

**EXPLORACIÓN DE LAS RELACIONES *ESTRUCTURA-ACTIVIDAD* DE  
COMPUESTOS TIPO PERINAFTENONA EN EL SISTEMA BIOLÓGICO**

*Mycosphaerella fijiensis*



**WILLIAM FERNANDO HIDALGO BUCHELI**

**CONVENIO**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA – UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA,**

**SEDE MEDELLÍN**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**MEDELLÍN**

**2009**

**EXPLORACIÓN DE LAS RELACIONES *ESTRUCTURA-ACTIVIDAD* DE  
COMPUESTOS TIPO PERINAFTENONA EN EL SISTEMA BIOLÓGICO**

*Mycosphaerella fijiensis*

**WILLIAM FERNANDO HIDALGO BUCHELI**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Magíster Ciencias en Biotecnología**

**Director**

**LEÓN FELIPE OTÁLVARO TAMAYO**

**Dr. Ciencias Químicas**

**Asesor**

**RAFAEL ARANGO ISAZA, Ph. D.**

**CONVENIO**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA – UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA,**

**SEDE MEDELLÍN**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**MEDELLÍN**

**2009**

Notas de aceptación

---

---

---

---

---

Felipe Otálvaro.

Director de tesis

---

Jurado I

---

Jurado II

*“Profundizar en el conocimiento científico  
es una de las mejores vías para lograr la  
Plenitud y Libertad”  
Pilar Álvarez Pellicero*

## AGRADECIMIENTOS

Hoy, ya culminado mi trabajo de grado de Maestría, quiero agradecer a Dios, a mis padres José Félix Hidalgo y Stella Bucheli, mis hermanos, demás familiares y mi novia Alexandra Ortiz, quienes me apoyaron incondicionalmente en todo el transcurso de mi posgrado.

Quiero agradecer de manera muy especial a mí director de tesis y amigo *Dr. León Felipe Otálvaro*, quién compartió conmigo de su valioso conocimiento, me brindó su apoyo incondicional en las circunstancias buenas y malas por las que viví durante el desarrollo de la presente investigación y sobre todo, por su gran calidad humana como director y amigo.

De igual manera, agradezco al Dr. Rafael Arango por cuanto me brindo su conocimiento y apoyo en la realización de los ensayos biológicos del presente proyecto, los cuales fueron llevados a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB.

A los jurados, Dres. Jesús Gil y Benjamín Rojano, por su participación en la corrección y evaluación del proyecto de tesis.

A Luisa Duque, estudiante de Química de U de A, quien me brindó su colaboración en la síntesis y purificación de algunos compuestos, sobre todo en la síntesis de 9-hidroxiperinaftenona, pese a que no fue posible obtenerla después de varios intentos fallidos, agradezco por sus esfuerzos en el proyecto y su amor a la síntesis orgánica.

Finalmente, quiero agradecer a la Dra. Amanda Lucía Mora, Directora del Programa de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, a quién por sus valiosos consejos y colaboración quedo inmensamente agradecido.

## ABREVIATURAS

FRAC	Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
CIREAD	Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo
FHIA	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola
IITA	Investigación en Agricultura para el Desarrollo en África
COSY	Correlated spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiplet quantum coherence
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
TLC	Thin Layer chromatography (cromatografía en capa fina)
DMSO	Dimetilsulfóxido
NBS	N-bromosuccinimida
<i>p</i> -TSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
2,4,8-THT	2,4,8-trihidroxitetralona
TMS	Tetrametilsilano
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -butilhidroperóxido
PAL	Fenilalanina amonio liasa
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria del 50% de la población
R <sub>f</sub>	Factor de retención

## TABLA DE CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
<b>RESUMEN</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	18
<b>1. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
1.1 ASPECTOS SOCIOECONÓMICOS DEL CULTIVO DE BANANO	21
1.2 ASPECTOS TAXÓNOMICOS DE LA FAMILIA <i>Musaceae</i>	23
1.3 ENFERMEDADES DEL BANANO	25
1.3.1 SIGATOKA NEGRA: <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet	26
1.3.1.1 Agente Causal	27
1.3.1.2 Infección y síntomas de la enfermedad	28
1.3.1.3 Estrategias de control de la enfermedad.	31
1.4 INTERACCIÓN Banano- <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	35
1.5 FITOALEXINAS DE MUSA	38
1.6 FENILFENALENONAS	38
1.6.1 Aspectos biosintéticos generales de fenilfenalenonas	41
1.6.2 Actividad biológica	42
1.7 PERINAFTENONAS	44
1.7.1 Biosíntesis de perinaftenonas en hongos	45
1.7.2 Aspectos sintéticos de perinaftenonas	46
1.7.3 Actividad biológica	48
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1 OBJETIVO GENERAL	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49

	<i>Pág.</i>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES	50
3.1.1 Seguimiento de la Reacción y porcentaje de rendimiento	50
3.1.2 Purificación de compuestos sintéticos	50
3.1.3 Métodos espectroscópicos	50
3.1.4 Reactivos	51
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO	51
3.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS: <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	53
3.3.1 Método para determinar el crecimiento micelar de <i>M. fijiensis</i>	53
3.3.2 Método para determinar el crecimiento del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	55
3.3.3 Evaluación preliminar cualitativa de fitotoxicidad de perinaftenonas	56
3.3.4 Análisis estadístico	57
3.4 MÉTODOS SINTÉTICOS	57
3.4.1 Síntesis de 2-hidroxiperinaftenona	57
3.4.2 Síntesis de 4-hidroxiperinaftenona	58
3.4.3 Síntesis de 6-hidroxiperinaftenona	59
3.4.4 Metilación de 2-hidroxiperinaftenona	60
3.4.5 Metilación de 3-hidroxiperinaftenona	61
3.4.6 Metilación de 6-hidroxiperinaftenona	62
3.4.7 Síntesis de 4-metoxiperinaftenona	63
3.4.8 Síntesis de 2-nitroperinaftenona	65
3.4.9 Hidrogenación catalítica de 2-nitroperinaftenona	66
3.4.10 Bromación de perinaftenona con NBS/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> en seco	67
3.4.11 Cloración de perinaftenona con HCl en HNO <sub>3</sub>	68
3.4.12 Síntesis de 2-nitro-4-metoxiperinaftenona	69

	<i>Pág.</i>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	70
<b>5. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS</b>	79
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	81
<b>PRODUCCIÓN ACADÉMICA</b>	99
<b>ANEXOS</b>	100
<b>ANEXO A.</b> Elucidación estructural (espectros tomados en acetona deuterada)	101
<b>ANEXO B.</b> Tabla de datos y análisis estadístico	142

## ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
Tabla 1. Grados de reacción de acuerdo a los síntomas de la enfermedad	31
Tabla 2. Variedades de banano con diferentes niveles de resistencia a la Sigatoka Negra.	34
Tabla 3. Valores de IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>1-8</b> obtenidos para la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad	143
Tabla 4. Valores de IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>1-8</b> obtenidos para la cepa 060124 bajo condiciones de fotoperiodo	144
Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>1-8</b> en la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo	145
Tabla 6. Comparación de medias IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de los compuestos tipo perinaftenona <b>1-8</b> evaluados para la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo	145
Tabla 7. Valores de IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>1-8</b> obtenidos para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad	146
Tabla 8. Valores de IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>1-8</b> obtenidos para la cepa 080105 bajo condiciones de fotoperiodo	147

	<i>Pág.</i>
Tabla 9. Analisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>1-8</b> en la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo	148
Tabla 10. Comparación de medias IC <sub>50</sub> (μg/mL) de los compuestos tipo perinaftenona <b>1-8</b> evaluados para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo	148
Tabla 11. Valores de IC <sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>9-14</b> obtenidos para la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad. Comparación con fungicidas de referencia (benomil y propiconazol).	149
Tabla 12. Valores de IC <sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>9-14</b> obtenidos para la cepa 060124 bajo condiciones de fotoperiodo. Comparación con fungicidas de referencia (benomil y propiconazol)	150
Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>9-14</b> en la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo.	151
Tabla 14. Comparación de medias IC <sub>50</sub> (μg/mL) de los compuestos tipo perinaftenona <b>9-14</b> evaluados para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo	151
Tabla 15. Valores de IC <sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>9-14</b> obtenidos para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad. Comparación con fungicidas de referencia (benomil y propiconazol).	152

	<i>Pág.</i>
Tabla 16. Valores de IC <sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>9-14</b> obtenidos para la cepa 080105 bajo condiciones de fotoperiodo. Comparación con fungicidas de referencia (benomil y propiconazol)	153
Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>9-14</b> en la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo	154
Tabla 18. Comparación de medias IC <sub>50</sub> (μg/mL) de los compuestos tipo perinaftenona <b>9-14</b> evaluados para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo	154
Tabla 19. Análisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona <b>11, 13 y 14</b> en la inhibición del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> . Control fungicida propiconazol.	155
Tabla 20. Valores de IC <sub>50</sub> (μg/mL) y comparación de medias en la evaluación de los compuestos <b>11, 13 y 14</b> en la evaluación del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> . Comparación con fungicida propiconazol.	155

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1. Exportación de banano en Colombia. Fuente Augura	22
Figura 2. Estadísticas de países exportadores de banano. Fuente FAO	23
Figura 3. Clasificación taxonómica de los bananos comestibles	24
Figura 4. Estados del desarrollo de la enfermedad de acuerdo a Fouré. A) Estado 1; B) Estado 2; C) Estado 3; D) Estado 4 y 5; E) Estado 6 y F) Daño total de la hoja	30
Figura 5. Estructuras químicas de los principales fungicidas utilizados para el control de la Sigatoka Negra	32
Figura 6. Estructuras de fenaleno, fenalenona (perinaftenona) y fenilfenalenona	39
Figura 7. Estructuras de las primeras fenalenonas reportadas en hongos ( <i>Penicillium herquei</i> ) y plantas ( <i>Haemodorum corymbosum</i> )	39
Figura 8. Estructuras generales de fenilfenalenonas y compuestos afines encontrados en <i>Musa</i> .	40
Figura 9. Fenilfenalenonas identificadas en algunas especies de <i>Musa</i> .	40
Figura 10. Esquema ilustrativo de la hipótesis biosintética general para la biosíntesis de una 9-fenilfenalenona (anigorufona).	42

	<i>Pág.</i>
Figura 11. Relaciones químicas entre fenalenonas del hongo <i>Penicillium herquei</i> (a y b) y <i>Penicillium duclauxi</i> (c)	44
Figura 12. Fenalenonas aisladas de (a) <i>Strelitzia reginae</i> y (b y c) <i>Musa acuminata</i> var. “Yangambi Km 5”	45
Figura 13. Esquema general de la ruta biosintética de fenalenonas en hongos	46
Figura 14. Ruta de síntesis del ácido 3-(2-metoxi-1-naftil) propanoico (precursor de la 4-metoxiperinaftenona)	47
Figura 15. Estrategias comunes para la síntesis del núcleo perinaftenona	48
Figura 16. PCR para identificación de <i>M. fijiensis</i> . Línea 1, cepa 0601146 (control positivo). Línea 2, cepa 060124. Línea 3, cepa 080105. Línea 4, cepa 060124 con primers específicos para <i>M. musicola</i> . Línea 5, control negativo. Línea 6, Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder.	52
Figura 17. Fotografías de la morfología típica de las dos cepas de <i>M. fijiensis</i> utilizadas en este estudio (en medio de cultivo PDA)	53
Figura 18. Curva de crecimiento de las cepas de <i>M. fijiensis</i> en estudio	55
Figura 19. Producción de especies reactivas de oxígeno por absorción de luz en la perinaftenona	71

Figura 20. Actividad antifúngica de compuestos 1-8 sobre *M. fijiensis*. (a) 72  
Efecto sobre el crecimiento de micelio medido después de 8 días de  
incubación en la oscuridad, (b) bajo fotoperiodo de 12 horas durante 8  
días de incubación.

Figura 21. Actividad antifúngica de los compuestos **9-14** sobre *M.* 74  
*fijiensis*. (a) Efecto sobre el crecimiento de micelio después de 8 días de  
incubación en la oscuridad, (b) bajo fotoperiodo 12h durante 8 días de  
incubación. Fungicidas comerciales (benomil y propiconazol) fueron  
evaluados como referencia.

Figura 22. Actividad antifúngica de los compuestos **11, 13 y 14** sobre 76  
ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* y observación al microscopio  
(40X): A) control negativo, B) 2-bromoperinaftenona, C) 2-  
nitroperinaftenona, D) 2-nitro-4-metoxiperinaftenona a una concentración  
de 2µg/mL.

Figura 23. Fotografías de la evaluación fitotóxica del compuesto 2- 78  
nitroperinaftenona a una concentración de 50µg/mL: A) 2 días; B) 5  
días; C) 10 días; D) 25 días; E) envés de la hoja a 25 días

## RESUMEN

Trece compuestos tipo perinaftenona (**1-13**) fueron evaluados para determinar su actividad *in vitro* contra *Mycosphaerella fijiensis* bajo condiciones lumínicas controladas y su concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>) fué calculada para establecer relaciones *estructura-actividad* (SAR). Una tendencia en la relación estructura-actividad (SAR) fue postulada, la cual permitió el diseño del compuesto (**14**). El compuesto diseñado exhibió una mejor actividad contra *M. fijiensis* en comparación con los demás compuestos evaluados en este estudio y la actividad fue comparable con la observada para algunos fungicidas comerciales.

## ABSTRACT

Thirteen perinaphthenone-type compounds (**1-13**) were evaluated for their activity against *Mycosphaerella fijiensis* under light controlled conditions and their half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) were calculated in order to establish structure-activity relationships (SAR). A SAR trend was hypothesized which allowed the design of compound (**14**). The designed compound displayed significantly enhanced *in vitro* activity against *Mycosphaerella fijiensis* in comparison with other perinaphthenone-type compounds and the activity was comparable with some commercial fungicides.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de banano en Colombia representa el 3% de las exportaciones totales de frutas y el 0.4% del producto interno bruto, además, Colombia está ubicado en el tercer lugar en exportación de banano en el mundo con cerca de 80 millones de cajas que representan 400 millones de dólares al año [1, 2].

Dicho cultivo se ve atacado por múltiples enfermedades entre ellas la Sigatoka Negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, la cual ha sido considerada la enfermedad más devastadora que ataca al banano en todo el mundo. En Colombia, el manejo de dicha enfermedad cuesta alrededor de 30 millones de dólares al año (800 dólares por hectárea al año) y su control se basa en el empleo de fungicidas sintéticos [3]. El empleo de dichas sustancias en la producción agrícola ha sido objeto de fuertes cuestionamientos en las dos últimas décadas en el mundo, tanto por la resistencia concomitante que se genera debido a la aparición de cepas resistentes del hongo, lo que resulta en un aumento de ciclos de aspersion, como también por los efectos nocivos que ocasionan en el hombre y en el medio ambiente debido a su creciente acumulación [4, 5].

Sin embargo, el tratamiento quimioterapéutico continúa siendo el modo más efectivo y rápido de controlar esta enfermedad, lo cual pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevos motivos estructurales para el desarrollo de fungicidas ambientalmente amigables y con modos de acción novedosos [6]. Otra opción podría fundamentarse en el desarrollo de variedades resistentes a esta enfermedad, de las cuales ya existen reportes (Calcutta 4, Yangambi Km5 entre otra), pero debido a sus pobres características agronómicas no son adecuadas para el cultivo [7, 8]. Por tanto, algunas de estas variedades resistentes se han utilizado como base genética para desarrollar híbridos tetraploides resistentes en trabajos de mejoramiento convencional realizados

por varias entidades internacionales como IITA (África), CIRAD (Francia) y algunos investigadores importantes como Phillip Rowe y sus colegas en FHIA (Honduras) [9, 10]. A pesar de producir variedades resistentes de banano y plátano, la calidad de la fruta aún no es lo suficientemente buena como para satisfacer las necesidades de los mercados de exportación [11]. La variedad de banano Cavendish Valery, continúa dominando el mercado de exportación, siendo aún altamente susceptible a la enfermedad de la Sigatoka Negra [9].

Por otra parte, existen evidencias que sugieren que en algunas variedades de *Musa*, la resistencia podría ser debida al efecto de un grupo de compuestos microbicidas llamados fitoalexinas las cuales son sustancias de bajo peso molecular que se acumulan en las plantas cuando se activan las vías enzimáticas del metabolismo secundario [12]. Hasta el momento no se conocen los genes implicados en la síntesis de estos metabolitos secundarios y en general no se conocen los genes involucrados en las respuestas de defensa en *Musa*. Sin embargo, la investigación fitoquímica de este tipo de metabolitos ofrece una oportunidad invaluable para el descubrimiento de nuevos núcleos, los cuales, por ser productos naturales, se podrían presumir como ambientalmente amigables.

Una clase importante de metabolitos secundarios son los compuestos fenólicos [13]; jugando un papel primordial en la interacción de plantas con su ambiente [14]. Ellos pueden actuar como atrayentes de insectos y animales frugívoros, como señales alelopáticas entre plantas y como mediadores en la interacción de plantas con organismos simbióticos o patógenos. Bajo este contexto, los compuestos fenólicos también tienen potencial para proteger las plantas contra estrés de tipo biótico (bacteria, hongos, herbívoros) y abiótico (contaminación aérea, metales pesados, radiación UV) [15, 16].

En las últimas décadas se ha prestado gran atención a la investigación de metabolitos fenólicos tales como flavonoides, taninos, o lignina; metabolitos que se encuentran distribuidos casi que de manera ubicua en el reino vegetal.

Las fenilfenalenonas son compuestos fenólicos a los cuales se les atribuye una función defensiva contra patógenos (fitoalexinas) en banano, tales como *Colletotrichum musae* y *Mycosphaerella fijiensis*. La distribución de estos compuestos se limita a las familias Haemodoraceae [17], Musaceae [18], Pontederiaceae [19, 20] y Strelitziaceae [21].

Recientemente se ha reportado una única clase de fitoalexinas aisladas de la variedad resistente *Musa acuminata* var. “Yangambi km 5”. Dichas estructuras químicas reciben el nombre de perinaftenonas y su importancia recae sobre su actividad antifúngica, puesto que este núcleo inhibe eficientemente tanto la germinación como el crecimiento micelar del hongo *Mycosphaerella. fijiensis*. Esto ha permitido correlacionar la resistencia de ésta variedad de *Musa* con la producción de este tipo de compuestos [6].

Por tal razón, el presente trabajo explora la relación estructura-actividad de compuestos tipo perinaftenona en la interacción con *Mycosphaerella fijiensis*, compuestos con potencial para el desarrollo de nuevos fungicidas que sean ambientalmente amigables.

## **1. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **1.1 ASPECTOS SOCIOECONÓMICOS DEL CULTIVO DE BANANO**

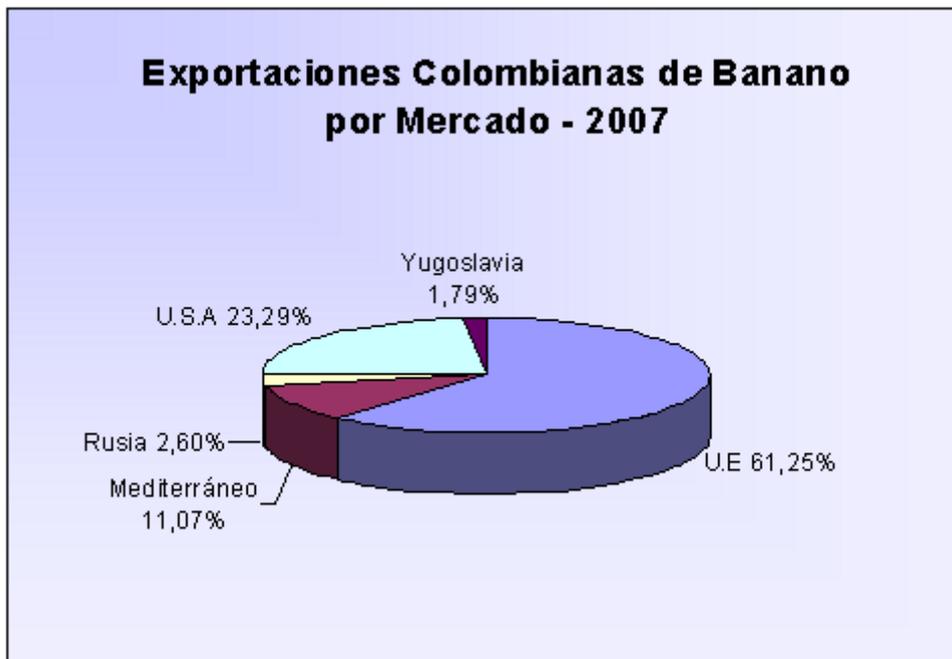
Colombia tiene una larga trayectoria en la producción de banano. Se producen en el país tres tipos diferentes de bananos: banano tipo exportación, banano para consumo interno y banano bocadillo. El banano tipo exportación sólo se produce en dos regiones del país: en el norte del departamento de Magdalena y en el Urabá Antioqueño, siendo este último el de mayor participación en el mercado de exportación, llegando al 72% en el 2007 [2, 22].

Las exportaciones colombianas de banano son el tercer producto agrícola en importancia, después del café y las flores. El tipo de banano que Colombia exporta es el Cavendish Valery, en donde la agroindustria bananera sobresale como un modelo económico y social exitoso que se ha sobrepuesto a las condiciones de violencia en la zona, desarrollando una industria de producción y comercialización de banano competitiva en los mercados internacionales, posicionándose como rubro importante en la economía Colombiana, generador de divisas, junto con café y flores (con valores de exportación que han oscilado entre 400 y 444 millones de dólares desde 1995) [1, 2].

En el año 2007, las exportaciones colombianas de banano ascendieron a 85.5 millones de cajas de 18.14 Kg por valor de US\$509.6 millones. Se presentaron crecimientos de 2.04% en volumen y de 10.09% en valor, respecto al año 2006. Las hectáreas sembradas de banano de exportación en éste año fueron de 42,287 en las dos zonas productoras del país; 827 hectáreas menos que las reportadas para el año 2006. Pese a la reducción de siembra, la productividad promedio fue levemente superior a la observada en el año 2006 debido a la mejora en productividad de la región de Urabá [1, 23].

Los países hacia los cuales se exporta la fruta colombiana son, en su orden, Bélgica (y a otros países de Unión Europea), Alemania, Estados Unidos y el Mediterráneo. En la figura 1, se observa la participación de estos países en el mercado de exportación [23].

**Figura 1.** Exportación de banano en Colombia. Fuente Augura.

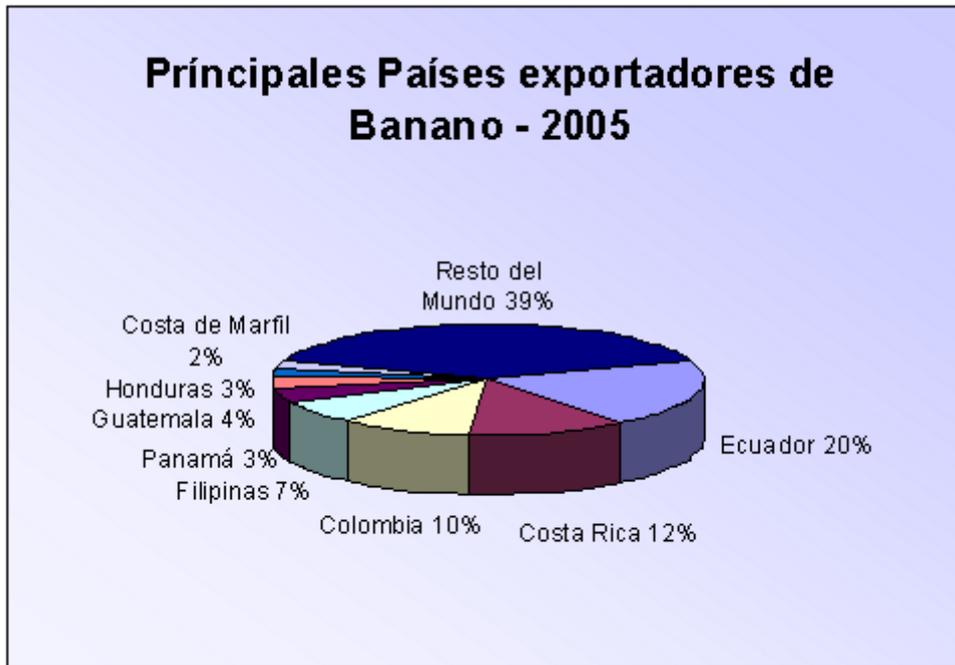


En el mercado internacional, las principales frutas que conforman el movimiento diario son las bananas. En términos de volumen, representan las primeras frutas de exportación, y ocupan el segundo lugar, después de las cítricas en términos de valor; y corresponde al 12% del volumen total de frutas producidas en el mundo [1, 24, 25].

Los mayores productores de banano en el mundo son India y Brasil, quienes concentran el 33,6% de la producción mundial. Por su parte, Ecuador, China, Filipinas, Indonesia y Costa Rica concentran otro 33,3%. Colombia se ubica en el puesto once, con una participación del 2,2% de la producción mundial. En general, los países de América Latina y el Caribe constituye la zona de mayor exportación de banano del mundo, concentrando el 81% del total [24].

Ecuador es el primer exportador mundial de banano, con una participación del 20%, seguido de Costa Rica 12%, Colombia 10%, y Filipinas 6% (Figura 2), siendo abastecido los mercados consumidores en más del 60% por los cuatro países, que sumado Guatemala alcanzan el 70% de la oferta mundial [1, 24].

**Figura 2.** Estadísticas de países exportadores de banano. Fuente: FAO



En el comercio internacional del banano, los mercados más grandes son Estados Unidos, la Unión Europea, Canadá y Japón.

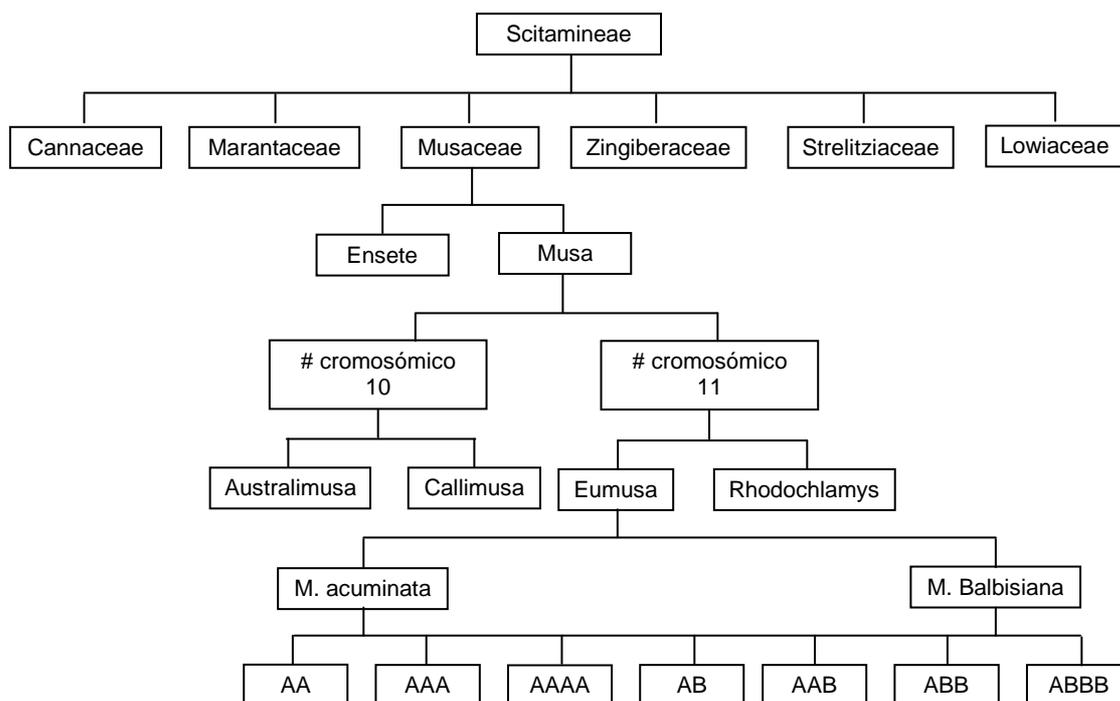
## 1.2 ASPECTOS TAXONÓMICOS DE LA FAMILIA *Musaceae*

La familia Musaceae pertenece al orden Scitamineae el cual también incluye las familias Cannaceae, Lowiaceae, Marantaceae, Strelitziaceae, y Zingiberaceae. La familia Musaceae posee dos géneros (*Musa* y *Ensete*). El género *Musa* se divide en cuatro grandes grupos, de los cuales el grupo Eumusa contiene la gran mayoría de bananos comestibles, que a su vez derivan principalmente de dos variedades silvestres: *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*. De acuerdo a la multiplicidad genética y al grado en que cada una

de las variedades silvestres *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* haya contribuido en la diversidad genética de la planta en cuestión [26, 27], se establece la subdivisión de cada grupo en “collas” (figura 3): *Musa acuminata* Colla (genoma A) y *M. balbisiana* Colla (genoma B), siendo éstos los ancestros comunes de todos los cultivares triploides y tetraploides conocidos [28].

Dichas “collas” se subdividen en subgrupos, cada subgrupo con un buen número de entradas. Por ejemplo, el grupo diploide AA (colla AA) de los cultivos acuminata posee más de 24 subgrupos, uno de los cuales, el subgrupo “Dorado” posee más de 6 variedades [26].

**Figura 3.** Clasificación taxonómica de los bananos comestibles.



Las variedades comerciales de banano mas comunes corresponden a los clones: “Cavendish”, “Gros Michel”, “Lacatan”, “Gran Cavendish”, “Dwarf Cavendish”, “Robusta” y “Mysore”; y en general son susceptibles a alguna de las enfermedades como Sigatoka Negra, Mal de Panamá y/o Antracnosis. De

otro lado, la serie híbrida entre *Musa acuminata* y *balbisiana* genera bananos y plátanos (estos últimos siendo no comestibles) cuya susceptibilidad a la Sigatoka Negra es muy diferente. De los otros tres grandes grupos restantes se destaca la producción de una fibra importante (Abacá, procesada de *M. textiles*, Australimusa), un grupo pequeño de cultivos comestibles, alguna que otra fibra y plantas ornamentales [27].

Los bananos son principalmente hierbas terrestres las cuales poseen un sistema adventicio de raíces. Los tallos aéreos son altos y están soportados por una capa de hojas finamente empaquetadas las cuales forman los seudotallos.

Comúnmente se asume que los bananos de África y América son originarios de Asia o el Pacífico; esto implica que la propagación de estas plantas en América ha sido exclusivamente clonal y que la principal fuente de variabilidad genética ha sido la mutación somática [29].

### **1.3 ENFERMEDADES DEL BANANO**

Entre las enfermedades más devastadoras en la producción de banano y plátano se encuentran la Sigatoka Negra y Amarilla causadas por los hongos *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y *M. musicola* respectivamente, y el Mal de Panamá causada por *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* respectivamente, siendo los principales patógenos que afectan enormemente la producción y utilización de las *Musáceas* [30, 31]. El uso de fungicidas químicos ha sido la forma más común de controlar estas enfermedades, lo cual significa entre un 30-40 % de los costos de producción, además de producir trastornos a los ecosistemas, a la salud humana y traer como consecuencia la aparición de fungorresistencia que demanda cambios constantes del fungicida que se está aplicando [11, 32].

Por esta razón, una de las principales preocupaciones del Ministerio de Agricultura, es la protección permanente en las plantaciones bananeras contra plagas y enfermedades, por medio de campañas fitosanitarias realizadas bajo la dirección y supervisión de los técnicos de campo, disminuyendo el riesgo de pérdidas causadas por este tipo de patógenos. A continuación se describe en más detalle la enfermedad “Sigatoka Negra”, la cual es objeto de estudio en esta investigación.

### 1.3.1 SIGATOKA NEGRA: *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

La Sigatoka Negra es la forma más severa del complejo Sigatoka el cual involucra dos patógenos estrechamente relacionados: *Mycosphaerella musicola*, causante de la Sigatoka amarilla, identificado por primera vez en la Isla de Java en 1902 y, *Mycosphaerella fijiensis* [anamorfo *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton] agente causante de la Sigatoka Negra, descubierto en las islas Fiji en 1963 y en Honduras en 1972 [33, 34, 35]. Estos dos últimos patógenos son apenas discernibles pues los síntomas ocasionados por ellos son idénticos [30, 36].

En Colombia, la Sigatoka Negra se detectó por primera vez en octubre de 1981, en la zona bananera de Urabá y desde entonces se ha difundido por las regiones Atlántica, Pacífica y hacia el centro del país alcanzando los departamentos de Caldas, Cundinamarca y Tolima [37]. En las zonas bananeras y plataneras del país, el control de esta enfermedad representa un costo que oscila entre US\$700-800 ha/año, representando cerca del 13,8% de los costos totales de producción del cultivo y el 46% de los costos en agroquímicos [38].

*Mycosphaerella fijiensis* es particularmente un patógeno mucho más agresivo y destructor que *M. musicola*, causando daños a bananos de genoma AAA así como también cultivares correspondientes a otros grupos genómicos (AA, AAB, ABB). Su mayor impacto ha sido en las áreas de América Central,

Latinoamérica y África las cuales cuentan con banano y plátano (genoma AAB) como el principal alimento más no con la financiación ni las fuentes técnicas suficientes para el uso de fungicidas [11, 30].

Las pérdidas en la producción son principalmente debidas a los daños sobre la superficie funcional de la hoja, que a su vez ocasiona la producción de fruta pequeña y de baja calidad [11, 39].

La severidad de este patógeno se magnifica en un sistema agrícola como el de las *Musáceas*, en el cual la propagación vegetativa (reproducción asexual) y el cultivo en grandes extensiones de tierra de un clon genéticamente uniforme, lo hace altamente vulnerable a ataques epidémicos de la enfermedad [40].

#### 1.3.1.1 Agente causal.

*Mycosphaerella fijiensis*, el agente causal de la Sigatoka Negra de bananos y plátanos (*Musa spp*), presenta en su ciclo de vida un estado sexual perfecto o teleomorfo (ascosporas) y un estado asexual, imperfecto o anamorfo (conidias).

La dispersión por salpicadura y el lavado por lluvia son los principales medios de diseminación de la enfermedad causada por conidias y/o ascosporas [35, 41, 42]. Las conidias se asocian principalmente con la diseminación local de la enfermedad y son importantes durante períodos de humedad alta. Las ascosporas en cambio, son la principal fuente de inóculo de la enfermedad [35], puesto que son diseminadas por el viento a distancias más largas entre las plantaciones y éstas son depositadas principalmente en la hoja “Candela” y en las cuatro hojas más jóvenes [30, 43, 44, 45]. Además, debido a que *M. fijiensis* produce relativamente pocos conidios, las ascosporas son consideradas más importantes en la dispersión de la enfermedad [46].

No obstante, las conidias pueden ser importantes en la prevalencia de la enfermedad durante periodos de baja precipitación, en los que se forma abundante rocío en las horas de la madrugada y las primeras horas de la mañana. Hasta el momento, no ha sido posible determinar diferencias entre los síntomas de las infecciones causadas por conidias o ascosporas [47].

#### 1.3.1.2 Infección y síntomas de la enfermedad.

El ciclo de infección se inicia con la deposición de las ascosporas o conidios del hongo que han sido liberados por el viento sobre las hojas libres de la enfermedad. Bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y agua libre en la superficie de la hoja, el proceso de germinación ocurre en alrededor de una hora [5, 48], seguido por un crecimiento epifítico de los tubos germinativos, los cuales entran a la hoja a través del estoma, para luego proliferar en tejido intercelular de la hoja [42].

Se ha demostrado que justo después de que el hongo penetra por el estoma de la hoja, se producen reacciones químicas de hipersensibilidad que evitan la expansión del patógeno por el tejido vegetal. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el patógeno supera rápidamente esta resistencia química y por consiguiente no es duradera [49].

Bajo condiciones óptimas, el patógeno establece una relación biotrófica durante 3 a 4 semanas después de la penetración por el estoma antes de la aparición de síntomas necróticos [50]. Cabe anotar que, el desarrollo de la enfermedad es favorecido cuando existe alta humedad y altas precipitaciones, mientras que las temperaturas menores de 20°C y períodos secos inhiben el crecimiento del hongo [51]. La culminación del ciclo de infección ocurre con la liberación de las primeras ascosporas, lo cual se puede presentar aproximadamente a las seis semanas después de la infección [52].

Los síntomas de la Sigatoka Negra varían en función del estado de desarrollo de la planta, variedad del hospedero y severidad del ataque [52].

De acuerdo a Meredith y Lawrence [42] y Fouré [36], se han identificado seis estados de la evolución de los síntomas de la enfermedad con las siguientes características (figura 4):

Estado 1. Sobre la superficie abaxial, decoloraciones pequeñas menores de 1mm de longitud de color blanco amarillento; estas líneas, conocidas como pizcas, en condiciones naturales aparecen principalmente cerca al borde del lado izquierdo de la hoja y particularmente hacia el ápice. Sobre la superficie adaxial, usualmente no se presentan síntomas, ocasionalmente manchas circulares pálidas correspondientes a síntomas menores [48, 52, 53].

Estado 2. Rayas de 2-3mm de longitud de color café rojizo, visibles primero en el envés y luego en el haz donde varían de color amarillo a café y negro (conservan el color café rojizo solo en el envés) a causa de manchas cloróticas previo a la decoloración por xantofilas y fenoles. Su distribución sobre las hojas puede ser muy variable; sin embargo, es común encontrar grupos de líneas o estrías en toda la hoja o en el borde, o en bandas sobre la lámina foliar que se conservan paralelas a la vena central [48, 52].

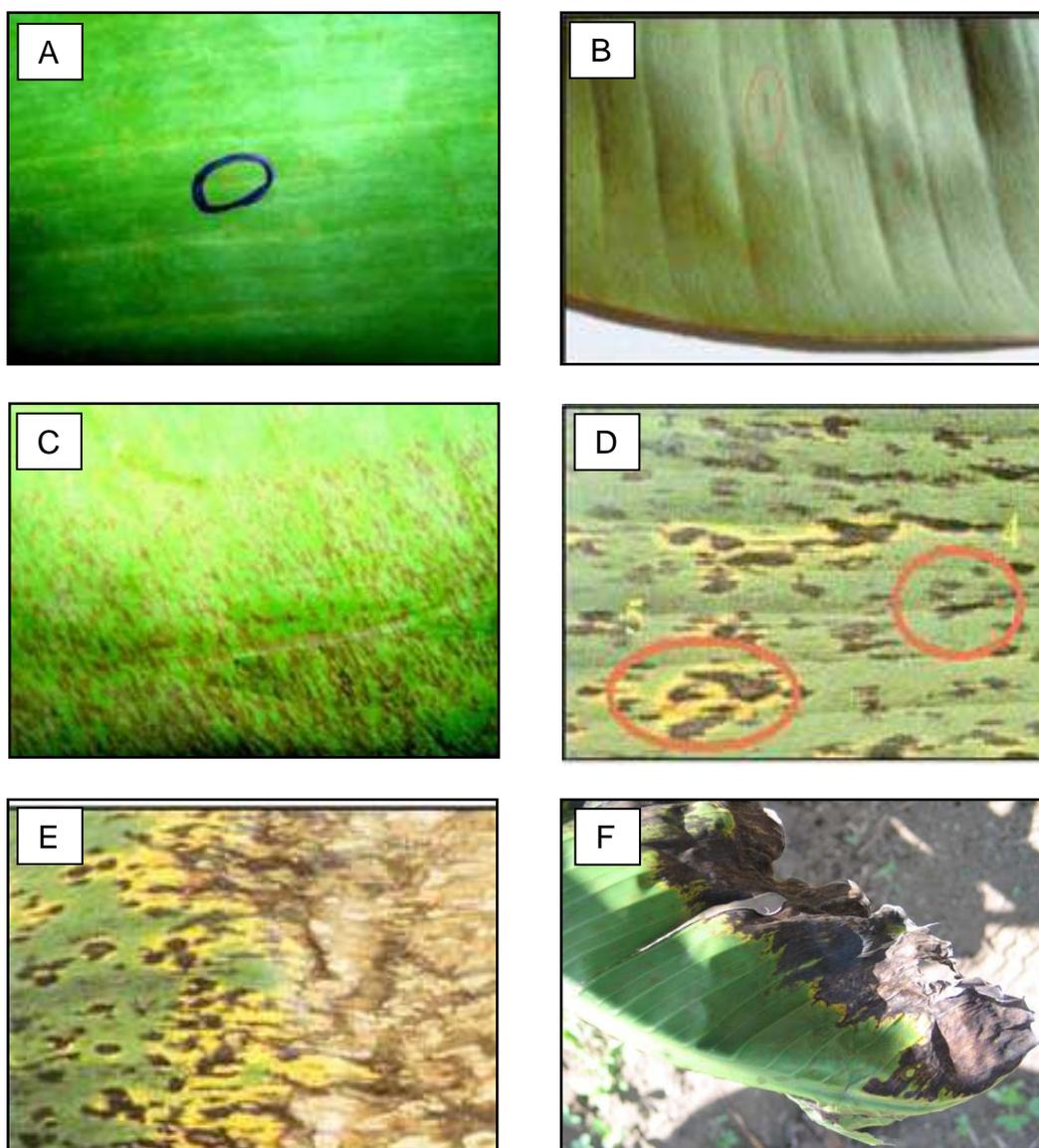
Estado 3. Las estrías continúan alargándose hasta llegar a tener una longitud que va desde 5 hasta 20mm, cambiando su coloración a un tono café oscuro o negro dependiendo del cultivar. Su distribución sobre la hoja es similar al estado anterior [48].

Estado 4. Muerte y sequedad de tejidos observado como manchas ovales de color café en el envés y negro en el haz. En este estado es común encontrar en horas de la mañana, en presencia de rocío o después de las lluvias, un borde húmedo alrededor de la mancha [48, 52].

Estado 5. Manchas negras rodeadas de un halo amarillento y centro semihundido [52].

Estado 6. Manchas con centro hundido de color blanco grisáceo, donde a simple vista se pueden observar los pseudotecios o cuerpos productores de ascosporas [52].

**Figura 4.** Estados del desarrollo de la enfermedad de acuerdo con Fouré. **A)** Estado 1; **B)** Estado 2; **C)** Estado 3; **D)** Estados 4 y 5; **E)** Estado 6 y **F)** Daño total de la hoja [36].



Fullerton y Olsen [54], determinaron el grado de reacción del hospedero al ataque del patógeno, de acuerdo al progreso de los síntomas, los cuales dependen de la combinación particular entre estos dos organismos, tal como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Grados de reacción de acuerdo a los síntomas de la enfermedad

<b>Grado</b>	<b>Síntomas (estado/tiempo)</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Hospedero</b>
1	Máximo 1 o 2	Avirulento	Alta resistencia
2	Máximo 3	Virulencia baja	Resistencia moderada
3	4 > 45 días	Virulencia baja	Resistente
4	4 < 45 días	Virulencia alta	Susceptibilidad moderada
5	4 < 30 días	Virulencia muy alta	Altamente susceptible

#### 1.3.1.3 Estrategias de control de la enfermedad.

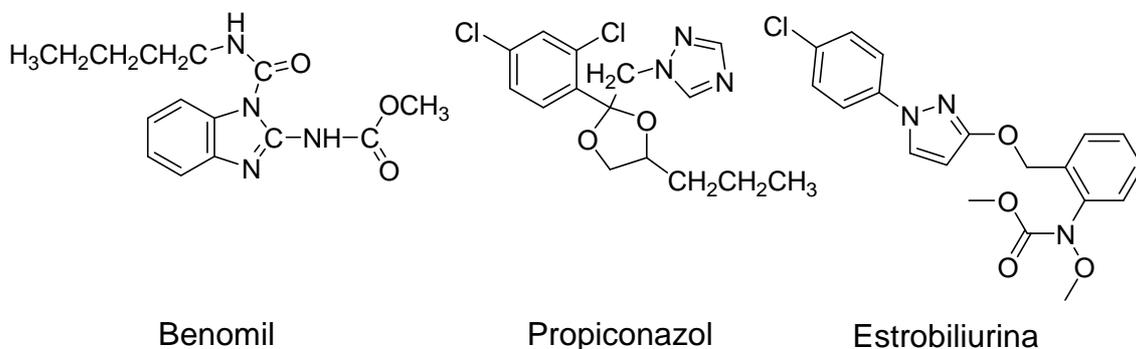
La Sigatoka Negra, es controlada principalmente con la aplicación de fungicidas, puesto que es la medida más viable y efectiva para reducir los daños causados por la enfermedad, aunque esta medida también es apoyada con algunas prácticas de cultivo como el deshoje fitosanitario, densidad de la plantación, drenaje, control de malezas y fertilización [55].

**Control químico.** A escala mundial, el uso de agentes químicos continúa siendo el mecanismo más eficaz para controlar la enfermedad de la Sigatoka Negra en variedades susceptibles. Típicamente, el control requiere de 12 a 15 aplicaciones de fungicidas (de acción sistémica y de contacto) al año y los cultivadores gastan de 30% a 40% de sus ingresos brutos en fungicidas [3, 38, 55].

No obstante, el uso indiscriminado de fungicidas ha generado un grave problema de contaminación ambiental, conllevando a serios riesgos para la salud humana [35, 56] y además, generando la pérdida de sensibilidad del hongo a este tipo de sustancias para su manejo [4].

Los principales fungicidas sistémicos utilizados para el control de la enfermedad han sido benzimidazoles, triazoles, estrobiliurinas y morfolininas (figura 5). Entre 1991 – 1992 una amplia resistencia a Benomil fue reportada en Costa Rica y posteriormente distribuida en todo el mundo, lo que obligó a retirar éste fungicida de los programas de manejo de la enfermedad. Como alternativa, se incremento el uso del fungicida propiconazol [57, 58] para el cual, la pérdida de sensibilidad a triazoles fue encontrada posteriormente en Honduras, Costa Rica, México, Panamá y Cameron [59].

**Figura 5.** Estructuras químicas de los principales fungicidas utilizados para el control de la Sigatoka Negra.



Esta resistencia del patógeno a algunos fungicidas y el incremento en su virulencia, ha hecho que su control sea más complejo y costoso al incrementar el número de aplicaciones [58]; por esta razón, recientemente se ha utilizado como alternativa el sistema preaviso biológico, que consiste en la detección oportuna de los síntomas en tres de las hojas más jóvenes de la planta y detener el desarrollo de la enfermedad con el uso de fungicidas sistémicos y de

contacto (como ditiocarbamatos y derivados de isoftalonitrilo) que tienen efecto curativo sobre los cultivos con temprano proceso de patogénesis del hongo [60].

**Control biológico.** Otra alternativa es el uso de agentes de control biológico como el hongo *Trichoderma spp.*, cuyo efecto se ha evaluado sobre el desarrollo de *M. fijiensis* en laboratorio y en campo, así como también bacterias del género *Serratia* y *Bacillus* [61].

La selección de microorganismos ha sido enfocada sobre la capacidad del microorganismo de secretar enzimas hidrolíticas de la pared celular tales como glucanasa y quitinasa [61].

Sin embargo, los resultados no han sido satisfactorios debido a que no tienen un efecto similar de control como el de los fungicidas, pero tienen potencial para ser usados en las regiones donde existen poblaciones de *M. fijiensis* resistentes a fungicidas [61]

**Mejoramiento Genético.** El desarrollo de variedades resistentes a la Sigatoka Negra, ha sido otra de las herramientas utilizadas para el control de la enfermedad. En la actualidad existen varios híbridos resistentes que se han desarrollado en algunos centros de investigación (tabla 2), como son los obtenidos por la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) en Nigeria, y el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD-FLHOR) en Francia [62].

Sin embargo, una de las dificultades especiales en el mejoramiento vegetal enfocado hacia el desarrollo de nuevos cultivares de *Musa* resistentes, hace énfasis sobre los altos niveles de infertilidad de machos y hembras, poliploidía, diferentes combinaciones genómicas en germoplasma, la necesidad para retener esas características en la progenie final y la calidad del fruto [54, 63].

A pesar que la resistencia a enfermedades de Sigatoka ha sido objeto de estudio de programas de mejoramiento por muchos años (Jamaica >40años, Honduras >30 años), poco se conoce sobre la herencia de resistencia a los patógenos de Sigatoka [54]. Se espera que, con ayuda de los avances de la biotecnología moderna se logre transformar genéticamente plantas de banano a través del bombardeo de micropartículas [64] o por *Agrobacterium* [65], lo que permitiría en un futuro obtener plantas de banano y plátano resistentes a la enfermedad mediante la transferencia de genes de resistencia a variedades de interés comercial.

**Tabla 2.** Variedades de banano con diferentes niveles de resistencia a la Sigatoka Negra.

<b>Variedad</b>	<b>Genoma</b>	<b>Nivel de Resistencia</b>
Calcutta 4	AA	HR
Tuu gia	AA	HR
M.a. burmanica	AA	HR
M.a. malaccensis	AA	HR
Bocadillo	AA	S
Niyarma yik	AA	S
Fougamou	ABB	PR
Yangambi	AAA	HR
Grand Nain	AAA	VS
Gross Michel	AAA	VS
Balbisiana	BB	HR
Pelipita	ABB	PR
Manzano	AAB	VS
FHIA1	AAAB	HR
FHIA2	AAAB	PR

HR: Muy Resistente, PR: Parcialmente Resistente, S: Sensible y VS: Muy Sensible

#### 1.4 INTERACCIÓN Banano- *Mycosphaerella fijiensis*

La especificidad de la interacción banano - *M. fijiensis* está descrita a nivel de especies para el patógeno y a nivel de variedades para el hospedero [53, 66, 67, 68], por cuanto la clasificación de los genotipos de *Musa spp.* con relación a su resistencia a la enfermedad, ha sido el resultado de la caracterización de las interacciones planta-patógeno. Esta interacción inicia cuando las ascosporas o conidios de *M. fijiensis* llegan e inician la penetración a los espacios intercelulares del parénquima de la hoja, a través del estoma [49, 50].

De acuerdo al resultado de esta interacción, los cultivares se han clasificado en tres categorías; los altamente resistentes, que bloquean tempranamente la infección (interacciones incompatibles), los parcialmente resistentes que desarrollan los síntomas lentamente (interacciones compatibles), y los susceptibles que desarrollan los síntomas rápidamente (interacciones compatibles) [69, 70, 71].

La resistencia de algunas especies de *Musa* a *M. fijiensis* parece estar relacionada con la postinfección, en la cual, la planta activa mecanismos de defensa manifestado por la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis [72], fitoalexinas [73] así como también cambios en la estructura de sustancias preformadas [50].

Una vez liberado este tipo de sustancias en los espacios intercelulares, se produce el contacto con las hifas del hongo para limitar su extensión en el parénquima. Este material se cree que desempeña un papel importante en las últimas etapas del proceso de la infección. Los fenotipos altamente resistentes muestran una rápida inducción de los mecanismos de defensa, que inducen a una muerte rápida de las células huésped en los sitios de la infección, una reacción que se encuentra en las interacciones incompatibles planta-patógeno [53]. Yangambi km5, un triploide AAA originario del oeste Africano, es altamente resistente a *M. fijiensis* bajo condiciones de campo y laboratorio. Los

síntomas son bloqueados en un estado temprano del desarrollo y, sobre la base de estudios histológicos, conforman una típica reacción hipersensible [36, 53].

La densidad estomática también parece estar involucrado en la resistencia; estudios realizados con clones de plátano resistentes a la enfermedad reportaron una menor densidad estomática en las hojas, reduciendo de forma directa la probabilidad de invasión del hongo a la planta e indirectamente participando en la eficiencia de la misma para elaborar sustancias bioquímicas capaces de frenar en mayor tiempo el avance del patógeno en la hoja [74].

Algunos trabajos [6, 18, 73, 75] sugieren que al menos en ciertas variedades de *Musa*, la resistencia puede ser debida al efecto de un grupo de fitoalexinas denominadas fenilfenalenonas, las cuales se han aislado de los rizomas y hojas del banano y se ha demostrado que tienen actividad *in vitro* contra *Mycosphaerella fijiensis*. Algunas de estas sustancias están presentes solamente después de la colonización por *Mycosphaerella fijiensis* o *Fusarium oxysporum*. Adicionalmente, se han detectado en al menos cuatro especies de *Musa* varios tipos de fenilfenalenonas y parece haber una correlación entre el tipo de fenilfenalenona y la resistencia de las plantas a los microorganismos patogénicos [73, 75]. No se sabe aún las vías enzimáticas implicadas en la regulación y síntesis de éstos compuestos. Apoyando la hipótesis de que el metabolismo secundario juega un papel importante en la respuesta de defensa a la Sigatoka Negra, se ha demostrado que existe una fuerte activación de la enzima fenilalanina-amonio-liasa (PAL) después de la inoculación con *M. fijiensis* en la cual juega un papel importante el metabolito producido por el hongo, denominado 2,4,8-trihidroxitetralona [50, 76].

Estudios realizados con base en la biosíntesis de éste metabolito fúngico (2,4,8-THT) en este tipo de interacciones, describen dos eventos con respecto a la susceptibilidad y resistencia de las variedades de *Musa*: (1), la incompatibilidad es marcada por una activación específica del metabolismo

fúngico incrementando la concentración fisiológica de 2,4,8-THT como un resultado de la interacción con la planta hospedante resistente, la cual causa micro-lesiones necróticas y elicitación de los mecanismos de defensa a través de la síntesis de fitoalexinas dependientes de *PAL*; en consecuencia, el crecimiento del hongo es restringido en un estado temprano y el proceso de infección bloqueado; (2) por otra parte, la interacción compatible es marcada por los niveles sub-letales de 2,4,8-THT durante la fase temprana de contacto huésped-patógeno, los cuales permiten la dispersión del micelio en el espacio intercelular y sucesivamente la acumulación de 2,4,8-THT causando desarrollo de síntomas en los estados posteriores a la patogénesis [50].

Algunos estudios sugieren que la respuesta hipersensible como mecanismo de defensa de la planta es en gran parte, producto de la interacción de las fitotóxicas de *M. fijiensis*, por lo que éstas podrían servir como un determinante secundario de patogenicidad en cultivares altamente resistentes a la enfermedad, y en consecuencia, los prospectos en la investigación de cultivares de banano resistentes a Sigatoka Negra son prometedores [77].

*Shepherd* (1990) [54] encontró que la resistencia en las formas silvestres de *M. acuminata* fueron dependientes, en parte, sobre genes homocigotos recesivos. La resistencia a la Sigatoka Negra en plantas híbridas utilizando *M. acuminata* ssp. *Burmannica* Calcutta 4 (tabla 2) como un patrón resistente, ha mostrado ser controlado por un alelo recesivo principal (*bsr1*) y dos alelos recesivos independientes con efectos aditivos (*bsr2* y *bsr3*).

No obstante, debido a la gran variabilidad patogénica de *M. fijiensis*, se ha demostrado que algunos aislamientos obtenidos de diferentes hospederos procedentes de varios países, fueron virulentos en ciertos hospederos considerados como resistentes Calcutta 4, T8, Paka y Pisang Lilin los cuales son comúnmente utilizados como fuente de resistencia en los programas de mejoramiento genético [54]

## 1.5 FITOALEXINAS DE *MUSA*

Recientemente, el estudio de metabolitos secundarios tipo fenilfenalenonas de *Musa* es una de las investigaciones de gran importancia con miras hacia la manipulación genética de las rutas metabólicas que están involucradas en la activación de mecanismos de defensa de la planta contra agentes patógenos. Por esta razón, en el caso de las plantas de la familia *Musaceae*, el análisis fitoquímico enfocado hacia este tipo de estudios, ha arrojado como resultado un gran número de fenilfenalenonas las cuales se han reportado también en otras especies vegetales [78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88].

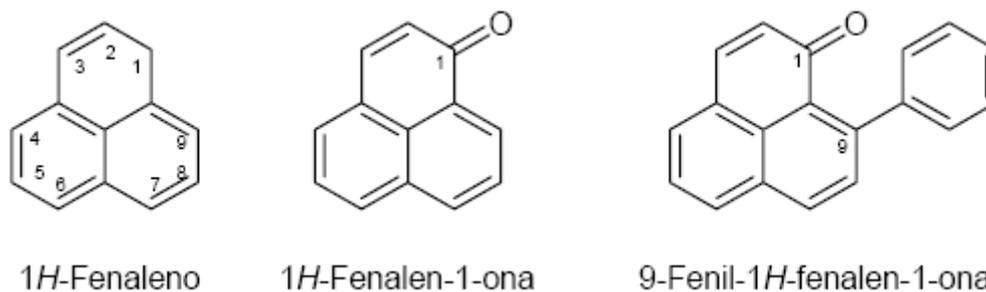
A continuación, se presenta una revisión del estado del arte de los aspectos más relevantes de estas sustancias.

## 1.6 FENILFENALENONAS

Los compuestos de carácter fenólico conocidos como fenilfenalenonas han sido reportados como fitoalexinas del género *Musa* [78].

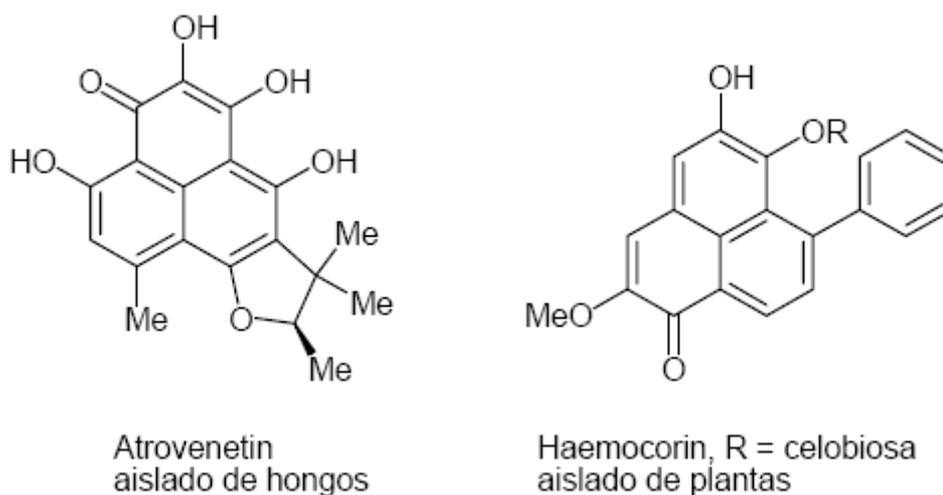
El término fenilfenalenona deriva del sistema principal tricíclico de fenaleno, un grupo carbonilo y un anillo fenilo lateral enlazado al carbono C-4 ó C-9 (figura 6). Los primeros compuestos de este tipo fueron aislados en 1955 de plantas superiores de la familia *Haemodoraceae* [17], y de hongos del género *Hypomicetos* y *Discomicetos* [89, 90]. Claro está que las estructuras de las fenalenonas derivadas de plantas son significativamente diferentes de las derivadas de hongos (figura 7), ya que ambos tipos de sustancias derivan de rutas biosintéticas diferentes [90, 91].

**Figura 6.** Estructuras de fenaleno, fenalenona (perinaftenona) y fenilfenalenona.



Poco después que se reportara el aislamiento de la primera fenalenona en una planta, específicamente haemocorin [17], otras fenilfenalenonas y compuestos afines fueron encontrados en la misma familia Haemodoraceae [92, 93, 94].

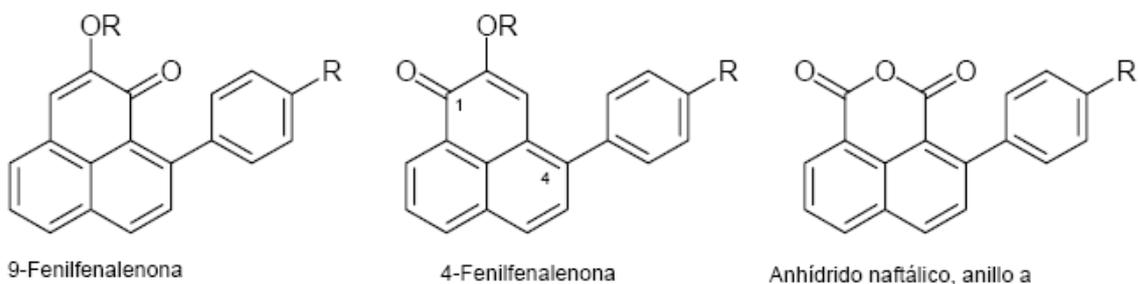
**Figura 7.** Estructuras de las primeras fenalenonas reportadas en hongos (*Penicillium herquei*) y plantas (*Haemodorum corymbosum*)



Hasta la fecha más de 30 fenilfenalenonas o análogos estructurales han sido aislados de raíces, flores, frutos, y material vegetal completo de la familia *Musáceae* [78, 79]. Las características estructurales generales de estas moléculas se presentan en la figura 8. Es importante mencionar que todos estos compuestos pueden ser referenciados como derivados de 9-fenilfenalenonas haciendo alusión a la relación 1,3 (*peri*) entre un carbono

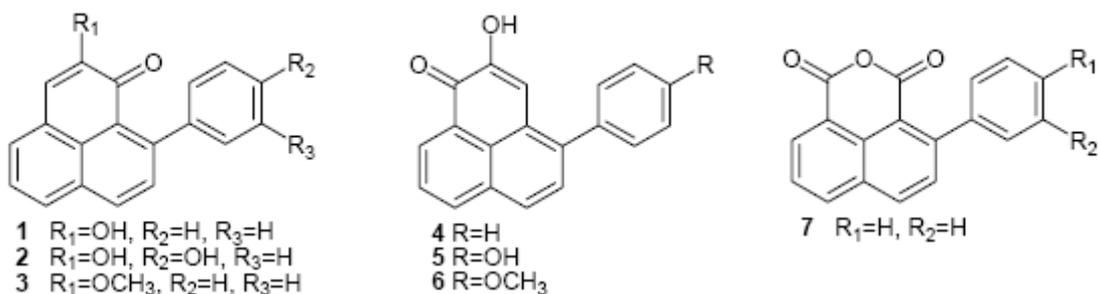
oxigenado y el otro carbono que soporta el anillo fenilo lateral y otros como 4-fenilfenalenonas.

**Figura 8.** Estructuras generales de fenilfenalenonas y compuestos afines encontrados en *Musa*.



En la figura 9 se muestran las estructuras de fenilfenalenonas comunes en algunas especies de *Musa*: Anigorufona (1), hidroxianigorufona (2) [95], metoxianigorufona (3) [84], 2-hidroxi-4-fenil-fenalen-1-ona (isoanigorufona) (4) [91], irenolona (5) [78], 4'-metoxiirenolona (6) [80], y el anhídrido 2-fenil-1,8-naftálico (7) [96].

**Figura 9.** Fenilfenalenonas identificadas en algunas especies de *Musa*.



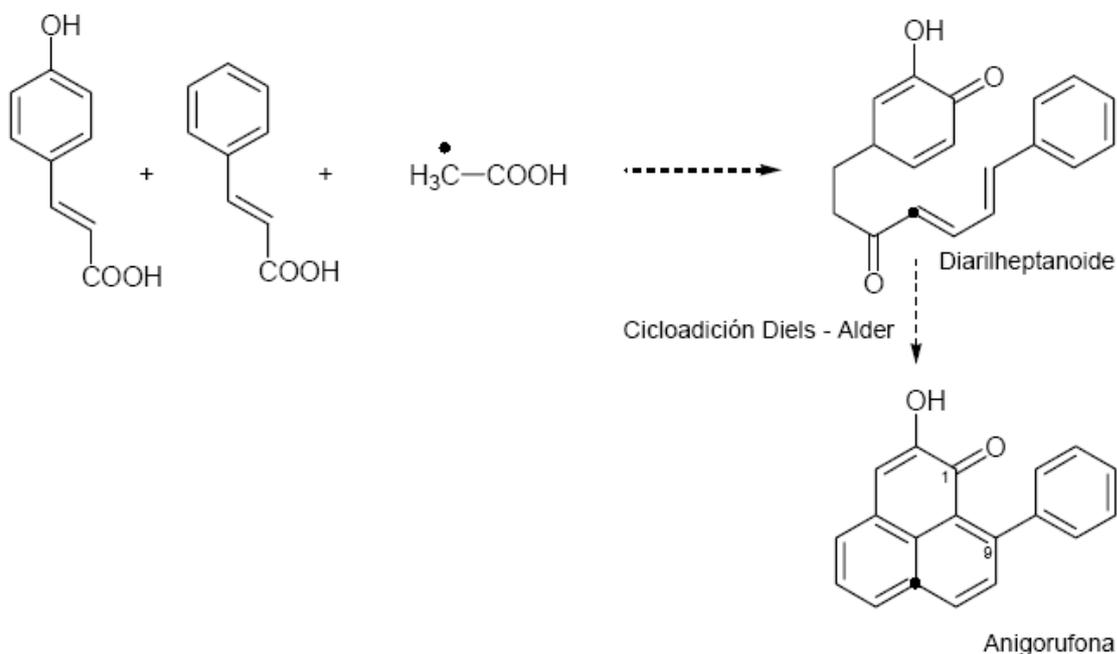
Al comparar las estructuras de fenilfenalenonas reportadas en *Musa* con las reportadas en otras especies, se ha encontrado características similares así como también sustanciales diferencias; por ejemplo, las 9-fenilfenalenonas han sido aisladas de varias especies e incluso se han detectado compuestos idénticos. Sin embargo, la sustitución en el anillo lateral de las 9-

fenilfenalenonas es una característica que ocurre con mayor frecuencia en *Musa*. De hecho, el grupo 4'-metoxilo se encuentra exclusivamente en fenilfenalenonas de *Musa*. También hay un único tipo de estructura presente en *Musa*, conocido como las 4-fenilfenalenonas [78, 80, 82, 87, 97], en las cuales el carbono oxigenado C-1 y el átomo de carbono que soporta el anillo lateral, C-4, se encuentran en relación 1:5.

#### 1.6.1 Aspectos biosintéticos generales de fenilfenalenonas.

Los estudios biosintéticos realizados han demostrado el papel primordial que la ruta del ácido shikímico juega en la biosíntesis de las fenilfenalenonas. Esta ruta genera fenilalanina, el principal precursor involucrado en la formación de dichos compuestos [98], que es posteriormente transformado en ácido *p*-cumárico por las respectivas enzimas fenilalaninamonioliasa (PAL) y cinamato hidroxilasa (C4H). Se ha demostrado que dos unidades de ácidos fenilpropanoicos (una de ácido cinámico y otra de hidroxicinamatos) se condensan con un carbono del acetato para dar lugar a la formación de un intermedio diarilheptanoide, el cual, presumiblemente vía cicloadición intramolecular de Diels-Alder forma el núcleo fenilfenalénico [99, 100] (Figura 10).

**Figura 10.** Esquema ilustrativo de la hipótesis biosintética general para la biosíntesis de una 9-fenilfenalenona (anigorufona).



### 1.6.2 Actividad biológica

#### *Actividad de fenilfenalenonas en la defensa inducible de las plantas.*

Se ha reportado que la biosíntesis de varias fenilfenalenonas es estimulada después de que la planta es infectada con hongos patogénicos o nemátodos en *Musa acuminata* [85, 101]. Por lo anterior, las fenilfenalenonas son consideradas como metabolitos que juegan un importante papel en los mecanismos de defensa inducida de las plantas del género *Musa* [78, 84]. Kamo *et al.* [81] demostraron que los frutos verdes producen fenilfenalenonas antifúngicas (en las cáscaras) cuando son infectados por *Colletotrichum musae*; al parecer estos metabolitos están involucrados en los mecanismos de defensa haciendo que el patógeno no se desarrolle hasta que la fruta madure [102]. Los ensayos *in vitro* mostraron que tanto las 9- como las 4- fenilfenalenonas que contenían un grupo hidroxifenilo presentaban una buena actividad biológica

contra *Colletotrichum musae* [81], siendo estas últimas las más activas. Adicionalmente, la actividad antifúngica contra *Mycosphaerella fijiensis* de algunas 9- fenilfenalenonas naturales junto con algunos análogos estructurales ha sido reportada, dando como resultado una actividad biológica relativamente moderada por parte de las 9-fenilfenalenonas naturales [73].

Pese a que algunas fenalenonas aparecen solo después que la planta es infectada (biosíntesis *de novo*), hay reportes en los que se demuestra que las fenilfenalenonas se encuentran presentes en baja concentración en material vegetal sano (no infectado) como antibióticos naturales constitutivos del género *Musa*. Es por esto que algunas fenilfenalenonas se encuentran clasificadas como fitoanticipinas [84]. Kamo *et al.* [96] demostraron que la concentración fisiológica en banano de hidroxianigorufona aumenta cuando la planta sufre lesiones físicas pero no cuando es inoculada con conidias de *C. musae*; mientras que otras fenilfenalenonas solo aparecen después de un daño físico de la planta junto con inoculación.

En resumen, parece ser que las fenilfenalenonas juegan un papel tanto de fitoalexinas como de fitoanticipinas en los mecanismos de defensa de las plantas, e incluso, el nombre de fitoresistinas ha sido propuesto para compuestos con esta dualidad (fitoalexina y fitoanticipina) [103].

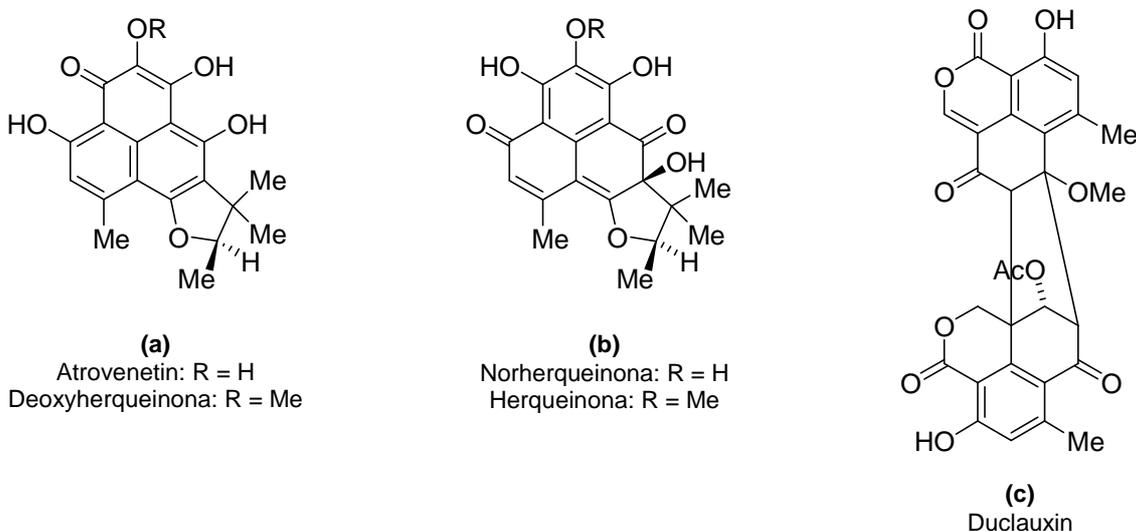
#### *Actividad farmacológica de las fenilfenalenonas*

Muy pocos estudios han sido reportados en relación con la actividad farmacológica de las fenilfenalenonas. Haemocorin fue la primera fenalenona a la cual se le exploró su actividad antitumoral [104] y antibacterial [105]. Estudios recientes reportaron que las 9-fenilfenalenonas naturales anigorufona y metoxianigorufona poseen actividad leishmanicida, actuando sobre la mitocondria de los promastigotes de *Leishmania donovani* [106].

## 1.7 PERINAFTENONAS.

Los metabolitos secundarios que poseen el núcleo fenalenona, o estructuras presumiblemente derivadas de una fenalenona, se encuentran raramente en la naturaleza. Los primeros compuestos de este tipo fueron aislados en 1955 y su ocurrencia se ha restringido a una familia de plantas superiores (*Haemodoraceae*), cuatro generadas de Hyphomycetes (hongo imperfecto), y un género (*Roesleria*) dentro de la clase Discomycetes (*Ascomycotina*). Las fenalenonas de plantas y hongos son estructuralmente diferentes por cuanto son derivados de vías biosintéticas distintas; hasta el momento, estas rutas de biosíntesis se desconocen para aquellas fenalenonas de origen vegetal [90] (figura 11).

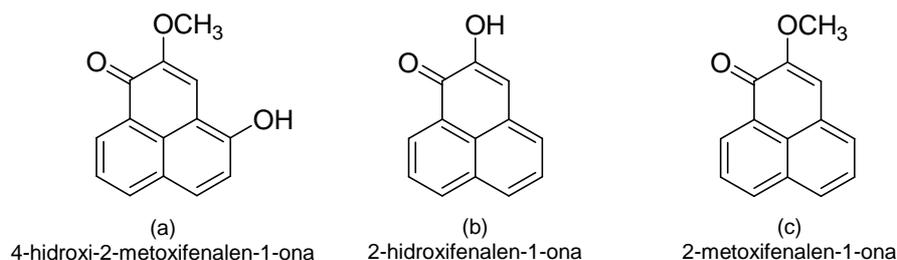
**Figura 11.** Relaciones químicas entre fenalenonas del hongo *Penicillium herquei* (a y b) y *Penicillium duclauxi* (c)



Interesantemente, en esta última década se han reportado nuevos compuestos tipo perinaftenona procedentes de las familias, *Strelitziaceae* y *Musaceae*; dichos compuestos corresponden a la 4-hidroxi-2-metoxifenalen-1-ona, aislado de *Strelitzia reginae* [21] y, los compuestos 2-hidroxifenalen-1-ona y 2-metoxifenalen-1-ona (figura 12), aisladas de *Musa acuminata* var. “Yangambi km5” [6], los cuales constituyen el grupo de compuestos tipo fenalenonas de

gran interés como productos naturales únicos reportados hasta el momento en *Musa*.

**Figura 12.** Fenalenonas aisladas de (a) *Strelitzia reginae* y (b y c) *Musa acuminata* var. “Yangambi km5”.



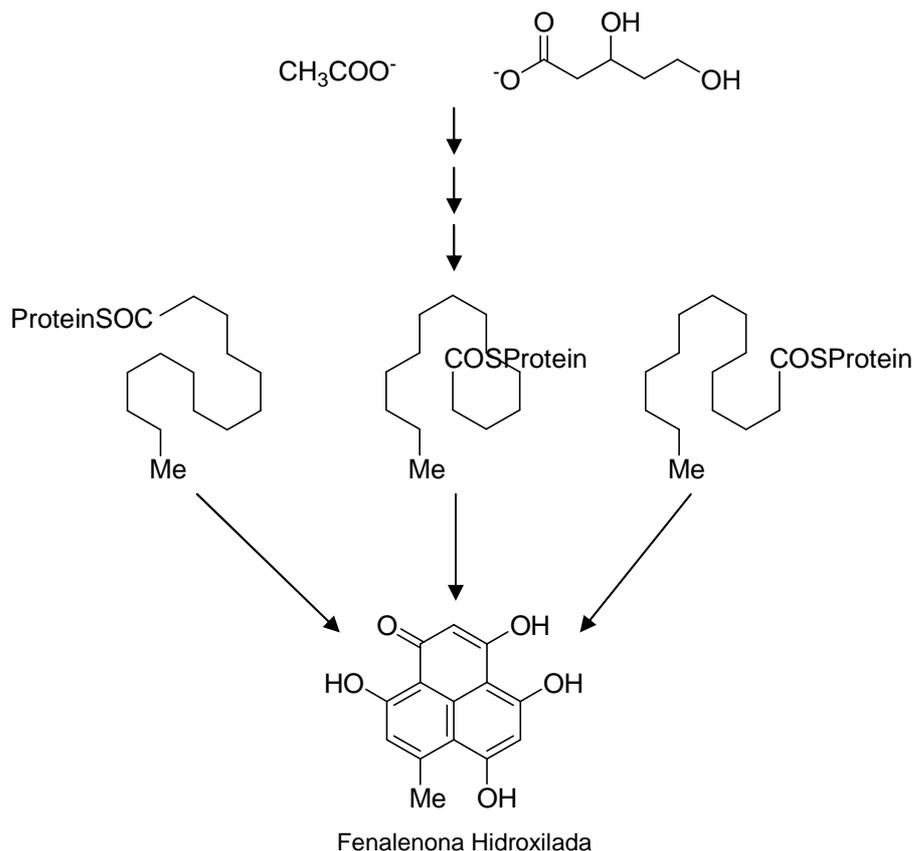
#### 1.7.1 Biosíntesis de perinaftenonas en hongos.

En 1956, Barton y colaboradores [107, 108] propusieron que el sistema central del anillo del pigmento atrovenetin (figura 11) probablemente era derivado de unidades de acetato, con una unidad de mevalonato en el C-5 formando el anillo dihidrofurano. No obstante, en 1961 a través de la incorporación de precursores radio-marcados dentro de la norherqueinona (figura 11), Thomas [109] comprobó esta hipótesis en estudios realizados con *Penicillium hequei* incorporando los precursores 1-<sup>14</sup>C-acetato y ácido 2-<sup>14</sup>C-mevalónico. Pese a que se desconoce los posibles intermediarios acíclicos en la formación del policétido-C<sub>14</sub> lineal de las fenalenonas aisladas de hongos, ha sido posible establecer en estudios con <sup>13</sup>C, tres modos estructurales en los que se podría plegar el policétido-C<sub>14</sub> para formar el sistema metilfenalenona, donde cada uno podría resultar en la misma fenalenona hidroxilada (figura 13).

Cabe señalar que este tipo de estudios ha sido enfocado hacia la investigación de rutas biosintéticas implicadas en la síntesis de fenalenonas fúngicas, pero hasta el momento, se desconoce totalmente los precursores y las vías

metabólicas que conducen a la formación de este tipo de compuestos en plantas, más específicamente en *Musa*.

**Figura 13.** Esquema general de la ruta biosintética de fenalenonas en hongos



### 1.7.2 Aspectos sintéticos de perinaftenonas.

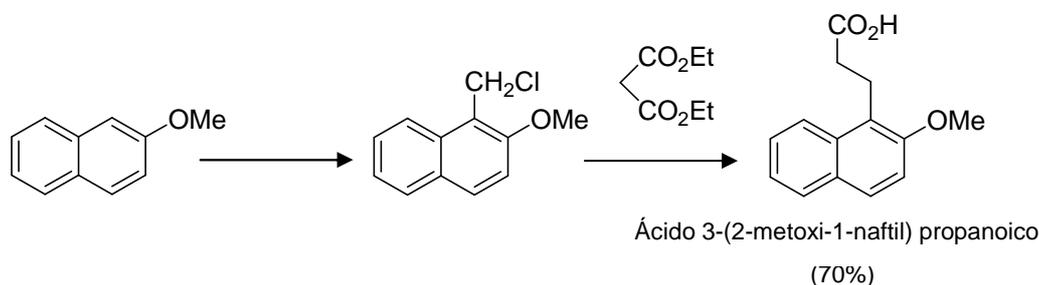
La síntesis de fenilfenalenonas y fenalenonas en general, parten de reactivos comerciales tipo perinaftenona [73], por cuanto la formación de este sistema tricíclico compacto es quizás el reto más importante en la síntesis de estas moléculas.

Típicamente, el núcleo químico “perinaftenona” puede ser obtenido en un solo paso por condensación del 2-naftol con glicerol, ácido sulfúrico, y un agente

oxidante moderado. Sin embargo, el rendimiento de la reacción es muy bajo y resulta en mezclas complejas [110, 111, 112].

Otras metodologías involucradas en la síntesis de 4-metoxi-1*H*-fenalen-1-ona (4-metoxiperinaftena) y perinaftenas semejantes, han sido establecidas utilizando estrategias de ciclación de ácidos  $\beta$ -1-naftilpropanoicos obtenidos por la síntesis del éster malónico, utilizando 1-halogenometilnaftalenos, como materiales de partida (figura 14) [112]. Esta estrategia ha sido reconocida como la síntesis más versátil de fenalenos, 2,3-dihidrofenaletos, y 2,3-dihidrofenaletos [112]. Sin embargo, el ácido 3-(2-metoxi-1-naftil) propanoico, el precursor directo de 4-metoxiperinaftena, es formado en rendimientos moderados, en donde la clorometilación y condensación del malonato requieren un manejo adecuado para alcanzar rendimientos reproducibles [113].

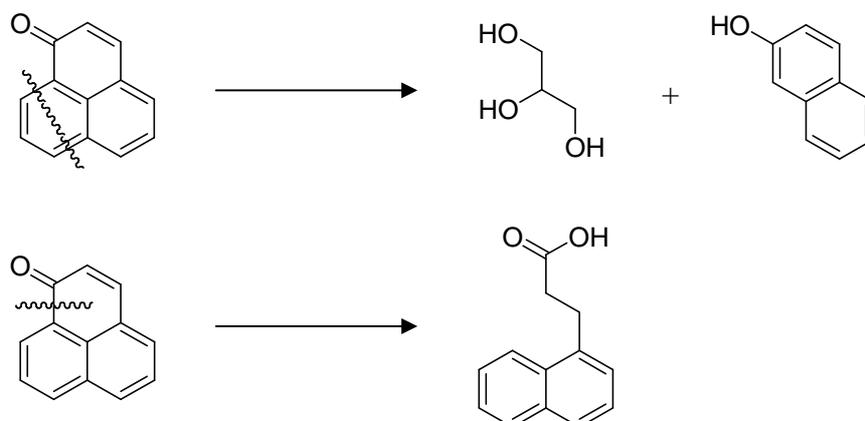
**Figura 14.** Ruta de síntesis del ácido 3-(2-metoxi-1-naftil) propanoico (precursor de la 4-metoxiperinaftena).



Por otra parte, cabe señalar que los sustratos como el ácido 3-(2-metoxi-1-naftil) propanoico (figura 14) pueden ser ciclados utilizando las condiciones de Friedel-Crafts, que en una posterior hidrogenación, resultan en buenos rendimientos en la síntesis de compuestos tipo perinaftenas.

En resumen, en la figura 15 se indican las estrategias más comunes en la síntesis de perinaftenas.

**Figura 15.** Estrategias comunes para la síntesis del núcleo perinaftenona.



### 1.7.3 Actividad biológica.

Entre las fenalenonas fúngicas con actividad biológica cabe resaltar la Atrovenetina [114] y en menor proporción la deoxiherqueinona [115], las cuales presentan actividad antibacteriana contra algunos organismos Gram-positivos. La Herqueinona y norherqueinona no presentan ningún tipo de actividad (figura 11).

Por otra parte, al Duclauxin (figura 11) se le ha determinado actividad antitumoral puesto que disminuye la proliferación *in vitro* de células del carcinoma de *Ehrlich* y, ejerce su efecto citotóxico sobre las células cancerígenas por inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos sin afectar la síntesis de proteínas [116]. Como se comentó en la sección 1.6.2, se ha demostrado que las fenalenonas presentan buena actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*, siendo la perinaftenona [73] y los compuestos naturales, 2-hidroxiperinaftenona y 2-metoxiperinaftenona [6], los más activos en la inhibición *in vitro* del hongo ascomycete. Esto les permitió a Otálvaro *et. al* [6] correlacionar la resistencia que presenta la variedad de *Musa* "Yangambi km 5" a la enfermedad Sigatoka Negra, con la presencia de este tipo de compuestos tipo perinaftenona como un posible mecanismo de defensa inducible por la planta.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Explorar la relación estructura-actividad en la interacción *in vitro* de compuestos tipo perinaftenona contra el hongo patógeno *Mycosphaerella fijiensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar una serie de compuestos tipo perinaftenona, con sustitución en C-2, C-3, C-4 y C-6 por un grupo hidroxilo o metoxilo con fines de explorar los efectos de la posición de estos sustituyentes en el núcleo perinaftenona.
2. Sintetizar una serie de perinaftenonas con sustituyentes en la posición C-2 que afecten la densidad electrónica del doble enlace sea por efecto inductivo o por conjugación.
3. Evaluar la actividad *in vitro* de los compuestos tipo perinaftenonas en la inhibición del crecimiento micelar de las cepas 060124 y 080105 del hongo *M. fijiensis* bajo condiciones de oscuridad y fotoperiodo lumínico de 12 horas diarias.
4. Con base en los resultados de los objetivos 1-3, diseñar, sintetizar y evaluar *in vitro*, una molécula tipo perinaftenona que permita mejorar la actividad contra el hongo *M. fijiensis*.
5. Evaluar la actividad *in vitro* de los compuestos tipo perinaftenonas que presentaron buena actividad antifúngica, sobre la inhibición del tubo germinativo de ascosporas del hongo *M. fijiensis*.
6. Realizar una evaluación preliminar del efecto fitotóxico de algunas perinaftenonas seleccionadas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES

##### 3.1.1 Seguimiento de la reacción y porcentaje de rendimiento.

El seguimiento de la reacción se realizó por cromatografía en capa fina (placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>). En todos los casos los reportes de rendimiento se calcularon con base a medidas directas de peso del producto puro.

##### 3.1.2 Purificación de los compuestos sintéticos.

Se utilizaron diferentes técnicas para el aislamiento y purificación de los productos de reacción: cromatografía de columna de sílica gel 60 (0,063-0,200mm), cromatografía de capa fina (TLC) preparativa (sílica gel 60 F<sub>254</sub>, 2mm, con zona de concentración 20x4cm). Los solventes: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y etanol 96% fueron destilados previamente; éter etílico y etanol absoluto fueron obtenidos de fuente comercial (Merck).

##### 3.1.3 Métodos espectroscópicos.

La elucidación estructural de los compuestos se realizó utilizando espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución (HR-RMN): Los espectros <sup>1</sup>H-RMN, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC y HMQC fueron colectados en un equipo de resonancia Bruker Avance DRX500 equipado con microsonda de detección inversa (2.5mm) o en su defecto con crío-sonda TXI de 5mm. Para el espectro <sup>13</sup>C RMN se utilizó una microsonda desacoplada de banda ancha (2.5mm) operando a una frecuencia de 125.75 MHz.

En todos los casos se utilizó TMS como referencia interna. El equipo de resonancia magnética nuclear Bruker AMX 300 MHz fue empleado para la toma de espectros rutinarios. Los espectros de masas de alta resolución con ionización por impacto electrónico (HR-EIMS) fueron colectados usando un espectrómetro de masas Micromass MasSpec operando a 70 eV y equipado con una sonda de inyección directa.

#### 3.1.4 Reactivos.

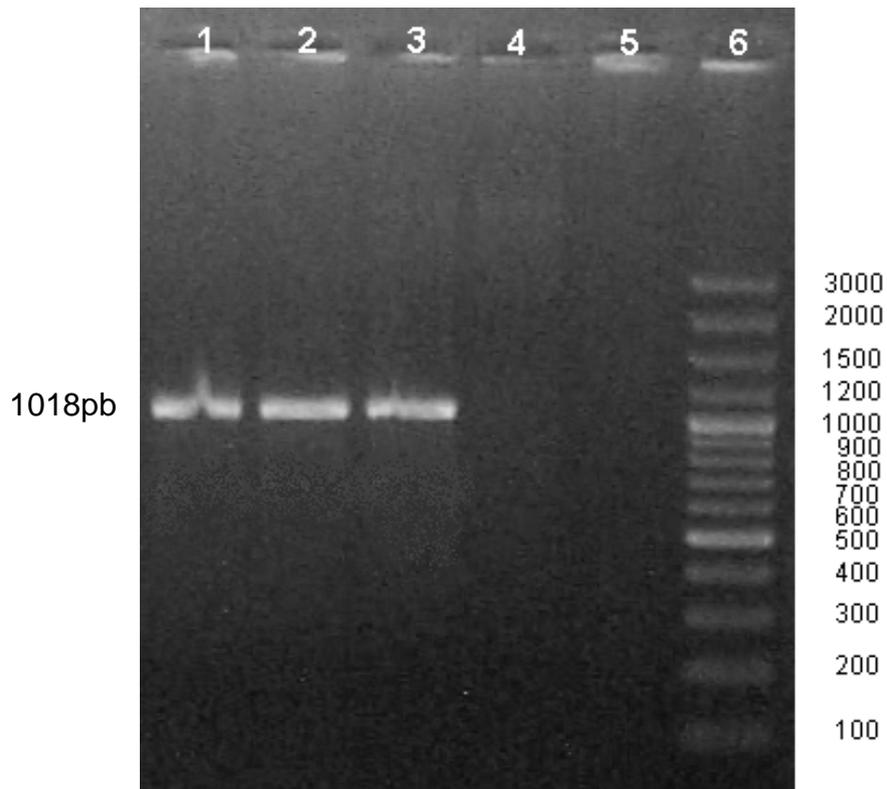
Todos los reactivos fueron obtenidos de fuente comercial (Sigma-Aldrich) y utilizados de acuerdo a las instrucciones señaladas.

El proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Síntesis y Biosíntesis de Metabolitos Naturales (SIMBIOMENA) de la Universidad de Antioquia en convenio con la Unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

### 3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

*Mycosphaerella fijiensis* fue aislado de hojas de banano naturalmente infectadas, suministradas por la Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA) de Apartadó, Colombia acorde a la metodología reportada por Quiñonez, *et. al* [75]. En resumen, los aislados de *M. fijiensis* fueron obtenidos de ascosporas, después de la descarga de las hojas infectadas con Sigatoka Negra sobre agar-agua al 2%, y fueron mantenidas en tubos con medio Potato Dextrosa Agar (PDA) a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los aislados de *M. fijiensis* fueron caracterizados por amplificación de la región ITS por PCR para diferenciar ésta de *Mycosphaerella musicola* [117] (figura 16). Las siguientes secuencias de oligonucleótidos fueron utilizadas: MF137 5'GGCGCCCCCGGAGGCCGTCTA3' (específico para *M. fijiensis*), MM137 5'GGCGCCCCCGGAGGTCTCCTT3' (específico para *M. musicola*) en conjunto con el primer inespecífico R635 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'

que codifica para una región conservada situada en la subunidad 25S del DNA ribosomal [117]. Las cepas de *M. fijiensis* fueron clasificadas acorde con Cañas *et. al* [118] y son mantenidas en la Unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB (Medellín, Colombia) bajo las referencias No. 060124 y 080105 (figura 17)



**Figura 16.** PCR para identificación de *M. fijiensis*. Línea 1, cepa 0601146 (control positivo). Línea 2, cepa 060124. Línea 3, cepa 080105. Línea 4, cepa 060124 con primers específicos para *M. musicola*. Línea 5, control negativo. Línea 6, Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder.

**Figura 17.** Fotografías de la morfología típica de las dos cepas de *M. fijiensis* utilizadas en este estudio (en medio de cultivo PDA)



### **3.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS: *Mycosphaerella fijiensis***

#### **3.3.1 Método para determinar el crecimiento micelar de *Mycosphaerella fijiensis***

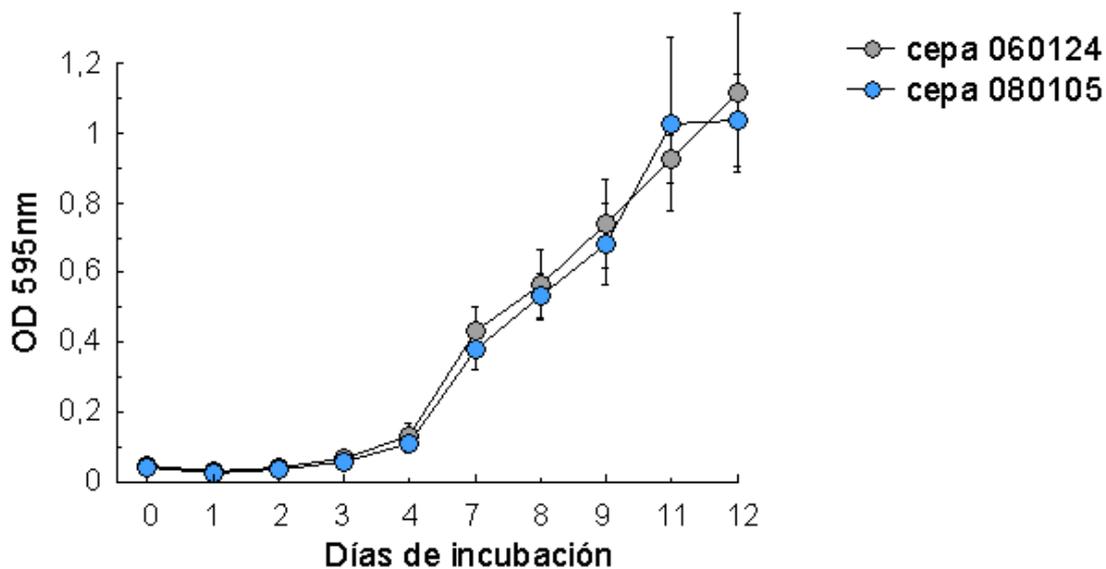
Se utilizó el método automatizado y cuantitativo desarrollado por Peláez, *et. al* [120]. Para esto, se prepararon subcultivos monóspóricos frescos de las dos cepas de *M. fijiensis* (Ref. 060124 y 080105) mantenidos durante 15-20 días a 27°C en medio PDA para obtener el inóculo. El micelio de esos subcultivos fueron resuspendidos en 2-3mL de agua destilada estéril. La suspensión fue fragmentada por vortex durante 2 minutos seguido por la filtración con membrana de “etamina” estéril (poro de 100µm) para obtener fragmentos micelares uniformes. La concentración de fragmentos de micelio se determinó utilizando cámara de Neubaver (1/10 mm de espesor) y se ajustó a  $2 \times 10^5$  fragmentos de micelio/mL con agua destilada estéril [119]. Posteriormente, en platos de ELISA (FALCON) de 96 pozos cada uno, se adicionó 50 µL del inóculo fúngico, 50 µL de caldo Sabouraud (BBL™ Becton Dickinson) y 50 µL del compuesto de interés disuelto previamente en dimetil sulfóxido “DMSO” a 0.5, 1.0, 5.0, 10, 25, 50 y 100 ppm (sección 3.4).

Como control negativo se utilizó 50µL de agua, 50 µL de medio Sabouraud y 50 µL del inóculo; los productos comerciales benomil y propiconazol (antifúngicos) se utilizaron como control positivo. La concentración de DMSO en la solución final fue ajustada a 0,5% para todos los tratamientos incluidos los controles.

El crecimiento se determinó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia de la solución en cada pozo a una densidad óptica de 595nm en el tiempo cero y a los ocho días, tiempo establecido como óptimo de acuerdo a la curva de crecimiento preliminar realizada para las dos cepas de estudio (figura 18). Los ensayos *in vitro* se realizaron bajo condiciones de oscuridad y en exposición a 12 horas diarias de iluminación (fotoperiodo), utilizando la cámara de incubación de la Unidad de Biotecnología Vegetal (CIB) con unas dimensiones de 1 metro de alto por 1,30 metro de ancho. El sistema de iluminación consta de ocho lámparas de luz día de 20 wattios cada una, las cuáles están controladas por un programa automático para activar las lámparas cada 12 horas. La temperatura se controló por medio de un calentador Navoplus RI.1016 a través de un control Vertex VT4810 el cual tiene como función mantener la temperatura constante en 25°C dentro de la cámara.

A partir de los datos de crecimiento micelar se determinó la media, desviación estándar, porcentaje de crecimiento y la concentración inhibitoria del 50% de la población (IC<sub>50</sub>).

**Figura 18.** Curva de crecimiento de las cepas de *M. fijiensis* en estudio.



### 3.3.2 Método para determinar el crecimiento del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella. fijiensis*

El Hongo *Mycosphaerella fijiensis* se aisló por descarga sobre medio de cultivo a partir de hojas de banano naturalmente infectadas y en estado de necrosis, las cuales se recolectaron en diferentes fincas del municipio de Antioquia. Las hojas infectadas se cortaron en cuadros de 1 cm<sup>2</sup> de lado y fueron grapadas en círculos de papel Kraft (cinco cuadros de hoja por cada círculo de papel), para someterlas a tratamiento en cámara húmeda por 48 horas (en bolsas plásticas con toallas de papel húmedas). Los círculos de papel filtro se adhirieron a las tapas de las cajas de petri las cuales contenían agar agua al 2% y el compuesto de interés (sólo se evaluaron los compuestos **11**, **13** y **14**) a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2ppm. Se dejó en incubación durante 24 horas a 27°C para su posterior lectura utilizando microscopio de luz (las hojas infectadas unidas al papel Kraft fueron retiradas de la caja de petri a la hora de incubación). Las mediciones del tubo germinativo se realizaron utilizando una retícula micrométrica ubicada en el ocular del microscopio en

objetivo de 20X. El experimento se realizó por triplicado y se contaron 50 ascosporas por caja de petri. Como control positivo se evaluó el fungicida propiconazol a concentraciones de 0.003, 0.01, 0.1 y 1ppm. Se calculó el porcentaje de inhibición tomando como referencia ascosporas descargadas sobre agar-agua al 2%.

### 3.3.3 Evaluación preliminar cualitativa de fitotoxicidad de perinaftenonas

La fitotoxicidad de los compuestos tipo perinaftenonas que presentaron buena actividad antifúngica contra *M. fijiensis* fueron evaluados de forma cualitativa (presencia o ausencia de síntomas necróticos), utilizando plántulas de banano variedad *Williams* de 2 meses de edad.

Para este análisis, se prepararon soluciones de perinaftenonas a evaluar en concentraciones de 1, 10, 25 y 50 ppm, utilizando como solvente una mezcla de agua-alcohol al 40% para facilitar la solubilidad de los compuestos y la rápida fijación de los mismos a la superficie de la hoja. La aplicación se realizó por medio de un aerógrafo Picasso K-3 a 50 psi a una distancia aproximada de 20 cm tanto por la parte adaxial como en el envés de cada hoja. Se asperjó un volumen de 2mL de cada solución a las 3 primeras hojas de cada planta. Las plantas controles fueron asperjadas con la solución de agua-alcohol al 40%. Posteriormente, se transfirieron las plántulas a la Cámara de Incubación (con características antes mencionadas) a una temperatura de 29°C. En este experimento, no se utilizó el aspersor de agua automático puesto que el agua podría arrastrar los compuestos fijados en las hojas; a cambio de ello, se suministro agua de forma manual dos veces al día sobre la maceta de cada plántula a fin de mantener una humedad relativa por encima del 95%.

Las observaciones se registraron a los 2, 5, 10 y 25 días de exposición a cada uno de los compuestos.

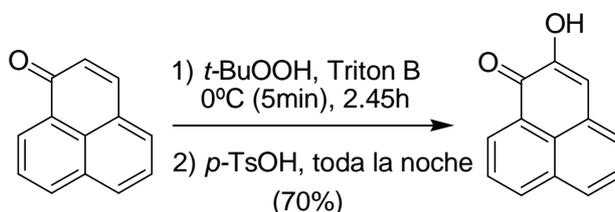
### 3.3.4 Análisis estadístico.

En la evaluación del crecimiento micelar del hongo, se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, con diferente número de repeticiones y tres réplicas por experimento; el diseño completamente aleatorizado fue empleado en la determinación del crecimiento del tubo germinativo de ascosporas. El  $IC_{50}$ , definido como la concentración de un componente requerido para inhibir el crecimiento del hongo al 50% del valor del control, fue obtenido por interpolación de las correspondientes gráficas de porcentaje de crecimiento micelar vs. Concentración de fenalenona, utilizando el software *Kyplot* versión 2.0. Éstos resultados fueron transformados a  $\text{Log}(Y)$  y estuvieron sujetos a un análisis inicial para corroborar la distribución normal de los datos (Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de varianza [120], seguido por el análisis de varianza ANOVA y la prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95%. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software SAS, versión 8.0.

## 3.4 MÉTODOS SINTÉTICOS

La perinaftenona (**10**) y 3-hidroxiperinaftenona (**3**) fueron adquiridas de Aldrich (Milwaukee, WI) y, previo a los bioensayos, purificadas por cromatografía preparativa usando el sistema 2:1 éter etílico:*n*-hexano como eluente ( $R_f$  0.68 y 0.21 respectivamente).

### 3.4.1 Síntesis de 2-hidroxiperinaftenona (**1**)

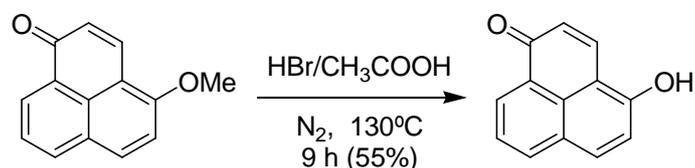


La metodología descrita por Otálvaro *et.al* [6] fue empleada para este caso.

A una solución en frío (en baño de hielo-agua) conteniendo 200mg de perinaftena (**10**) en benceno se le adicionó 100 $\mu$ L de *tert*-butilhidroperóxido acuoso (70% en agua) y 100 $\mu$ L de TritonB (40% en metanol). Después de 5 minutos en frío, la mezcla se deja que alcance la temperatura ambiente y se mantiene en agitación constante durante 45 minutos antes de otra adición igual de 100 $\mu$ L de *t*-BuOOH y 100 $\mu$ L de TritonB. La formación del epóxido fue observado por TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) durante un periodo de 2 horas. El ácido *p*-Toluensulfónico monohidratado (200mg) fue luego adicionado, y la mezcla resultante se dejó en agitación magnética durante toda la noche. El producto fue purificado por cromatografía de columna en silica gel utilizando diclorometano como eluente para obtener 145mg de 2-hidroxiperinaftena (70%) como un sólido naranja.

2-hidroxi-1-H-fenalen-1-ona (**1**, 2-hidroxiperinaftena). Sólido naranja, pf 176-178°C; UV-vis (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 230 (4.42), 260 (4.29), 330 (3.96), 360 (3.89), 430 (3.87) nm; <sup>1</sup>H RMN :  $\delta$  8.64 (H-9, d,  $J=7.5$ Hz), 8.43 (H-7, d,  $J=8.0$ Hz), 8.06 (H-6, d,  $J=8.2$ Hz), 7.89 (H-8, dd,  $J_1=7.5$ Hz,  $J_2=8.0$ Hz), 7.84 (H-4, d,  $J=7.0$ Hz), 7.66 (H-5, dd,  $J_1=8.2$ Hz,  $J_2=7.0$ Hz), 7.20 (H-3, s); <sup>13</sup>C RMN:  $\delta$  180.9 (C-1), 150.0 (C-2), 136.9 (C-7), 132.4 (C-6a), 131.5 (C-9), 130.8 (C-4), 130.2 (C-6), 128.9 (C-3a), 127.9 (C-9a), 127.6 (C-5), 127.2 (C-8), 124.9 (C-9b), 114.2 (C-3). HREIMS  $m/z$  196.0528 (Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, 196.0524)

### 3.4.2 Síntesis de 4-hidroxiperinaftena (**5**)

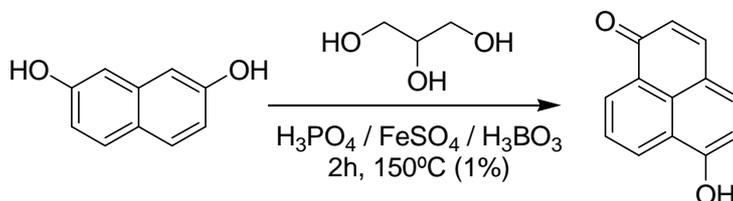


La siguiente adaptación del método descrito por Otálvaro *et.al* [111] fue empleada para este caso.

El compuesto 4-metoxiperinaftena (**6**) (200mg, 0.95mmol) se sometió a reflujo en atmósfera de Nitrógeno (N<sub>2</sub>) junto con una solución de AcOH (20mL) y HBr (2.8mL, 47%) durante 9 horas. Al producto crudo se le realizó una extracción líquido-líquido entre agua (20mL) y diclorometano (30mL). El producto orgánico fue purificado por TLC preparativa utilizando una mezcla 40:1 diclorometano/metanol (R<sub>f</sub>=0.20) para obtener 102mg de producto esperado (55%).

4-hidroxi-1-H-fenalen-1-ona (**5**, 4-hidroxiperinaftena). Sólido naranja. <sup>1</sup>H RMN: δ 8.51 (H-9, dd, J=7.9, 1.2Hz), 8.38 (H-3, d, J=9.0 Hz), 7.91 (H-7, dd, J<sub>1</sub>=7.4, J<sub>2</sub>= 1.2Hz), 7.80 (H-6, d, J=9.4Hz), 7.48 (H-8, dd, J<sub>1</sub>=7.9, J<sub>2</sub>= 7.4Hz), 6.84 (H-5, d, J=9.4Hz), 6.82 (H-2, d, J=9.0Hz); <sup>13</sup>C RMN: δ 176.6 (C-4), 175.2 (C-1), 138.2 (C-6), 135.6 (C-3), 132.9 (C-7), 131.0 (C-9b), 128.8 (C-9), 128.1 (C-6a), 127.7 (C-5), 127.3 (C-9a), 123.7 (C-8), 118.0 (C-2), 116.6 (C-3a) HREIMS m/z 196.053394 (calculado para C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, 196.052430)

### 3.4.3 Síntesis de 6-hidroxiperinaftena (**7**)

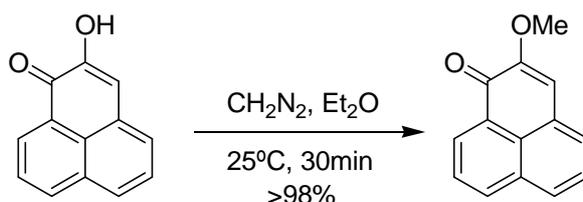


El método reportado por Cooke R.G [112], fue modificado para este caso. Una mezcla de 2,7-dihidroxinaftaleno (2g, 12.5mmol), glicerol (5g), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%, 14mL), FeSO<sub>4</sub> (0.6g) y H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1g) fue calentada bajo agitación magnética a 150°C durante 2 horas (Nota. El nitrobenenosulfonato de sodio no fue utilizado en este caso). El crudo de reacción se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 50°C y se agregó sílica gel (~50g) hasta sequedad. La masa obtenida se trasvasó a una columna de cromatografía, se adicionó diclorometano hasta recuperar todo el compuesto de interés y finalmente se seco en rotaevaporador.

El producto crudo fue purificado mediante cromatografía de columna en sílica gel y TLC preparativa utilizando el sistema 40:1 diclorometano/metanol para obtener 26.4 mg de 6-hidroxiperinaftenona (1.1%).

6-hidroxi-1H-fenalen-1-ona (7, 6-hidroxiperinaftenona). Sólido violeta.  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.69 (H-7, d,  $J=8.0$  Hz), 8.57 (H-9, d,  $J=8.0$  Hz), 7.85 (H-8, dd,  $J_1=8.0$ ,  $J_2=8.0$  Hz), 7.83 (H-3, d,  $J=9.4$  Hz), 7.80 (H-4, d,  $J=8.0$  Hz), 7.08 (H-5, d,  $J=8.0$  Hz), 6.48 (H-2, d,  $J=9.4$  Hz);  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  185.4 (C-1), 159.6 (C-6), 143.0 (C-3), 134.8 (C-4), 131.1 (C-7), 130.8 (C-9a), 130.3 (C-9), 129.8 (C-9b), 126.8 (C-8), 126.7 (C-2), 125.6 (C-6a), 121.2 (C-3a), 110.4 (C-5). EI-MS:  $m/z$  196  $[\text{M}]^+$  (100); HR-MS: encontrado 196.051903 (Calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_2$ : 196.052430)

#### 3.4.4 Metilación de 2-hidroxiperinaftenona (2)

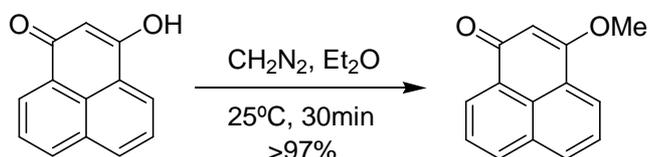


La solución de diazometano fue preparada utilizando el método estándar con Diazald® [121]. Esta solución se adicionó gota a gota a la 2-hidroxiperinaftenona (1) (6mg, 0.031mmol) hasta que cesó la producción de gas. Se dejó secar a  $30^\circ\text{C}$  durante 48 horas para obtener 6.4mg de 2-metoxiperinaftenona (aceite amarillo).

2-Metoxi-1H-fenalen-1-ona (2, 2-metoxiperinaftenona): Aceite amarillo. UV-Vis (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 230 (4.20), 260 (4.16), 330 (3.74), 360 (3.82), 420 (3.80) nm;  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.56 (H-9, d,  $J=7.5$ Hz), 8.37 (H-7, d,  $J=8.0$  Hz), 8.03 (H-6, d,  $J=8.2$  Hz), 7.85 (H-8, dd,  $J_1=7.5$ Hz,  $J_2=8.0$  Hz), 7.82 (H-4, d,  $J=7.1$  Hz), 7.64 (H-5, dd,  $J_1=8.2$  Hz,  $J_2=7.1$  Hz), 7.20 (H-3, s), 3.89 ( $\text{OCH}_3$ , s);  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  180.1 (C-1), 154.8 (C-2), 136.5 (C-7), 133.5 (C-6a), 130.9 (C-9), 130.5 (C-4), 130.2 (C-6), 129.9 (C-3a), 129.9 (C-9a), 128.5 (C-5), 128.2 (C-8), 125.8 (C-9b),

113.8 (C-3), 56.2 (OCH<sub>3</sub>). HREIMS *m/z* 210.0686 (Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>, 210.0681)

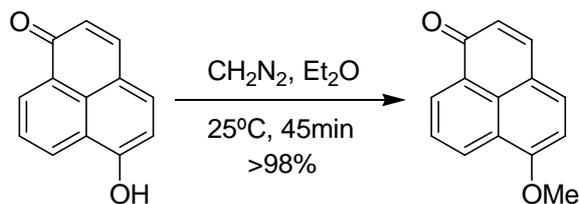
#### 3.4.5 Metilación de 3-hidroxi-perinaftena (**3**)



El procedimiento ante descrito fue empleado para este caso. Se utilizó 3-hidroxi-perinaftena (**3**) (5mg, 0.0255mmol) y el tiempo de reacción con solución diazometano fue de 30 minutos. El producto de reacción se dejó secar a 30°C durante 24 horas y fue purificada por TLC preparativa usando el sistema 40:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (R<sub>f</sub>=0.70) para obtener 5.2mg de 3-metoxiperinaftena como un sólido amarillo.

3-metoxi-1-H-fenalen-1-ona (**4**, 3-metoxiperinaftena). Sólido amarillo. <sup>1</sup>H RMN: δ 8.45 (H-9, dd, *J*<sub>1</sub>=7.2Hz, *J*<sub>2</sub>=1.3Hz), 8.30 (H-7, dd, *J*<sub>1</sub>=8.1Hz, *J*<sub>2</sub>=1.3Hz), 8.23 (H-4, dd, *J*<sub>1</sub>=7.3Hz, *J*<sub>2</sub>=1.2Hz), 8.21 (H-6, dd, *J*<sub>1</sub>=8.3Hz, *J*<sub>2</sub>=1.2Hz), 7.80 (H-8, dd, *J*<sub>1</sub>=7.2Hz, *J*<sub>2</sub>=8.1Hz), 7.71 (H-5, dd, *J*<sub>1</sub>=7.3Hz, *J*<sub>2</sub>=8.3Hz), 6.08 (H-2, s), 4.07 (3- OCH<sub>3</sub>, s); <sup>13</sup>C RMN: δ 184.9 (C-1), 166.8 (C-3), 134.9 (C-7), 133.1 (C-6), 133.1 (C-6a), 129.5 (C-9a), 129.4 (C-9), 128.0 (C-9b), 127.6 (C-8), 127.2 (C-5), 126.8 (C-4), 125.7 (C-3a), 104.3 (C-2), 56.7 (3- OCH<sub>3</sub>); HREIMS *m/z* 210.068131 (calculado para C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>, 210.06080)

### 3.4.6 Metilación de 6-hidroxi-perinaftena (**8**)



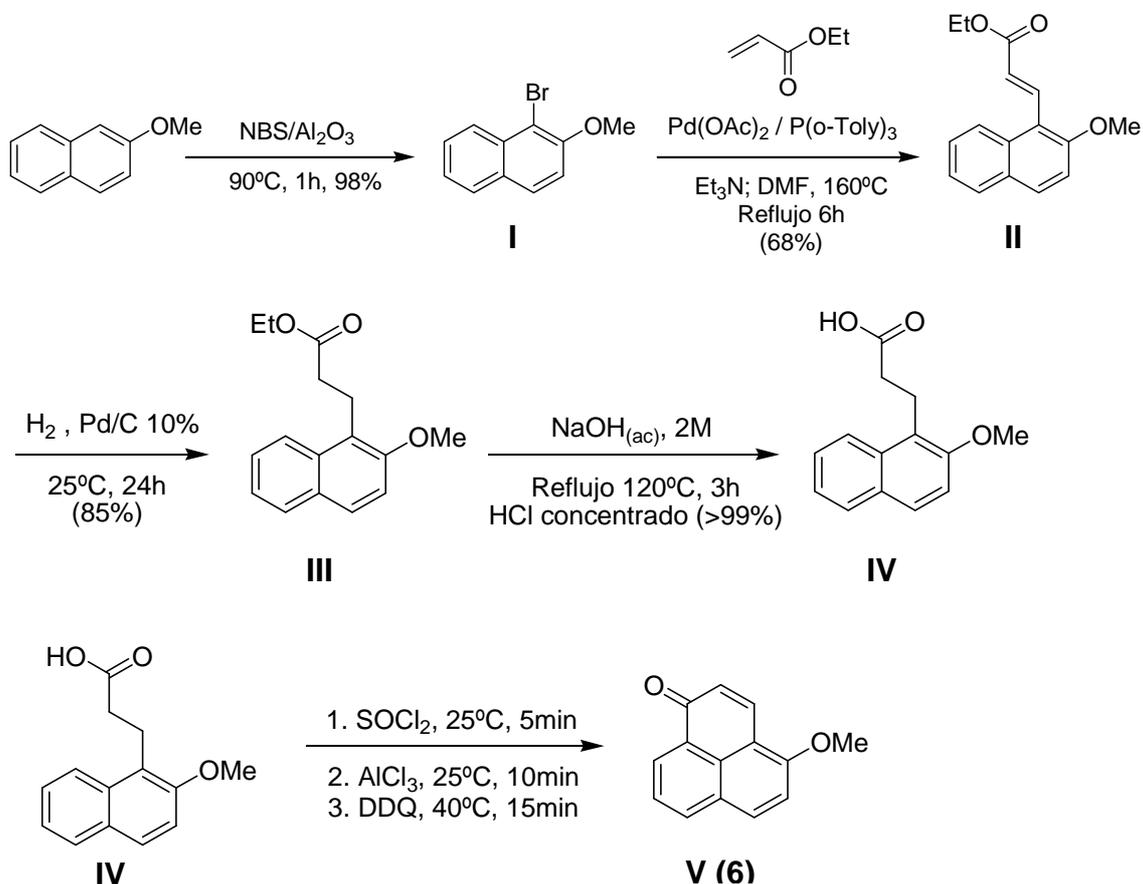
Para este caso particular, el tiempo de reacción entre 6-hidroxi-perinaftena (**4**) (4.5mg, 0.023mmol) y diazometano fue de 45 minutos.

El producto de reacción fue purificado mediante cromatografía en capa fina preparativa utilizando el sistema 49:1 diclorometano/metanol como eluente, para obtener 4.8mg de 6-metoxiperinaftena (98%).

6-metoxi-1-H-fenalen-1-ona (**8**, 6-metoxiperinaftena). Sólido naranja.  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.65 (H-7, dd,  $J_1 = 8.4$ ,  $J_2 = 1.3$  Hz), 8.56 (H-9, d,  $J = 7.4$ , 1.3 Hz), 7.91 (H-4, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.86 (H-3, d,  $J = 9.7$  Hz), 7.86 (H-8, dd,  $J_1 = 8.4$ ,  $J_2 = 7.4$  Hz), 7.15 (H-5, d,  $J = 8.0$  Hz), 6.51 (H-2, d,  $J = 9.7$  Hz), 4.16 (6-OCH<sub>3</sub>, s);  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  185.2 (C-1), 160.5 (C-6), 142.9 (C-3), 134.9 (C-4), 131.0 (C-9), 130.4 (C-9a), 129.9 (C-7), 129.6 (C-9b), 127.5 (C-8), 127.4 (C-2), 126.2 (C-6a), 121.6 (C-3a), 106.5 (C-5), 57.0 (6-OCH<sub>3</sub>). EI-MS:  $m/z$  210 [M]<sup>+</sup> (100), 195 (26); HR-MS: encontrado 210.067098 (Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>: 210.068080).

### 3.4.7 Síntesis de 4-metoxiperinaftenona (**6**)

La metodología reportada por Nanclares *et. al* [122] fue utilizada para este caso, la cual involucra cinco pasos:



*Compuesto I.* La bromación de 2-metoxinaftaleno (procedimiento descrito en la sección 3.4.10) en seco con NBS/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a 90°C por una hora para obtener rendimientos del 98% del producto deseado.

*Compuesto II.* Reacción de Heck entre el 1-bromo-2-metoxinaftaleno y el etilacrilato. Esta metodología fue llevada a cabo utilizando acetato de paladio, tri(o-toluil)fosfina y 1-bromo-2-metoxinaftaleno; posteriormente, se adicionó al balón de reacción DMF seca, trietilamina y etilacrilato. La mezcla de reacción se colocó a reflujo por 6 horas (160°C) con agitación. El crudo obtenido se disolvió en acetato de etilo y se sometió a cromatografía en columna de sílica

gel usando 9:1 *n*-hexano/éter etílico como fase móvil. El producto mayoritario fue separado como un aceite café.

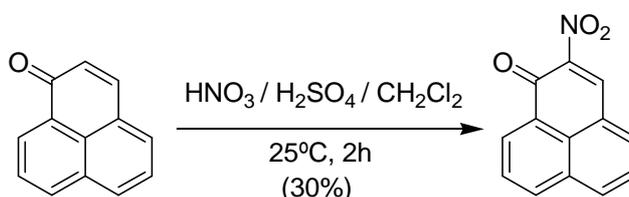
*Compuesto III.* Hidrogenación catalítica del (*E*)-etil-3-(2-metoxinaftalen-1-il)acrilato. El procedimiento descrito en la sección 3.4.9 fue utilizado en este caso, donde el tiempo de reacción fue de 24 horas. El crudo obtenido fue filtrado, y el catalizador lavado con metanol. El filtrado se seco en rotaevaporador para obtener el producto como un aceite incoloro (85%).

*Compuesto IV* Saponificación del 3-(2-metoxinaftalen-1-il)propanoato de etilo. En un balón de fondo redondo contenido el sustrato **3** y disuelto en etanol, se adicionó una solución de hidróxido de sodio (2M); este sistema fue colocado en reflujo (120°C) durante 3 horas. Una vez se encuentre a temperatura ambiente, se aciduló con HCl concentrado hasta un pH ~ 2. La solución turbia resultante se sometió a extracciones sucesivas con éter etílico (3x30mL). El solvente orgánico fue retirado en un rotaevaporador para obtener un rendimiento del 99% del producto.

*Compuesto V (6).* *Reacción de Friedel-Crafts.* En un balón de fondo redondo, se adicionó el compuesto **IV** y lentamente, cloruro de tionilo. Éste sistema se dejó en agitación magnética y temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, el crudo fue llevado a sequedad y posteriormente fue disuelto en diclorometano; luego se adicionó tricloruro de aluminio y la reacción se colocó en agitación constante a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, al crudo obtenido se adicionó DDQ y éste sistema fue llevado a baño maría a una temperatura de 40°C durante 15 minutos. El crudo de reacción fue llevado a un embudo de separación y se le realizaron varios lavados con agua. El producto fue purificado mediante una columna de sílica gel utilizando una mezcla 1:1 *n*-hexano/diclorometano para lograr un rendimiento del 65%.

4-metoxi-1-H-fenalen-1-ona (**6**, 4-metoxiperinaftenona). Sólido naranja.  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.50 (H-9, d,  $J=7.4$ ), 8.30 (H-5, d,  $J=7.8$  Hz), 8.25 (H-6, d,  $J=9.1$  Hz), 8.25 (H-2, d,  $J=10.0$ , Hz), 7.72 (H-8, dd,  $J_1=7.5$ ,  $J_2=7.9$  Hz), 7.60 (H-5, d,  $J=9.3$  Hz), 6.58 (H-2, d,  $J=10.0$  Hz), 4.17 (-OCH<sub>3</sub>, s);  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  184.7(C-1), 159.9 (C-4), 135.9 (C-6), 135.6 (C-7), 131.3 (C-9), 129.0 (C-6a), 127.9 (C-2), 125.7 (C-8), 114.9 (C-5), 113.8 (C-3a), 57.1 (-OCH<sub>3</sub>). HREIMS  $m/z$  210.067280 (Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>, 210.068080)

### 3.4.8 Síntesis de 2-nitroperinaftenona (**13**)

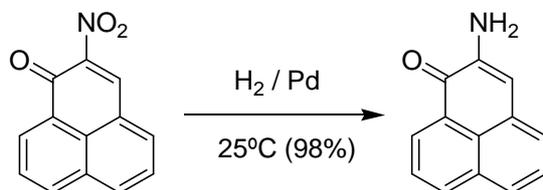


Fue empleado el método reportado por Dokunikhin *et al.* [123], en la cual, una mezcla de ácido nítrico concentrado 65% (42 $\mu$ L) y ácido sulfúrico concentrado (121 $\mu$ L) fue adicionado gota a gota a una solución preenfriada (0°C) de perinaftenona (**10**) (100mg, 0.6mmol) disuelta en ácido sulfúrico concentrado (2mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y luego extraído con agua (3x10mL) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x15mL). La fase orgánica fue evaporada y concentrada al vacío. La purificación se realizó por cromatografía preparativa utilizando el sistema 1:1 *n*-hexano: acetato de etilo ( $R_f$  0.65) obteniendo 13.5mg del compuesto de interés con un rendimiento del 30% (55% basado sobre la perinaftenona recuperada).

2-Nitro-1-H-fenalen-1-ona (**13**, 2-nitroperinaftenona): Sólido amarillo.  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.77 (H-3, s), 8.71 (H-9, dd,  $J_1=7.3\text{Hz}$ ,  $J_2=1.2\text{Hz}$ ), 8.59 (H-7, dd,  $J_1=8.1\text{Hz}$ ,  $J_2=1.2\text{Hz}$ ), 8.03 (H-8, dd,  $J_1=7.3\text{Hz}$ ,  $J_2=8.1\text{Hz}$ ), 7.91 (H-5, dd,  $J_1=7.2\text{Hz}$ ,  $J_2=8.3\text{Hz}$ ), 7.50 (H-6, dd,  $J_1=7.3\text{Hz}$ ,  $J_2=1.1\text{Hz}$ ), 7.40 (H-4, dd,  $J_1=7.2\text{Hz}$ ,  $J_2=1.1\text{Hz}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  175.2 (C-1), 147.9 (C-2), 138.8 (C-3), 137.7 (C-7), 137.6 (C-4), 136.6 (C-6), 133.3 (C-6a), 132.4 (C-9), 130.5 (C-9a), 129.0 (C-8), 128.6

(C-5), 127.8 (C-9b), 125.2 (C-3a); HREIMS  $m/z$  225.043327 (calculado para  $C_{13}H_7NO_3$ , 225.042593)

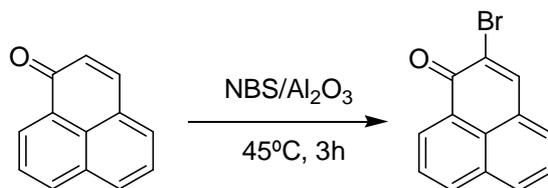
### 3.4.9 Hidrogenación catalítica de 2- $NO_2$ perinaftenona (**9**)



En balón de fondo redondo se adicionó 2-nitroperinaftenona (**13**) (5mg, 0.022mmol) disuelta en metanol (5mL), el catalizador Paladio/carbono (2.5mg, Pd al 10%), se colocó un septum y se dejó en agitación magnética (20rpm) durante 5 minutos. Posteriormente, se sometió la mezcla de reacción en atmósfera de hidrógeno ( $H_2$ ) y se mantuvo durante 10 minutos (tiempo en el cual, se observó cambio de color naranja a violeta). La extracción con diclorometano/agua, rotaevaporación de la fase orgánica hasta sequedad y cromatografía en capa fina preparativa (TLC) utilizando el sistema de elusión 2:1 *n*-hexano/acetato de etilo ( $R_f=0.62$ ), permitió obtener 4.2mg de 2-aminoperinaftenona (98%).

2-Amino-1H-phenalen-1-ona. (**9**, 2-aminoperinaftenona): Sólido rojo;  $^1H$  NMR ( $C_3D_6O$ , 500.13 MHz)  $\delta$  8.61 (dd,  $J = 7.3, 1.2$  Hz, H-9), 8.33 (H-7, dd,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 1.2$  Hz), 7.88 (H-6, dd,  $J_1 = 7.9$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz), 7.83 (H-4, dd,  $J_1 = 7.3$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz), 7.59 (H-4, dd,  $J_1 = 7.3$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz), 7.56 (H-5, dd,  $J_1 = 7.3$  Hz,  $J_2 = 7.9$  Hz), 6.89 (s, H-3);  $^{13}C$  NMR ( $C_3D_6O$ , 125.75 MHz)  $\delta$  180.9 (C-1), 143.0 (C-2), 136.3 (C-7), 133.1 (C-6a), 131.1 (C-3a), 130.5 (C-9), 129.2 (C-9a), 128.2 (C-5), 127.9 (C-4), 127.8 (C-6), 127.5 (C-8), 124.7 (C-9b), 110.0 (C-3); LC-HRESIMS  $m/z$  194.06097 (calculado para  $C_{13}H_8NO$ , 194.06059).

### 3.4.10 Bromación de perinaftenona con **NBS/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** en seco (**11**)

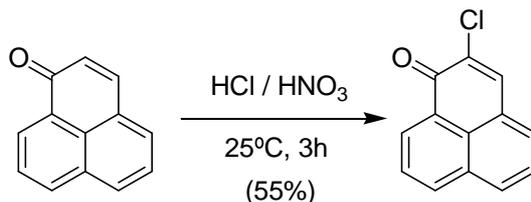


Se utilizó la metodología reportada por Gholamhassan *et. al* [124]. En general, la alúmina anhidra se macera en un mortero de porcelana junto con la NBS. A ésta mezcla se adicionó perinaftenona (**10**) y se homogenizó hasta obtener una mezcla de color uniforme. Se transfirió a un tubo de ensayo y se calentó a 45°C en baño maría durante 3 horas.

La mezcla de reacción se dejó enfriar, se solubilizó con diclorometano, se filtró y el solvente orgánico se evaporó hasta sequedad. La purificación del compuesto se llevo a cabo mediante cromatografía de columna en silica gel utilizando el sistema de elusión 1:1 *n*-hexano/diclorometano ( $R_f=0.28$ ). El rendimiento de la reacción fue del 58%.

2-bromo-1-H-fenalen-1-ona (**11**, 2-bromoperinaftenona): Sólido amarillo. <sup>1</sup>H RMN: δ 8.63 (H-9, d,  $J=7.4$ Hz), 8.48 (H-3, s), 8.46 (H-7, d,  $J=8.1$ Hz), 8.27 (H-6, d,  $J=8.2$ Hz), 8.02 (H-4, d,  $J=7.0$ Hz), 7.92 (H-8, dd,  $J_1=7.7$ Hz,  $J_2=7.8$ Hz), 7.74 (H-5, dd,  $J_1=7.5$ Hz,  $J_2=7.8$ Hz); <sup>13</sup>C RMN: δ 178.6 (C-1), 144.2 (C-3), 136.7 (C-7), 133.5 (C-6), 133.3 (C-6a), 133.0 (C-4), 132.3 (C-9), 129.4 (C-9a), 128.7 (C-3a), 128.5 (C-8), 128.2 (C-5), 127.4 (C-9b), 126 (C-2). HREIMS  $m/z$  257.967261 (Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>BrO, 257.968026)

### 3.4.11 Cloración de perinaftenona con *HCl* en *HNO*<sub>3</sub> (**12**)

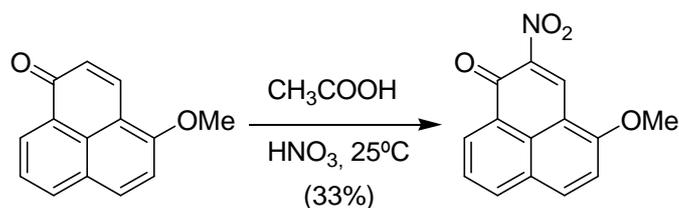


La reacción se llevó a cabo con HCl concentrado al 36% (5mL) al cual se adicionó perinaftenona (**10**) (100mg, 0.56mmol) y se homogenizó con agitación magnética durante 2 minutos con posterior adición gota a gota de HNO<sub>3</sub> concentrado al 65% (186μL, 4.8mmol). La mezcla se dejó bajo agitación constante a temperatura ambiente durante 3 horas.

Posteriormente se hizo varias extracciones con diclorometano, se evaporó la fase orgánica hasta sequedad y se purificó el compuesto por cromatografía capa fina preparativa utilizando una mezcla 2:3 *n*-hexano/diclorometano ( $R_f=0.65$ ) como eluente. Se obtuvo 66.5mg del compuesto de interés 2-cloro-perinaftenona (55%).

2-Cloro-1-*H*-fenalen-1-ona (**12**, 2-cloroperinaftenona): Sólido amarillo. <sup>1</sup>H RMN: δ 8.66 (H-9, dd,  $J_1=7.4\text{Hz}$ ,  $J_2=1.2\text{Hz}$ ), 8.49 (H-7, dd,  $J_1=8.1\text{Hz}$ ,  $J_2=1.2\text{Hz}$ ), 8.28 (H-6, dd,  $J_1=1.1\text{Hz}$ ,  $J_2=7.1\text{Hz}$ ), 8.27 (H-3, d,  $J=0.5\text{Hz}$ ), 8.05 (H-4, ddd,  $J_1=7.1\text{Hz}$ ,  $J_2=1.1\text{Hz}$ ,  $J_3=0.5\text{Hz}$ ), 7.95 (H-8, dd,  $J_1=8.1\text{Hz}$ ,  $J_2=7.4\text{Hz}$ ), 7.77 (H-5, dd,  $J_1=8.3\text{Hz}$ ,  $J_2=7.1\text{Hz}$ ); <sup>13</sup>C RMN: δ 178.7 (C-1), 140.1 (C-3), 136.8 (C-7), 133.9 (C-2), 133.4 (C-6), 133.3 (C-6a), 133.1 (C-4), 132.1 (C-9), 129.9 (C-9a), 128.5 (C-8), 128.2 (C-5), 128.1 (C-3a), 127.1 (C-9b); HREIMS  $m/z$  214.018414 (calculado para C<sub>13</sub>H<sub>7</sub><sup>35</sup>ClO, 214.018543).

### 3.4.12 Síntesis de 2-nitro-4-metoxiperinaftenona (**14**)



Para este caso, se utilizó 4-metoxiperinaftenona (**6**) como sustrato (70mg, 0.3mmol) la cual fue disuelta previamente en 7mL de ácido acético glacial. Luego, se adicionó HNO<sub>3</sub> al 65% (30μL, 0.43mmol), se dejó en agitación magnética a temperatura ambiente durante 3 horas. Al crudo de reacción se le adicionó agua fría y se realizaron varios lavados con diclorometano (3x30mL), solución de carbonato de sodio (5%) y posterior secado con sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, el solvente orgánico fue evaporado en rotaevaporador y el compuesto purificado por cromatografía preparativa utilizando el sistema 2:1 *n*-hexano/acetato de etilo ( $R_f=0,14$ ) para obtener un rendimiento del 33% del producto.

4-metoxi-2-nitro-1H-fenalen-1-ona (**14**, 2-nitro-4-metoxiperinaftenona). Sólido amarillo. <sup>1</sup>H RMN: δ 8.94 (H-3, s), 8.70 (H-9, dd,  $J_1=7.6$ ,  $J_2=1.2$ Hz), 8.54 (H-6, d,  $J=9.3$ Hz), 8.47 (H-7, dd,  $J_1=7.9$ ,  $J_2=1.2$ Hz), 7.85 (H-8, dd,  $J_1=7.6$ ,  $J_2=7.9$ Hz), 7.74 (H-5, d,  $J=9.3$ Hz), 4.30 (4-OCH<sub>3</sub>, s); <sup>13</sup>C RMN: δ 164.5 (C-4), 146.1 (C-2), 140.7 (C-6), 137.5 (C-7), 133.2 (C-9), 132.8 (C-3), 130.7 (C-9a), 129.1 (C-9b), 128.7 (C-6a), 126.7 (C-8), 115.3 (C-5), 110.2 (C-3a), 57.9 (4-OCH<sub>3</sub>); HREIMS  $m/z$  255.053327 (calculado para C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>, 255.053158).

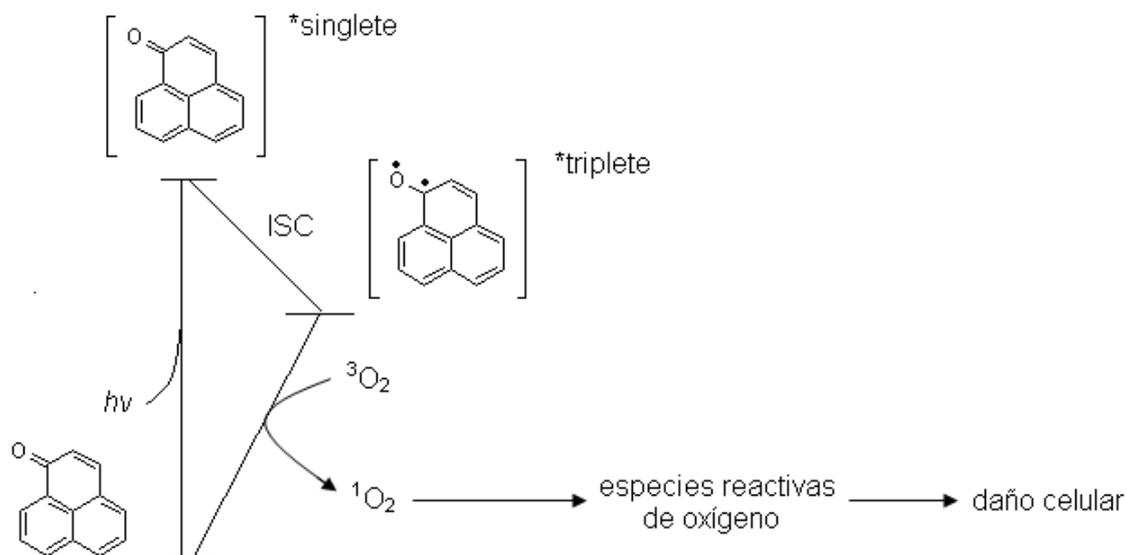
#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El reciente descubrimiento de compuestos naturales tipo perinaftenona en *Musa acuminata* cv. “Yangambi km5” como la clase de compuestos más potentes aislados de esta planta contra el hongo patógeno ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* (agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra), situó el núcleo perinaftenona como una interesante plantilla estructural para el desarrollo de una nueva clase de fungicidas [6].

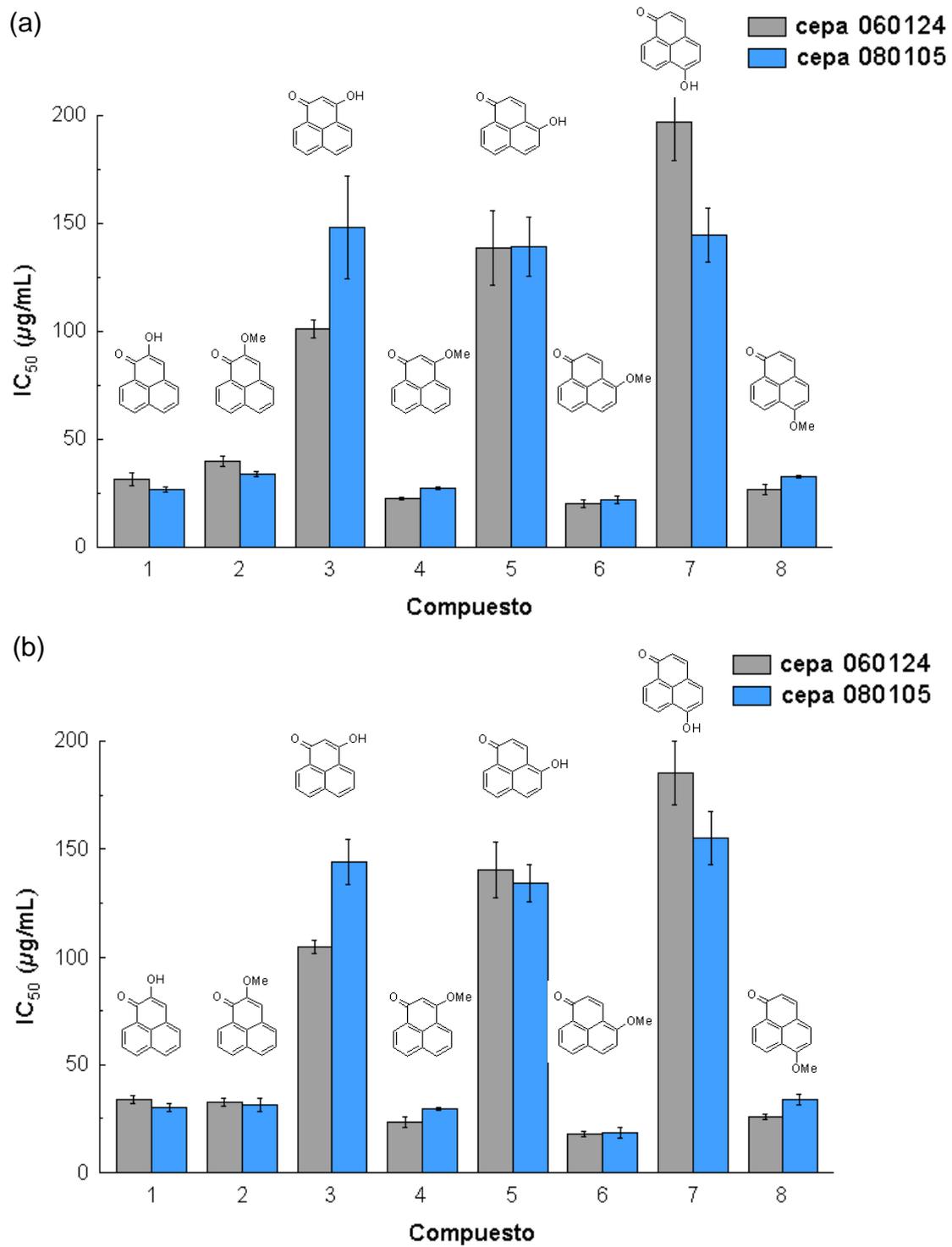
Una de las razones que enfocaron el interés en el núcleo perinaftenona recae en su posible modo de acción fototóxico [73, 125, 126]. Aquí, la perinaftenona, un fotosensibilizador bien conocido de oxígeno molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) [127], se presume actúa como un catalizador para la producción de especies reactivas de oxígeno las cuales pueden causar daños celulares al patógeno [73].

Para producir oxígeno singlete ( $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$ ), la perinaftenona excitada por el fotón debe hacer un sistema intercruzado (ISC) a un estado triplete del cual la desactivación puede ocurrir por diferentes procesos de transferencia de energía tales como fosforescencia, decaimiento térmico o reacciones tipo radicales con otros compuestos [128] (figura 19). Por consiguiente, las condiciones experimentales adecuadas deben ser diseñadas para demostrar la generación de  $^1\text{O}_2$  para cada patosistema vegetal particular [129]. Previos bioensayos, con perinaftenonas naturales, contra *M. fijiensis* fueron llevados a cabo en oscuridad [6]. Bajo condiciones de exclusión de luz, la fototoxicidad no pudo ser evaluada y por tanto, no fue claro si los compuestos evaluados exhibían actividad fotodinámica. Sin embargo, en caso de más de un modo de acción, la exclusión de luz es adecuada para distinguir la fototoxicidad de otras formas de actividad.

**Figura 19.** Producción de especies reactivas de oxígeno por absorción de luz en la perinaftena



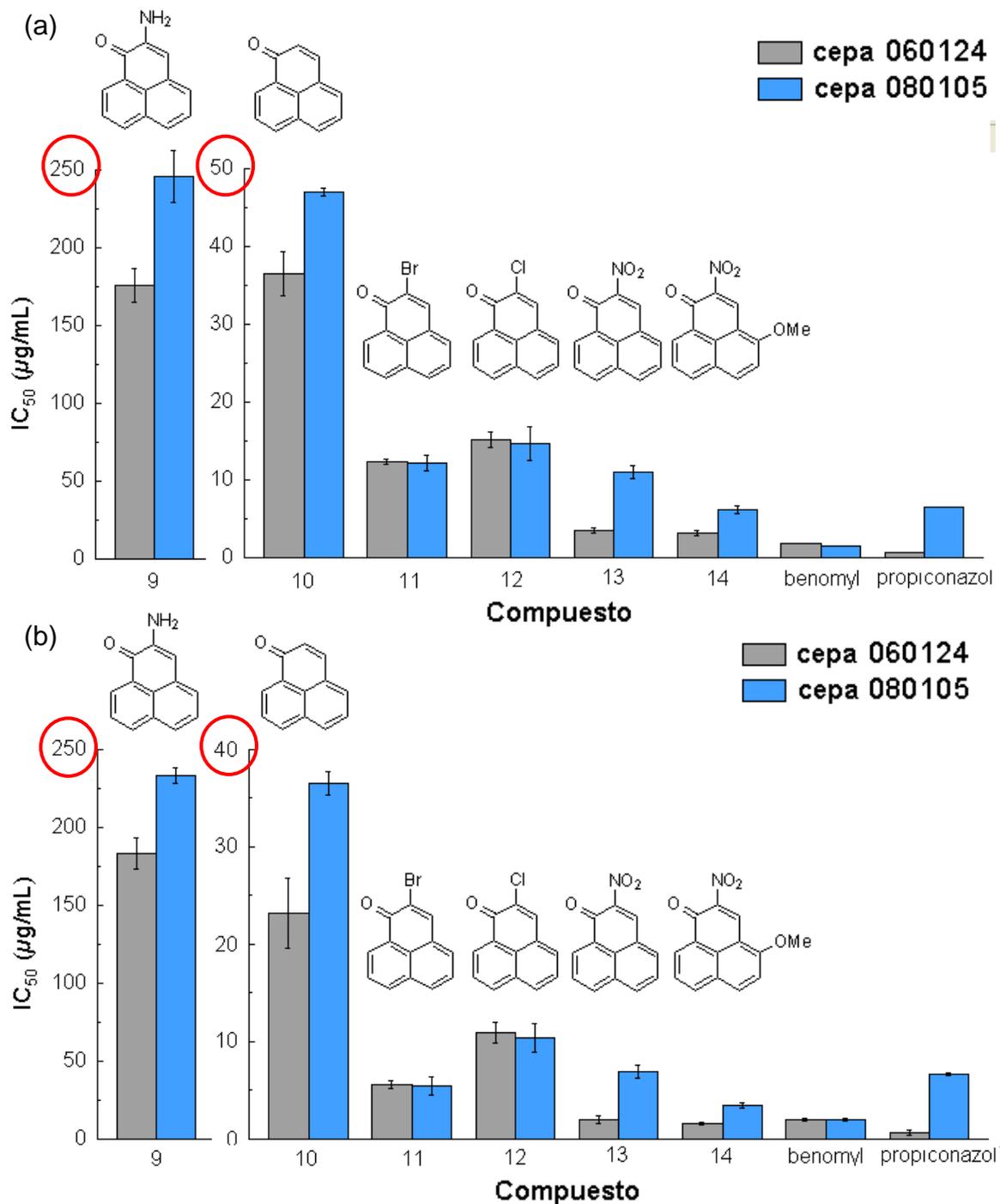
Para verificar la actividad fotodinámica de compuestos tipo perinaftena, los compuestos 2-hidroxiperinaftena (**1**) y 2-metoxiperinaftena (**2**), presentes en *Musa acuminata* var. “Yangambi km 5” fueron evaluadas contra *M. fijiensis* (inhibición del crecimiento micelar) bajo condiciones controladas de luz utilizando una ligera modificación de un protocolo reportado [6] (figura 20). Interesantemente, la actividad de los compuestos naturales **1** y **2** no cambió significativamente bajo la influencia de la luz. Esto originó la pregunta de saber si los grupos hidroxilo y metoxilo generalmente previenen la actividad fotodinámica de perinaftenas o si esto fue un efecto del sustituyente unido en la posición “o” relativa al grupo carbonilo. Para dirigir esta pregunta, los compuestos **3-8** fueron sintetizados y evaluados bajo las mismas condiciones (figura 20).



**Figura 20.** Actividad antifúngica de compuestos 1-8 sobre *M. fijiensis*. (a) Efecto sobre el crecimiento de micelio medido después de 8 días de incubación en la oscuridad, (b) bajo fotoperiodo de 12 horas durante 8 días de incubación.

La figura 20 muestra que con excepción del compuesto **1** y **2**, reemplazando un grupo hidroxilo por metoxilo incrementa la actividad por más de 3 veces. Un incremento en lipofilidad podría ser una posible explicación del aumento de actividad de los compuestos metoxilados. La actividad similar del compuesto **1** y su análogo *O*-metilo (**2**) (figura 20) puede ser visto en términos de un fuerte enlace de hidrógeno intramolecular presente en **1** el cual deja a éste con una polaridad más baja que su contraparte *O*-metilo **2** como lo revela sus valores de  $R_f$  (0,77 para **2** y 0,88 para **1**), en sílica gel fase normal CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 40:1. Cabe resaltar que los compuestos **3**, **5**, **7** ofrecen la posibilidad de un fuerte enlace de hidrógeno intermolecular [130] el cual resulta en un efecto nocivo en la actividad. Por otra parte, no se observó ningún efecto fotodinámico sobre la actividad de los compuestos **1** a **8** lo cual, indujo a explorar otras tendencias de relación *estructura-actividad* en la serie perinaftenona (análisis de varianza Tukey, 95% de confiabilidad).

Las cetonas policíclicas aromáticas  $\alpha,\beta$ -insaturadas son bien reconocidas por su habilidad aceptor Michael [131]; por tanto, la perinaftenona podría ser un buen candidato para este modo de acción. Acorde con esto, grupos electro-atrayentes unidos a la posición C-2 de perinaftenona deberían incrementar la actividad y, por el contrario, el efecto opuesto debería ser observado con grupos electro-donantes unidos en la misma posición. Para explorar esta hipótesis, las perinaftenonas derivadas **9-13** (figura 21) fueron sintetizadas con sustituyentes que afectan la densidad electrónica del doble enlace por efecto inductivo o conjugación y evaluados en la oscuridad. Los resultados indicados en las figuras 21a y 22, muestran que los grupos electro-atrayentes unidos en la posición C-2 en perinaftenona incrementan dramáticamente la actividad de perinaftenonas tanto en la inhibición de crecimiento micelar como del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*. La 2-Nitroperinaftenona (**13**) fue el compuesto más activo en esta serie (figura 21a y 22), como se esperaba para un nitroalqueno conjugado bajo un modo de acción aceptor Michael [132].

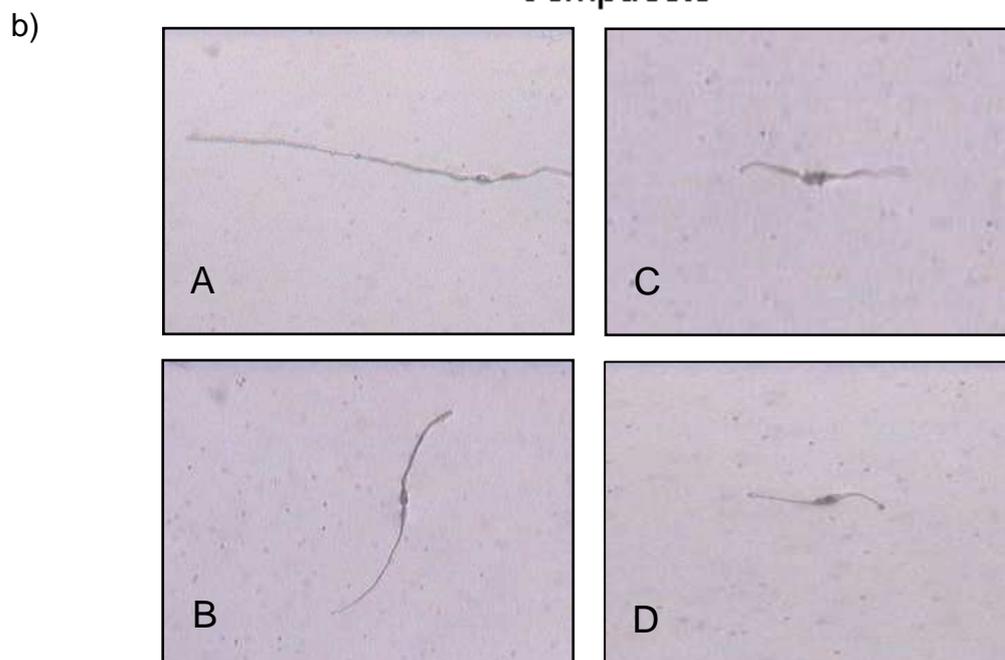
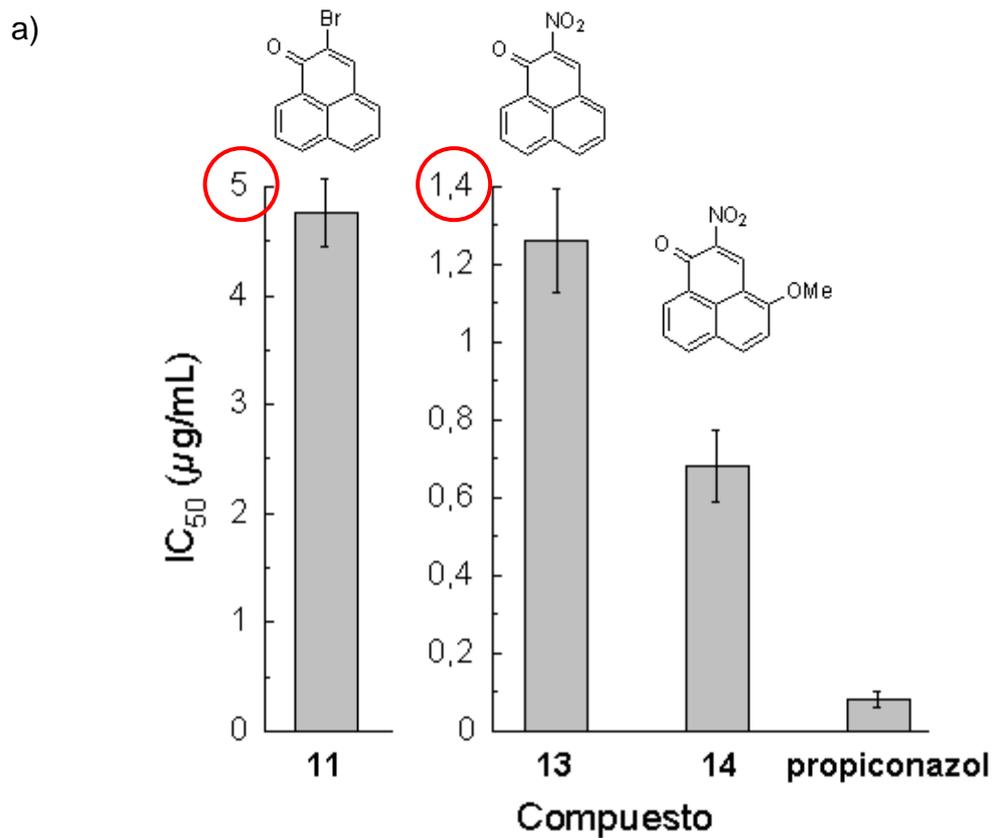


**Figura 21.** Actividad antifúngica de los compuestos 9-14 sobre *M. fijiensis*. (a) Efecto sobre el crecimiento de micelio después de 8 días de incubación en la oscuridad, (b) bajo fotoperiodo 12h durante 8 días de incubación. Fungicidas comerciales (benomil y propiconazol) fueron evaluados como referencia.

Interesantemente, los compuestos **10-13** fueron los únicos en esta serie que exhibieron un significativo aumento de actividad bajo luz (análisis de varianza Tukey, 95% de confiabilidad). Específicamente, los compuestos **11-13** con grupos electroatrayentes, exhibieron este aumento con ambas cepas de *M. fijiensis* (figura 22). Esto está en concordancia con previas evidencias que indican que los grupos electro-atrayentes en posición C-2 de perinaftenona resultan en moléculas con altos rendimientos de quantum en la producción de  $^1\text{O}_2$  [133]. En caso de la perinaftenona (**10**), diferencias significativas entre la actividad en fotoperiodo-oscuridad fueron observados únicamente para la cepa 060124 (figura 21b)

La comparación de los derivados O-metil **4**, **6** y **8** con la perinaftenona no sustituida (**10**) revela que en todos los casos el grupo O-metil afecta positivamente la actividad y el compuesto **6** fue el más activo en esta serie. Esto demostró la relevancia de una sustitución en C-3, C-4 o C-6 por un grupo metoxilo, por ejemplo, en este núcleo. Esta observación abrió la oportunidad de explorar si un grupo electro-atrayente en el C-2 de los derivados O-metil **4**, **6** y **8** podrían resultar en un efecto sinérgico. Por consiguiente, la 2-nitro-4-metoxiperinaftenona (**14**) fue sintetizada, como un ejemplo, y su actividad medida bajo experimentos controlados de iluminación (figura 21 y 22).

El valor de  $\text{IC}_{50}$  del compuesto **14** fue el más bajo entre todos los compuestos perinaftenona evaluados y su actividad *in vitro* fue comparable a los fungicidas comerciales benomil y propiconazol (figura 21 y 22). Sin embargo, la actividad de la 2-nitro-4-metoxiperinaftenona (**14**) fue significativamente mejor en la presencia de luz. Comparando el valor de  $\text{IC}_{50}$  de la 2-nitro-4-metoxiperinaftenona (**14**) con aquellos derivados 4-metoxi **6** y 2-nitro **13** (figura 21 y 22) sugiere que los dos grupos funcionales afectan de forma sinérgica la capacidad aceptor Michael de la estructura perinaftenona sin perturbar las propiedades fotodinámicas del centro del núcleo.

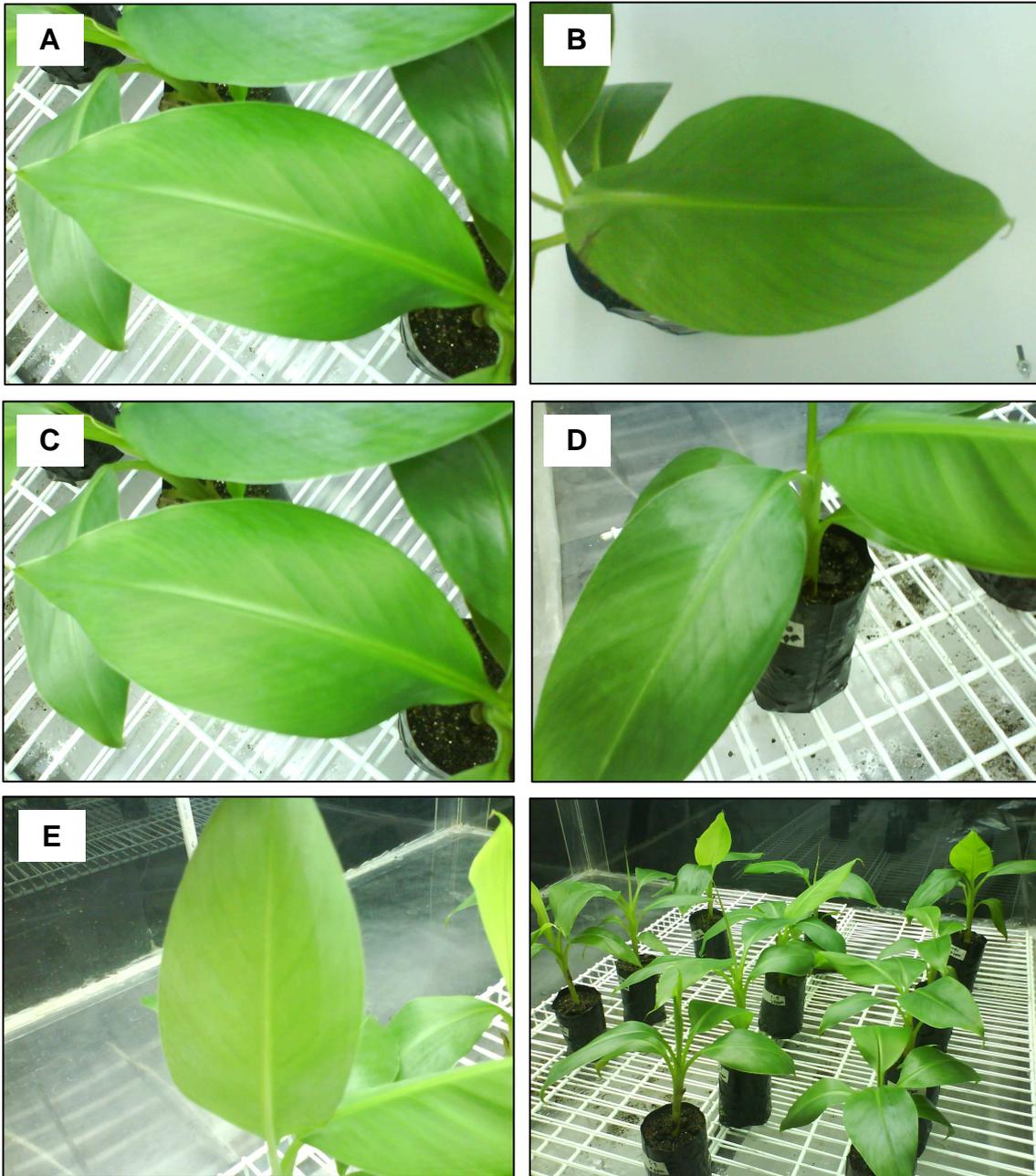


**Figura 22.** a) Actividad antifúngica de los compuestos **11**, **13** y **14** sobre ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* y b) observación al microscópio (40X): A) control negativo, B) 2-bromoperinaftena, C) 2-nitroperinaftena, D) 2-nitro-4-metoxiperinaftena a una concentración de 2µg/mL.

Al comparar los valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos 2-nitroperinaftenona (**13**) y 2-nitro-4-metoxiperinaftenona (**14**) en la inhibición de micelio (asexual) y, evaluación de ascosporas (sexual) de *M. fijiensis* (figura 21 y 22), el compuesto **14** resultó ser dos veces más activo sobre la inhibición del tubo germinativo de ascosporas, mientras que el compuesto **13** no presentó ninguna diferencia al evaluar estos dos estados reproductivos del hongo. Puesto que la ascospora es considerada la estructura reproductiva de mayor importancia en el ciclo infeccioso de la enfermedad [9, 35], las características químicas del compuesto **14** podrían ser un núcleo químico apropiado para el desarrollo de nuevos fungicidas ambientalmente amigables ante el desafío contra la Sigatoka Negra.

Finalmente, no se determinó ningún tipo de lesión necrótica visible sobre las hojas de las plántulas de banano variedad Williams (figura 23) cuando se evaluó los compuestos **11**, **12**, **13** y **14** en las pruebas preeliminares de fitotoxicidad. Sin embargo, estudios más detallados de fitotoxicidad se requieren, puesto que se ha demostrado que la 2-nitroperinaftenona (**13**) es altamente mutagénica en estudios realizados sobre *Salmonella* [134].

En resumen, los resultados demuestran que es posible mejorar la actividad de compuestos tipo perinaftenona contra *M. fijiensis* por la introducción de grupos electro-atrayentes en la posición C-2 sin perturbar la fotodinámica inherente al centro del núcleo perinaftenona (figura 21 y 22). Adicionalmente, la relevancia de la sustitución en la posición C-4 de perinaftenona fue demostrada por un grupo metoxilo y su efecto fue más activo sobre ascosporas de *M. fijiensis*. Los efectos de otros tipos de sustitución en esta posición merecen más atención.



**Figura 23.** Fotografías de la evaluación fitotóxica del compuesto 2-nitroperinaftena a una concentración de  $50\mu\text{g/mL}$ : A) 2 días; B) 5 días; C) 10 días; D) 25 días; E) envés de la hoja a 25 días.

## 5. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo permitió demostrar algunas tendencias tanto topológicas como electrónicas relevantes para el aumento de la actividad fungicida del núcleo de perinaftenona en el sistema biológico *M. fijiensis*. En términos topológicos, la sustitución por un grupo metoxilo en la posición C-4 del núcleo de perinaftenona es relevante para aumentar la actividad contra *M. fijiensis*; en este caso, la lipofilicidad puede ser una posible explicación puesto que su contraparte “hidroxilo”, presenta menor actividad. Es interesante notar que perinaftenonas sustituidas en esta posición ya han sido reportadas como fitoalexinas exclusivas del género *Musa*, aunque en este caso, el sustituyente es un anillo fenilo [81]. Infortunadamente no hay mucha información sobre la actividad biológica de este tipo de compuestos (4-fenilfenalenonas) debido a la baja disponibilidad a partir de fuentes naturales y a los deficientes métodos sintéticos existentes para obtenerlas [81]; además, esto último tampoco permitió determinar la topología de las posiciones C-5, C-7, C-8 y C-9 en perinaftenona sobre la actividad contra el hongo en estudio, por cuanto explorar nuevas metodologías de síntesis que permitan obtener información del comportamiento de cada una de éstas posiciones del núcleo perinaftenona, sería indispensable para el diseño de estrategias que permitan mejorar la actividad contra el sistema biológico *Mycosphaerella fijiensis*.

La introducción de grupos electro-atrayentes en C-2 de perinaftenona, permitió determinar la tendencia electrónica en la actividad contra el hongo en estudio; de acuerdo con esto, los grupos más electro-atrayentes, que afectan la densidad electrónica del doble enlace en esta posición por inducción o conjugación, incrementaron de forma drástica la actividad contra *M. fijiensis*, siendo la 2-nitroperinaftenona, el compuesto más activo de esta serie.

Un aumento en reactividad de estas moléculas sobre un modo de acción aceptor Michael [134, 135], es una posible explicación de la inhibición temprana en los procesos metabólicos del microorganismo objeto de estudio.

Interesantemente, los compuestos 2-bromo **(11)**, 2-cloro **(12)** y 2-nitroperinaftenona **(13)** fueron los únicos que exhibieron un aumento significativo de actividad bajo condiciones de luz, por cuanto el efecto fotodinámico en estas moléculas se vió reflejado por este tipo de grupos químicos sustituidos en perinaftenona [136]. Sin embargo, pese a las características relevantes que presentaron estos compuestos sobre la inhibición de *M. fijiensis*, se ha demostrado que las nitroperinaftenonas son agentes altamente mutagénicos en estudios realizados sobre *Salmonella* [137]. Esto abre las puertas para explorar otros grupos electro-atrayentes sustituidos en C-2 de perinaftenona, que no afecten la fotodinámica del centro del núcleo, no impliquen riesgos para la salud humana y/o el medio ambiente y además, puedan ser evaluados como posibles fármacos en el desafío contra la Sigatoka Negra.

La síntesis de la *2-nitro-4-metoxiperinaftenona*, permitió demostrar que es posible mejorar la actividad de compuestos tipo perinaftenona contra *M. fijiensis*, cuya hipótesis surgió de agrupar las características topológicas y electrónicas mencionadas anteriormente y exhibirlas en una sola molécula capaz de actuar en forma sinérgica en la inhibición de *M. fijiensis* sin afectar la fotodinámica inherente al centro del núcleo perinaftenona. El campo de estudio sobre las propiedades sinérgicas de este compuesto parecen ser prometedoras, puesto que fue más activo en la inhibición del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, estructuras reproductivas consideradas como la principal fuente de la enfermedad Sigatoka Negra [9, 35]. Además, sería interesante explorar rutas de síntesis de dímeros de perinaftenonas que exhiban este tipo de características sinérgicas, lo cual permitiría aumentar la concentración efectiva contra el hongo en estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Espinal G Carlos Federico, Covalada Martínez Hector J, & Peña Marín Yadira (2006). La cadena del banano en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de Trabajo No. 101, 2-42. <http://www.agrocadenas.gov.co/>
- [2] Velásquez, J., Giraldo, P. (2005) Informe de Avance. Posibilidades Competitivas de Productos Prioritarios de Antioquia frente a los Acuerdos De Integración y Nuevos Acuerdos Comerciales. Departamento de Planeación. Gobernación de Antioquia.
- [3] Carta informativa Augura, Colombia (2000). Boletín no. 210 Medellín: Augura.
- [4] Stover, R. H. (1979). Field observations on benomyl tolerance in ascospores of *Mycosphaerella fijensis* var. *diffromis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **69**, 500-502
- [5] Stover, R.H, and Simmonds, N.W. (1987). Bananans (Third edition), Longman Scientific and Technical New York. USA. 468p.
- [6] Otálvaro, F., Nanclares, J., Vásquez, L.E., Quiñonez, W., Echeverri, F., Arango, R. and Schneider, B. (2007). Phenalenone-Type Compounds from *Musa acuminata* var. "Yangambi km 5" (AAA) and Their Activity against *Mycosphaerella fijensis*. *Journal of Natural Products* **70** (5), 887-890.
- [7] Mobambo K.N, Pasberg-Gauhl C, Gauhl F. and Zuofa K. (1997). Host response to black sigatoka in *Musa* germplasm of different ages under natural inoculation conditions. *Crop protection*, **16** (4), 359-363

- [8] Ssebuliba, R. Talengera, D and others (2006). Reproductive efficiency and breeding potential of East African highland (*Musa AAA-EA*) bananas. *Field Crops Research*, **95**, 250–255
- [9] Mourichon, X., Carlier, J. y Fouré, E. (1997). Enfermedades de *Musa*: Hoja Divulgativa No. 8, CIRAD /INIBAP, Montpellier, 1-4.
- [10] Gómez, M. A., González, J., Ortiz, J. L., Aguilar, M. E. y Sandoval, J. (2004). Logros y perspectivas de la transformación genética en Banano. XVI reunión Internacional ACORBAT. Publicación Especial, México, 79-82.
- [11] Gómez, A., González, J., Ortiz, J., Aguilar, M. E. y Sandoval, J. (2002). Generación de Banano (C.V Gran Nain) transgénico conteniendo genes antifúngicos para conferir resistencia contra Sigatoka Negra. XV reunión Internacional ACORBAT. Cartagena de Indias, Colombia, 114-117.
- [12] Grayer, R. J., Kokubun, T. (2001). Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, **56**, 253-263.
- [13] Crawley M (1997) *Plant Ecology*. Blackwell Science.
- [14] Harborne J B (1994). Introduction to Ecological Biochemistry. *Academic Press*.
- [15] Daniel, O., Meier, M.S., Schlatter, J., & Frischknecht, P. (1999). Selected phenolic compounds in cultivated plants: Ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives*, **107**, 109-114.
- [16] Essenberg, M. (2001). Prospects for strengthening plant defenses through phytoalexin engineering. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**, 71-81.

- [17] Cooke,R.G. & Segal,W. (1955). Colouring matters of Australian plants. VI. Haemocorin - a unique glycoside from *Haemodorum corymbosum* Vahl. *Australian Journal of Chemistry* **8**, 107-113.
- [18] Luis,J.G., Echeverri,F., Quiñones, W., Brito,I., Lopez,M., Torres,F., Cardona,G., Aguilar,Z., Pelaez,C., & Rojas,M. (1993). Irenolone and Emenolone - 2 New Types of Phytoalexin from *Musa-paradisiaca*. *Journal of Organic Chemistry* **58**, 4306-4308.
- [19] Greca,M.D., Lanzetta,R., Molinaro,A., Monaco,P., & Previtera,L. (1992) Phenalene metabolites from *Eichhornia crassipes*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2**, 311-314
- [20] Greca,M.D., Molinaro,A., Monaco,P., & Previtera,L. (1993). Degraded phenalene metabolites in *Eichhornia crassipes*. *Natural Product Letters* **1**, 233-238.
- [21] Holscher,D. & Schneider,B. (2000). Phenalenones from *Strelitzia reginae*. *Journal of Natural Products* **63**, 1027-1028.
- [22] De La Hoz, Joaquín. (2008). BANANO Y REVALUACIÓN EN EL DEPARTAMENTO DEL MAGDALENA 1997-2007. No.105, Cartagena de Indias.
- [23] Asociación De Bananeros De Colombia - AUGURA. (2008) Coyuntura Bananera Colombiana.
- [24] Martínez, Héctor *et al.* (2005). *La cadena del banano en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005*, MADR, Observatorio Agrocadenas Colombia, Bogotá.

- [25] FAO. (2006). Banano, notas sobre productos básicos: situación del mercado del banano en 2005 y comienzos de 2006. . <http://www.fao.org> (visitada enero,2007).
- [26] Rosales, F., Arnaud, E. & Coto, J. (1999). A catalogue of wild and cultivated bananas. A tribute to the work of Paul Allen. <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/>. *International Plant Genetic Resources Institute*. 7-10-2005.
- [27] N.W.Simmonds (1966). *Bananas*, second edition edn. Longman, London and New York.
- [28] Simmonds, N.W., and Shepherd, K. (1955). Taxonomy and origins of cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London Botany*. **55**, 302-312
- [29] Rodríguez, A. Antonio. (2001). El banano y su desarrollo en Colombia. Bogotá, Editorial Gente Nueva Editorial, primera edición. p. 23-45
- [30] Ploetz, R. C. (1994). Banana. In *Compendium of Tropical Fruit Diseases*. (R. C. Ploetz, G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach and D. H. Ohr ed.) p. 2-22, *APS Press*
- [31] Stover, R.H. (1986). Disease management strategies and the survival of the banana industry. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 83-91
- [32] Chica, E., Navia, D., Torres, H., Quilambaquí, M. (2005). Efecto del butóxido de Piperonilo y sus Mezclas con Fungicidas Triazoles sobre el Crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Tecnológica ESPOL* **18** (1), 159-164

- [33] Rhodes, P.L. (1964). A new disease in Fiji. *Common wealth Phytopathological News* **10**, 38-41
- [34] Stover, R.H. (1972). *Banana, plantain and baca diseases*. Common. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England. 316p
- [35] Stover, R.H. (1980). Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. *Plant Disease*. **64**, 750-756
- [36] Foure, E. (1987). Varietal reaction of bananas and plantains to black leaf streak disease. p.110-113 En: *Banana and plantain breeding strategies*. Proceedings of an international workshop held in Cairns, Australia, 13-17. October 1986. Persley, G.J.; De Langhe, E.A ed. *ACIAR Proceedings* no. 21
- [37] Castaño, J. (1997). Comunicación personal (Universidad de Caldas, Manizales).
- [38] Chica, R., M. Herrera, I. Jiménez, S. Lizcano, J.A. Montoya, L.F. Patiño, P.A. Rodríguez y L.H. Ruíz. (2004). Impacto y manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo del banano de exportación en Colombia. p. 53-62. En: *Memorias XVI Reunión Internacional ACORBAT 2004*. Acorbat, Oaxaca, México.
- [39] Romero, M., Díaz, T., Castañeda, D. y Arango, R. (1999). DIAGNÓSTICO POR PCR DEL COMPLEJO SIGATOKA EN COLOMBIA. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. **52** (1), 395-424.
- [40] Clay, K., and Kover, P. (1996). Evolution and stasis in plant pathogen associations. *Ecology*. **77**, 997-1003
- [41] Marín, D.H., Romero. R.A., Gúzman, M., and Sutton, T.B. (2003). Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* **87**, 208-222

- [42] Meredith, D.S, and Lawrence, J.S. (1969). Black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society*. **52**, 459-476
- [43] Múlder, J.L, and Holliday, M. (1974). *Mycosphaerella fijiensis* CMI *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacterial* **413**. Kew, Surrey, UK.
- [44] Múlder, J.L and Stover, R.H. (1976). *Mycosphaerella* species causing banana leaf streak spot. *Transactions of the British Mycological Society* **67**, 77-82
- [45] Agrios, G. N. (1988). Plant Diseases Caused by Fungy. In Plant Pathology. ed.) p. 353-355, *Academic Press, Inc*, San Diego New York.
- [46] Gauhl, F. (1994). Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in plantain and banana in Costa Rica, Central América, Ed. By INIBAP. 120p
- [47] Jacome, L.H and Schuh, W. (1992). Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopathology* **82**, 515-520
- [48] Belalcázar, S. (1991). El cultivo del plátano en el trópico. Manual de Asistencia Técnica No. 50. Comité de Cafeteros de Colombia, CIID, INIBAP, ICA. Cali, Colombia. 376p.
- [49] Beveraggi, A., M.F. Zapater y X. Mourichon. (1995). Análisis de la Resistencia de los bananos a la Sigatoka Negra causada por *M. fijiensis* (*Cercospora fijiensis*). CIRAD-CA. Montpellier (FRA). Extraído de Referencias bibliográficas Musa Doc-1999, sobre bananos y plátanos de las Memorias XIII Reunión ACORBAT, Guayaquil, Ecuador.

- [50] Hoss, R., Helbig, J., and Bochow, H. (2000). Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black sigatoka disease pathosystem (*Musa spp.* – *Mycosphaerella fijiensis*). *Journal of Phytopathology* **148**, 387-394
- [51] Craenen, K. (1998). Black sigatoka disease of banana and plantain. A Reference Manual International Institute of Tropical Agriculture. Ibadan. Nigeria. 58p.
- [52] Merchán, V.M. (2000). Prevención y manejo de la Sigatoka Negra. Boletín informativo ICA, Manizales-Caldas. 30p
- [53] Sallé, G.; Pichard, V.; Mourichon, X. (1990). Cytological study of the interaction between *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and three cultivars of *Musa* representing different levels of resistance. p. 180-190 En: Sigatoka leaf diseases of bananas. Proceedings of an international workshop held at San Jose, Costa Rica, 1989.
- [54] Fullerton, R.A, T.L.Olsen. (1995). Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of Black Sigatoka in banana and plantain. *New Zealand journal of Crop and horticultural Science* **23**, 39-48
- [55] Orozco, M. (1998). Criterios para el control químico de la Sigatoka Negra de banano (*Mycosphaerella fijiensis*). Memorias, Primer simposio internacional sobre Sigatoka Negra. Manzanillo, Colima, México. p. 79-96
- [56] Henríquez, W., Jeffers, R.D., Leacher, T.E., and Kendall, R.J. (1997). Agrochemical use on banana plantations in Latin America: perspectives on ecological risk. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 91-99

- [57] Guzmán, M. y Romero, R. (1997). Comparación de los fungicidas azoxistrobina, propiconazole y diefeconazole en el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), en banano (*Musa* AAA). En: Corbana. **22** (47), p. 49-59.
- [58] Romero, R.R., and Sutton, T.B. (1998). Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Disease* **82**, 931-934
- [59] Cronshaw, K; Lorenz G. and Mappes, D. (1994). Monitoring results of *Mycosphaerella fijiensis* to tridemorph. p.315-321. En: Heany, S., Slawson, D., Holloman, D. W., Smith, M., Russell, P.E. and Parry, D. W., eds. Fungicide resistance. En: British Crop Protection Council Monograph. No. 60.
- [60] Pérez, L., Mauri, F., Hernández, A., Abreu, E., y Porras, A. (2000). Epidemiología de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba. Pronóstico bioclimático de los tratamientos de fungicidas en banano (*Musa acuminata* AAA). *Revista Mexicana de Fitopatología* **18**, 15-26
- [61] González, R., Bustamante, E., Shannon, P., Okumoto, S., y Leandro, G. (1996). Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Manejo Integrado de Plagas 40:12-16
- [62] Rowe, P.R and Rosales, F.E. (2000). Conventional banana Breeding in Honduras. p.435-449. En: Diseases of banana, Abacá and Enset. D.R Jones, ed. CAB International, Wallingford, UK
- [63] Vuylsteke, D., Ortiz, R., Ferris, R.S.B., and Crouch, J.H. (1997). Plantain improvement. *Plant Breeding Reviews* **14**, 267-320

[64] Sági, L., Panis, B., Remy, S., Schoofs, H., De Smet, K., Swennen, R., and Cammue, B. (1995). Genetic transformation of banana and plantain (*Musa spp.*) via particle bombardment. *Bio/Technology* **13**, 481-485

[65] May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J., and Amtzen, Cb.J. (1995). Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technology* **13**, 486-492

[66] Fullerton, R. A., Olsen T. L. (1991). Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. En Valmayor R. V., Umali B. E. and Bejosano C. P. (eds). *Banana Diseases in Asia and the Pacific* p.105- 114. INIBAP, Montpellier.

[67] Riveros, AE. (1992). Etude comparative de l'interaction hôte- parasite entre un cultivar sensible et un cultivar résistant à la cercosporiose noire du bananier. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux: Belgique, p. 77

[68] Beveraggi, A., X. Mourichon and G. Salle. (1993). Study of host–parasite interactions in susceptible and resistant bananas inoculated with *Cercospora fijiensis*, pathogen of black leaf streak disease. En *Breeding Banana and Plantain for resistance to disease and pests*. J., Ganry, Editor., CIRAD, INIBAP: Montpellier, France, p 213- 220

[69] Lepoivre, P., Busogoro, J.P., El Hadrami, A., Carlier, J., Harelimana, G., Mourichon, X., Panis, B., Riveros, S., Roux, N., Sallé, G., Strosse, H. and Swenen, R. (2002). Banana-*Mycosphaerella fijiensis* (black leaf streak disease) interactions. En: *Proceedings of the 2nd International Workshop on Mycosphaerella fijiensis leaf spot diseases of bananas*. INIBAP. CORBANA. CATIE, San José, Costa Rica. 317p.

- [70] Ortiz, R., and Vuylsteke, D. (1994). Inheritance of black sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa spp.*) hybrids. *Theoretical and Applied Genetic* **89**, 146-152
- [71] Fouré , E. (1993). Characterization of the reaction of banana cultivars to *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Cameroon and genetics of resistance. En Ganry, J. (ed). *Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests*, pp. 159- 170. CIRAD /INIBAP, Montpellier.
- [72] Lepoivre, P., Acuna, P., and Riveros, A.S. (1993). Screening procedure from improving resistance to banana black leaf streak disease. pp. 213-220 En: J. Ganry (ed.). *Breeding Bananas for Resistance to Disease and Pest*. CIRAD/INIBAP, Montpellier, Francia. 393p.
- [73] Quiñones, W., Escobar,G., Echeverri,F., Torres,F., Rosero,Y., Arango,V., Cardona,G., & Gallego,A. (2000) Synthesis and antifungal activity of *Musa* phytoalexins and structural analogs. *Molecules* **5**, 974-980.
- [74] Hermoso, L., H. Lindorf y E. de García. (1997). Anatomía foliar del variante somaclonal (CIEN BTA 03) *Musa sp.*, resistente a la Sigatoka Amarilla. *Anales de Botánica Agrícola* **4**, 63-67
- [75] Otalvaro,F., Echeverri,F., Quiñones,W., Torres,F., & Schneider,B. (2002) Correlation between phenylphenalenone phytoalexins and phytopathological properties in *Musa* and the role of a dihydrophenylphenalene triol. *Molecules* **7**, 331-340.
- [76] Stierle, A., Upadhayay, R., Hershenhorn, J., Strobel, G.A., and Molina, G. (1991). The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia* **47**, 853-858

- [77] Harelimana, G., Lepoivre, P., Jijakli, H., and Mourichon, X. (1997). Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black Leaf Streak. *Euphytica* **96**, 125-128
- [78] Luis,J.G., Echeverri,F., Quiñones,W., Brito,I., Lopez,M., Torres,F., Cardona,G., Aguilar,Z., Pelaez,C., & Rojas,M. (1993) Irenolone and Emenolone - 2 New Types of Phytoalexin from *Musa-paradisiaca*. *Journal of Organic Chemistry* **58**, 4306-4308.
- [79] Luis,J.G., Quiñonez, W, Echeverri F, Grillo,T.A., Kishi,M.P., Garcia-Garcia,F., Torres,F., & Cardona,G. (1996). Musanolones: Four 9-phenylphenalenones from rhizomes of *Musa Acuminata*. *Phytochemistry* **41**, 753-757.
- [80] Luis,J.G., Fletcher,W.Q., Echeverri,F., & Grillo,T.A. (1994). Phenalenone-Type Phytoalexins from *Musa-acuminata* Synthesis of 4-Phenyl-Phenalenones. *Tetrahedron* **50**, 10963-10970.
- [81] Kamo,T., Kato,N., Hirai,N., Tsuda,M., Fujioka,D., & Ohigashi,H. (1998) Phenylphenalenone-type phytoalexins from unripe Bungulan banana fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**, 95-101.
- [82] Kamo,T., Hirai,N., Iwami,K., Fujioka,D., & Ohigashi,H. (2001) New phenylphenalenones from banana fruit. *Tetrahedron* **57**, 7649-7656.
- [83] Luis,J.G., Fletcher,W.Q., Echeverri,F., Abad,T., Kishi,M.P., & Perales,A. (1995). New phenalenone-type phytoalexins from *Musa acuminata* (COLLA AAA) Grand Nain. *Natural Product Letters* **6**, 23-30.

- [84] Luis,J.G., Lahlou,E.H., Andres,L.S., Echeverri,F., & Fletcher,W.Q. (1997) Phenylphenalenonic phytoanticipins - new acenaphthylene and dimeric phenylphenalenones from the resistant *Musa* selected hybrid Sh-3481. *Tetrahedron* **53**, 8249-8256.
- [85] Luis,J.G., Fletcher,W.Q., Echeverri,F., Grillo,T.A., Perales,A., & Gonzales J.A (1995) Intermediates With Biosynthetic Implications In *De Novo* Production Of Phenyl-Phenalenone-Type Phytoalexins By *Musa acuminata* Revised Structure Of Emenolone. *Tetrahedron* **51**, 4117-4130.
- [86] Holscher,D. & Schneider,B. (1998) Phenylphenalenones from *Ensete ventricosum*. *Phytochemistry* **49**, 2155-2157.
- [87] Otalvaro,F., Gorls,H., Holscher,D., Schmitt,B., Echeverri,F., Quiñones,W., & Schneider,B. (2002) Dimeric phenylphenalenones from *Musa acuminata* and various Haemodoraceae species. Crystal structure of anigorootin. *Phytochemistry* **60**, 61-66.
- [88] Del Río, J., Jiménez, J., Chávez, M.I., Politi, M., and Gutiérrez, A. (2006). Phenylphenalenone Type Compounds from Leaf Fibers of Abaca (*Musa textilis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8744-8748
- [89] Harman,R.E., Cason,J., Stodola,F.H., & Adkins,A.L. (1955). Structural Features of Herqueinone, a Red Pigment from *Penicillium herquei*. *Journal of Organic Chemistry* **20**, 1260-1269.
- [90] Cooke,R.G. & Edwards,J.M. (1981) Naturally occurring phenalenones and related compounds. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **40**, 153-190.
- [91] Cooke,R.G. (1961). Studies in the biosynthesis of fungal metabolites. *Biochem. J.* **78**, 807

- [92] Edwards, J.M. & Weiss, U. (1974) Phenalenone pigments of the root system of *Lachnanthes tinctoria*. *Phytochemistry* **13**, 1597-1602.
- [93] Cooke, R.G. & Dagley, I.J. (1979). Coloring matters of Australian plants. 21. naphthoxanthenones in the Haemodoraceae. *Australian Journal of Chemistry* **32**, 1841-1847.
- [94] Holscher, D. & Schneider, B. (1997). Phenylphenalenones from root cultures of *Anigozanthos preissii*. *Phytochemistry* **45**, 87-91.
- [95] Cooke, R.G. & Thomas, R. (1975). Coloring Matters of Australian Plants. XVIII. Constituents of *Anigozanthos rufus*. *Australian Journal of Chemistry* **28**, 1053-1057.
- [96] Kamo, T., Hirai, N., Tsuda, M., Fujioka, D., & Ohigashi, H. (2000). Changes in the content and biosynthesis of phytoalexins in banana fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2089-2098.
- [97] Hirai Nobuhiro, Ishida Hiroki, & Koshimizu Koichi (1994) A phenalenone-type phytoalexin from *Musa Acuminata*. *Phytochemistry* **37**, 383-385.
- [98] Edwards, J.M. (1973) Biosynthesis of Plant Phenalenones. *Lloydia-the Journal of Natural Products* **36**, 441
- [99] Edwards, J.M., Schmitt, R.C., & Weiss, U. (1972) Biosynthesis of a 9-phenylperinaphthenone by *Lachnanthes tinctoria*. *Phytochemistry* **11**, 1717-1720.
- [100] Thomas, R. (1973) The Biosynthesis of Phenalenones. *Pure and Applied Chem* **34**, 515.

[101] Binks,R.H., Greenham,J.R., Luis,J.G., & Gowen,S.R. (1997) A phytoalexin from roots of *Musa acuminata* var. Pisang sipulu. *Phytochemistry* **45**, 47-49.

[102] Brown,A.E. & Swinburne,T.R. (1980) The resistance of immature banana fruits to anthracnose [*Coletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx.]. *Phytopath. Z.* **99**, 70-80.

[103] J.G.Luis, L.E.Hassane, M.P.Kishi, F.Garcia-Garcia, & F.Echeverri (1995) Phenalenone-type phytoanticipins in the *Musa* selected hybrid SH-3481. En Current trends in fruit and vegetables phytochemistry (C.Garcia-Viguera, M.Castañer, M.I.Gil, F.Ferreres, & F.A.Tomas-Barberan, eds), pp. 51-55. Imprenta S. Miguel S.L., Madrid-España.

[104] Schwenk,E. (1962). Tumor action of some quinonoid compounds in cheekpouch test. *Arzneimittelforschung - Drug Research* **12**, 1143.

[105] N.Narasimhachari, V.B.Joshi, S.Krishnan, M.V.Panse, & M.N.Wamburkar (1968) Antibacterial properties of perinaphthenone derivatives. *Current Science*. 288-289.

[106] Luque, J., Martínez, S., Saugar, J., Izquierdo, L., Abad, T., Luis G., Piñero, J., Valladares, B. & Rivas, L. (2004) Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target the mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 1534-1540.

[107] Barton, D.H., P. De Mayo, G.A. Morrison, and H. Raistrick. (1959). The Constitutions of Atrovenetin and Some Related Herqueinone Derivatives. *Tetrahedron*, **6**, 48.

- [108] Barton, D.H., P. De Mayo, G.A. Morrison, W.H. Schaeppi, and H. Raisirick. (1956). Some Observations on the Constitutions of Herqueinone and Related Compounds. *Chem. And Ind.* 552.
- [109] Thomas, R. (1961). Studies in the Biosynthesis of Fungal Metabolites. *Biochem. J.* **78**, 807.
- [110] Louis F.Fieser and E.B.Hershberg (1938) A New Synthesis of 3,4-Benzpyrene Derivatives *J. Am. Chem. Soc* **60**, 1658-1665.
- [111] Otálvaro, F., Quiñones, W., Echeverri, F. and Schneider, B. (2004). Synthesis of [phenyl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]lachnanthocarpone and other <sup>13</sup>C-labelled phenylphenalenones. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals.* **47**, 147-159
- [112] Cooke RG, Johnson BL, Segal W. (1958). *Austr J Chem.* **11**, 230–235.
- [113] G.M.Badger & W.Carruthers and J.W.Cook (1949) Polycyclic aromatic hydrocarbons. Part XXXV. Isomerization in the perinaphthene series. *J. Chem. Soc* 1768-1771.
- [114] Narasimachari, N., K.S. Gopalkrishnan, R.H. Haskins and L.C. Vining. (1963). Production of the antibiotic atrovenetin by a strain of *Penicillium herquei* Bainier and Sartory. *Canad. J. Microbiol.*, **9**, 134.
- [115] Narasimachari, N., B.N. Vasavada and S. Viswanathan. (1965). Antibiotic activity of deoxyherqueinone. *Experientia*, **21**, 376.
- [116] Fusková, A., B. Proksa and J. Fuska. (1977). *In vitro* effect of Duclauxin and derivatives of coumarin on nucleic acid and protein synthesis in Ehrlich's ascites carcinoma (EAC). *Pharmazie*, **32**, 291.

[117] Johanson, A., Crowhurst, R.N., Rikkerink, H., Fullerton, R., and Templeton, M. (1994). The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *Plant Pathology* **43**, 701-707

[118] Cañas, G., Angarita, M., Restrepo, J., Rodríguez, P., Moreno, C., Arango, R. Characterization of the CYP51 Gene in Several Field Isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. Pendiente publicación en Pest Management Science.

[119] Peláez, J., Vásquez, L., Díaz, T., Castañeda, D., Rodríguez, E. and Arango, R. (2006). Use of a micro title plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet. Revista de Agronomía Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

[120] Steel, R.G., and Torrie, J.H. (1980). Principles and Procedures of Statistics: A Biometric Approach. McGraw-Hill, New York.

[121] Aldrich Technical Information Bulletin No. AL-180.

[http://www.sigmaaldrich.com/aldrich/bulletin/al\\_techbull\\_al180.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/aldrich/bulletin/al_techbull_al180.pdf) .

Último Acceso 27-7-2007.

[122] Nanclares, J., Gil, J., Rojano, B., Saez, J., Schneider, B., and Otálvaro, F. (2008). Synthesis of 4-methoxy-1H-phenalen-1-one: a subunit related to natural phenalenone-type compounds. *Tetrahedron letters*.**49**, 3844-3847

[123] Dokunikhin, N. S.; Solodar, S. L.; Vinogradov, L. M. (1979). Transformations of polycyclic ketones. XIII. \*Nitration of phenalenone. *Zh. Org. Khim.* 2360-2366.

[124] Gholamhassan K.Imanzadeh, Mohammad R.Zamanloo, & Habibollah Eskandari and Keyvan shayesteh (2006). A new ring bromination method for

aromatic compounds under solvent-free conditions with NBS/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of chemical research* 151-153.

[125] Lazzaro, A.; Corominas, M.; Martí, C.; Flors, C.; Izquierdo, L. R.; Grillo, T. A.; Luis, J. G.; Nonell, S. (2004). Light- and singlet oxygen-mediated antifungal activity of phenylphenalenone phytoalexins. *Photochemistry and Photobiology Science* **3**, 706-710.

[126] Flors, C.; Nonell, S. (2006). Light and Singlet Oxygen in Plant Defense Against Pathogens: Phototoxic Phenalenone Phytoalexins. *Accounts of Chemical Research*. **39**, 293-300.

[127] Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C. (1994). Phenalenone, a Universal Reference Compound for the Determination of Quantum Yields of Singlet Oxygen O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δg) Sensitization. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **79**, 11-17.

[128] Flors, C.; Ogilby, P. R.; Luis, J. G.; Grillo, T. A.; Izquierdo, L. R.; Gentili, P.; Bussotti, L.; Nonell, S. (2006). Phototoxic Phytoalexins. Processes that Compete with the Photosensitized Production of Singlet Oxygen by 9-Phenylphenalenones. *Photochemistry and Photobiology*. **82**, 95-103.

[129] Berenbaum, M. R.; Larson, R. A. (1988). Flux of Singlet Oxygen From Leaves of Phototoxic Plants. *Experientia*. **44**, 1030-1032.

[130] Haddon, R. C. (1980). Symmetrical hydrogen bonding: molecular orbital theory of the .pi.-electron component *J. Am. Chem. Soc.* **102** (6), 1807-1811.

[131] Ahn, B. Z.; Sok, D. E. (1996). Michael acceptors as a tool for anticancer drug design. *Curr. Pharm. Des.* **2**, 247-262.

[132] Rai, V.; Namboothiri, I. N. (2006). A Theoretical Evaluation of the Michael-Acceptor Ability of Conjugated Nitroalkenes. *Eur. J. Org. Chem.* 4693-4703.

[133] Nonell, S.; Gonzáles, M.; Trull, F. R. (1993). 1H-Phenalen-1-One-2-Sulfonic Acid: an Extremely Efficient Singlet Molecular Oxygen Sensitizer for Aqueous Media. *Afinidad.* **50**, 445-450.

[134] Misaki, K., Hisamatsu, Y., Suzuki, H., and Takamura, T. (2008). Evaluation of the mutagenicity of nitration products derived from phenalenone (1H-phenalen-1-one). *Mutagénesis.* **23** (5), 359-366  
Cooke,R.G.

## PRODUCCIÓN ACADÉMICA

El presente proyecto de investigación dejó como resultado en producción intelectual dos publicaciones:

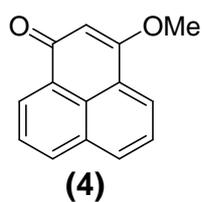
1. “Structure-Activity Relationship in the Interaction of Perinaphthenone-Type Compounds with *Mycosphaerella fijiensis*”. Aceptado y pendiente por publicación en el *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009.
2. “Estudio de la relación estructura-actividad en el núcleo de perinaftenona. Patosistema *Mycosphaerella fijiensis*”. Publicado en Memorias del XV Congreso Latinoamericano y XVIII Congreso Chileno de Fitopatología. 2009. Reconocimiento: Primer puesto en proyectos de investigación a nivel de Maestría.

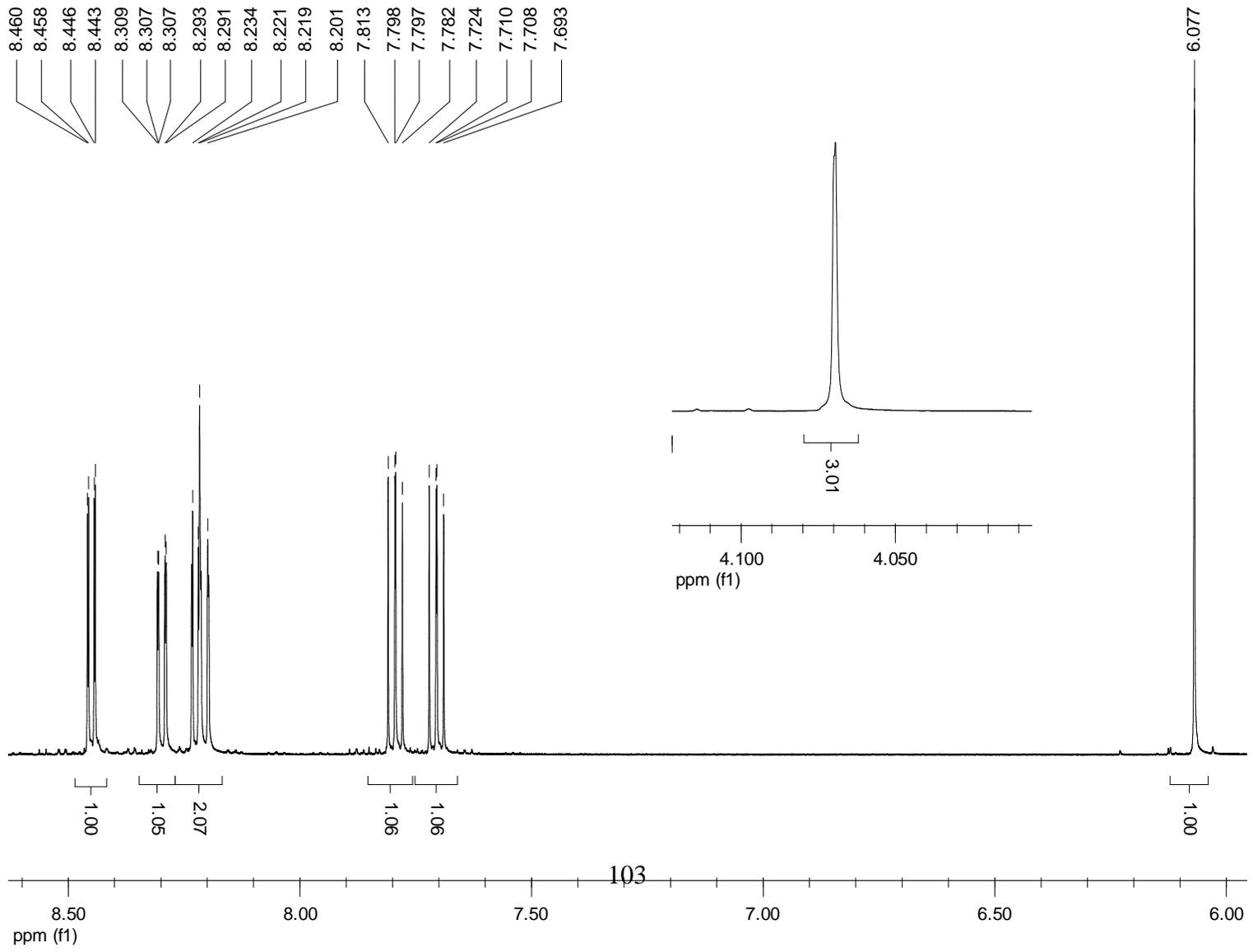


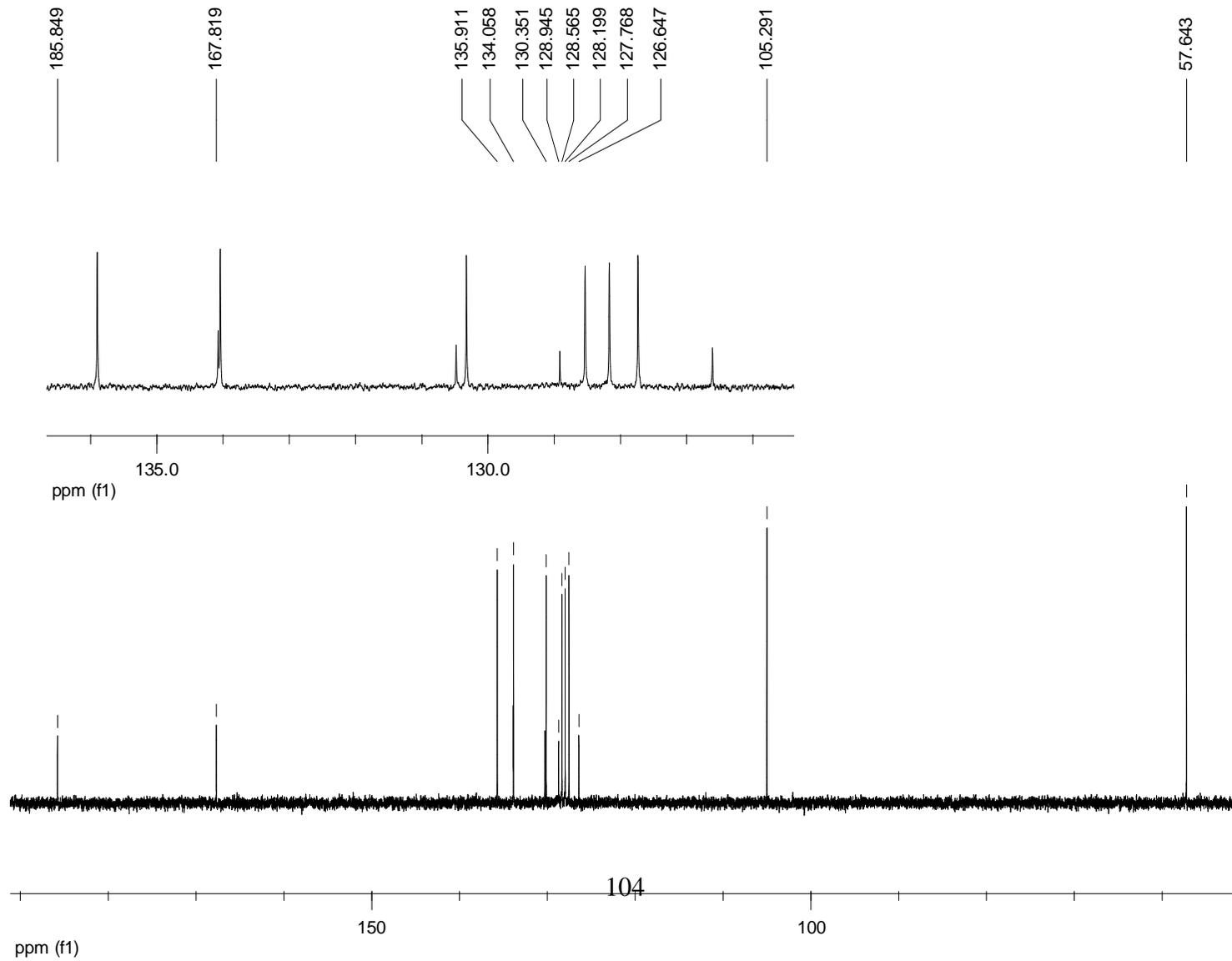
## **ANEXOS**

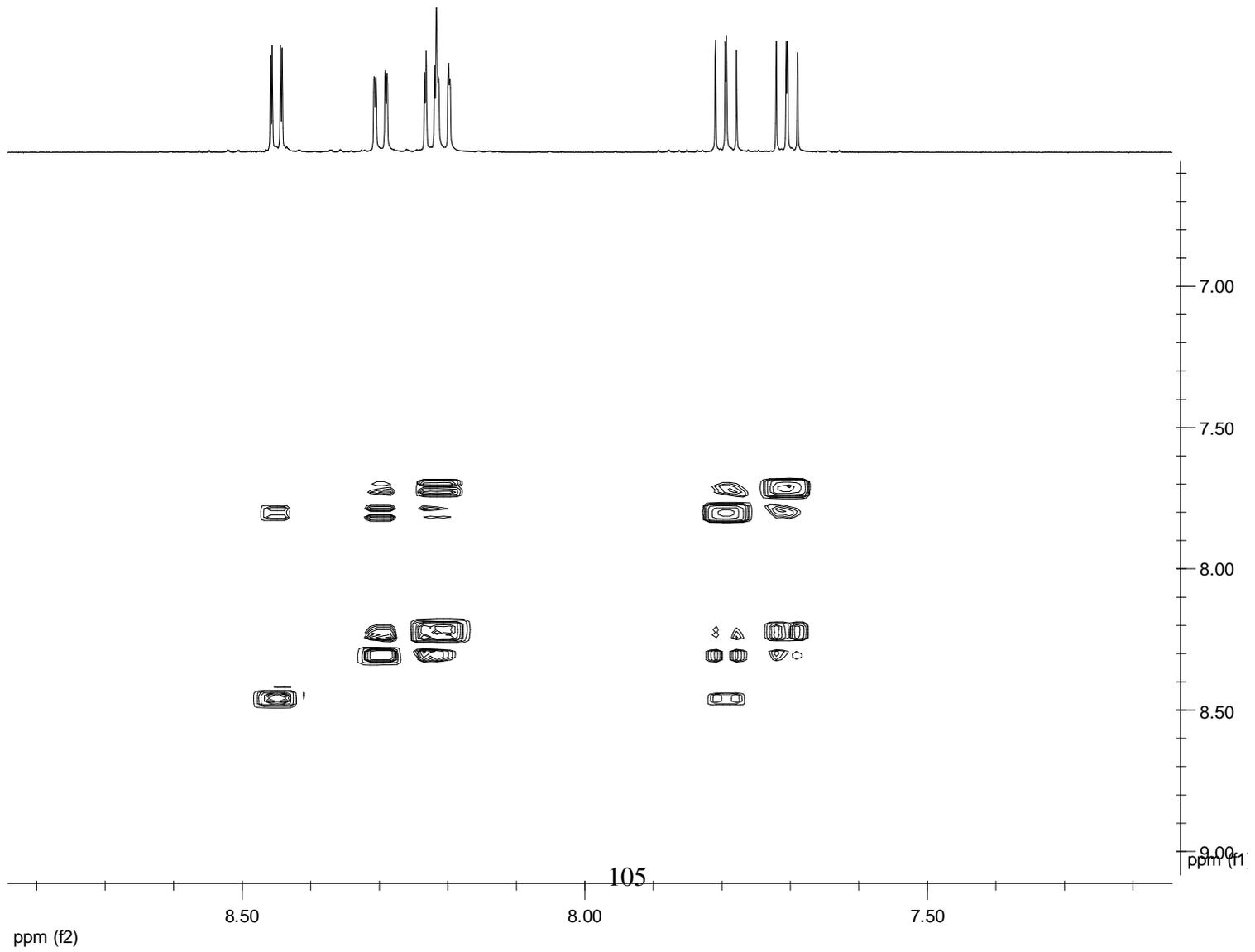
***ANEXO A. Elucidación estructural (espectros tomados en acetona deuterada)***

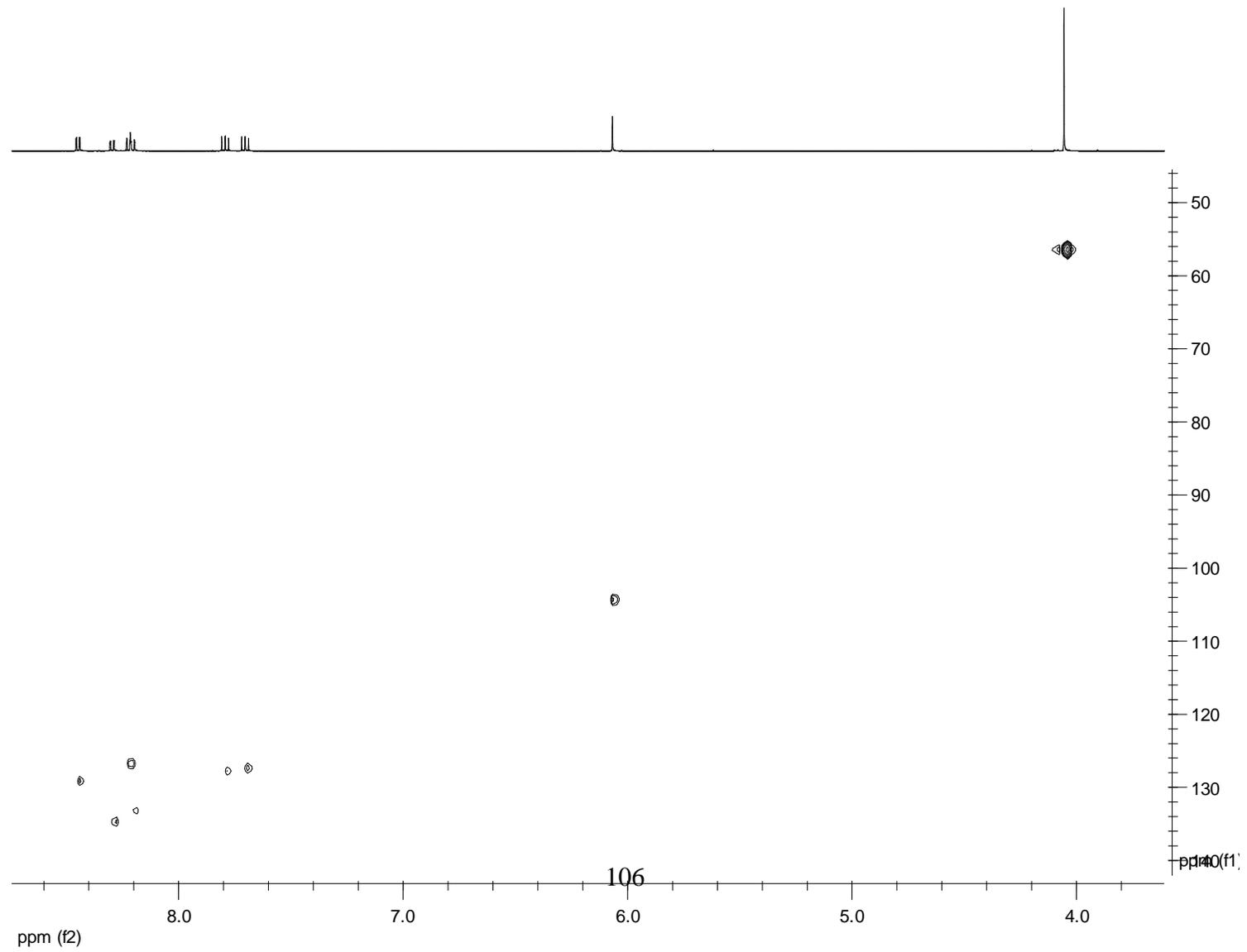
3-metoxi-1*H*-fenalen-1-ona

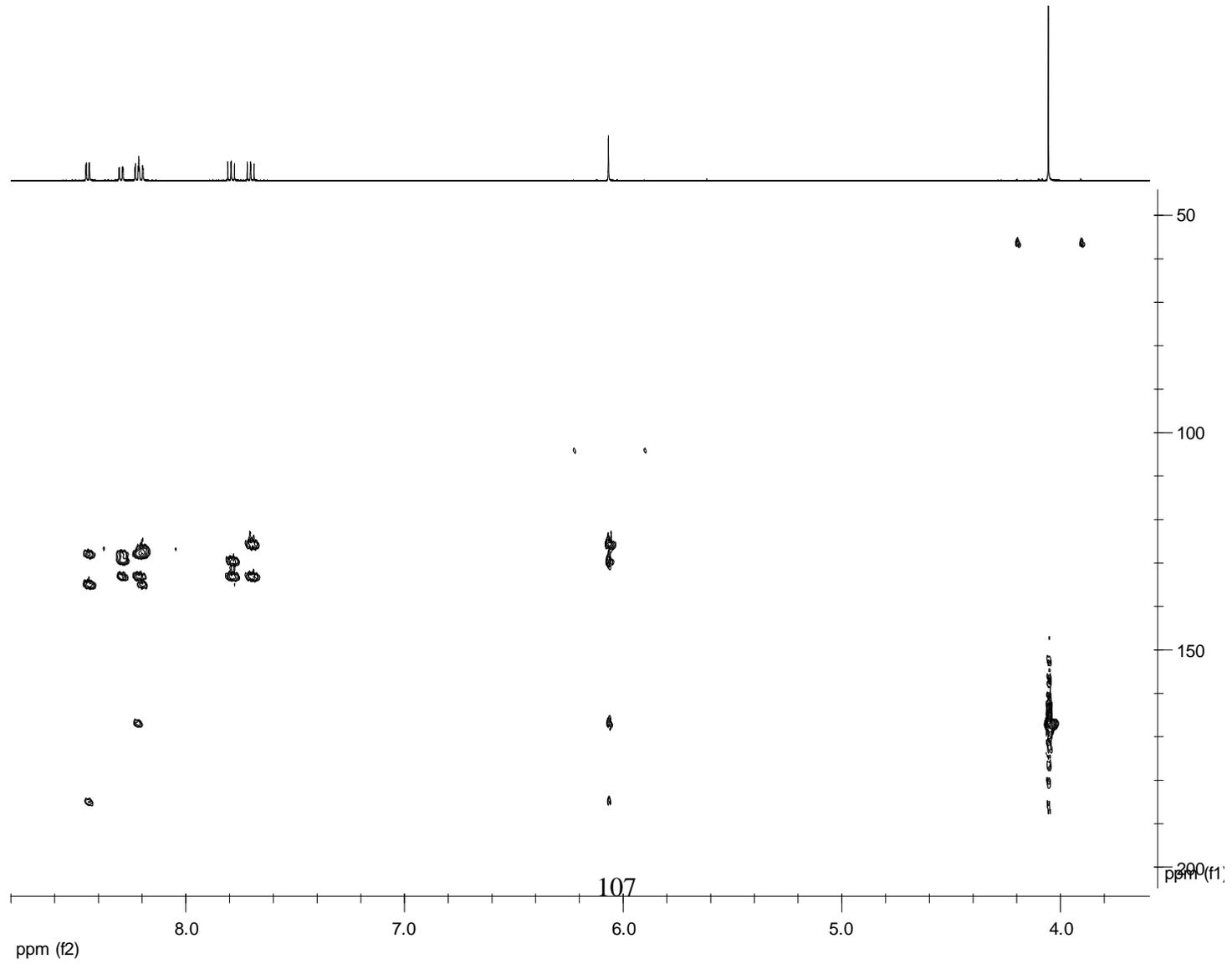




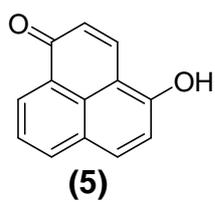


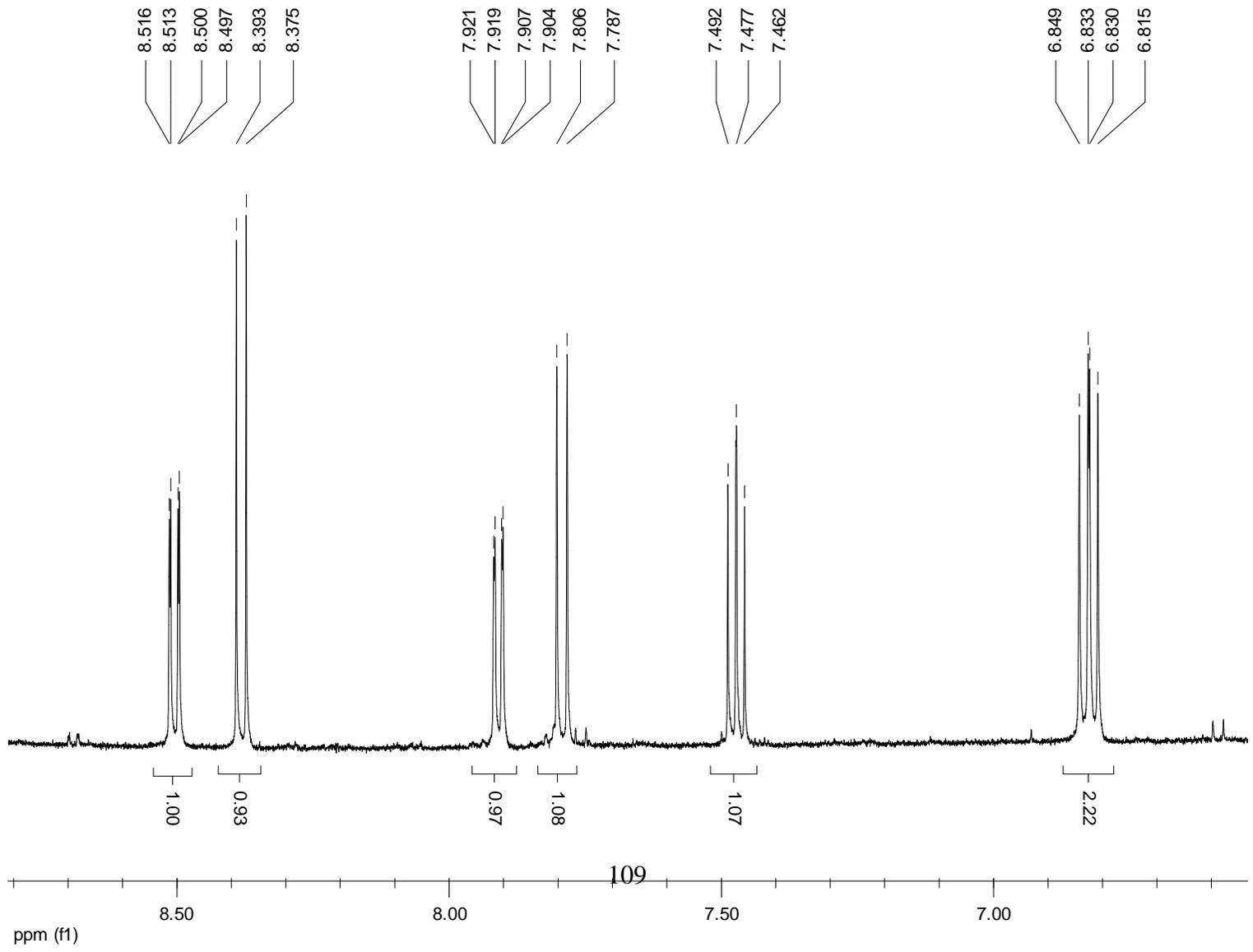






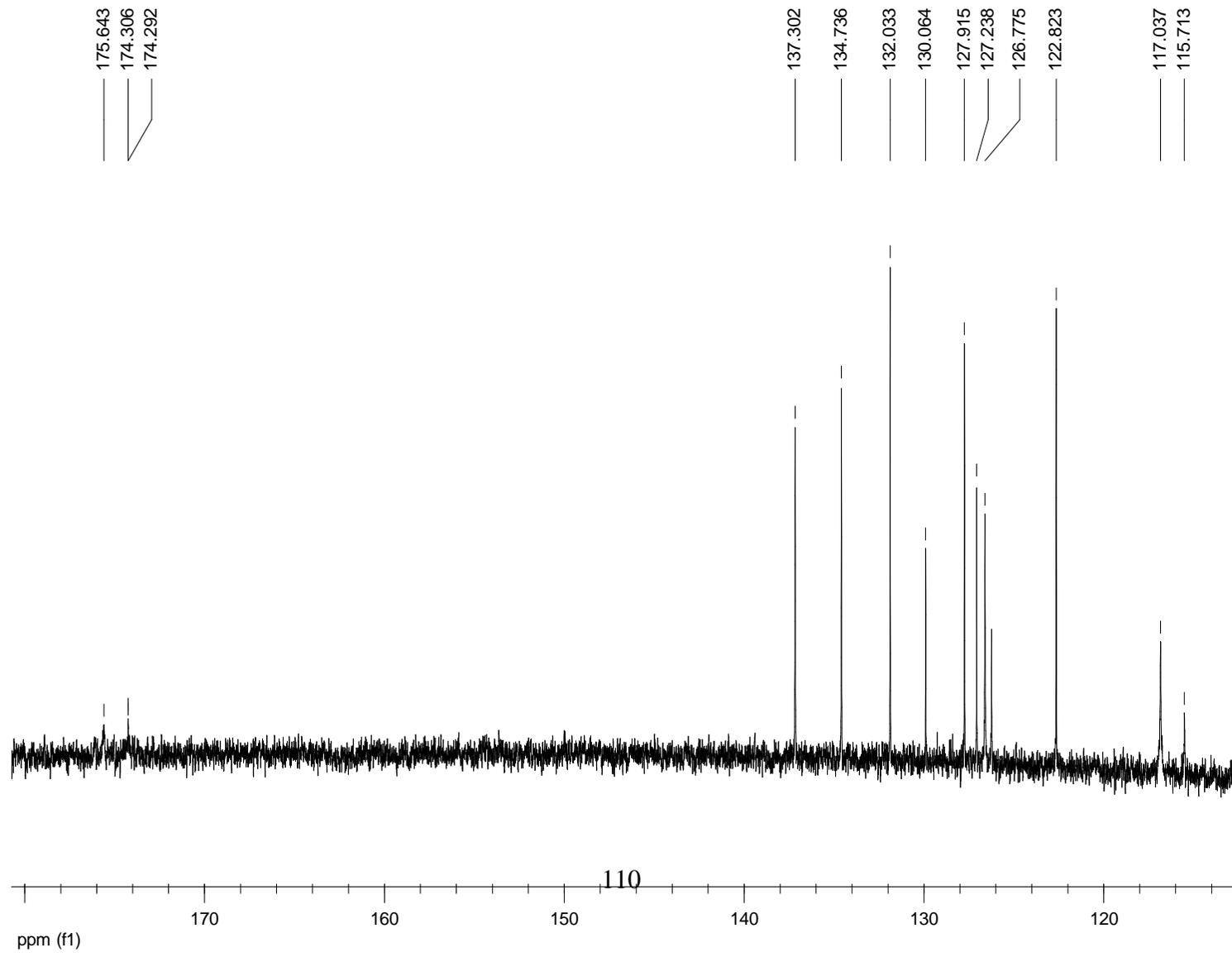
4-hidroxi-1*H*-fenalen-1-ona

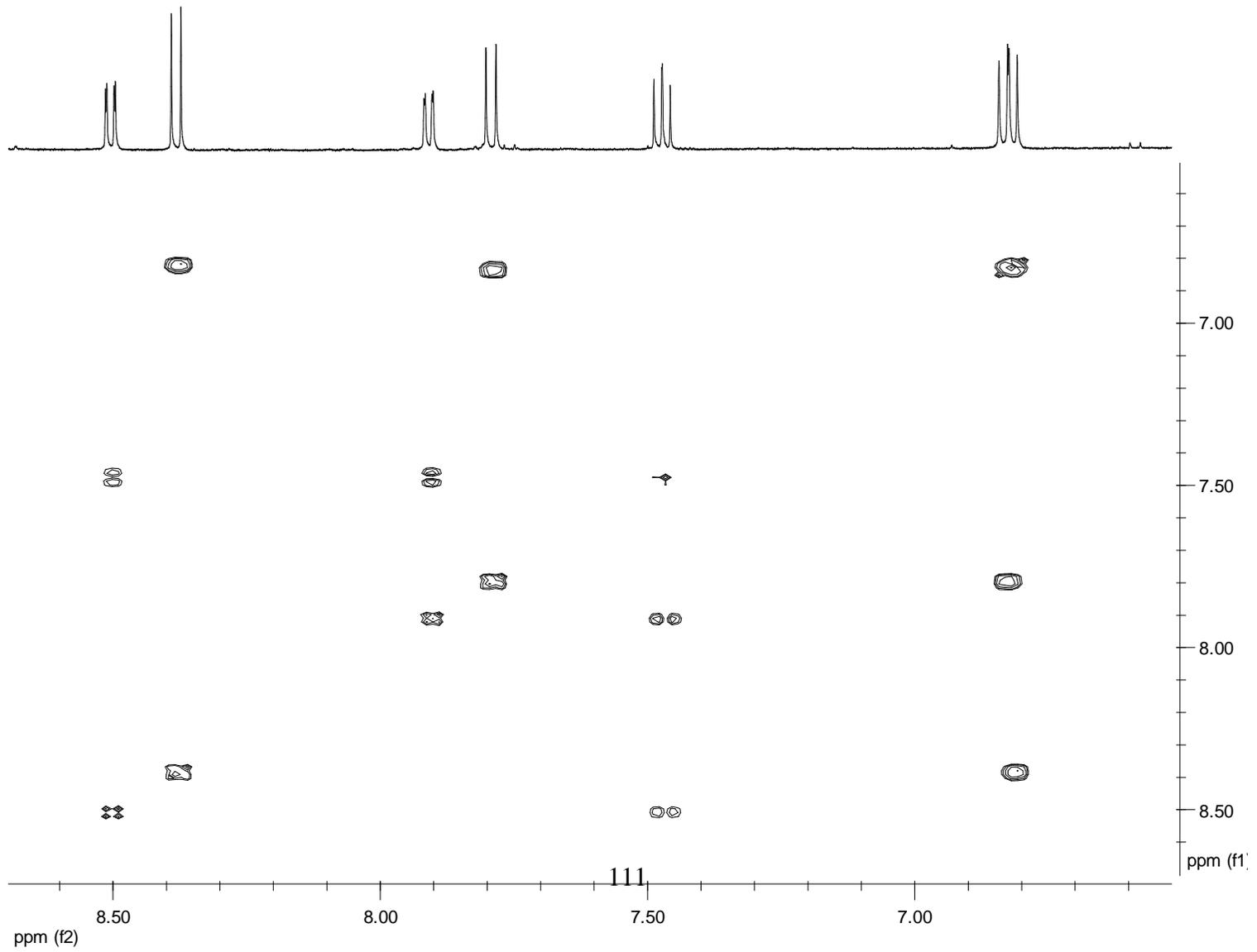


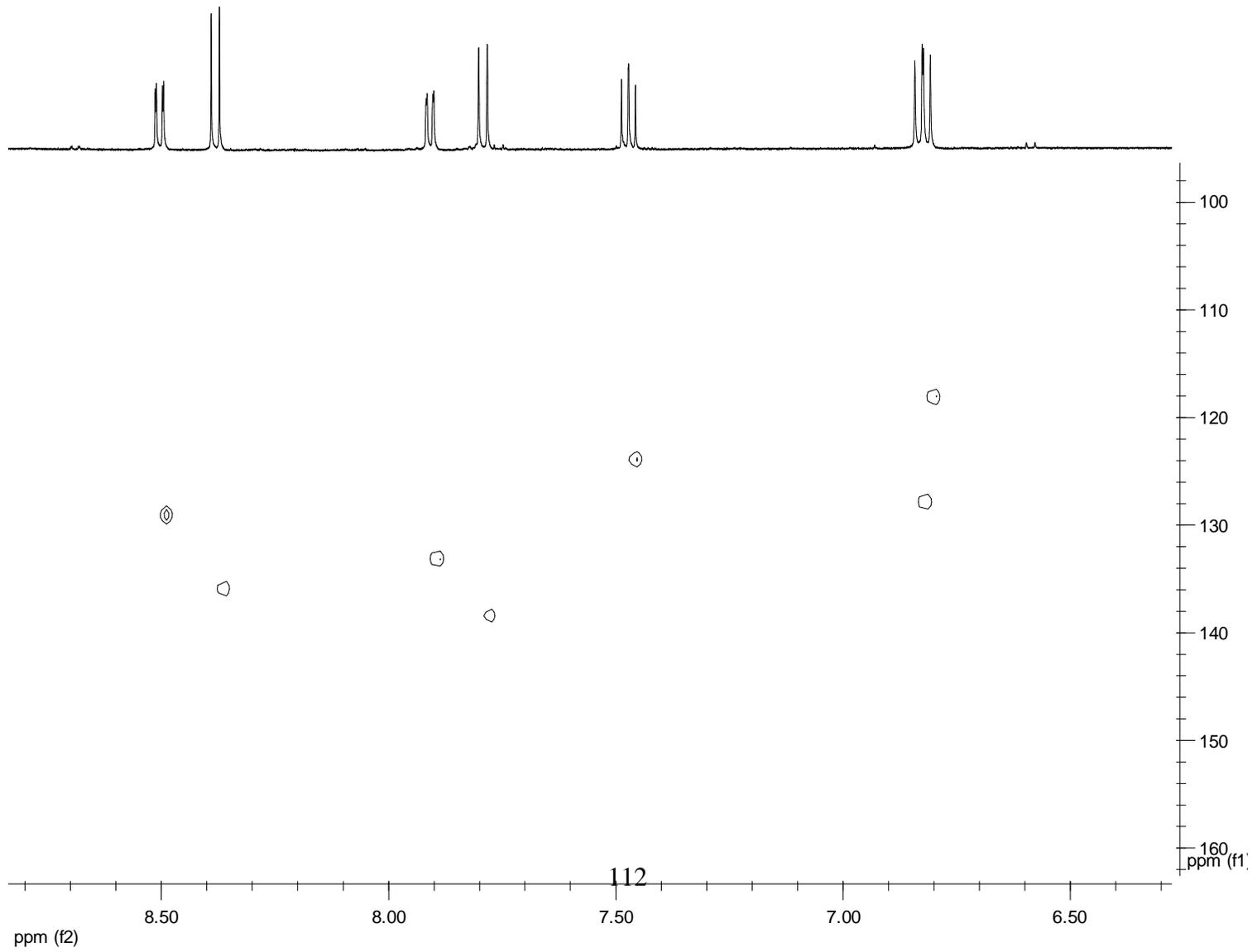


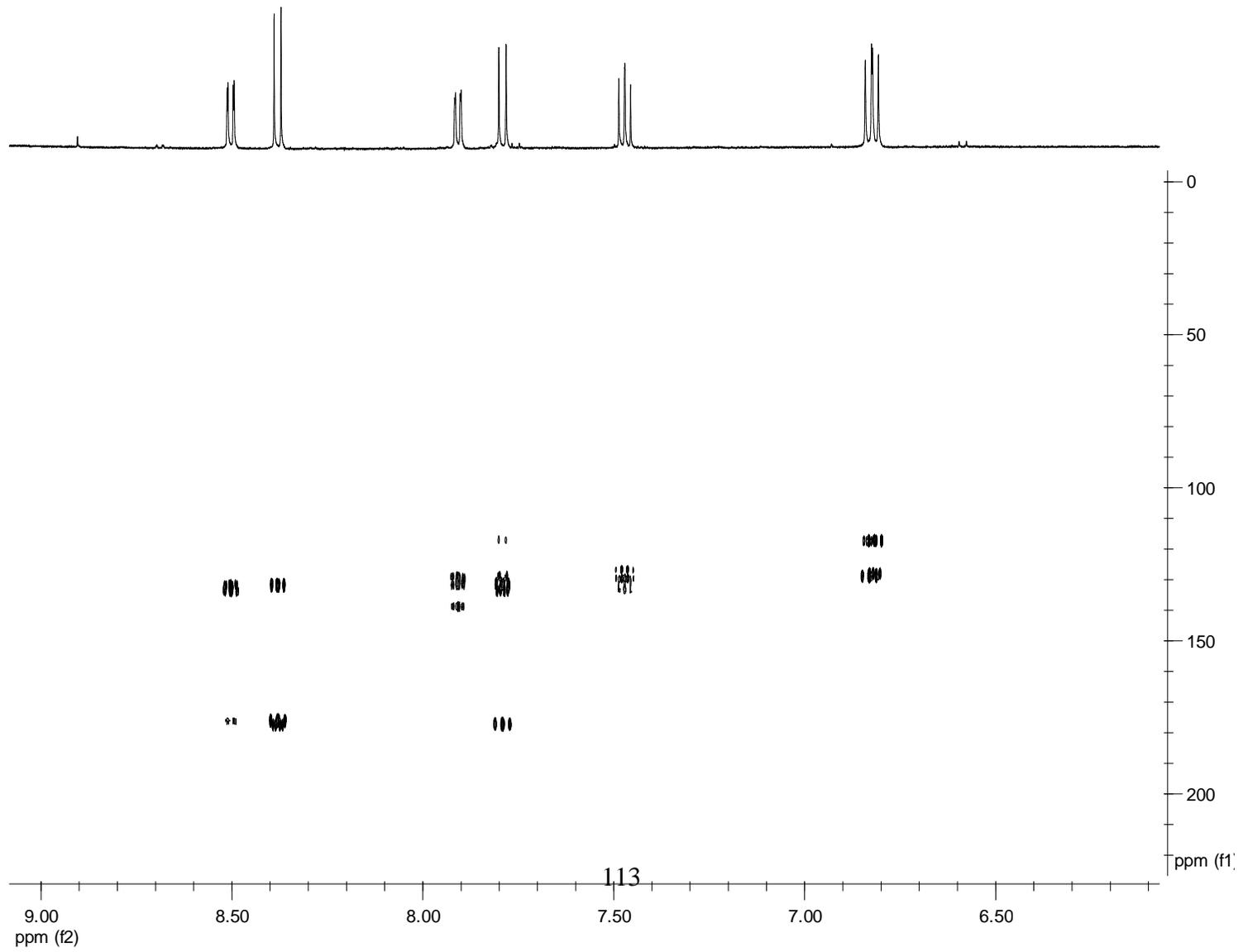
109

ppm (f1)

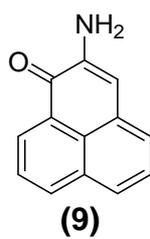


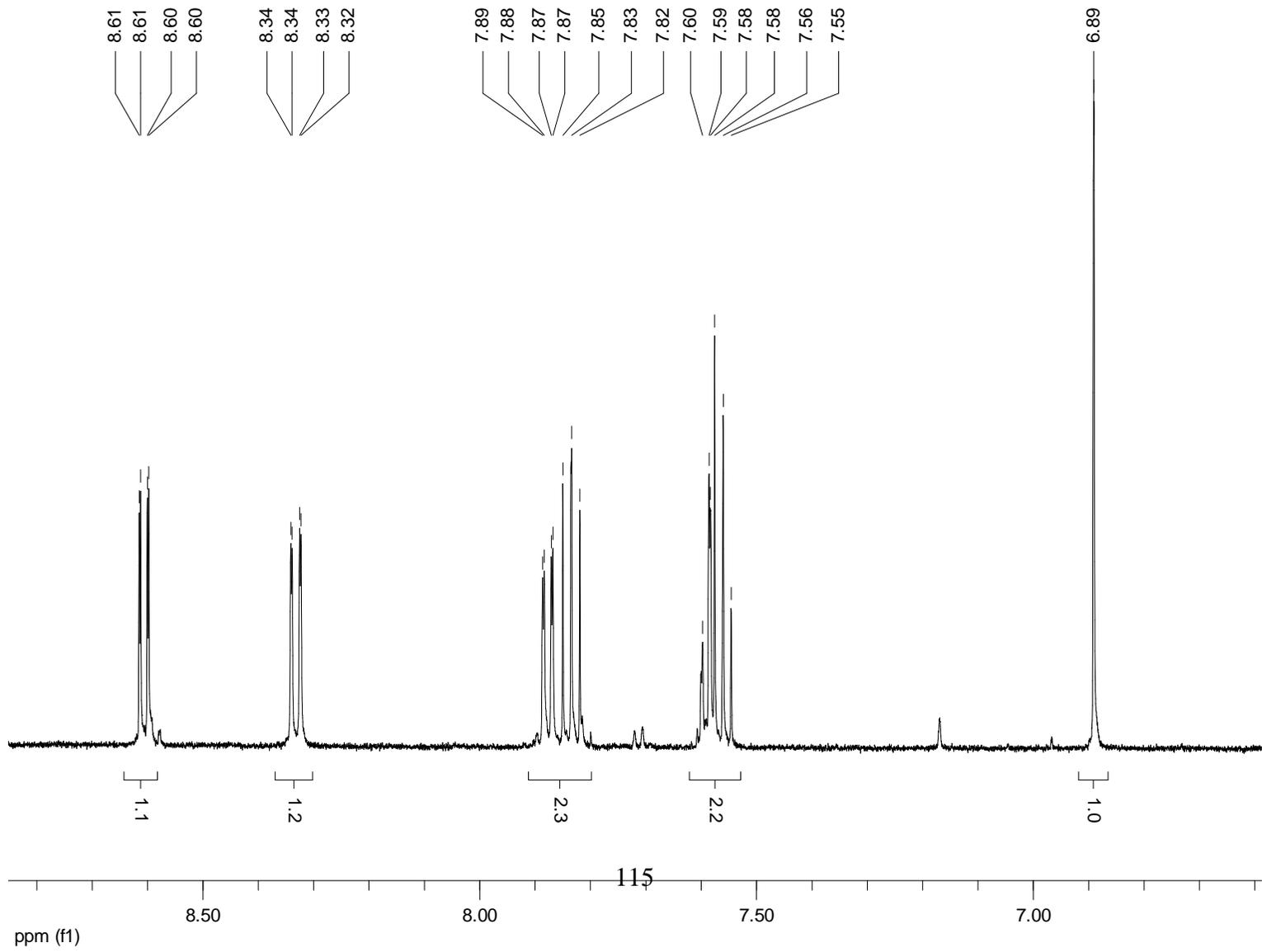


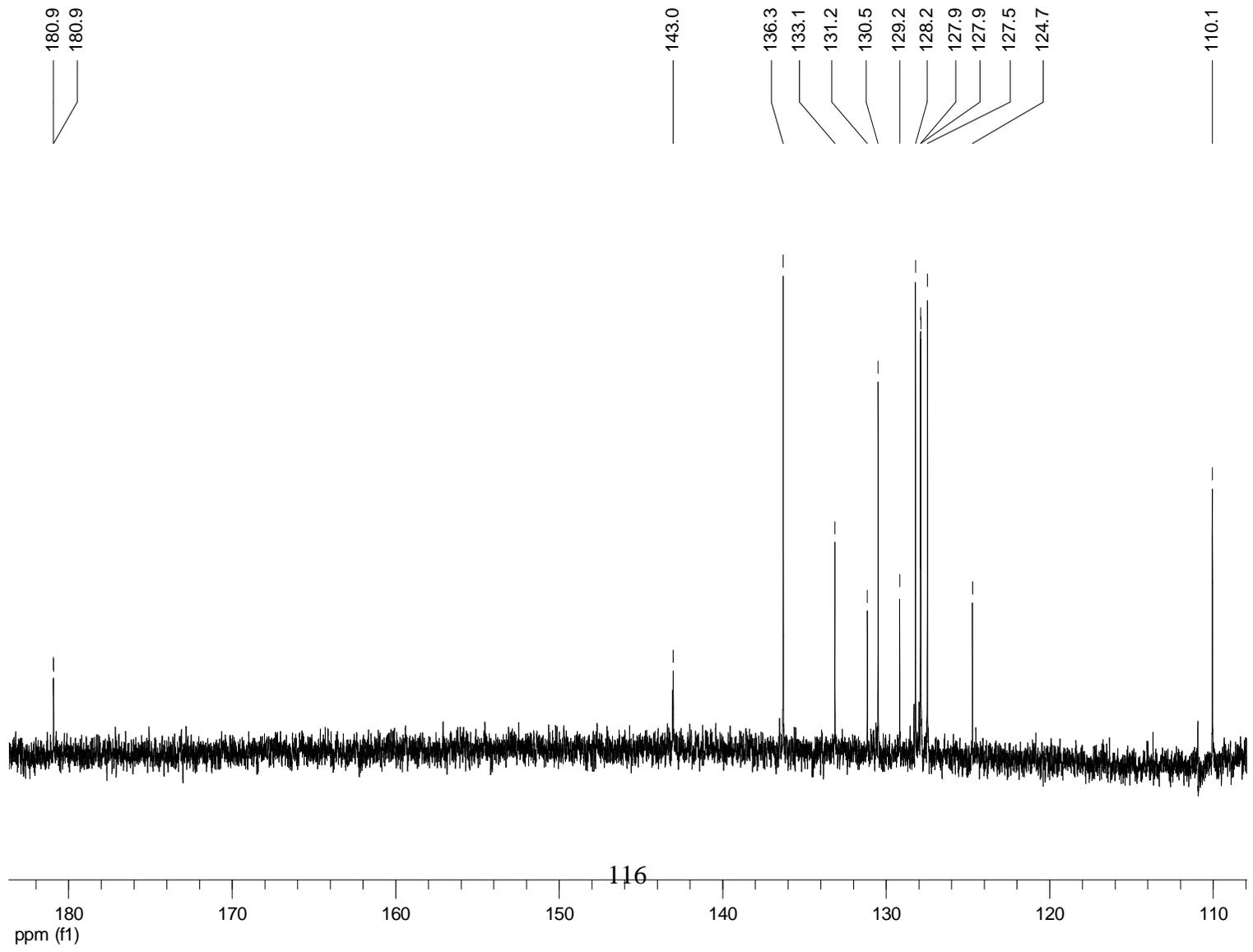


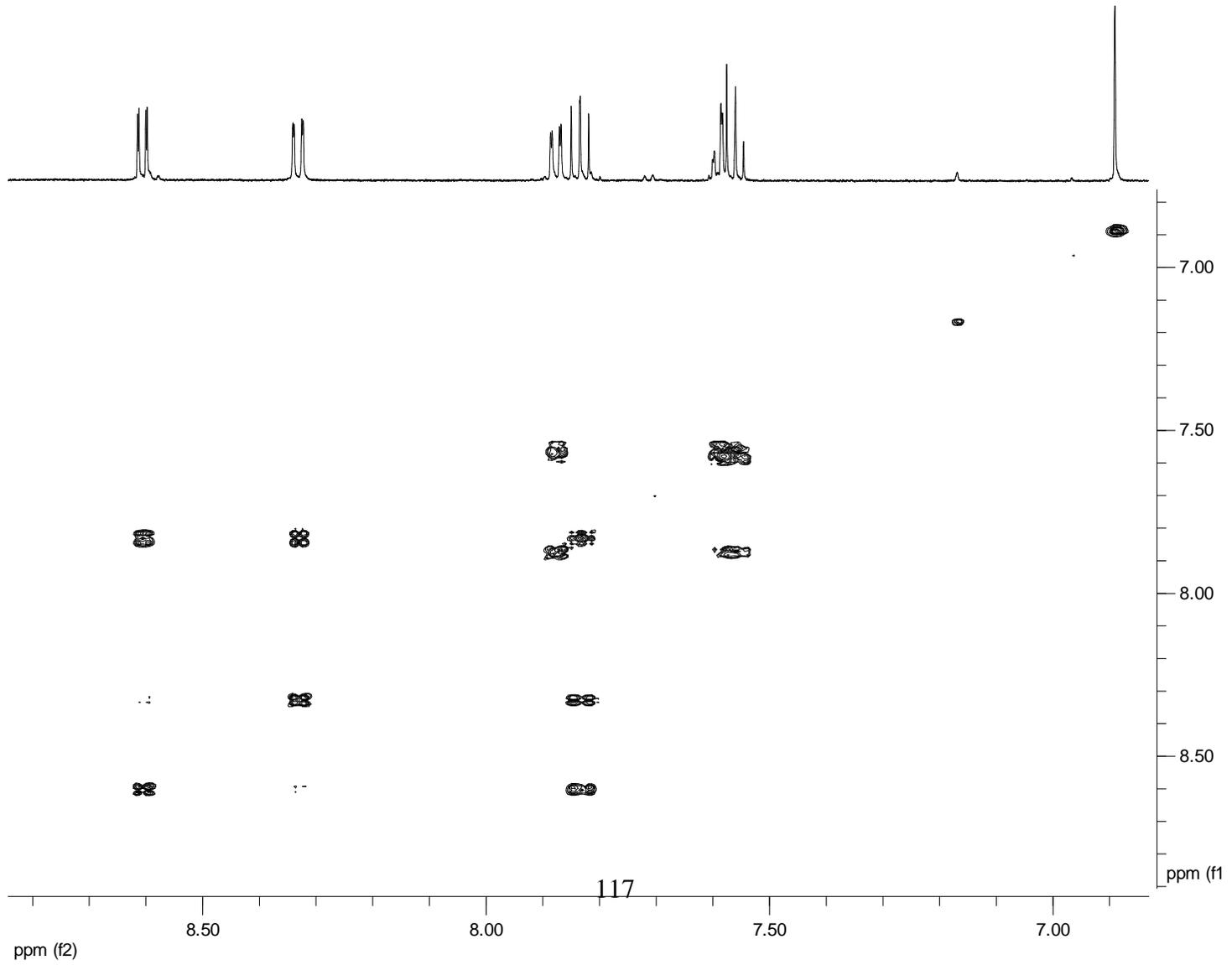


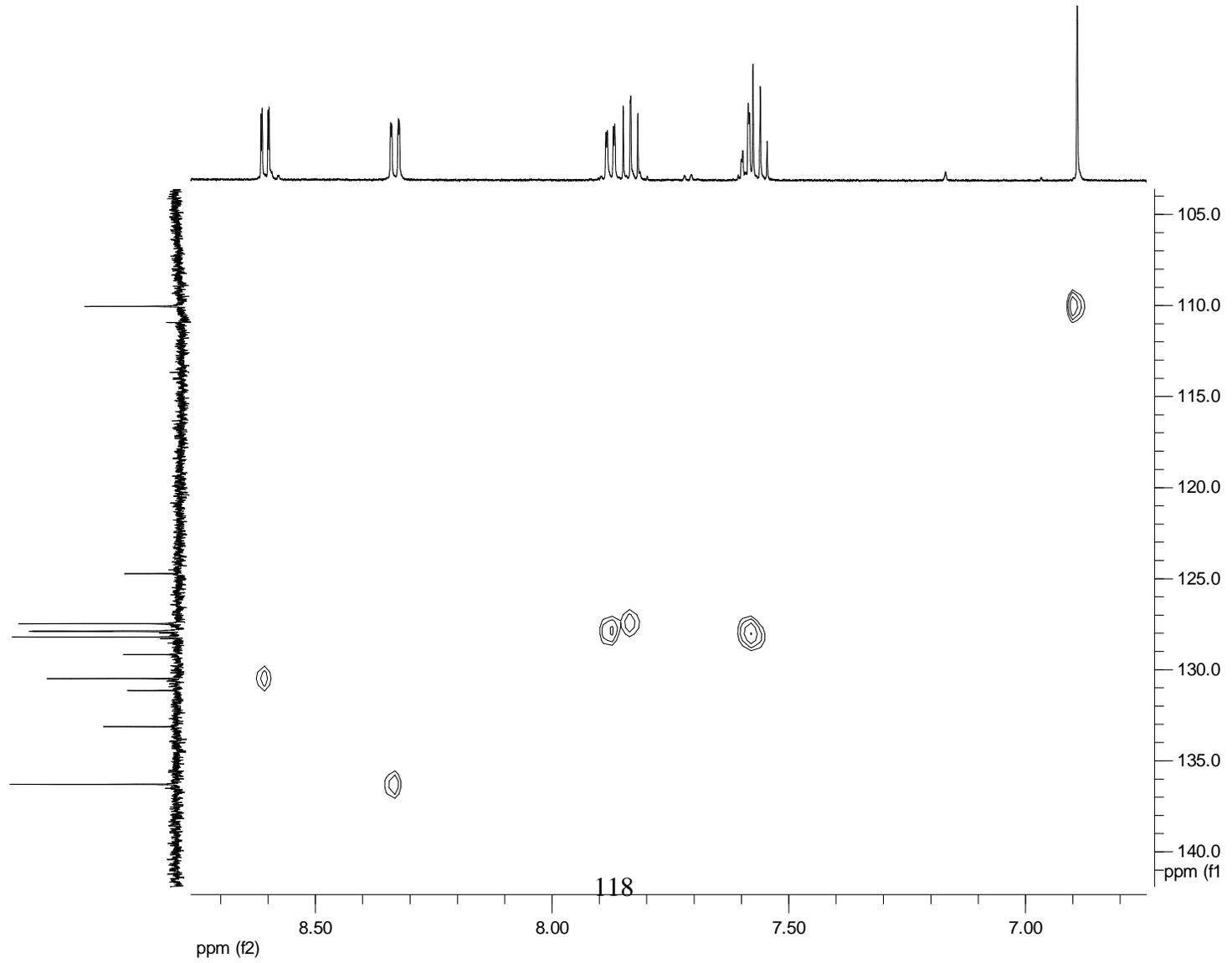
2-amino-1*H*-fenalen-1-ona

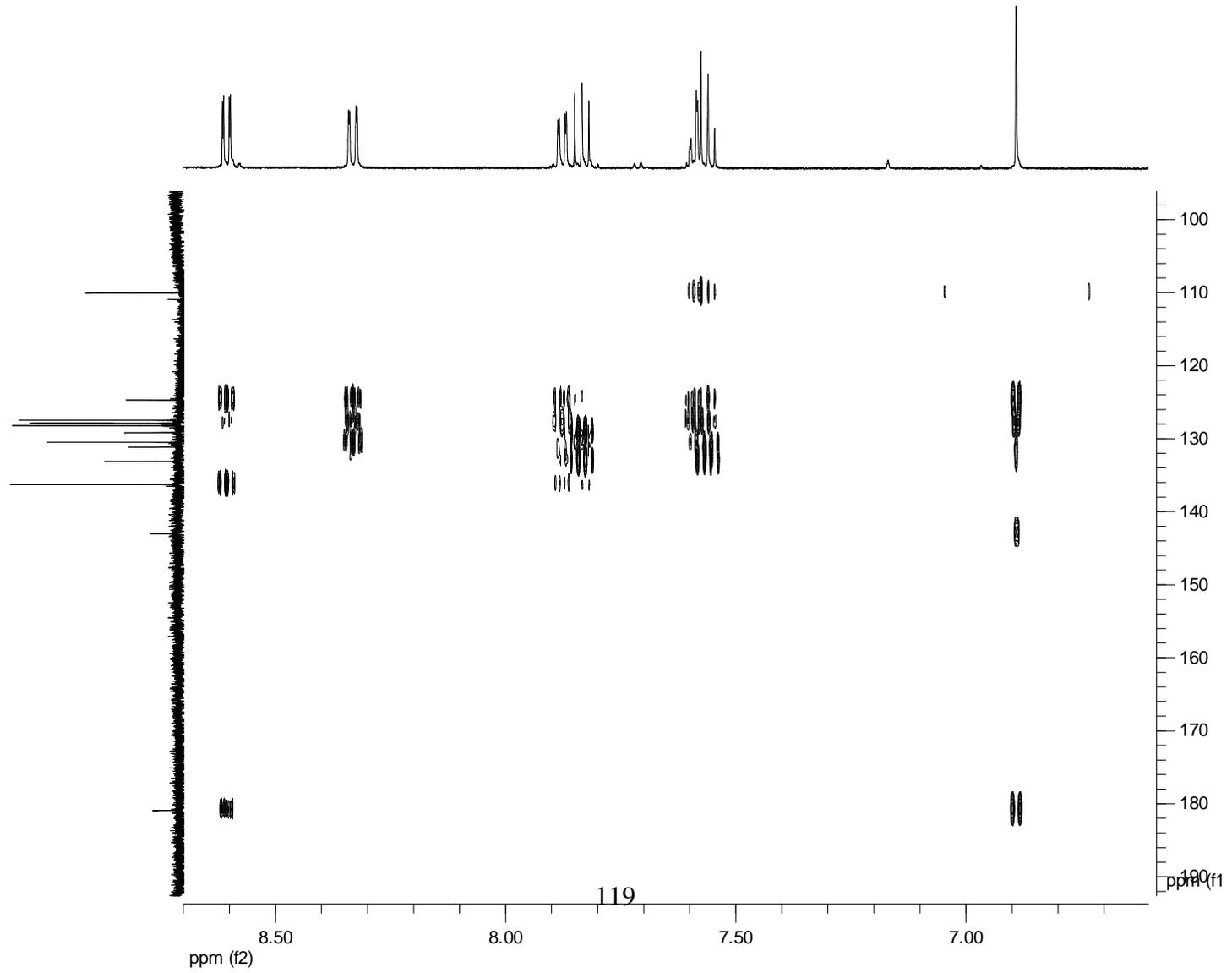




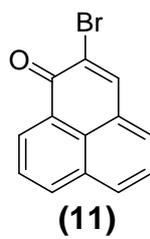


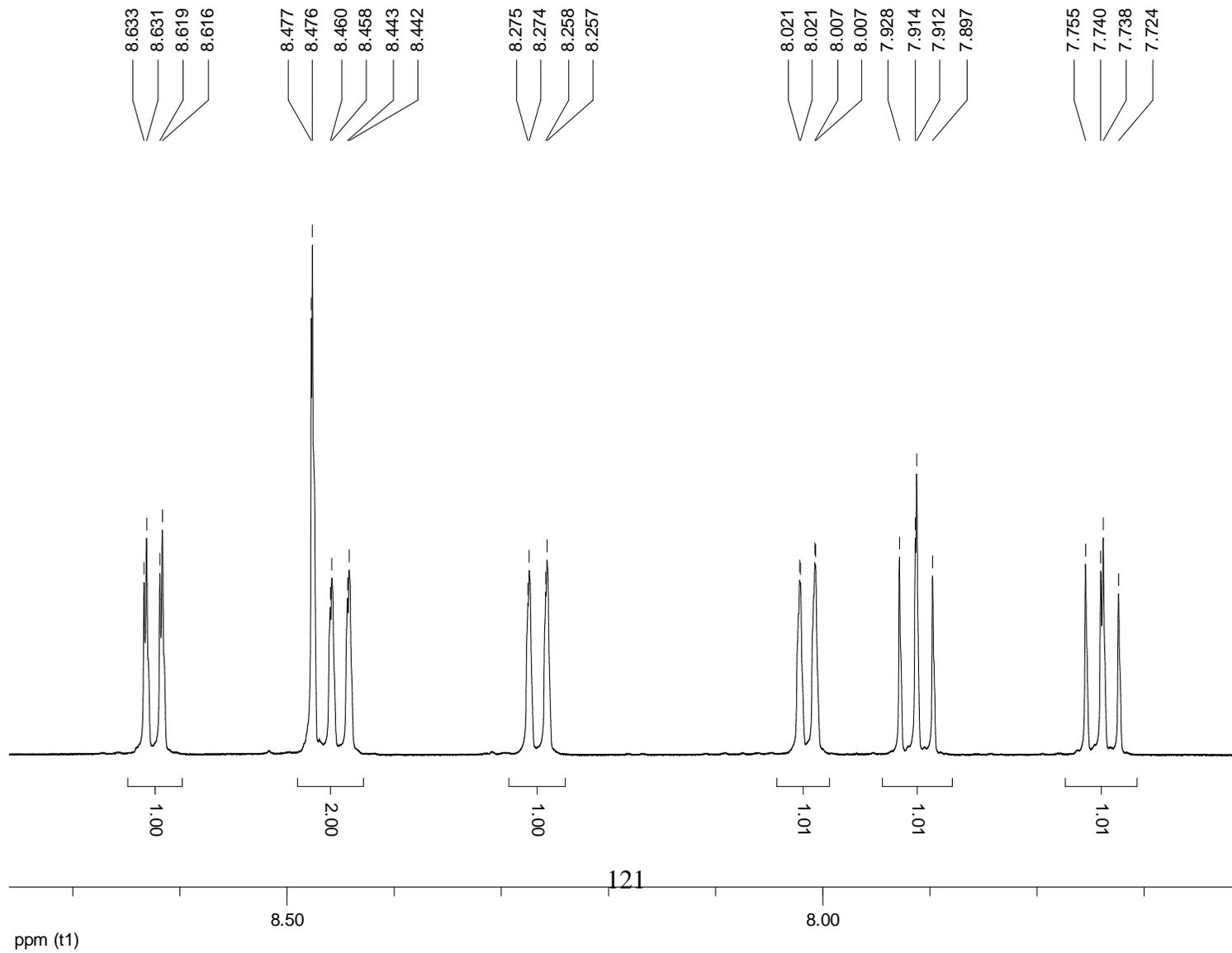


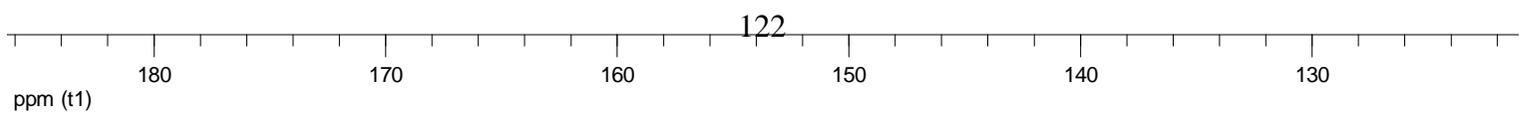
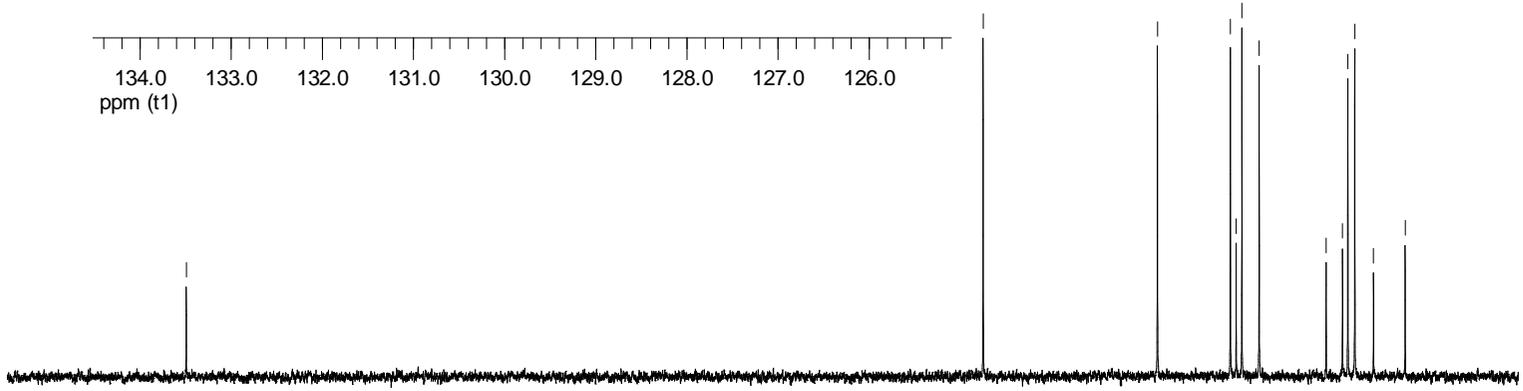
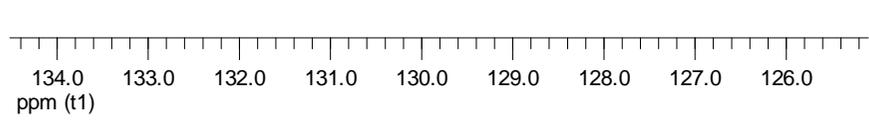
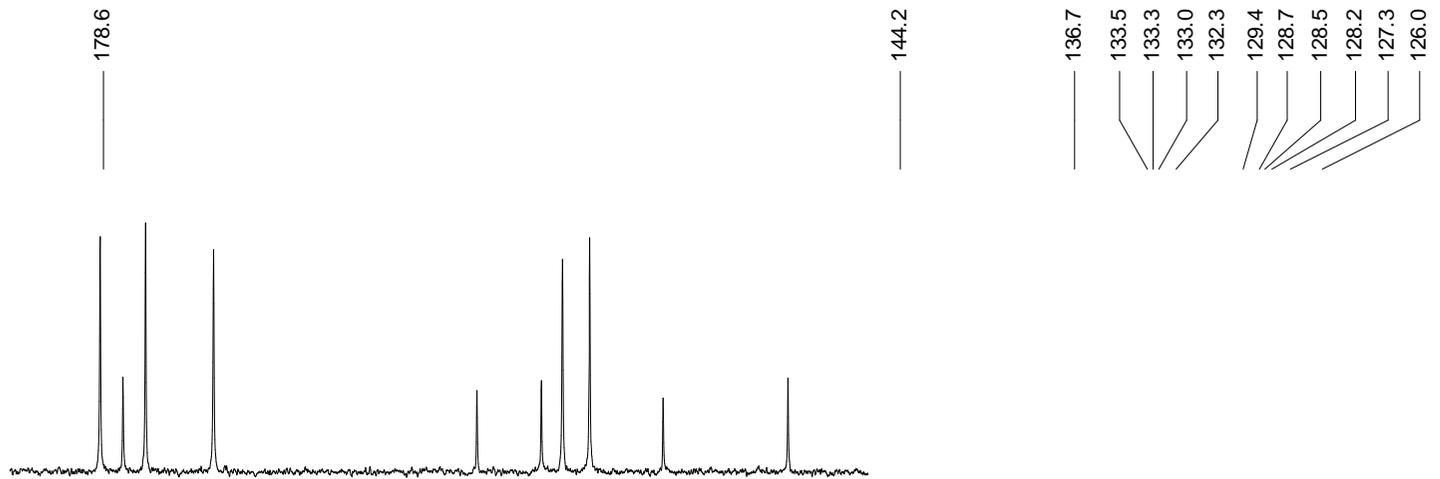


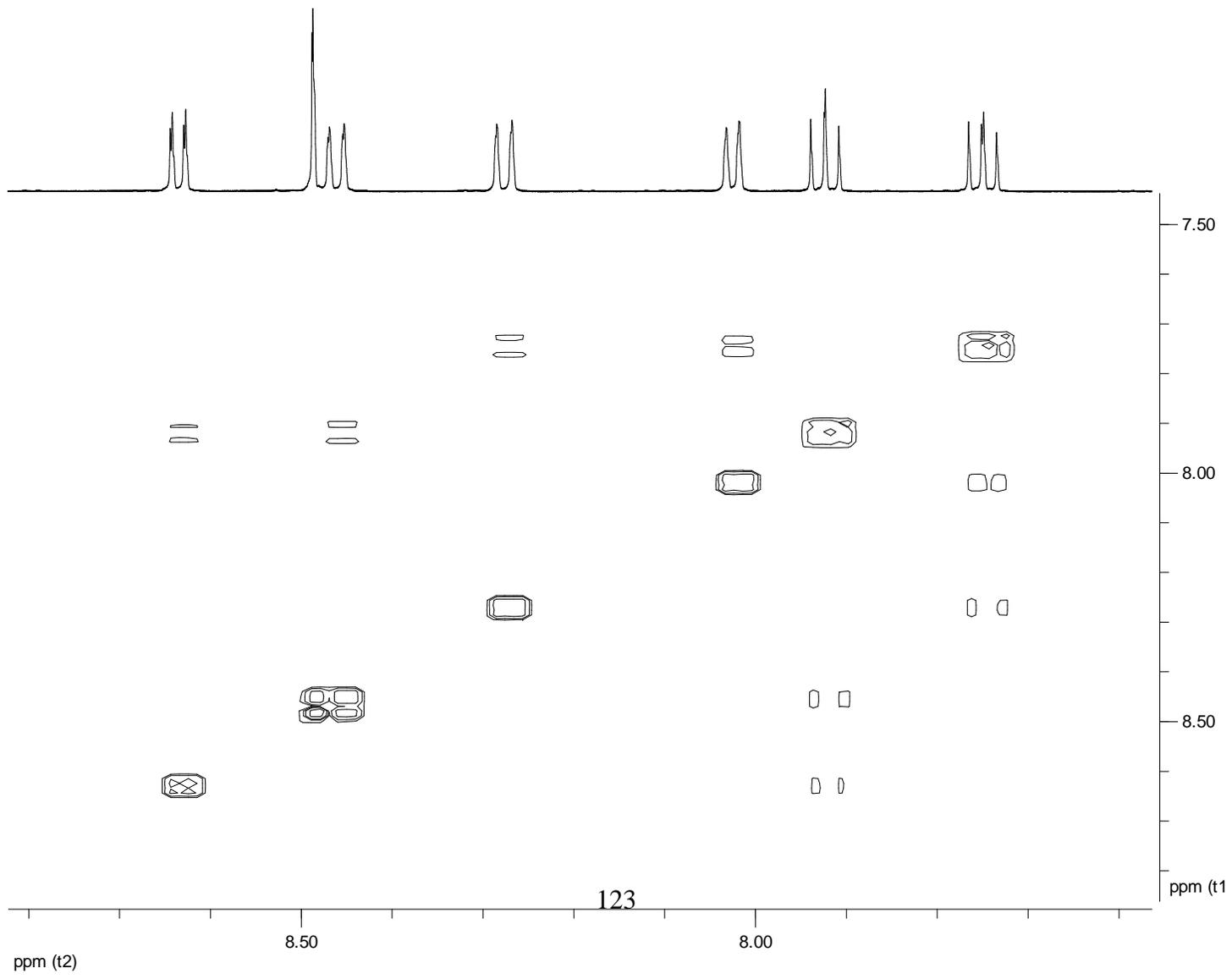


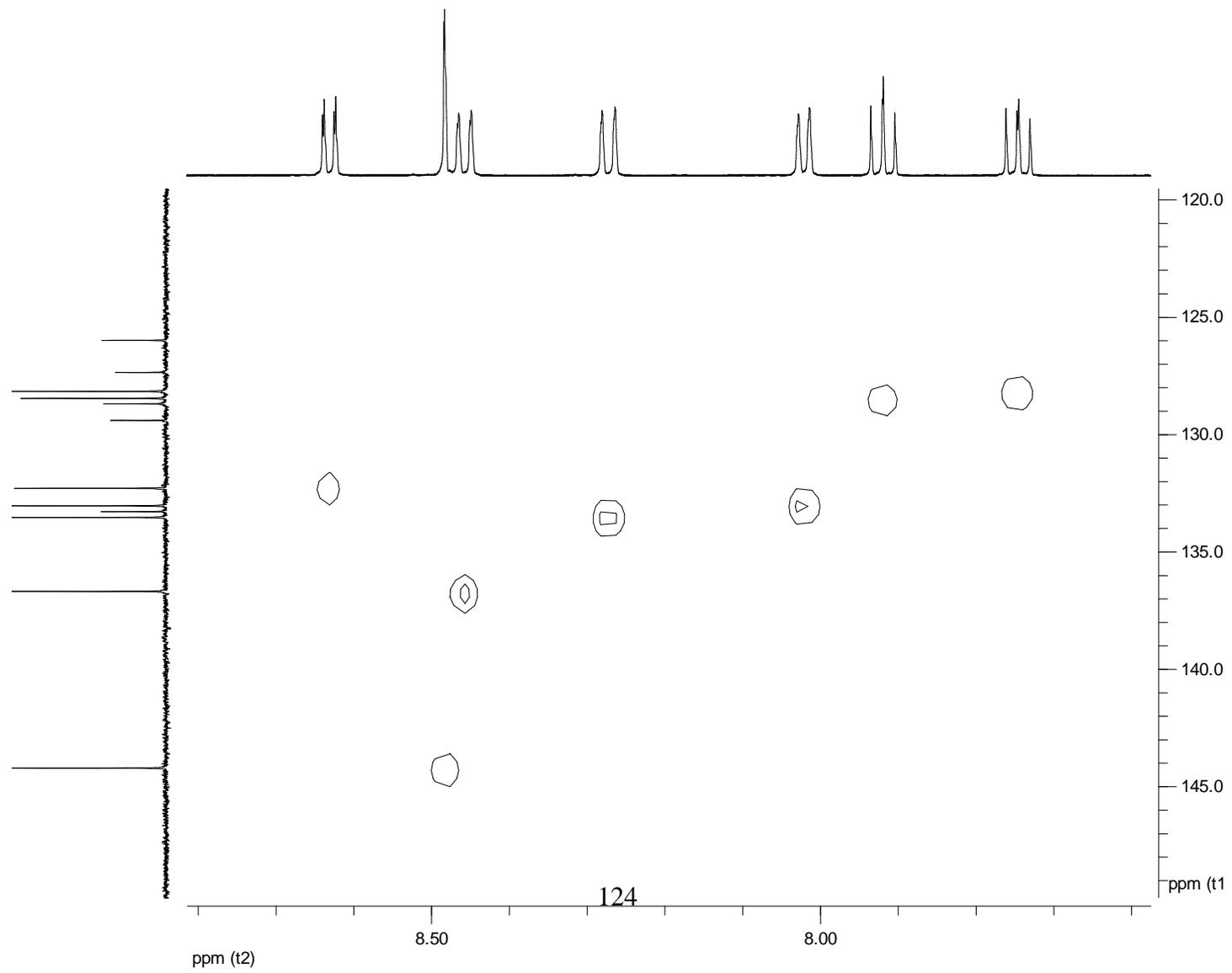
2-bromo-1*H*-fenalen-1-ona

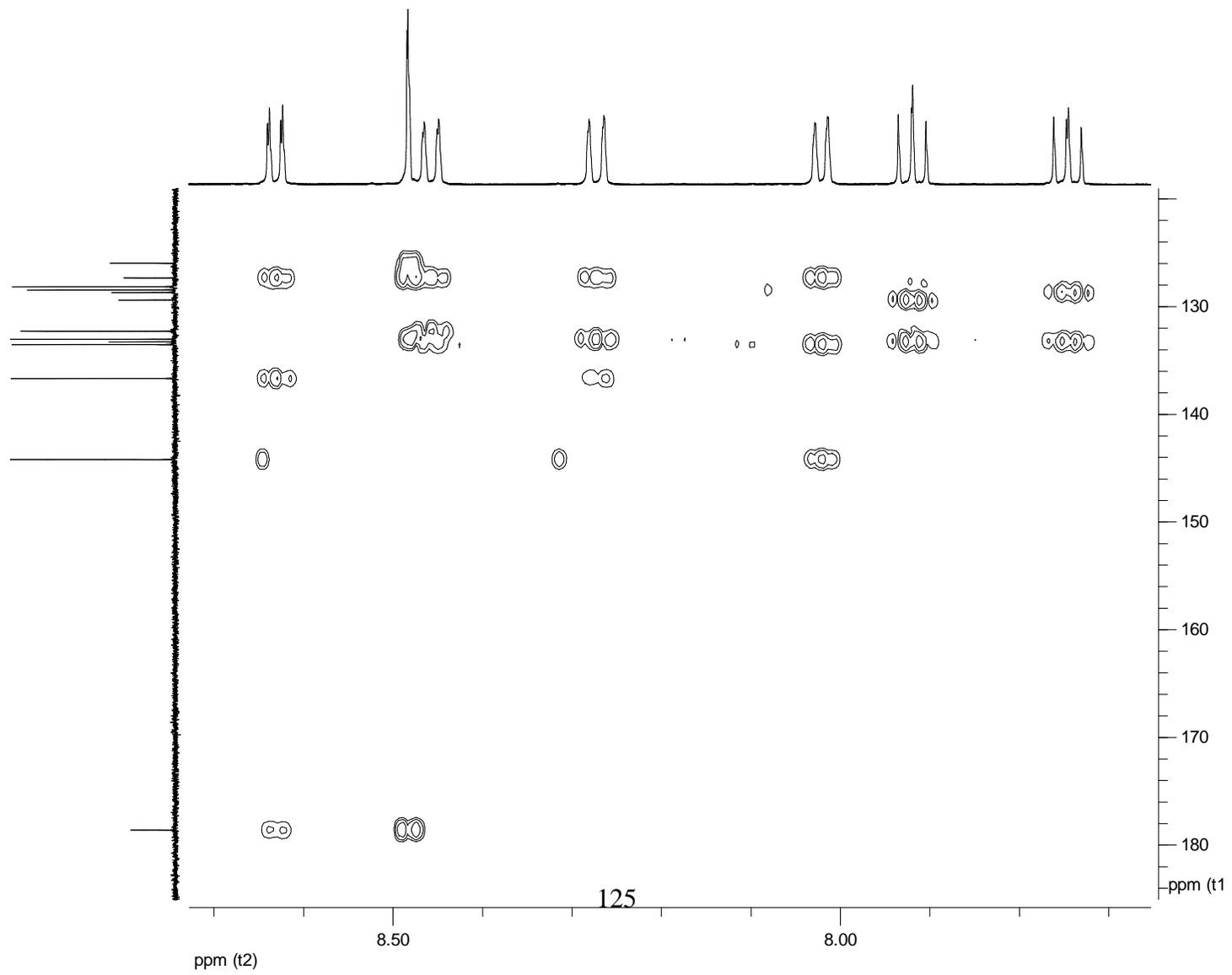




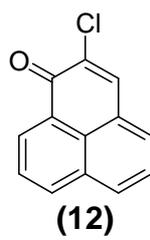


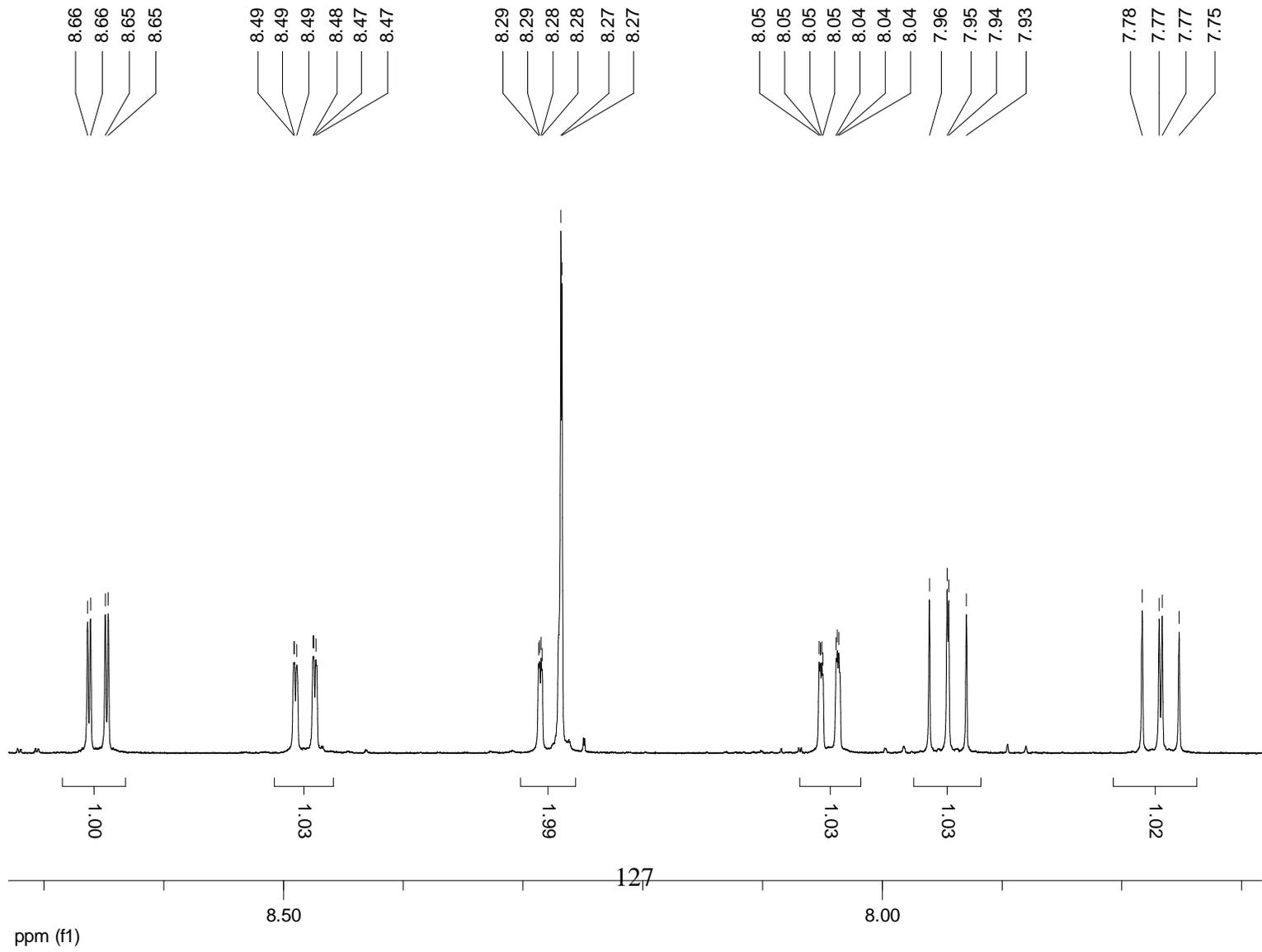


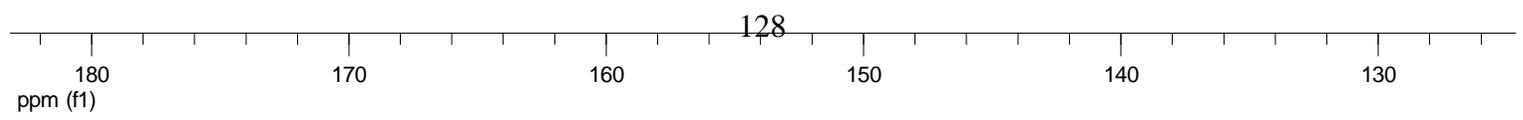
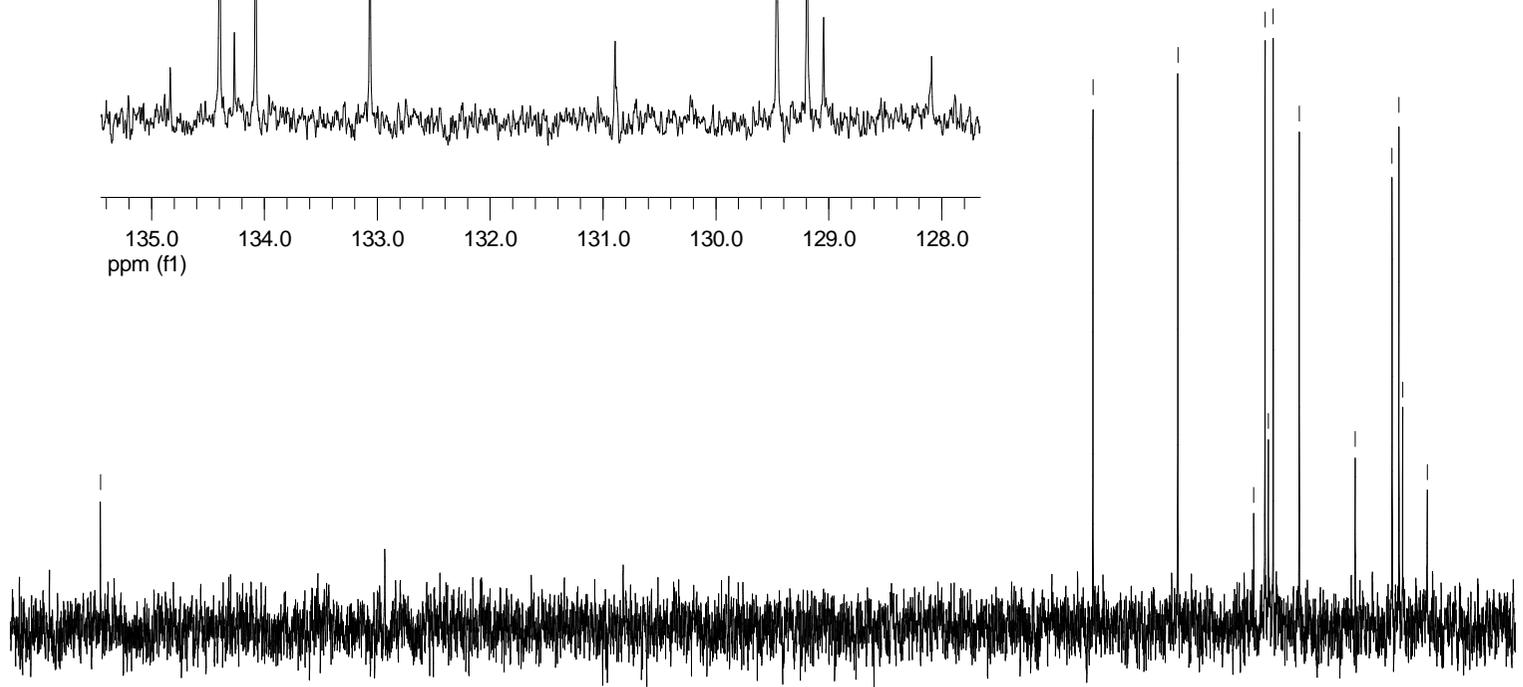
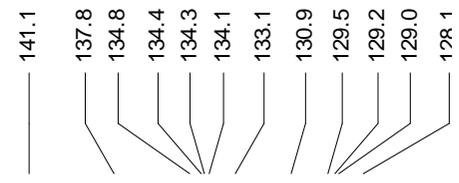
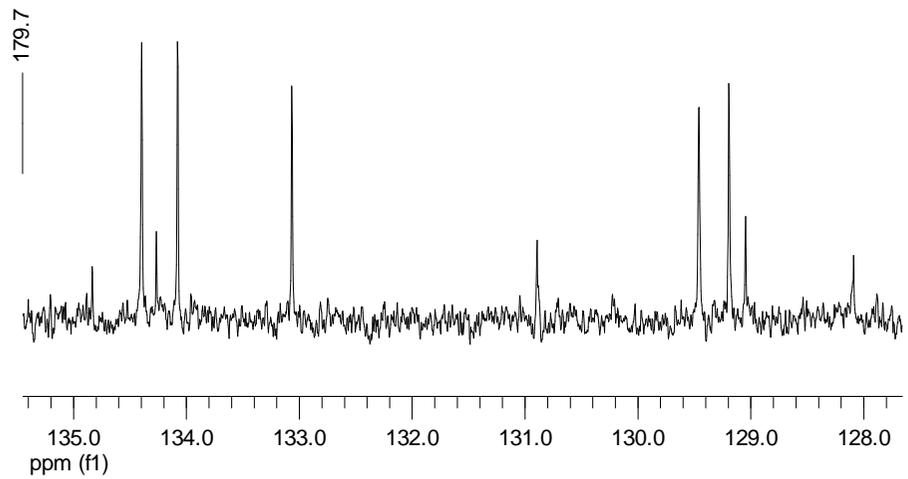


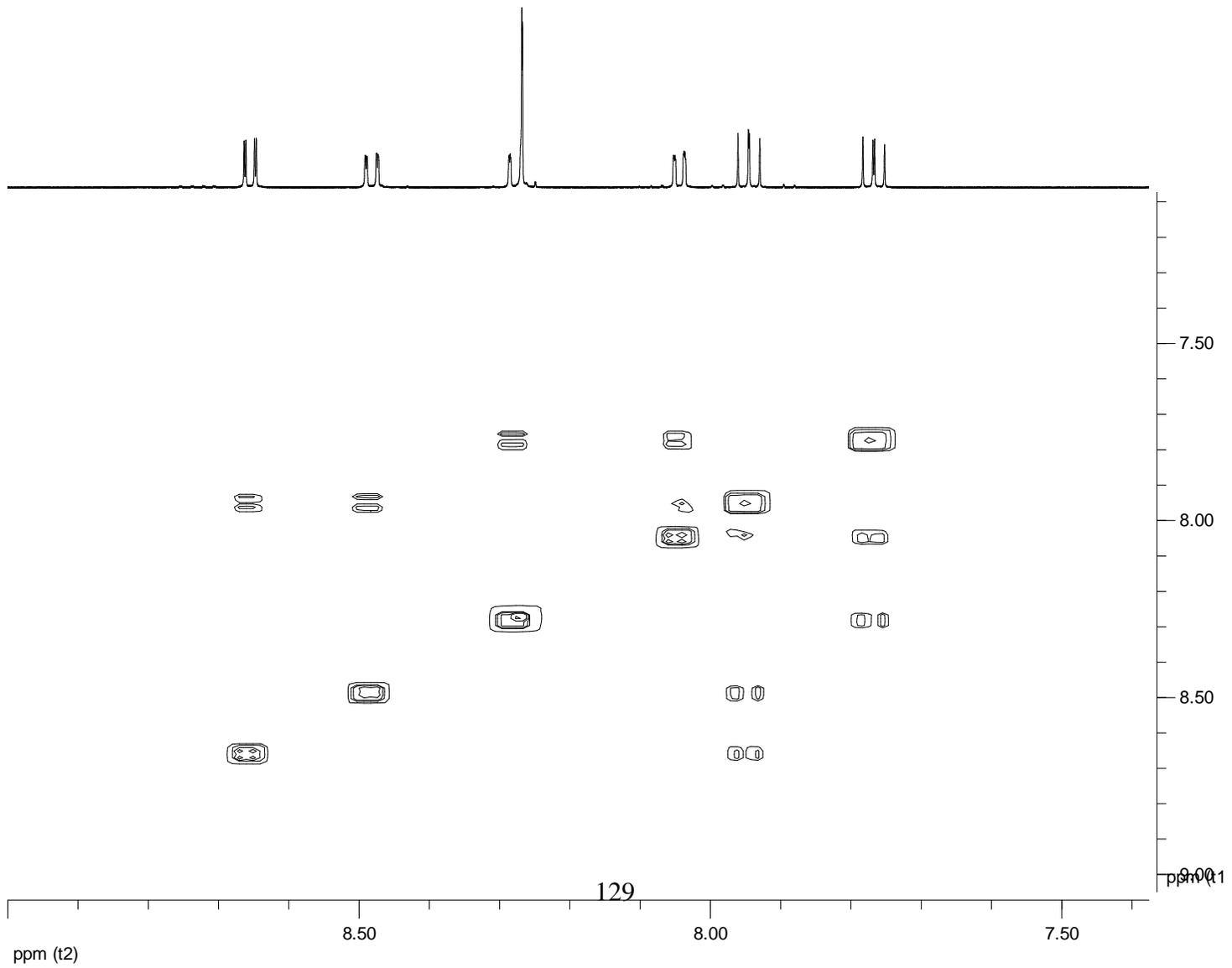


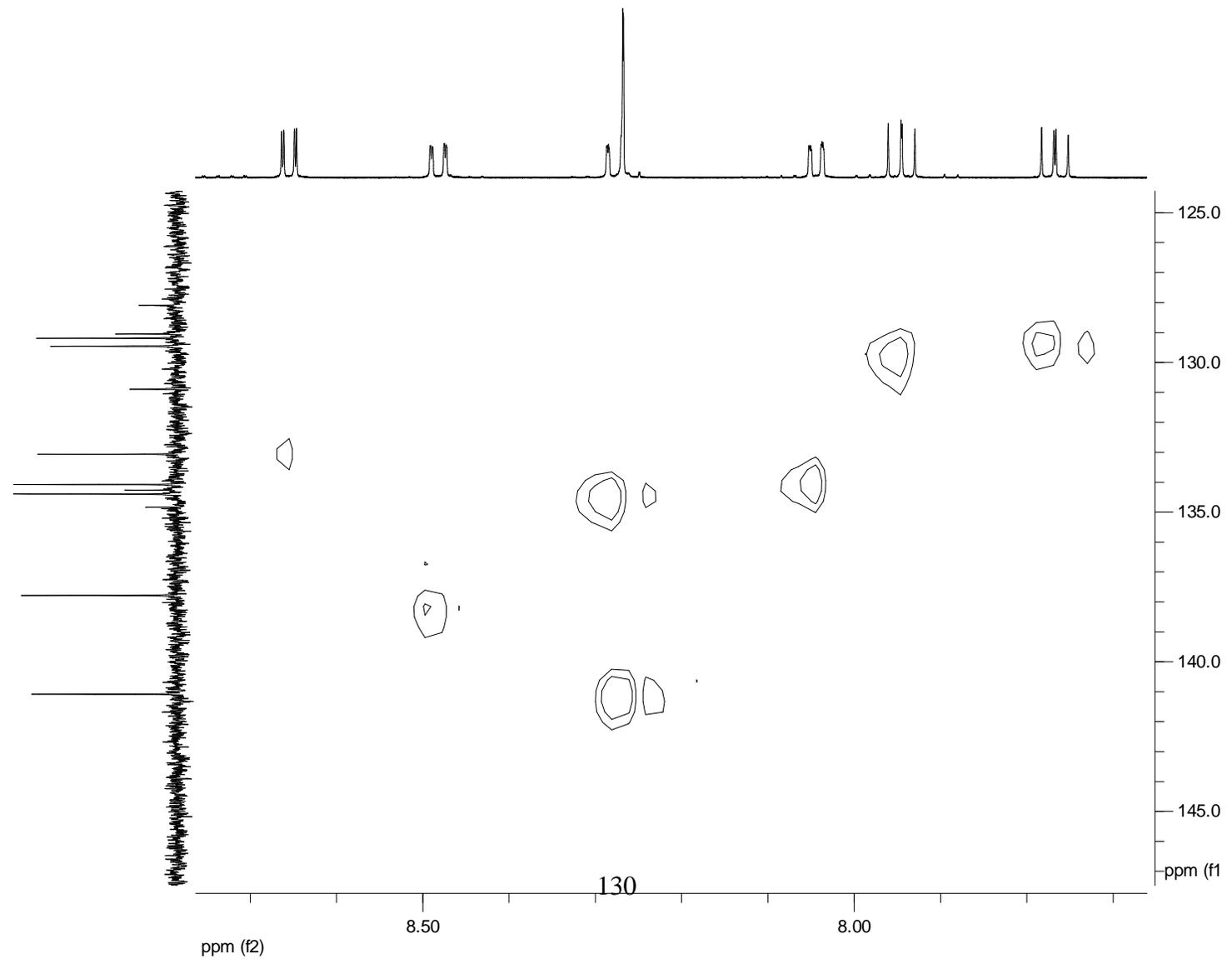
2-cloro-1*H*-fenalen-1-ona

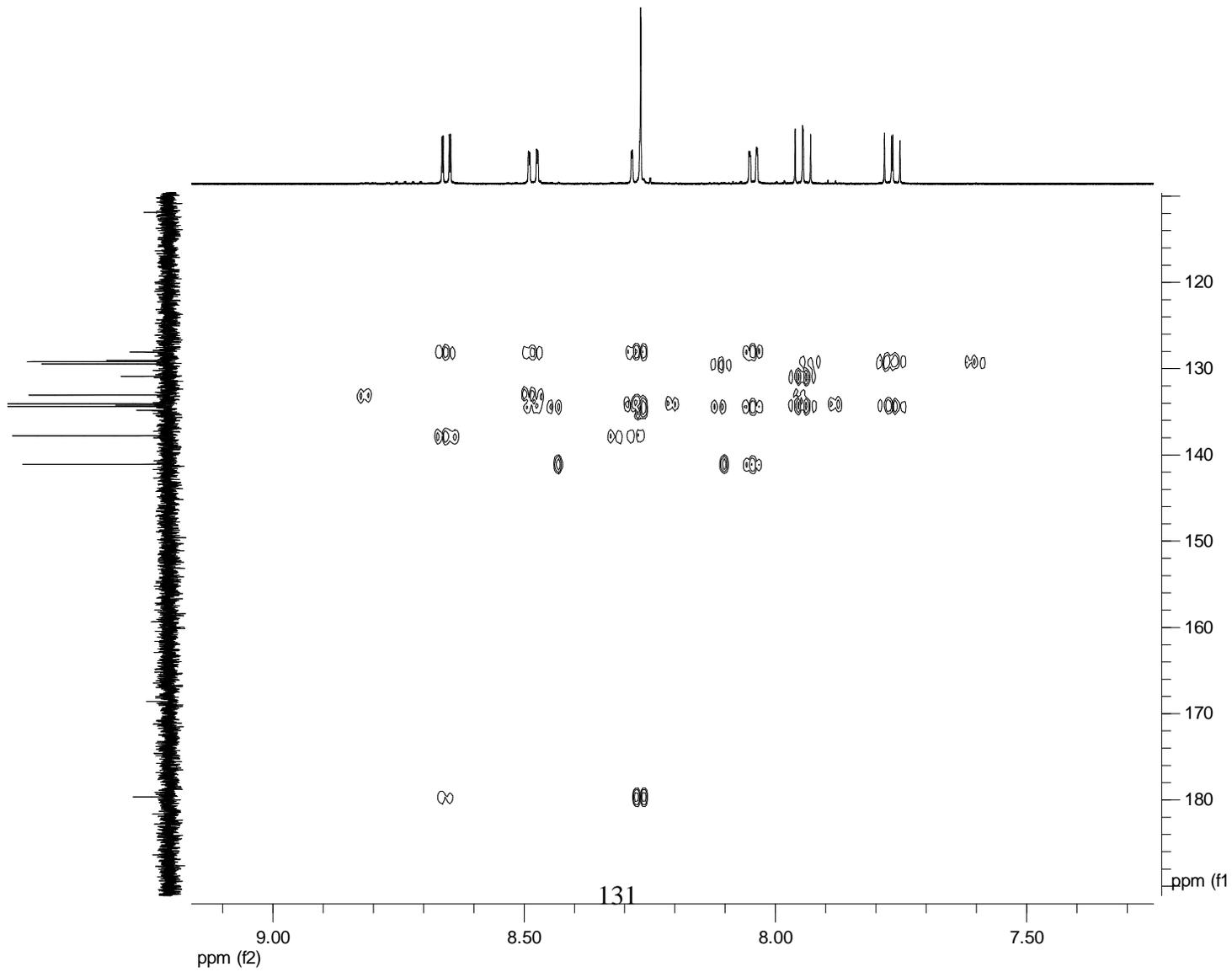




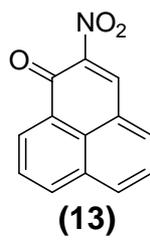


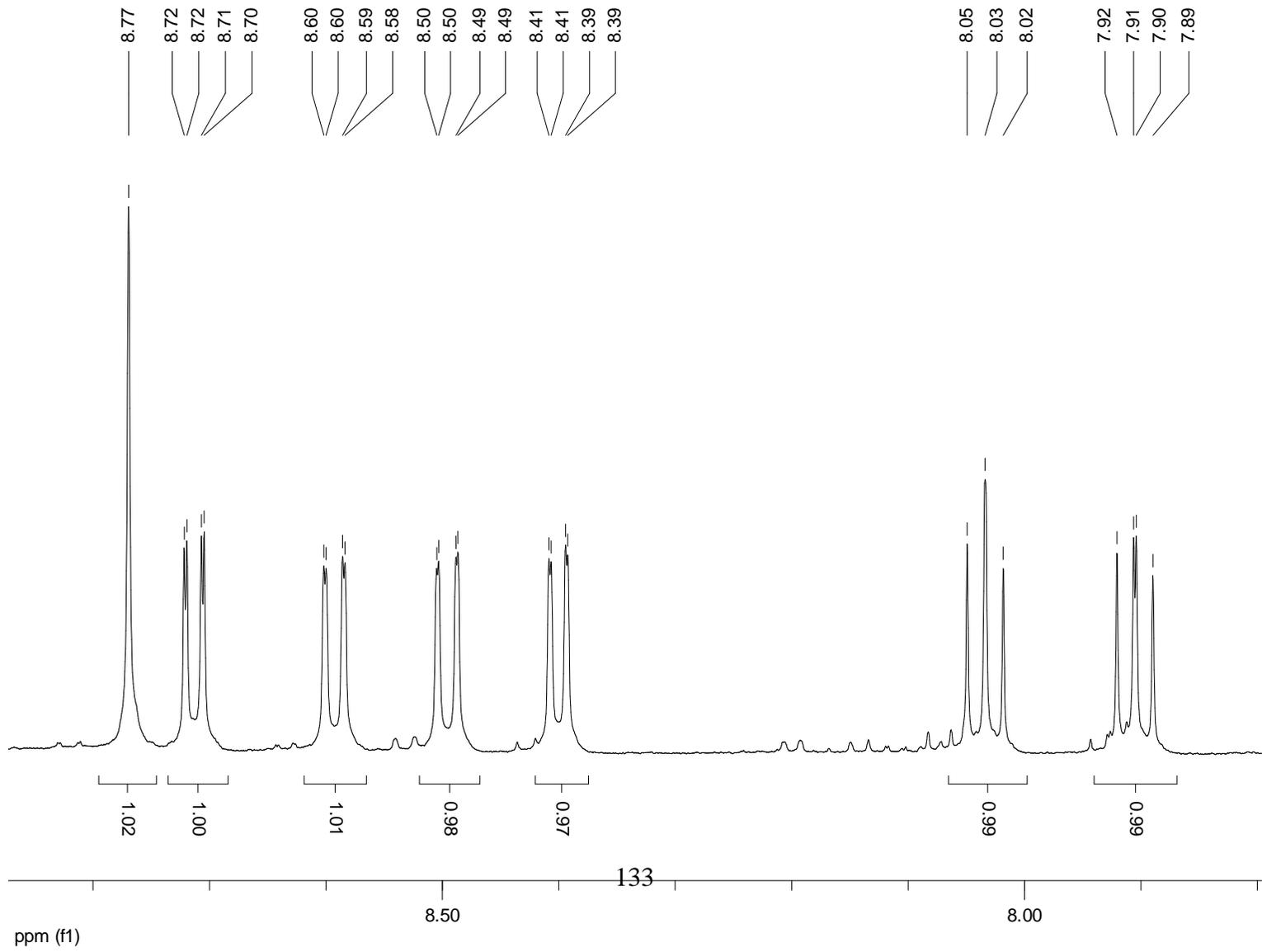


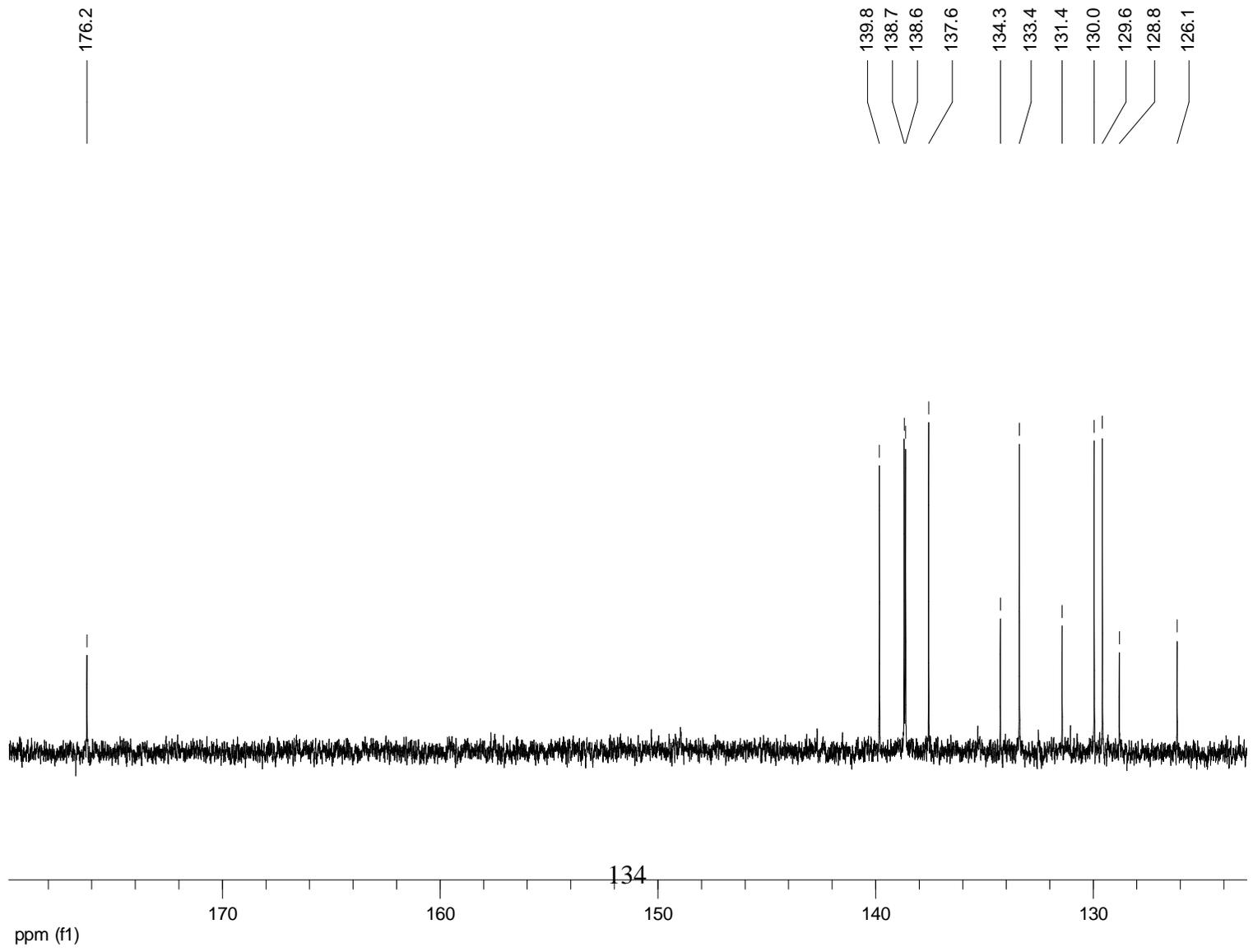


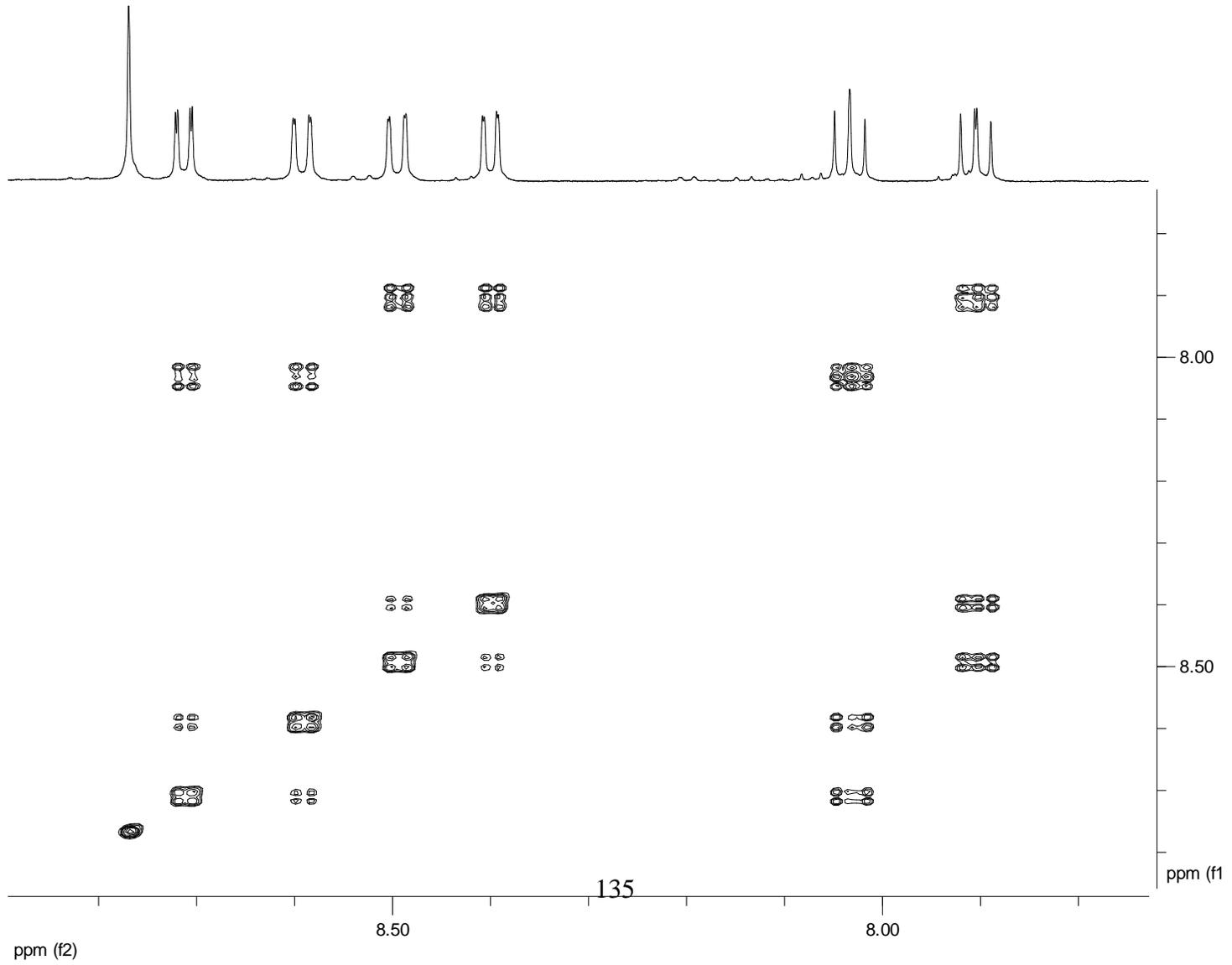


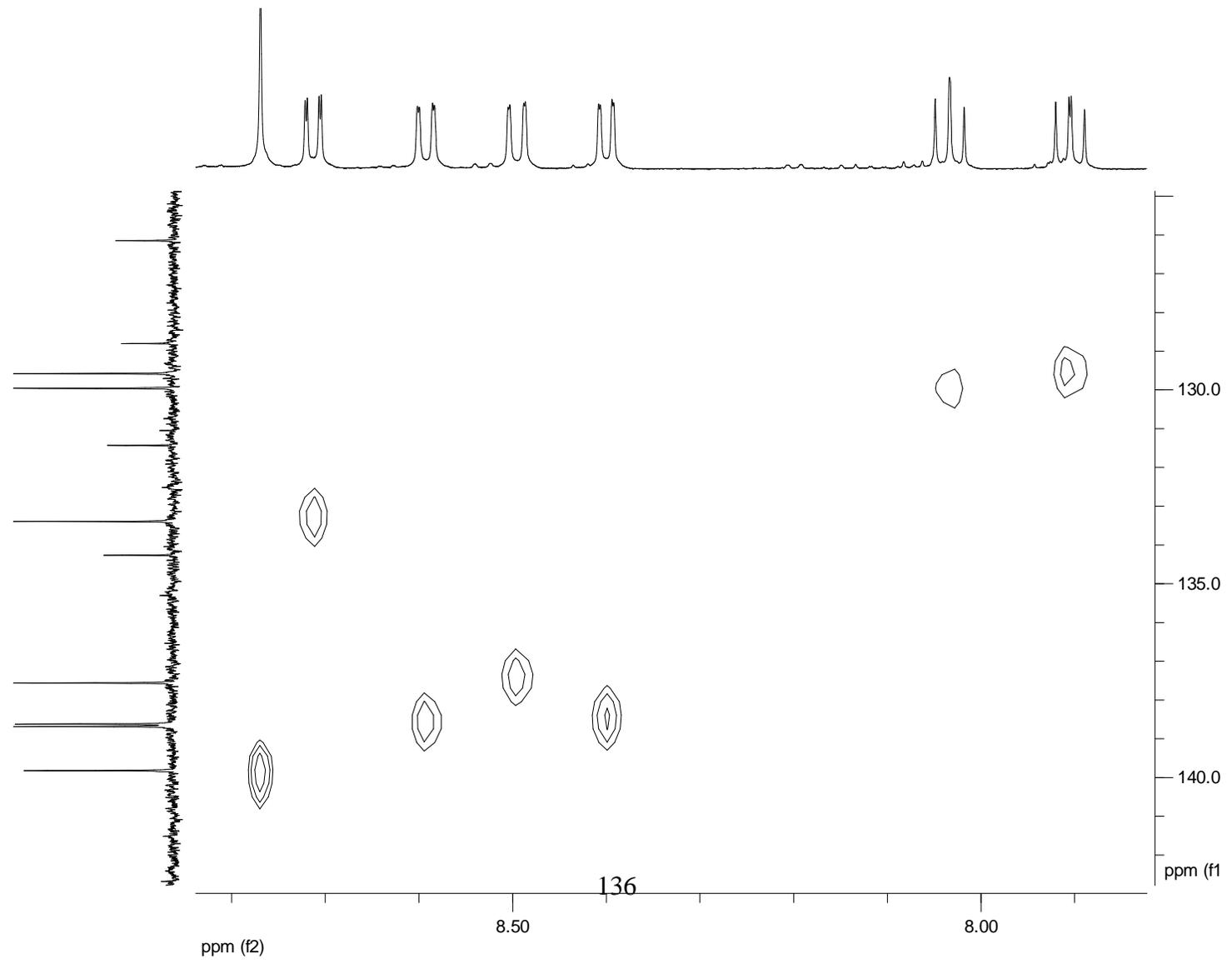
2-nitro-1*H*-fenalen-1-ona

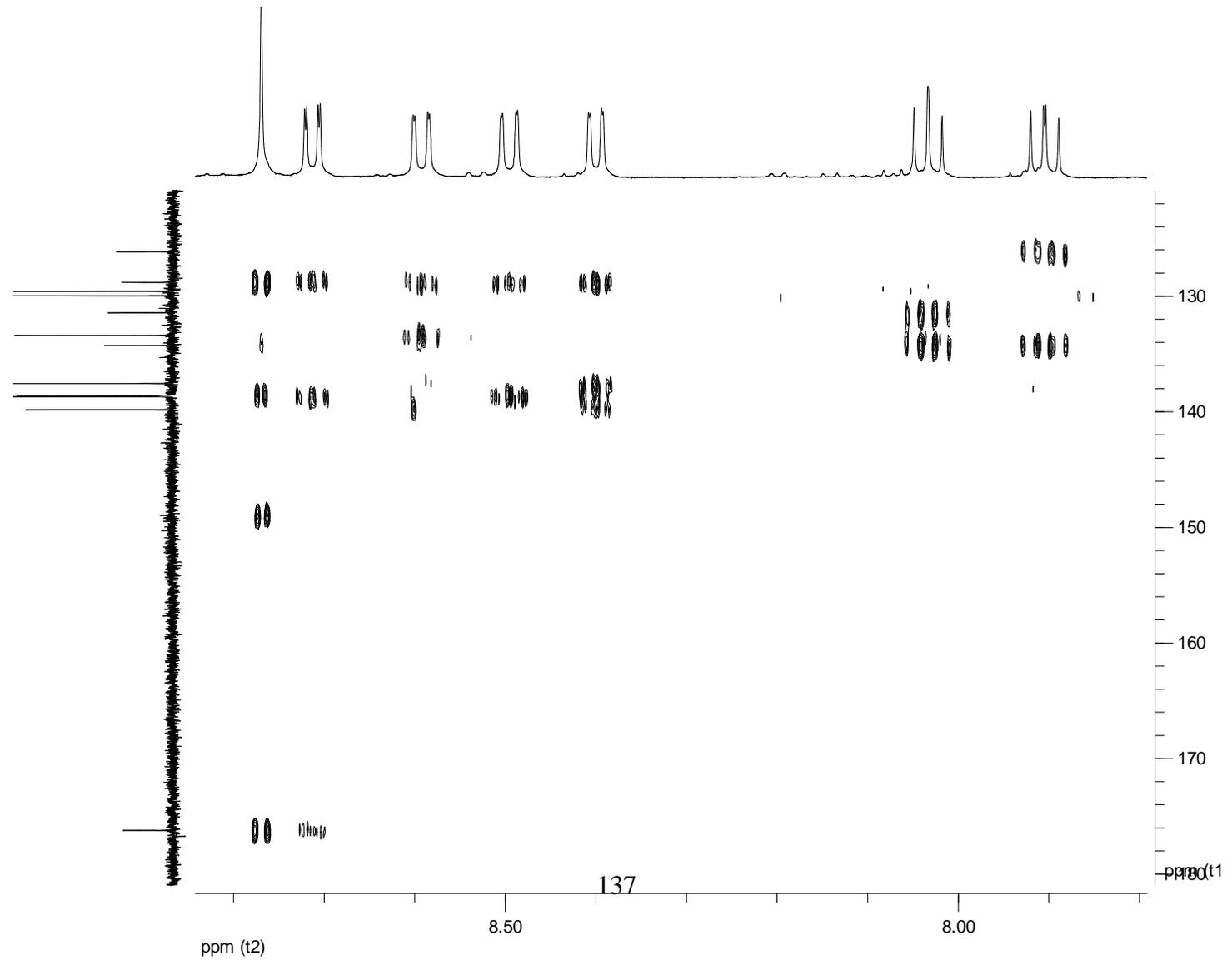




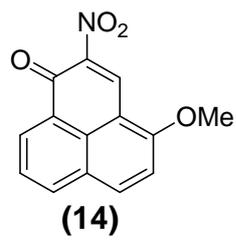


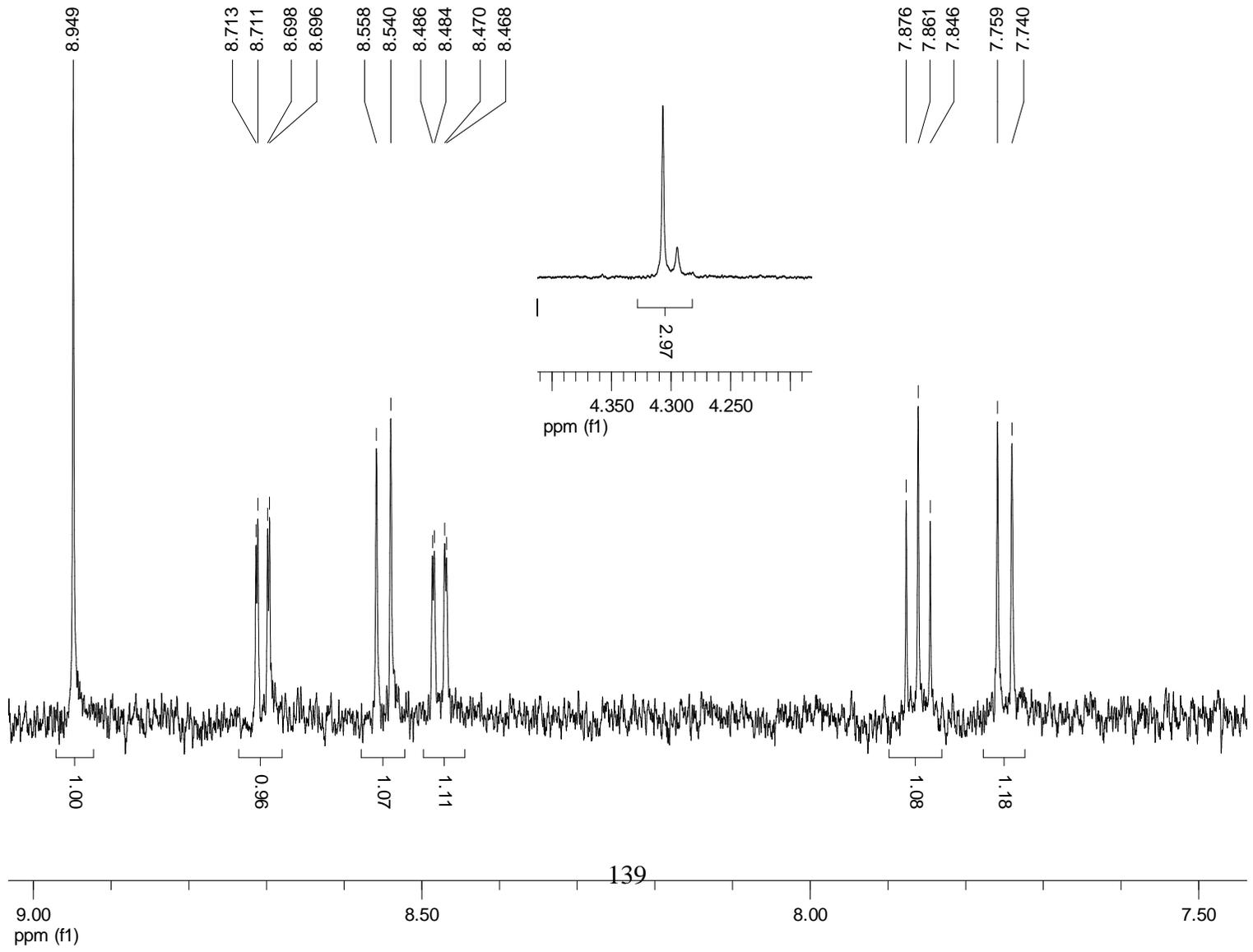


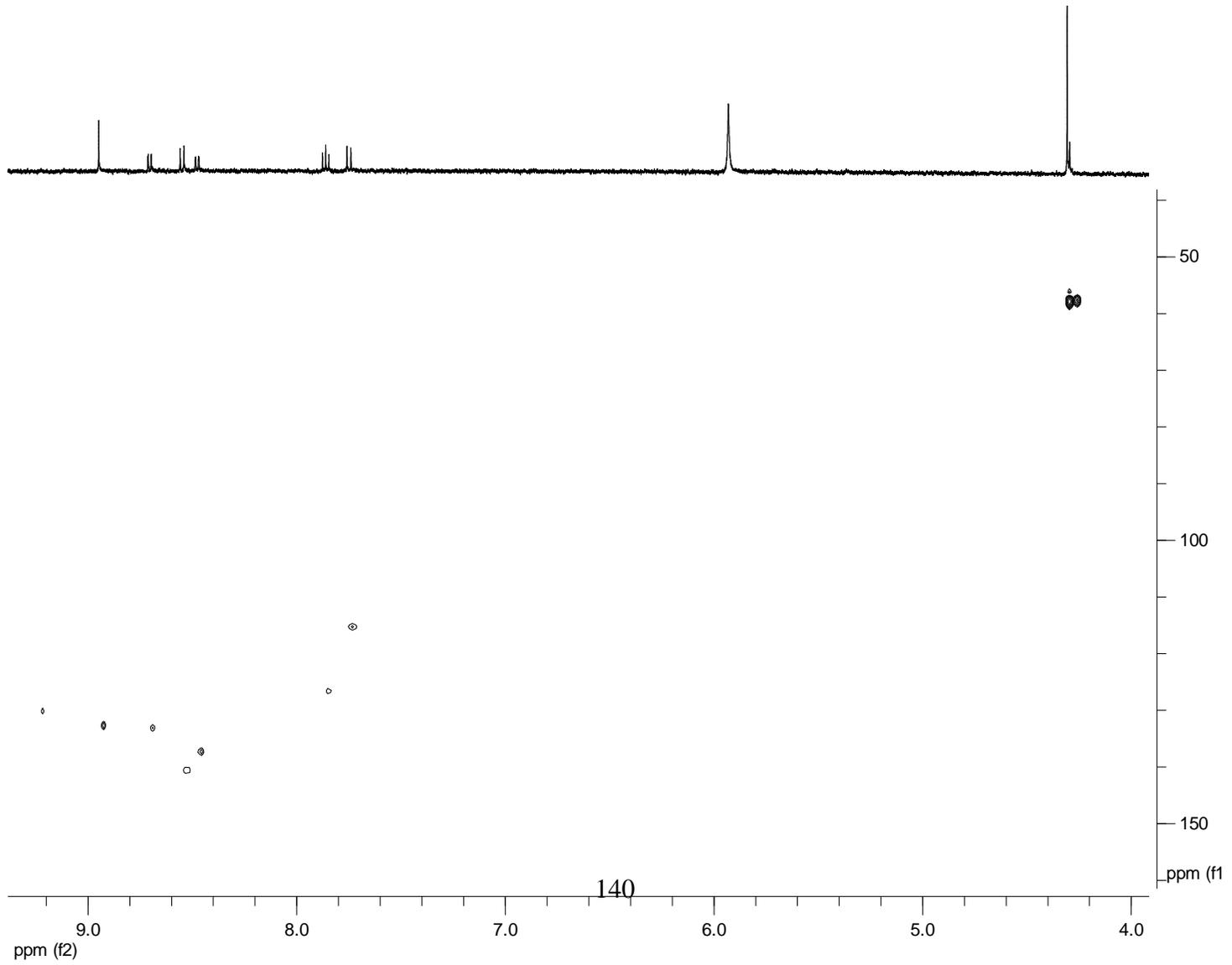


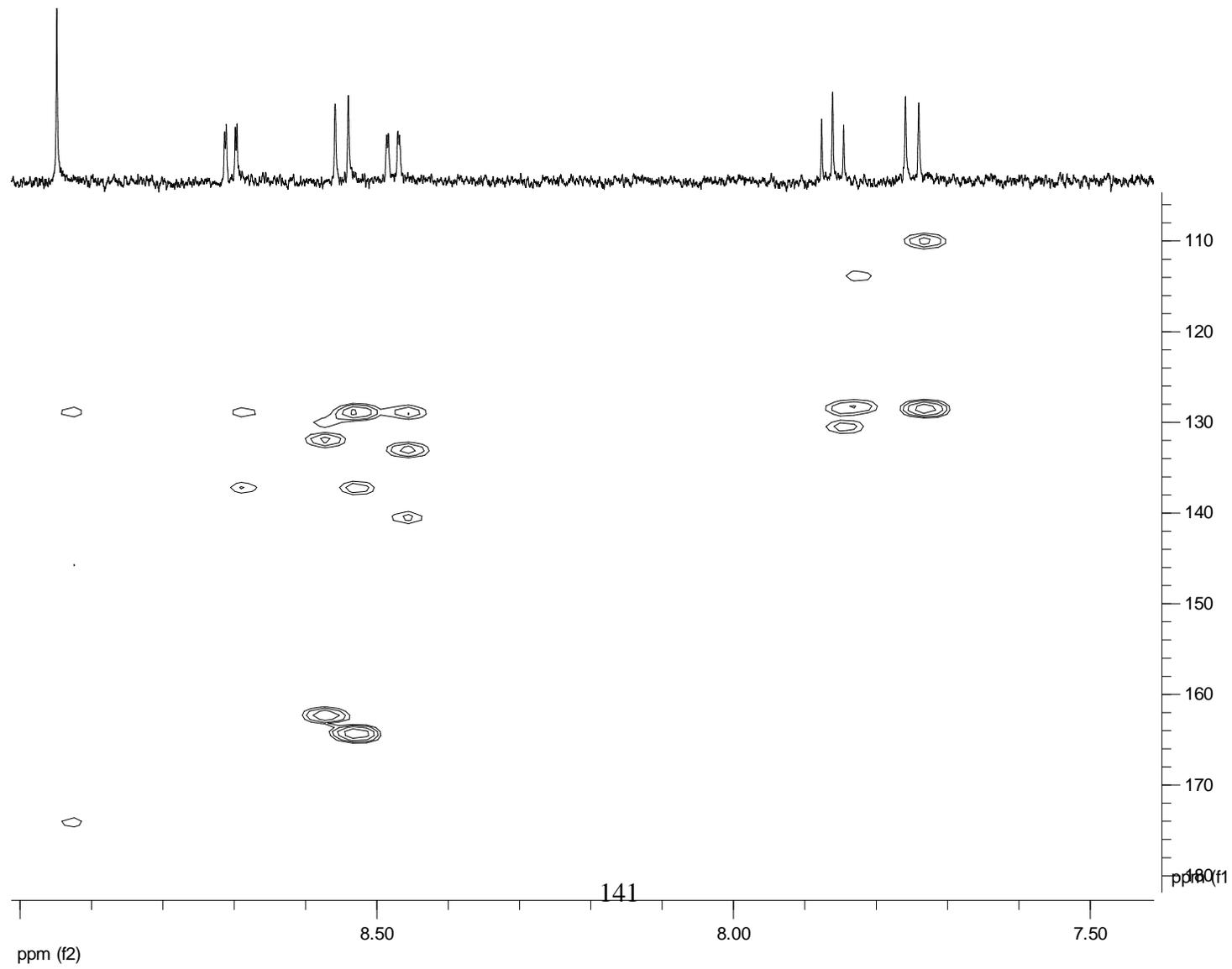


2-nitro-4-metoxi-1*H*-fenalen-1-ona









***ANEXO B. Tabla de datos y análisis estadísticos.***

Tabla 3. Valores de IC<sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftena **1-8** obtenidos para la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad

<b>Código</b>	<b>Compuesto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> promedio</b>	<b>Sd</b>
1	2-hidroxiperinaftena	34,85	31,43	3,00
		29,21		
		30,24		
2	2-metoxiperinaftena	42,21	39,94	2,46
		37,33		
		40,30		
3	3-hidroxiperinaftena	105,78	101,18	4,07
		98,08		
		99,67		
4	3-metoxiperinaftena	22,35	22,34	0,67
		21,67		
		23,01		
5	4-hidroxiperinaftena	132,31	138,50	17,42
		158,18		
		125,02		
6	4-metoxiperinaftena	22,30	20,33	1,76
		19,80		
		18,90		
7	6-hidroxiperinaftena	217,38	196,73	17,91
		187,33		
		185,48		
8	6-metoxiperinaftena	25,76	26,94	2,45
		29,76		
		25,30		

Tabla 4. Valores de IC<sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **1-8** obtenidos para la cepa 060124 bajo condiciones de fotoperiodo

<b>Código</b>	<b>Compuesto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> promedio</b>	<b>Sd</b>
1	2-hidroxiperinaftenona	34,24	33,65	1,78
		31,65		
		35,07		
2	2-metoxiperinaftenona	34,87	32,87	1,76
		32,20		
		31,54		
3	3-hidroxiperinaftenona	107,61	104,51	3,29
		101,06		
		104,87		
4	3-metoxiperinaftenona	25,35	23,24	2,17
		21,02		
		23,34		
5	4-hidroxiperinaftenona	129,32	140,48	12,66
		154,23		
		137,89		
6	4-metoxiperinaftenona	18,76	17,55	1,33
		16,12		
		17,78		
7	6-hidroxiperinaftenona	199,34	185,41	14,86
		169,76		
		187,12		
8	6-metoxiperinaftenona	24,34	25,92	1,54
		27,41		
		26,02		

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **1-8** en la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo

\*  $P < 0.05$ . Existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	$F_{calculada}$	Valor $P$
Bloque	2	0,025	0,012		
Tratamiento	15	33,85	2,257	423,47	<0.0001*
Error	30	0,16	0,0053		
Total	47	34,040			

$$R^2 = 0,9953$$

Coefficiente de Variación (CV%) = 1,87%

Tabla 6. Comparación de medias  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los compuestos tipo perinaftenona **1-8** evaluados para la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo

Código	COMPUESTO	CEPA 060124	
		FOTOPERIODO	OSCURIDAD
1	2-hidroxiperinaftenona	33,65 <b>d-e</b>	31,43 <b>e-f-g</b>
2	2-metoxiperinaftenona	32,87 <b>d-e-f</b>	39,94 <b>d</b>
3	3-hidroxiperinaftenona	104,51 <b>c</b>	101,18 <b>c</b>
4	3-metoxiperinaftenona	23,24 <b>h-i</b>	22,34 <b>h-i</b>
5	4-hidroxiperinaftenona	140,48 <b>b</b>	138,50 <b>b</b>
6	4-metoxiperinaftenona	17,55 <b>j</b>	20,33 <b>i-j</b>
7	6-hidroxiperinaftenona	185,41 <b>a</b>	196,73 <b>a</b>
8	6-metoxiperinaftenona	25,92 <b>g-h</b>	26,94 <b>f-g-h</b>

Datos originales y comparación de medias de datos transformados mediante  $\text{Log}(Y)$ . Medias que comparten la misma letra, no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a  $p=0.05$ .

Tabla 7. Valores de IC<sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftena **1-8** obtenidos para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad

<b>Código</b>	<b>Compuesto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> promedio</b>	<b>Sd</b>
1	2-hidroxiperinaftena	25,97	26,80	0,91
		27,77		
		26,65		
2	2-metoxiperinaftena	33,17	33,79	1,44
		32,78		
		35,44		
3	3-hidroxiperinaftena	148,83	147,91	23,52
		170,97		
		123,94		
4	3-metoxiperinaftena	27,67	27,47	0,63
		26,76		
		27,98		
5	4-hidroxiperinaftena	155,05	139,25	13,86
		133,53		
		129,16		
6	4-metoxiperinaftena	21,15	22,15	1,94
		24,38		
		20,91		
7	6-hidroxiperinaftena	153,09	144,39	12,20
		130,44		
		149,64		
8	6-metoxiperinaftena	33,42	32,81	0,55
		32,35		
		32,66		

Tabla 8. Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftena **1-8** obtenidos para la cepa 080105 bajo condiciones de fotoperiodo

<b>Código</b>	<b>Compuesto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> promedio</b>	<b>Sd</b>
1	2-hidroxiperinaftena	32,12	30,21	1,69
		29,57		
		28,93		
2	2-metoxiperinaftena	34,23	31,56	2,98
		32,12		
		28,34		
3	3-hidroxiperinaftena	150,67	143,82	10,25
		148,76		
		132,04		
4	3-metoxiperinaftena	30,05	29,29	0,79
		28,47		
		29,34		
5	4-hidroxiperinaftena	133,88	134,22	8,51
		142,89		
		125,89		
6	4-metoxiperinaftena	16,69	18,46	2,44
		21,24		
		17,45		
7	6-hidroxiperinaftena	166,81	155,25	12,37
		156,73		
		142,21		
8	6-metoxiperinaftena	33,76	33,67	2,26
		31,37		
		35,89		

Tabla 9. Analisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **1-8** en la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F <sub>calculada</sub>	Valor P
Bloque	2	0,029	0,015		
Tratamiento	15	30,98	2,065	348,58	<0.0001*
Error	30	0,18	0,0059		
Total	47	31,19			

\* P < 0.05. Existen diferencias significativas entre los tratamientos.

$$R^2 = 0,9943$$

Coefficiente de Variación (CV%) = 1,95%

Tabla 10. Comparación de medias IC<sub>50</sub> (µg/mL) de los compuestos tipo perinaftenona **1-8** evaluados para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo

Código	COMPUESTO	CEPA 080105	
		FOTOPERIODO	OSCURIDAD
1	2-hidroxiperinaftenona	30,21 <b>b</b>	26,8 <b>b-c</b>
2	2-metoxiperinaftenona	31,56 <b>b</b>	33,79 <b>b</b>
3	3-hidroxiperinaftenona	143,82 <b>a</b>	147,91 <b>a</b>
4	3-metoxiperinaftenona	29,29 <b>b</b>	27,47 <b>b-c</b>
5	4-hidroxiperinaftenona	134,22 <b>a</b>	139,25 <b>a</b>
6	4-metoxiperinaftenona	18,46 <b>d</b>	22,15 <b>c-d</b>
7	6-hidroxiperinaftenona	155,25 <b>a</b>	144,39 <b>a</b>
8	6-metoxiperinaftenona	33,67 <b>b</b>	32,81 <b>b</b>

Datos originales y comparación de medias de datos transformados mediante Log(Y). Medias que comparten la misma letra, no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a p=0.05.

Tabla 11. Valores de IC<sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **9-14** obtenidos para la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad. Comparación con fungicidas de referencia (benomil y propiconazol).

<b>Código</b>	<b>Compuesto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> promedio</b>	<b>Sd</b>
9	2-aminoperinaftenona	175,40	175,33	10,85
		186,15		
		164,44		
10	Perinaftenona	38,51	36,48	2,80
		37,64		
		33,29		
11	2-bromoperinaftenona	12,66	12,33	0,29
		12,24		
		12,09		
12	2-cloroperinaftenona	14,24	15,19	1,03
		16,28		
		15,05		
13	2-nitroperinaftenona	3,44	3,53	0,26
		3,82		
		3,32		
14	2-nitro-4-MeOperinaftenona	3,02	3,24	0,29
		3,57		
		3,12		
B	Benomil	1,86	1,81	0,07
		1,84		
		1,74		
P	Propiconazol	0,74	0,68	0,05
		0,64		
		0,67		

Tabla 12. Valores de IC<sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **9-14** obtenidos para la cepa 060124 bajo condiciones de fotoperiodo. Comparación con fungicidas de referencia (benomil y propiconazol)

<b>Código</b>	<b>Compuesto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> promedio</b>	<b>Sd</b>
9	2-aminoperinaftenona	180,43	182,99	10,30
		194,32		
		174,21		
10	Perinaftenona	23,87	23,12	3,62
		19,18		
		26,31		
11	2-bromoperinaftenona	5,40	5,66	0,37
		6,08		
		5,50		
12	2-cloroperinaftenona	12,24	10,98	1,11
		10,57		
		10,14		
13	2-nitroperinaftenona	1,61	2,01	0,39
		2,03		
		2,39		
14	2-nitro-4-MeOperinaftenona	1,63	1,61	0,13
		1,47		
		1,73		
B	Benomil	2,16	2,06	0,13
		1,91		
		2,11		
P	Propiconazol	0,76	0,73	0,26
		0,97		
		0,45		

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **9-14** en la cepa 060124 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo.

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F <sub>calculada</sub>	Valor P
Bloque	2	0,027	0,013		
Tratamiento	15	135,61	9,041	506,11	<0.0001*
Error	30	0,536	0,018		
Total	47	136,18			

\* P< 0.05. Existen diferencias significativas entre los tratamientos.

$$R^2 = 0,9960$$

Coeficiente de Variación (CV%) = 6,98%

Tabla 14. Comparación de medias IC<sub>50</sub> (µg/mL) de los compuestos tipo perinaftenona **9-14** evaluados para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo

Código	COMPUESTO	CEPA 060124	
		FOTOPERIODO	OSCURIDAD
9	9-aminoperinaftenona	188,99 <b>a</b>	175,33 <b>a</b>
10	Perinaftenona	23,12 <b>c</b>	36,48 <b>b</b>
11	2-bromoperinaftenona	5,66 <b>f</b>	12,33 <b>e</b>
12	2-cloroperinaftenona	10,98 <b>e</b>	15,19 <b>d</b>
13	2-nitroperinaftenona	2,01 <b>h</b>	3,53 <b>g</b>
14	2-nitro-4-metoxiperinaftenona	1,61 <b>h</b>	3,24 <b>g</b>
B	Benomil	2,06 <b>h</b>	1,81 <b>h</b>
P	Propiconazol	0,73 <b>i</b>	0,68 <b>i</b>

Datos originales y comparación de medias de datos transformados mediante Log(Y). Medias que comparten la misma letra, no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a p=0.05.

Tabla 15. Valores de IC<sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **9-14** obtenidos para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad. Comparación con fungicidas de referencia (benomil y propiconazol).

<b>Código</b>	<b>Compuesto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> promedio</b>	<b>Sd</b>
9	2-aminoperinaftenona	259,04	245,79	16,26
		250,69		
		227,65		
10	Perinaftenona	46,37	47,02	0,57
		47,31		
		47,40		
11	2-bromoperinaftenona	11,56	12,20	1,06
		11,63		
		13,42		
12	2-cloroperinaftenona	12,29	14,73	2,11
		15,98		
		15,93		
13	2-nitroperinaftenona	11,32	10,93	0,78
		11,43		
		10,03		
14	2-nitro-4-MeOperinaftenona	6,68	6,09	0,56
		6,03		
		5,57		
B	Benomil	1,61	1,58	0,07
		1,50		
		1,63		
P	Propiconazol	6,59	6,54	0,05
		6,55		
		6,49		

Tabla 16. Valores de IC<sub>50</sub> (μg/mL) en la evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **9-14** obtenidos para la cepa 080105 bajo condiciones de fotoperiodo. Comparación con fungicidas de referencia (benomil y propiconazol)

<b>Código</b>	<b>Compuesto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> promedio</b>	<b>Sd</b>
9	2-aminoperinaftenona	234,67	233,06	4,82
		236,87		
		227,65		
10	Perinaftenona	35,39	36,46	1,18
		37,72		
		36,26		
11	2-bromoperinaftenona	6,17	5,51	0,88
		5,85		
		4,51		
12	2-cloroperinaftenona	11,87	10,34	1,47
		8,93		
		10,23		
13	2-nitroperinaftenona	7,43	6,93	0,62
		6,23		
		7,13		
14	2-nitro-4-MeOperinaftenona	3,45	3,45	0,23
		3,68		
		3,23		
B	Benomil	2,23	2,04	0,16
		1,96		
		1,94		
P	Propiconazol	6,71	6,70	0,18
		6,52		
		6,87		

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **9-14** en la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F <sub>calculada</sub>	Valor P
Bloque	2	0,016	0,008		
Tratamiento	15	95,96	6,397	859,05	<0.0001*
Error	30	0,2234	0,007		
Total	47	96,196			

\* P < 0.05. Existen diferencias significativas entre los tratamientos.

$$R^2 = 0,9977$$

Coeficiente de Variación (CV%) = 3,46%

Tabla 18. Comparación de medias IC<sub>50</sub> (µg/mL) de los compuestos tipo perinaftenona **9-14** evaluados para la cepa 080105 bajo condiciones de oscuridad-fotoperiodo

Código	COMPUESTO	CEPA 080105	
		FOTOPERIODO	OSCURIDAD
9	9-aminoperinaftenona	233,06 <b>a</b>	245,79 <b>a</b>
10	Perinaftenona	36,46 <b>b</b>	47,02 <b>b</b>
11	2-bromoperinaftenona	5,51 <b>e</b>	12,20 <b>c-d</b>
12	2-cloroperinaftenona	10,34 <b>d</b>	14,73 <b>c</b>
13	2-nitroperinaftenona	6,93 <b>e</b>	10,93 <b>d</b>
14	2-nitro-4-metoxiperinaftenona	3,45 <b>f</b>	6,09 <b>e</b>
B	Benomil	2,04 <b>g</b>	1,58 <b>g</b>
P	Propiconazol	6,70 <b>e</b>	6,54 <b>e</b>

Datos originales y comparación de medias de datos transformados mediante Log(Y). Medias que comparten la misma letra, no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a p=0.05.

Tabla 19. Análisis de varianza (ANOVA): Evaluación de los compuestos tipo perinaftenona **11**, **13** y **14** en la inhibición del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*. Control fungicida propiconazol.

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F <sub>calculada</sub>	Valor P
Tratamiento	3	21,85	7,28	522,60	<0.0001*
Error	8	0,11	0,014		
Total	11	21,96			

\* P< 0.05. Existen diferencias significativas entre los tratamientos.

$$R^2 = 0,9949$$

Coeficiente de Variación (CV%) = 10,42%

Tabla 20. Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) y comparación de medias en la evaluación de los compuestos **11**, **13** y **14** en la evaluación del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*. Comparación con fungicida propiconazol.

Código	Compuesto	IC50 (ug/mL)			IC50 promedio	Sd
11	2-bromoperinaftenona	4,48	4,69	5,10	4,76a	0,32
13	2-nitroperinaftenona	1,36	1,11	1,31	1,26b	0,13
14	2-nitro-4-metoxiperinaftenona	0,61	0,65	0,79	0,68c	0,09
P	Propiconazol	0,09	0,10	0,06	0,08d	0,02

Datos originales y comparación de medias de datos transformados mediante Log(Y). Medias que comparten la misma letra, no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a p=0.05.