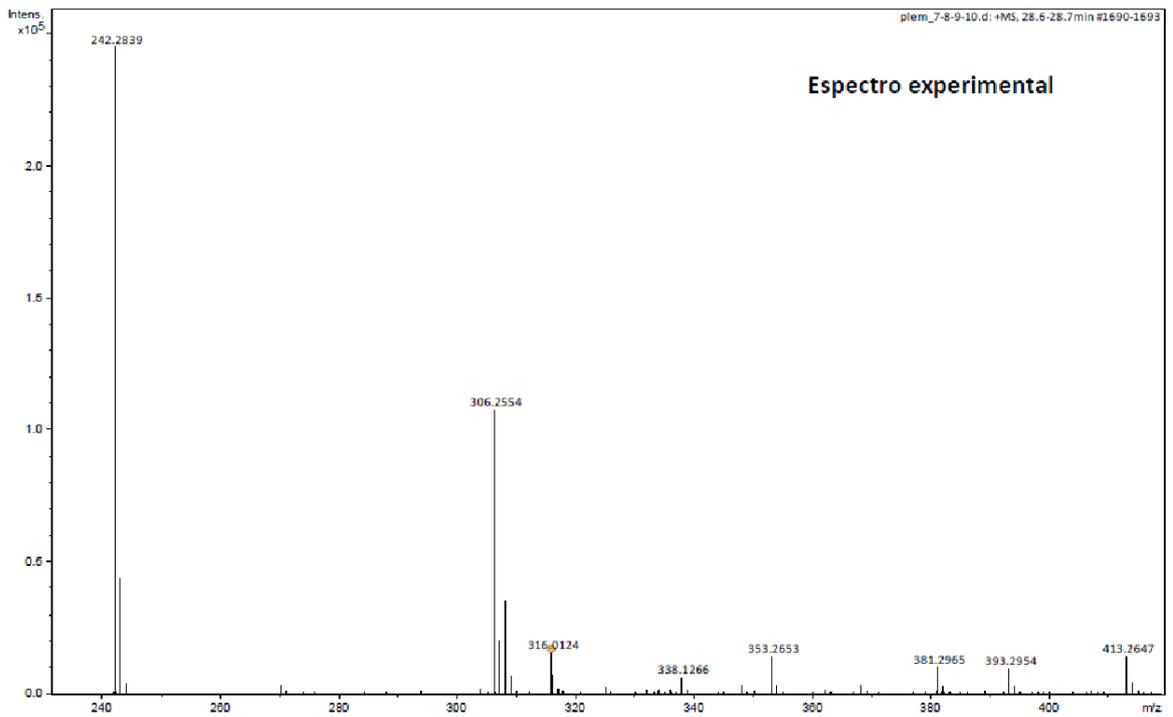


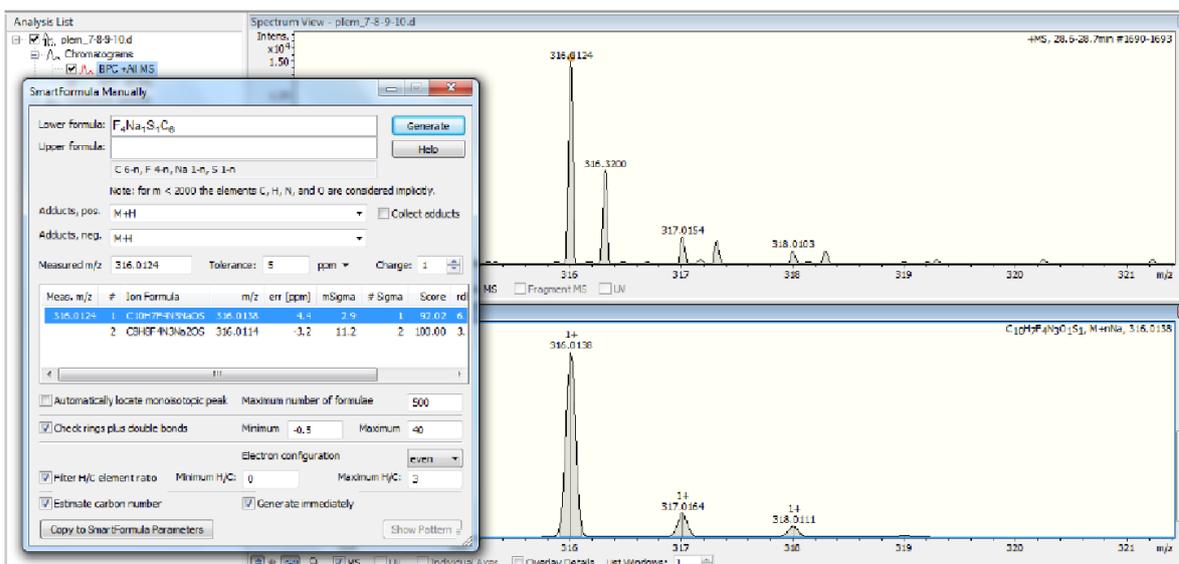
14b. 5-amino-1H-1-(4-fluorofenil)-4-((trifluorometil)sulfinil)pirazol

$C_{10}H_7F_4N_3OS$. 1H NMR [300 MHz ($CDCl_3$)] δ = 5.06 (s br, 2H, NH_2); 7.22 (t, 2H, CH); 7.50 (c, 2H, CH, $^1J=7.4$; $^2J=7.2$ Hz); ^{19}F NMR [300 MHz] δ = -75.10 (s, 3F), -111.06 (s, 1F); ^{13}C NMR [75 MHz]: δ = 91.5(C) ; 118.9 (C) ; 123.4 (CH); 124.3 (CH); 127.7 (CH); 128.9 (CH) ; 129.9 (CH); 132.2 (C); 136.4 (C); 138.8 (C) y 148.2 (C). HRMS Calc: 316.0138Na⁺, encontrada: 316.6124 [M + Na]⁺



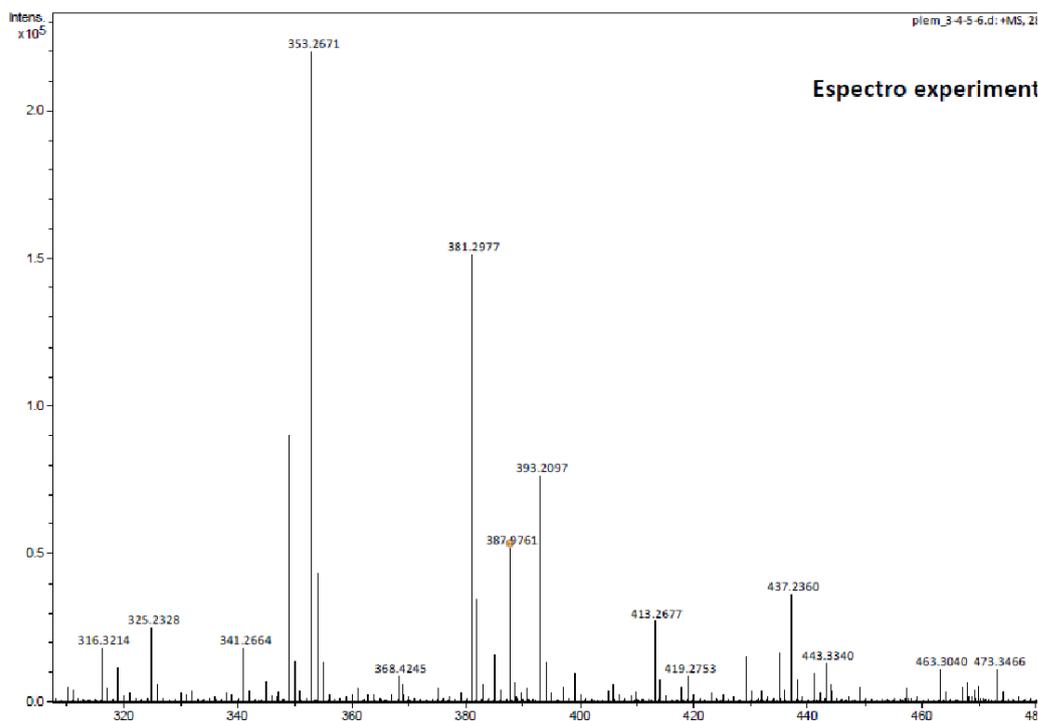
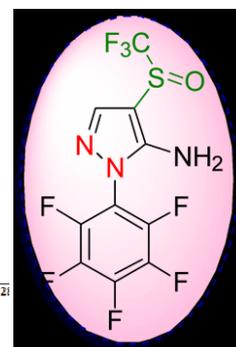




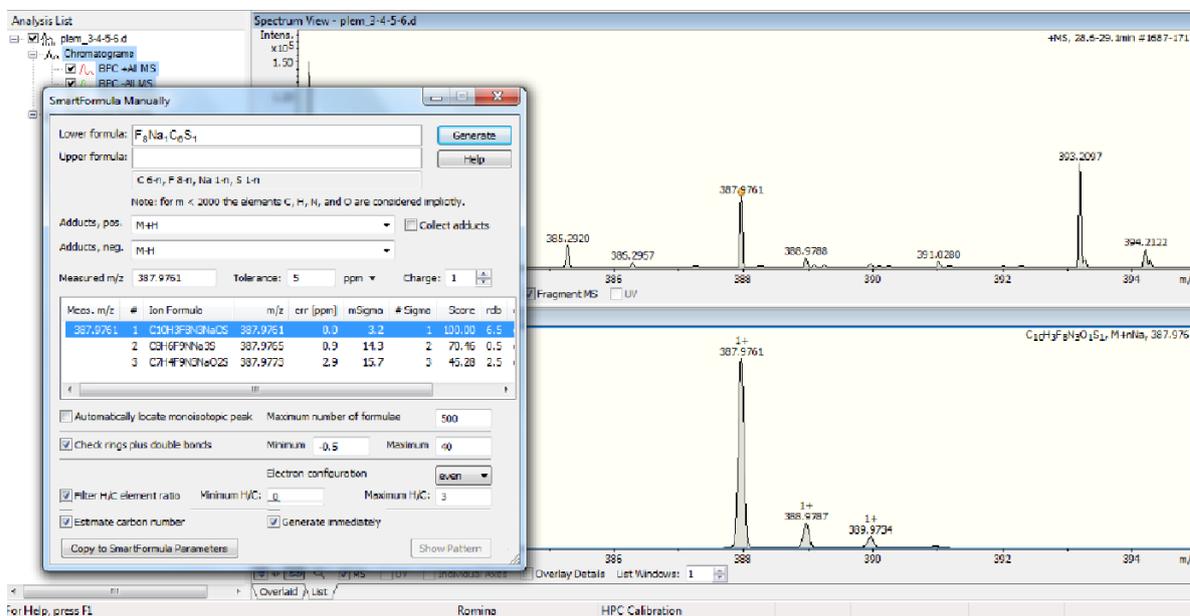
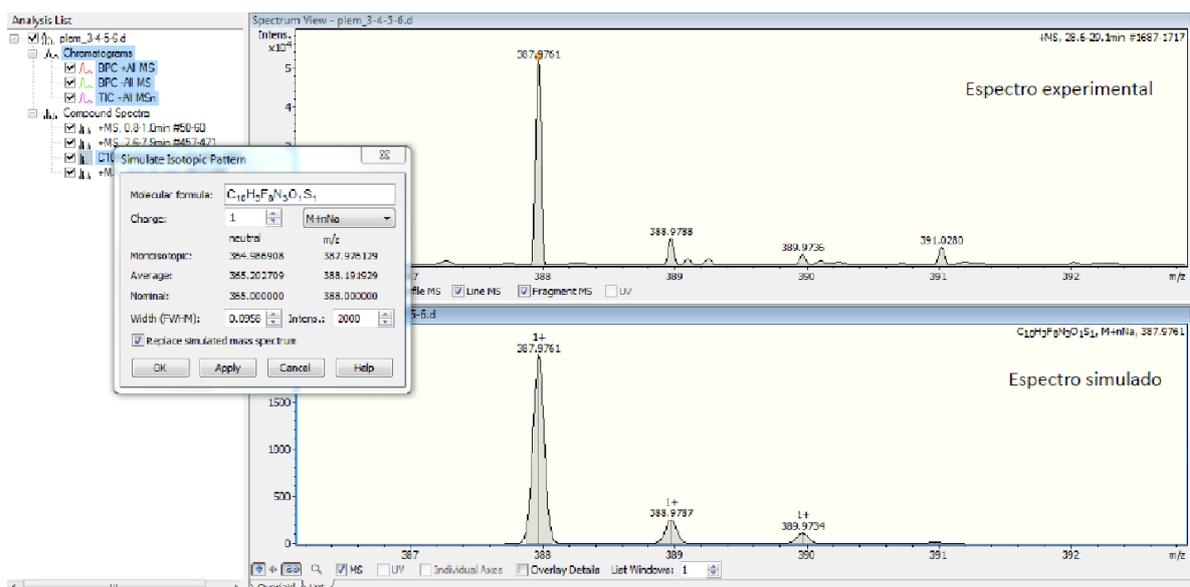


14-C- 5-amino-1H-1-(perfluorofenil)-4-((trifluorometil)sulfinil)pirazol

C₁₀H₃F₈N₃OS. ¹H NMR [300 MHz (CDCl₃)] δ = 5.06 (s br, 2H, NH₂); 7.22 (t, 2H, CH); 7.50 (c, 2H, CH, ¹J=7.4; ²J= 7.2Hz); ¹⁹F NMR [300 MHz] δ = -75.10 (s, 3F), -111.06 (s, 1F); ¹³C NMR [75 MHz]: δ = 91.5(C); 118.9 (C); 123.4 (CH); 124.3 (CH); 127.7 (CH); 128.9 (CH); 129.9 (CH); 132.2 (C); 136.4 (C); 138.8 (C) y 148.2 (C). HRMS Calc: 387.9761 [M+Na]⁺, encontrada: 387.9761

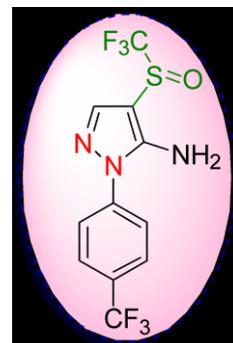


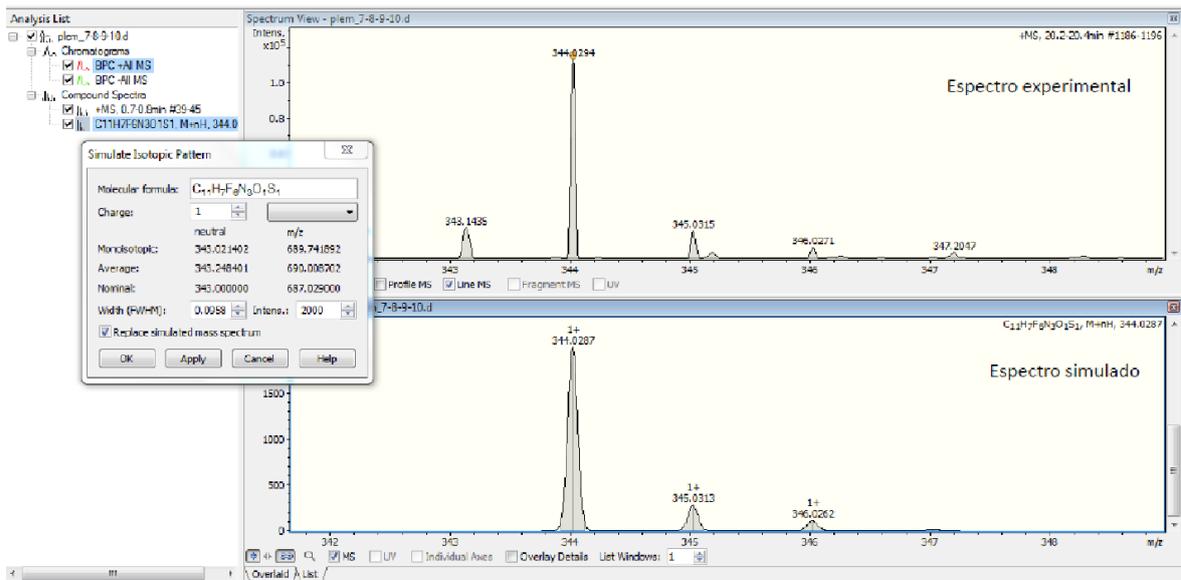
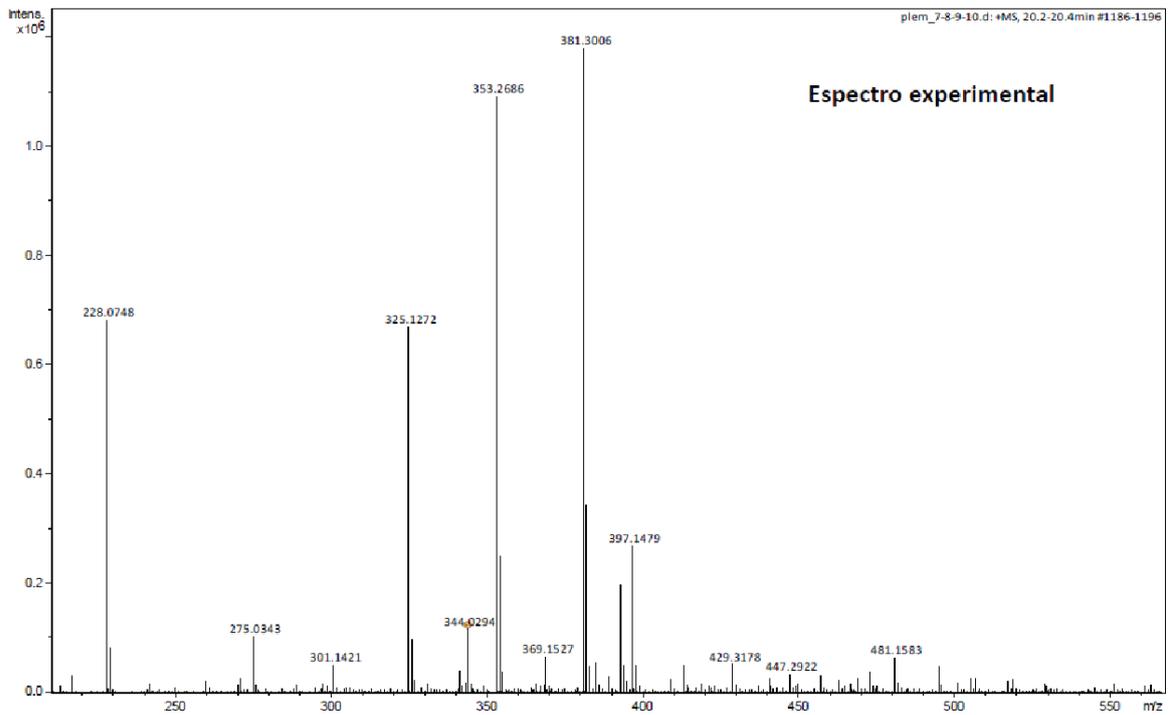
Espectro experiment

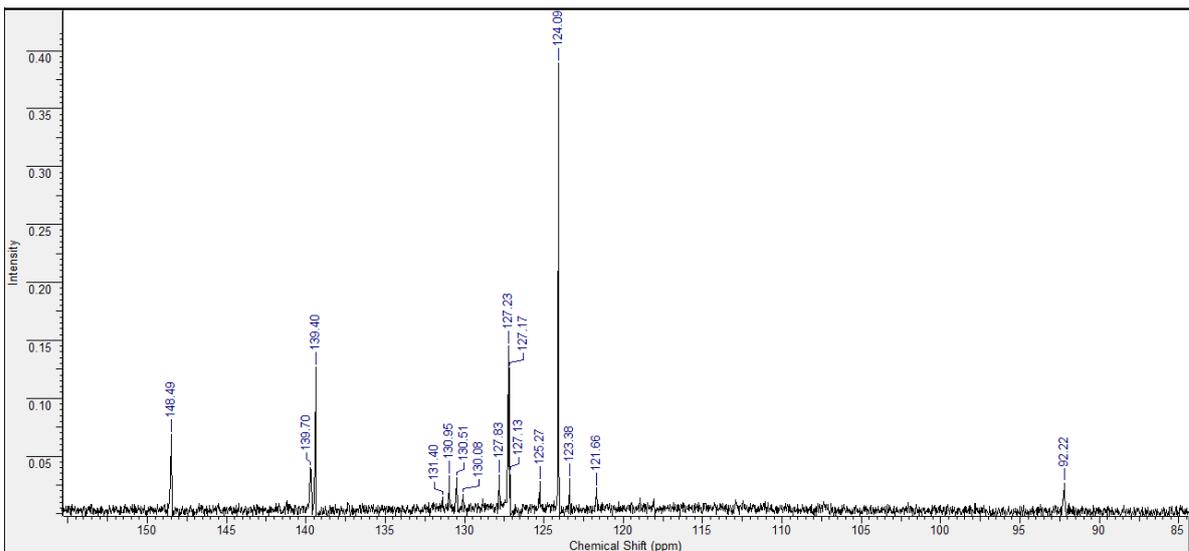
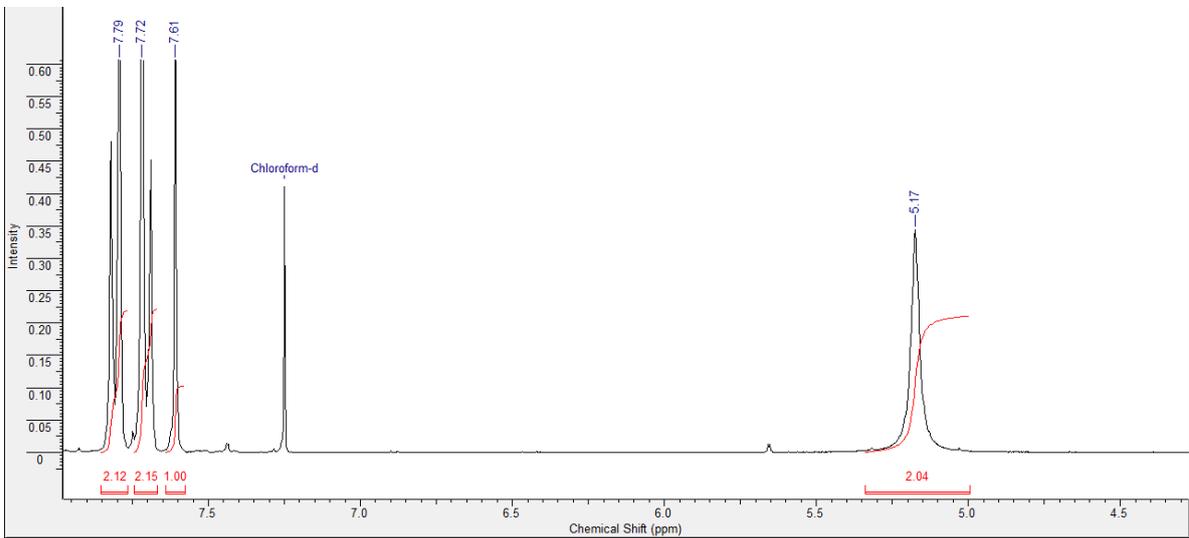
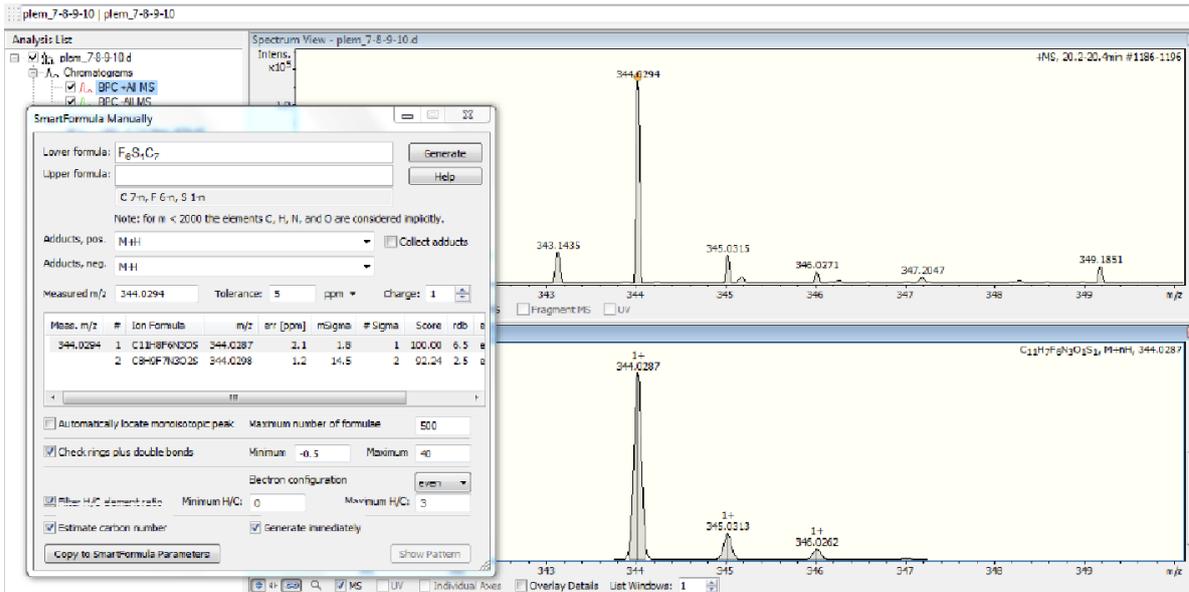


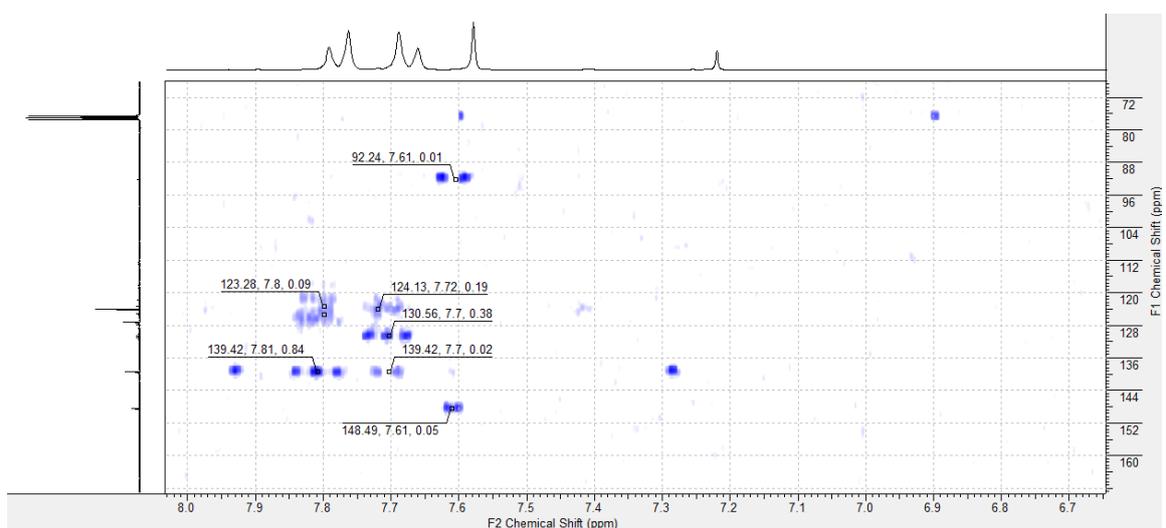
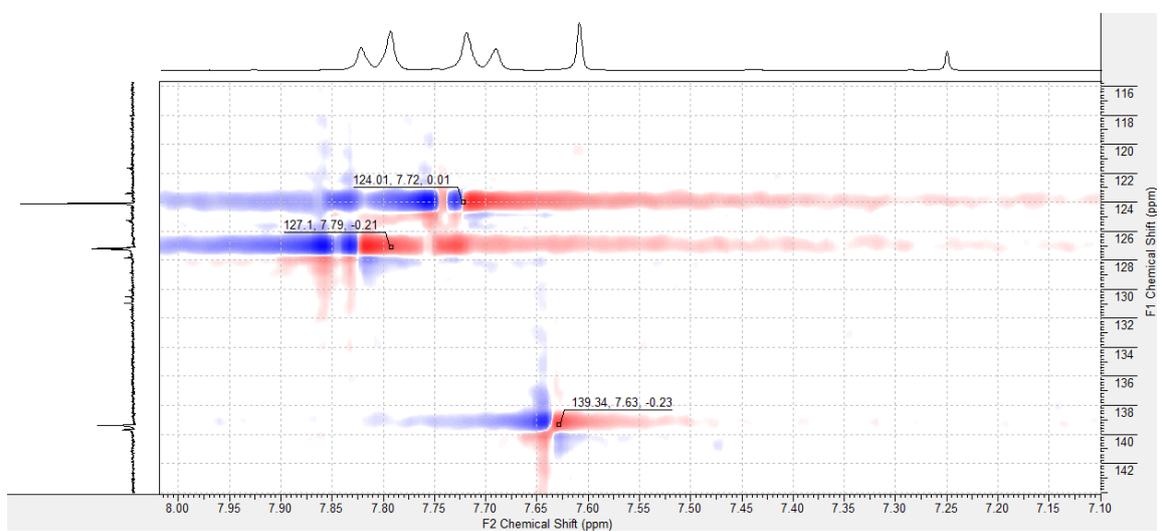
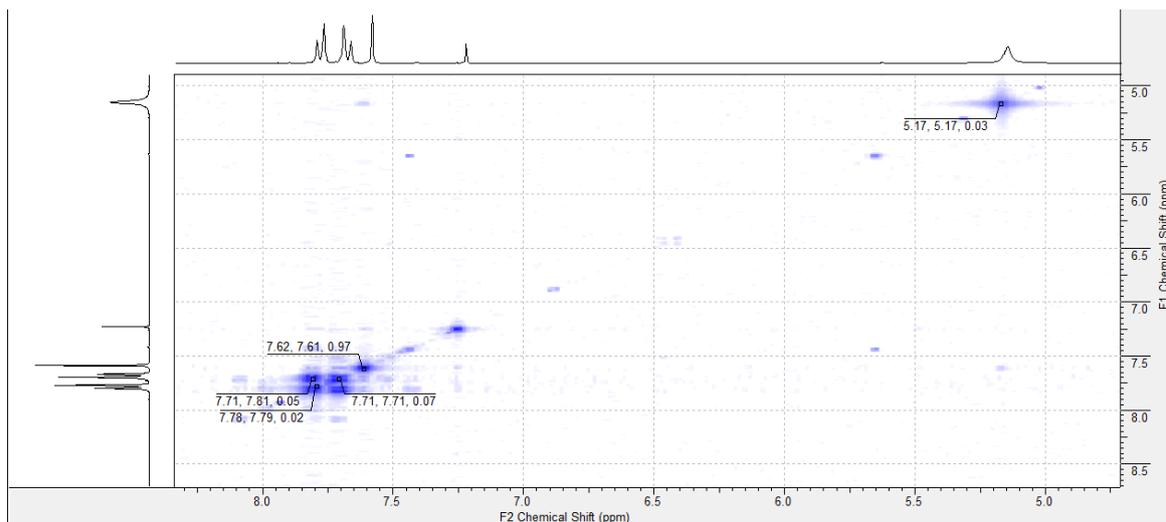
14d. 5-amino-1H-(4-trifluorometilfenil)-4-((trifluorometil)sulfinil)pirazol

$C_{11}H_7F_6N_3OS$. 1H NMR [300 MHz ($CDCl_3$)] δ = 5.17 (s br, 2H, NH_2); 7.61 (s, H, CH); 7.72 (d, 2H, CH, $^1J=8.57$); 7.79 (d, 2H, CH, $^2J= 8.57Hz$); ^{19}F NMR [300 MHz] δ = -75.10 (s, 3F), -111.06 (s, 1F); ^{13}C NMR [75 MHz]: δ = 92.2(C) ; 121.1 (CH) ; 123.4 (CH); 124.1 (CH); 125.3 (CH); (127.1; 127.2 $^1J=3.69$ y $^2J= 4.2Hz$ (CH)) ; 127.8 (CH); ((130.0; 130.5 $^1J=33.3Hz$, 130.9; 131.4 $^2J= 33.3Hz$ (C)); 139.4 (CH); 139.7(CH); y 148.5 (C). HRMS Calc: 344.0287 [M + Na] $^+$, encontrada: 344.0294



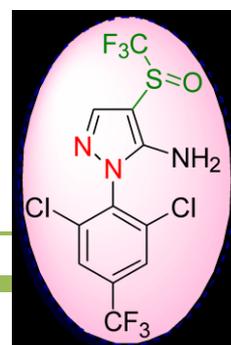




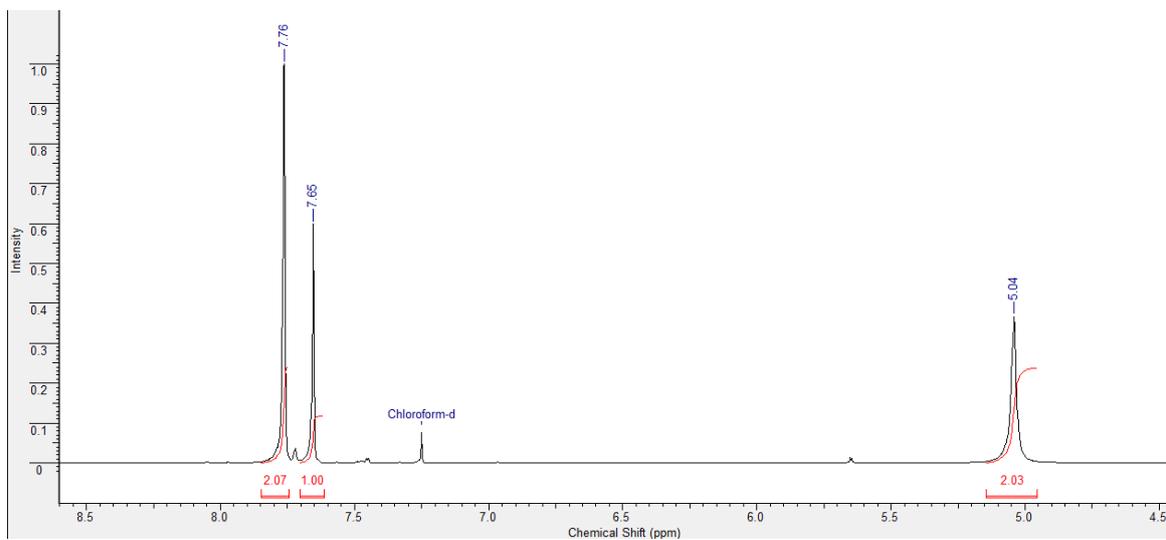
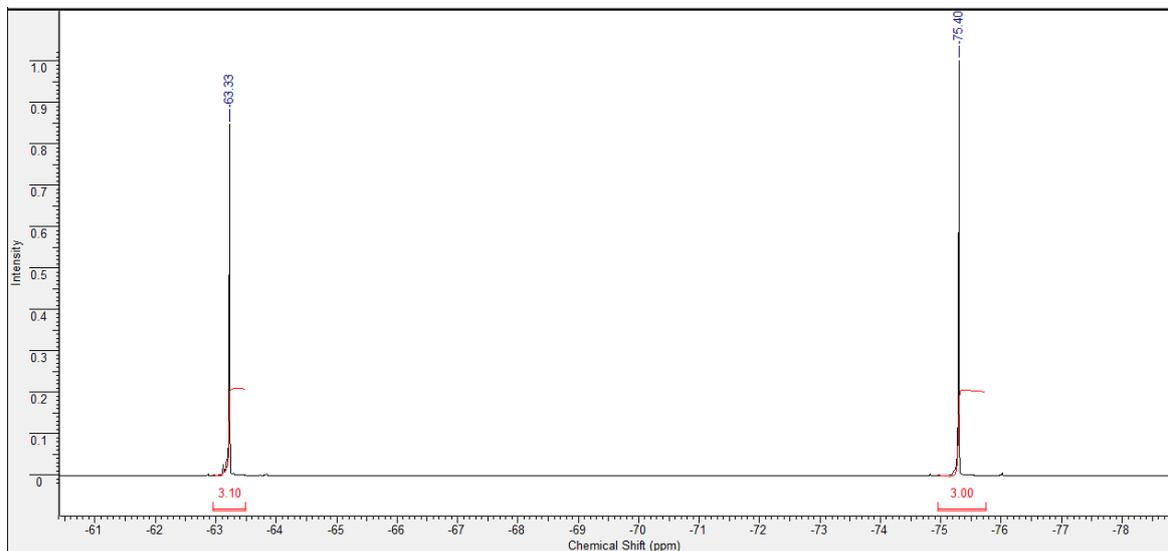


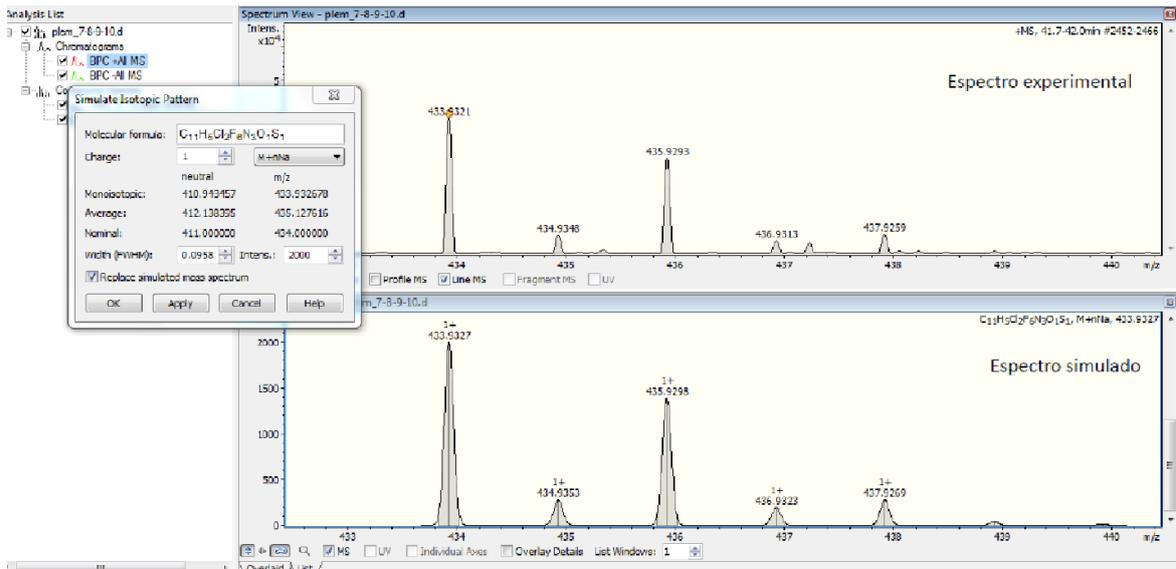
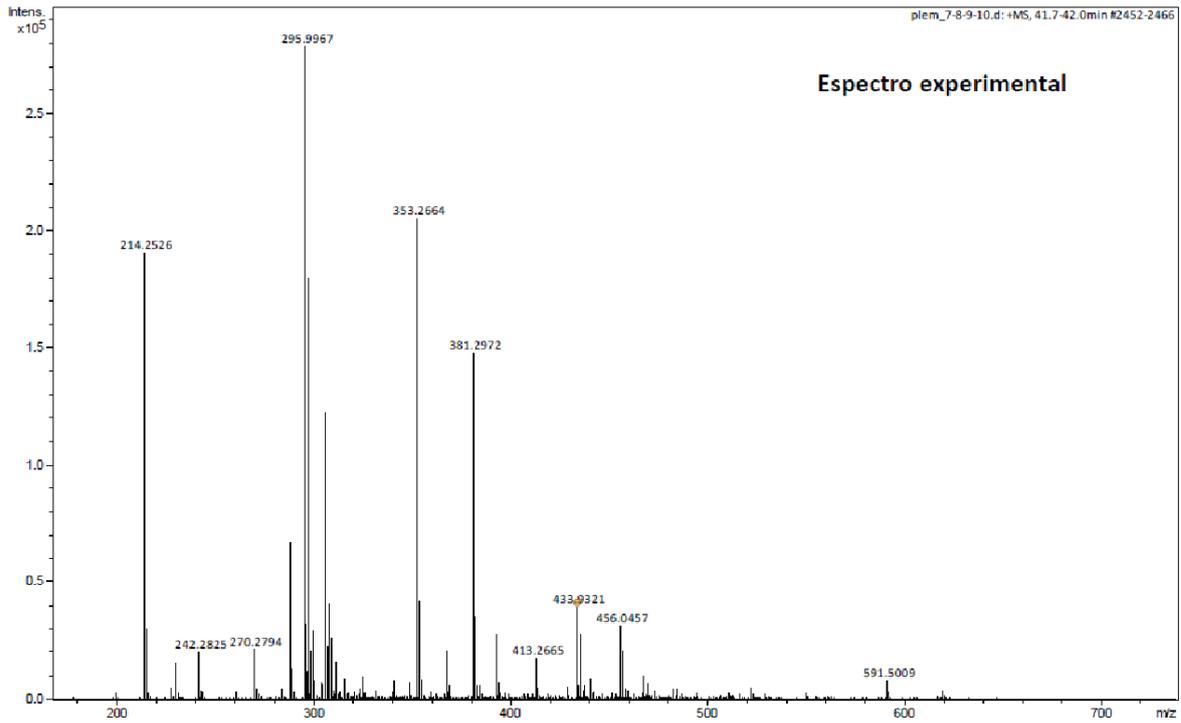
14e. 5-amino-1H-(2,6-dicloro-4-trifluorometilfenil)-4-((trifluorometil)sulfinil)pirazol

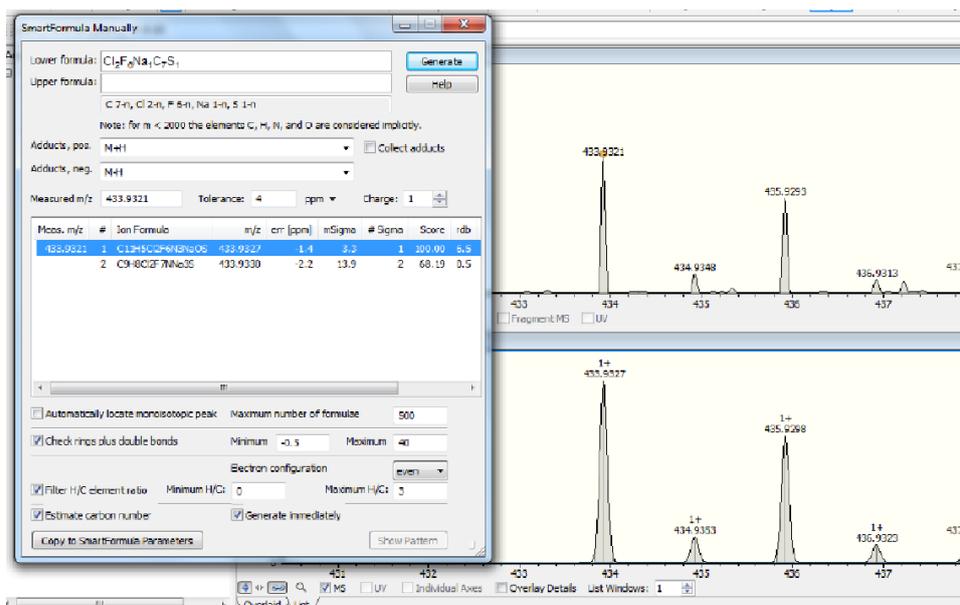
$C_{11}H_5Cl_2F_6N_3OS$. 1H NMR [300 MHz ($CDCl_3$)] δ = 5.17 (s br, 2H, NH_2); 7.61 (s, H, CH); 7.72 (d, 2H, CH, $^1J=8.57$); 7.79 (d, 2H, CH, $^2J= 8.57$ Hz); ^{19}F NMR [300



MHz] $\delta = -63.33$ (s, 3F), -75.40 (s, 3F); ^{13}C NMR [75 MHz]: $\delta = 92.2$ (C) ; 121.1 (CH) ; 123.4 (CH); 124.1 (CH); 125.3 (CH); (127.1 ; 127.2 $^1J=3.69$ y $^2J= 4.2\text{Hz}$ (CH)) ; 127.8 (CH); ((130.0 ; 130.5 $^1J=33.3\text{Hz}$, 130.9 ; 131.4 $^2J= 33.3\text{Hz}$ (C)); 139.4 (CH); 139.7 (CH); y 148.5 (C). HRMS Calc: 433.9327 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrada: 433.9321







14f. 5-amino-1H-(4-metoxifenil)-4-((trifluorometil)sulfinil)pirazol

$C_{11}H_{10}F_3N_3O_2S$. 1H NMR [300 MHz ($CDCl_3$)] δ = 3.37(s, H, CH); 4.98 (s br, 2H, NH_2); 7.03 (d, 2H, CH, $^1J=7.85$); 7.39 (d, 2H, CH, $^2J= 7.85$ Hz); 7.56(s, H, CH). ^{19}F NMR [300 MHz] δ = -63.33 (s, 3F), -75.40 (s, 3F); ^{13}C NMR [75 MHz]: δ = 55.1(CH) ; 91.4 (C); 115.0 (CH) ; ((118.0; 123.4; 127.8 $^1J=335.2$ Hz, $^2J= 335.2$ Hz (C)); 126.2 (CH); 129.0 (C); 138.5 (CH); 148.2(C) y 160.0 (CH). HRMS Calc: 328.0338 $[M+Na]^+$, encontrada: 328.0338

