

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Evaluación de derivados sintéticos de núcleos básicos presentes en fitoalexinas propias de Apiaceae, Fabaceae, Rutaceae y Musaceae como defensa alternativa contra hongos fitopatógenos**

**Luisa María Castaño Pulgarin**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Escuela de Química  
Medellín, Colombia

2018



# **Evaluación de derivados sintéticos de núcleos básicos presentes en fitoalexinas propias de Apiaceae, Fabaceae, Rutaceae y Musaceae como defensa alternativa contra hongos fitopatógenos**

**Luisa María Castaño Pulgarin**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Química**

Director:

Ph.D. Diego Luis Durango Restrepo

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Química de Productos Naturales y los Alimentos - QUIPRONAL

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Química

Medellín, Colombia

2018

**Dedicatoria**

***A mi familia, en especial a mi mamá por una vida de lucha***

# Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento a mi familia por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida y aún en la distancia.

A Vanessa Posada por ser parte de mi camino desde hace más de diez años y acompañarme incondicionalmente en la aventura que iniciamos en Medellín ya hace más de cuatro años.

A Gabriel Ospino por apoyarme en todo momento, aconsejarme y siempre hacerme mirar hacia adelante.

A mis amigos de ahora Gerson, Claudia y Gissel y algunos de siempre Stefanya y Manuel por hacer parte del camino y animarme cuando fue necesario.

A mi tutor Diego Luis Durango por su acompañamiento permanente y aportes a mi crecimiento durante este proceso

A los profesores Jesús Gil y Tatiana Lobo por sus aportes y compañía en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros y amigos de QUIPRONAL Linda, Samuel, Cesar, Felipe y Jose por su ayuda incondicional durante el desarrollo de este proyecto.

Finalmente un especial agradecimiento a al profesor Winston Quiñones del grupo de Química Orgánica de Productos Naturales de la Universidad de Antioquía por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

## Resumen

En el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica y metabolismo de los núcleos estructurales de fitoalexinas propias de las familias Musaceae, Rutaceae - Apiaceae y Fabaceae (perinaftenona, 1,2-benzopirona y 1,4-benzopirona respectivamente), frente a tres hongos fitopatógenos *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinérea* y *Fusarium oxysporum* aislados de cítricos. Se encontró un efecto fungiestático significativo de los tres núcleos contra los hongos evaluados; los mayores porcentajes de inhibición se encontraron para la perinaftenona. Lo anterior demuestra que las fitoalexinas pueden ser usadas para el control de hongos fitopatógenos.

A su vez se valoró el metabolismo de los tres núcleos estructurales con los tres hongos seleccionados, encontrándose que el sistema  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado común a los tres compuestos se ve afectado en el proceso, disminuyendo la actividad de los sustratos de partida. Los productos de biotransformación obtenidos fueron aislados por técnicas cromatográficas e identificados mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Se sintetizaron derivados estructurales de perinaftenona y 1,2-benzopirona, con sustituyentes diferentes y en distintas posiciones, con el fin de comparar sus efectos sobre la actividad; encontrándose variaciones significativas en la actividad contra *B. theobromae*. Esto permite concluir que el uso de derivados estructurales de fitoalexinas puede representar una alternativa viable en la búsqueda de fungicidas biorracionales.

**Palabras clave:** fitoalexinas, biotransformación, hongos fitopatógenos, actividad antifúngica.

## Abstract

In the present work, the antifungal activity and metabolism of phytoalexin common to Musaceae, Rutaceae – Apiaceae and Fabaceae structural moiety (perinaphthenone, 1,2-benzopyrone and 1,4-benzopyrone respectively), were evaluated against three phytopathogenic fungi *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* isolated from citrus. A significant fungistatic effect of the three compounds was found against the fungi evaluated; the highest percentage of inhibition was found for perinaphthenone. This shows that phytoalexins can be used to control phytopathogens fungi. Additionally, the metabolism of the three structural moiety with the three selected fungi was evaluated, finding that the  $\alpha$ ,  $\beta$  unsaturated system common to the three compounds is affected in the process, decreasing the activity of the initial substrates. The products obtained by biotransformation were isolated by chromatographic techniques and identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Structural derivatives of perinaphthenone and 1,2-benzopyrone were synthesized, with different substituents in various positions within the molecule in order to compare effects on activity due to the presence of substituents or specific positions, with significant variations in activity against *B. theobromae*. In conclusion, the use of structural derivatives of phytoalexins may represent a viable alternative in the search for biorational fungicides.

**Keywords:** phytoalexins, biotransformation, phytopathogens fungi, , antifungal activity.

# Contenido

	Pág.
1.1 Mecanismos de defensa de las plantas .....	5
1.2 Fitoalexinas.....	7
1.2.1 Fitoalexinas tipo 1,4-benzopirona: familia Fabaceae .....	10
1.2.2 Fitoalexinas tipo 1,2-benzopirona: familias Rutaceae y Apiaceae .....	14
1.2.3 Fitoalexinas tipo fenilfenalenonas: Familia Musaceae .....	18
1.3 Fitopatógenos y Enfermedades Asociadas .....	21
1.3.1 <i>Botryodiplodia theobromae</i> .....	22
1.3.2 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	22
1.3.3 <i>Botrytis cinerea</i> .....	24
2.1 Abstract .....	26
2.2 Resumen .....	27
2.3 Introducción.....	28
2.4 Metodología.....	29
2.4.1 Materiales químicos y biológicos.....	29
2.4.2 Equipos y métodos analíticos.....	30
2.4.3 Actividad antifúngica de la perinaftenona y derivados .....	31
2.4.4 Metabolismo de la perinaftenona .....	31
2.4.5 Aislamiento e identificación de los productos metabólicos .....	32
2.4.6 Cuantificación .....	33
2.4.7 Preparación de derivados .....	34
2.5 Resultados .....	39
2.5.1 Actividad antifúngica .....	39
2.5.2 Metabolismo.....	41
2.5.3 Actividad antifúngica de derivados de perinaftenona.....	50
3.1 Abstract .....	53
3.2 Resumen.....	54
3.3 Introducción.....	54
3.4 Materiales y métodos.....	56
3.4.1 Materiales químicos y biológicos.....	56
3.4.2 Equipos y métodos analíticos.....	56

3.4.3 Actividad antifúngica de la cumarina y derivados .....	57
3.4.4 Metabolismo de la cumarina.....	58
3.4.5 Aislamiento e identificación de los productos metabólicos.....	59
3.4.6 Cuantificación.....	60
3.4.7 Preparación de derivados.....	60
3.5 Resultados.....	63
3.5.1 Actividad antifúngica.....	63
3.5.2 Metabolismo .....	65
3.5.3 Actividad antifúngica de derivados de cumarina .....	71
4.1 Abstract .....	73
4.2 Resumen .....	73
4.3 Introducción .....	74
4.4 Materiales y métodos.....	75
4.4.1. Materiales químicos y biológicos .....	75
4.4.2 Equipos y métodos analíticos .....	75
4.4.3 Actividad antifúngica de cromona .....	76
4.4.4 Metabolismo de la cromona.....	77
4.4.5 Compuestos relacionados estructuralmente.....	77
4.5 Resultados.....	81
4.5.1 Actividad antifúngica de la cromona .....	81
4.5.2 Metabolismo .....	83
4.5.3 Actividad antifúngica de compuestos relacionados estructuralmente con la cromona.....	85
5. Conclusiones.....	92
Anexo A: Espectros de resonancia magnética nuclear (Compuestos - Capítulo 2).....	95
Anexo B: Espectros de resonancia magnética nuclear (Compuestos - Capítulo 3).....	122

# Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Fitoalexinas propias de la familia Fabaceae.....	11
<b>Figura 2.</b> Núcleo estructural fitoalexinas de la familia Fabaceae. ....	12
<b>Figura 3.</b> Transformación metabólica de daidzeina por acción de <i>Aspergillus saitoi</i> (A.s). .....	12
<b>Figura 4.</b> Bioconversión de formononetina por acción de <i>Fusarium proliferatum</i> (F.p). ..	13
<b>Figura 5.</b> Bioconversión de formononetina por acción de <i>Fusarium avenaceum</i> (F.a)....	13
<b>Figura 6.</b> Plantilla estructural y fitoalexinas propias de las familias Rutaceae.....	15
<b>Figura 7</b> Cumarinas con actividad antimicrobiana de la familia Apiaceae.....	16
<b>Figura 8.</b> Metabolitos obtenidos por biotransformación de dihidrocumarina por acción metabolica de <i>A. nigger</i> .(Aguirre-Pranzoni et al., 2011) .....	17
<b>Figura 9.</b> Plantilla estructural de las fenilfenalenonas y fitoalexinas encontradas en la familia Musaceae. ....	18
<b>Figura 10.</b> Sulfatos de fenilfenalenona identificados en extractos metanólicos con micelios de <i>M. fijiensis</i> (M.f).(Jena et al., 1981).....	19
<b>Figura 11.</b> . Actividad antifúngica de perinaftenona y derivados estructurales frente a <i>M.</i> <i>fijiensis</i> .(Quiñones et al., 2000) .....	20
<b>Figura 12.</b> Distribución geográfica de <i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i> (Mal de Panamá).(Martínez-Bolaños, 2013) .....	23
<b>Figura 13.</b> Estructuras químicas de derivados de perinaftenona sintéticos y naturales ( <i>Musa</i> spp.).....	29
<b>Figura 14.</b> Nitración de perinaftenona .....	34
<b>Figura 15.</b> Bromación de perinaftenona.....	35
<b>Figura 16.</b> Hidroxilación de perinaftenona .....	36
<b>Figura 17.</b> Metoxilación de perinaftenona .....	36

<b>Figura 18.</b> Dimerización de perinaftenona .....	37
<b>Figura 19.</b> Efecto de la perinaftenona (1) en el crecimiento radial micelial de <i>B. cinerea</i> (19a), <i>B. theobromae</i> (19b) y <i>F. oxysporum</i> (19c). Los resultados se muestran como valores promedio de tres réplicas del diámetro del micelio; bar = ± DE. ....	40
<b>Figura 20.</b> Perfil HPLC-DAD del metabolismo de (1) por <i>B. cinerea</i> (arriba), <i>F. oxysporum</i> (medio) y <i>B. theobromae</i> (abajo). Los espectros UV se presentan en el lado derecho para (1) (arriba) y sus metabolitos, (2) (medio) y (3) (abajo). Longitud de onda: 254 nm. Día 6. ....	44
<b>Figura 21.</b> Abundancia relativa en el curso del tiempo para la transformación microbiana de (1) por <i>B. theobromae</i> (arriba-izq.), <i>B. cinerea</i> (arriba-der.) y <i>F. oxysporum</i> (abajo). Compuesto (1), perinaftenona; compuesto (2), 2,3-dihidro-1 <i>H</i> -fenalen-1-ol; y compuesto (3), 2,3-dihidro-fenalen-1-ona. Longitud de onda de análisis: 254 nm. ....	45
<b>Figura 22.</b> Curvas de calibración para la perinaftenona (1) (arriba-izq.), 2,3-dihidro-1 <i>H</i> -fenalen-1-ol (2) (arriba-der.) y 2,3-dihidro-fenalen-1-ona (3) (abajo). ....	47
<b>Figura 23.</b> Concentración en el curso del tiempo de la biotransformación de perinaftenona (1) por los hongos <i>F. oxysporum</i> (arriba-izq.), <i>B. cinerea</i> (arriba-der.), y <i>B. theobromae</i> (abajo). ....	48
<b>Figura 24.</b> Inhibición (%) del crecimiento radial de <i>B. theobromae</i> con perinaftenona y derivados. Letras diferentes para un mismo tiempo corresponden a diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%. ....	50
<b>Figura 25.</b> Fitoalexinas cumarina de Apiaceae y Rutaceae. ....	55
<b>Figura 26.</b> Síntesis de 3-acetilcumarina. ....	60
<b>Figura 27.</b> Síntesis de la cumarina-3-carboxilato de etilo. ....	61
<b>Figura 28.</b> Síntesis de la 7-acetiloxi cumarina. ....	61
<b>Figura 29.</b> Síntesis de la 7-hidroxi-4-metil cumarina. ....	62
<b>Figura 30.</b> Síntesis de 6-Nitro cumarina. ....	62
<b>Figura 31.</b> Inhibición del crecimiento micelial de los hongos <i>B. cinerea</i> (arriba-izq, a), <i>B. theobromae</i> (arriba-der, b) y <i>F. oxysporum</i> (abajo, c) con cumarina (1) .....	64
<b>Figura 32.</b> Perfil HPLC-DAD del metabolismo de (1) por <i>F. oxysporum</i> (arriba), <i>B. theobromae</i> (medio) y <i>B. cinerea</i> (abajo). Longitud de onda: 254 nm. Día 6. ....	66
<b>Figura 33.</b> Abundancia relativa en el curso del tiempo para la transformación microbiana de (1) por <i>B. theobromae</i> . Compuesto (1), cumarina; compuesto (2), dihidrocumarina; y compuesto (3), ácido 3 (2- hidroxifenil) propanoico. Longitud de onda de análisis: 254 nm. ....	70

<b>Figura 345a.</b> Estructura de la cromona y compuestos relacionados estructuralmente sintetizados.....	79
<b>Figura 35b.</b> Estructura de la cromona y compuestos relacionados estructuralmente sintetizados.....	80
<b>Figura 36.</b> Inhibición del crecimiento micelial de los hongos <i>B. cinerea</i> (arriba-izq.), <i>B. theobromae</i> (arriba-der.) y <i>F. oxysporum</i> con cromona.....	82
<b>Figura 37.</b> Perfil HPLC-DAD del metabolismo de cromona por <i>B. cinerea</i> (arriba, a), <i>F. oxysporum</i> (medio, b), <i>B. theobromae</i> (abajo, c). Longitud de onda: 254 nm. Día 6. ....	84
<b>Figura 38.</b> Espectro de 1H RMN de la 1,3-Bis (4-metoxifenil) propenona.....	85
<b>Figura 39.</b> Espectro de 13C RMN de la 1,3-Bis (4-metoxifenil) propenona.....	86
<b>Figura 40.</b> Espectro de 13C RMN de la 1,3-Bis (4-metoxifenil) propenona.....	88
<b>Figura 41.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de la cromona y compuestos relacionados estructuralmente contra <i>B. theobromae</i> . Tiempo de evaluación: 48 h. ....	89

# Lista de Símbolos y abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
$^{13}\text{C}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
$^1\text{H}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
PDA	Agar papa dextrosa
ER	Enoato reductasa
ADH	Alcohol deshidrogenasa
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia - Detector arreglo de diodos
UV	Ultravioleta
DE	Desviación estándar

# Objetivos

## Objetivo general

Evaluar el metabolismo y la actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos de plantillas estructurales presentes en fitoalexinas y derivados sintéticos de las familias Apiaceae, Fabaceae, Rutaceae y Musaceae y sus derivados.

## Objetivos específicos

Evaluar la actividad antifúngica de las plantillas estructurales 1,2 – benzopirona, 1,4 – benzopirona y perinaftenona contra los microorganismos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinérea* y *Botryodiplodia theobromae*.

Analizar la transformación microbiana, productos metabólicos y su avance en el curso del tiempo de los núcleos estructurales en estudio por acción de los diferentes patógenos.

Preparar derivados sintéticos que contengan la funcionalidad afectada en el proceso de biotransformación.

Determinar el efecto antimicrobiano de los derivados estructurales obtenidos contra los fitopatógenos correspondiente.

## Introducción

Colombia es un país esencialmente agrícola que cuenta con un amplio potencial a nivel productivo debido a la gran variedad de condiciones ambientales y relieve propias para todo tipo de cultivos. Es por esta razón que en los últimos años frutas, hortalizas entre otras especies han tomado fuerza tanto en consumo interno como de exportación y así mismo las estrategias implementadas para el control de plagas y enfermedades también han debido avanzar en la medida de las necesidades de cada producto. Entre estas medidas encontramos el uso de agroquímicos en diferente cantidad, periodicidad y proporciones; que permiten evidenciar que a pesar de los esfuerzos por mantener el control, cada vez resulta más difícil garantizar la calidad y rendimiento en etapas de pre y pos cosecha en todo tipo de productos de interés económico para el país.

Infortunadamente, la producción agrícola está limitada por la alta incidencia de enfermedades, especialmente aquellas ocasionadas por hongos; lo que se agrava por el uso generalizado de variedades susceptibles. Lo anterior ha exigido la aplicación de fungicidas sintéticos de baja selectividad para su manejo, con consecuencias negativas tales como la alta exposición y riesgo para los campesinos a intoxicaciones, la contaminación del medio ambiente afectando los ecosistemas circundantes a cada cultivo, y la presencia de residuos tóxicos en productos agrícolas en niveles superiores a los permitidos por la legislación nacional e internacional. Además, la creciente resistencia de los microorganismos a los fungicidas usados para su control, ha obligado a la aplicación de dosis más altas y frecuentes en los cultivos. Este uso inadecuado ha terminado por elevar los costos de producción y es una de las causas de la pérdida de competitividad del sector, frente a la producción de otros países, en el marco de la globalización.

El país enfrenta la necesidad de aumentar la producción de alimentos, mejorar la calidad de los productos y hacerlos competitivos en el exterior. Los productos de exportación deben estar en excelente estado sanitario, es decir libres de hongos y al mismo tiempo, no exceder los niveles residuales máximos de los fungicidas permitidos internacionalmente. Difícilmente se podría cumplir con estos requisitos, si se toma en cuenta la creciente resistencia de los microorganismos a los pesticidas, y el costo progresivo que exige la aplicación de dosis mayores y más constantes en el campo. Por lo anterior, hoy en día se estudian alternativas diferentes para incrementar la productividad agrícola y reducir la aplicación de fungicidas sintéticos de baja selectividad, pero desde enfoques efectivos y ecológicamente más seguros. Uno de dichos enfoques involucra la búsqueda y aplicación de sustancias nuevas y mejores para combatir agentes fitopatógenos, pero cuyo desarrollo parte de un diseño racional de sus estructuras y mecanismos de acción, lo que precisa de un conocimiento íntimo de la bioquímica de la planta y su interacción con el patógeno.

Es por esto que el estudio de los mecanismos químicos asociados a interacciones negativas planta – patógeno han tomado importancia, ya que permiten establecer la base de la resistencia de las plantas al ataque de hongos y bacterias, mediada en gran parte por la producción de metabolitos secundarios de bajo peso molecular y con actividad antimicrobiana conocidos como fitoalexinas, que se han vinculado de forma puntual a la defensa de la planta en diferentes procesos infecciosos.

Estos compuestos poseen núcleos estructurales diversos pero característicos de diferentes familias de plantas. Tal es el caso de las cumarinas propias de la familia Rutaceae, cromonas de la familia Fabaceae y las fenalenonas típicas de la familia Musaceae. Estas familias a su vez cuentan con especies de alto interés económico a nivel nacional como son *Citrus latifolia* Tanaka ex Q. Jimenez (Lima Tahití), *Phaseolus vulgaris* L (Frijol Cargamanto) y *Musa acuminata* Colla (Banano) respectivamente.

La actividad antimicrobiana reconocida de las fitoalexinas, su acumulación en el sitio de la infección y la relación de su producción con la resistencia de plantas a enfermedades, han sido algunos de los antecedentes que han permitido plantear la posibilidad de que las fitoalexinas sirvan como plantilla estructural para el diseño biorracional de nuevos agentes antifúngicos. Esta aplicación de las fitoalexinas tiene dos ventajas: de un lado porque parte de una estructura bioquímicamente involucrada en la relación planta-patógeno, y de otro

lado porque aporta un menor impacto para el medio ambiente al contrarrestar la enfermedad de forma específica.

No obstante y si bien inicialmente se podrían obtener buenos resultados en la protección de cosechas con su aplicación, es de esperarse que también se genere a mediano plazo una resistencia microbiana, especialmente por la capacidad del patógeno para metabolizar las fitoalexinas a sustancias inocuas. Sin embargo este mismo metabolismo microbiano a su vez genera otras dos alternativas agronómicas. Por un lado, el conocimiento de las enzimas metabolizantes hace posible la búsqueda y aplicación de inhibidores específicos de dichas enzimas, que por su naturaleza no biocida tampoco deberían tener efectos secundarios sobre el medio ambiente. Adicionalmente, el conocimiento de los sitios en los cuales se realiza la biotransformación de la fitoalexina sería un excelente blanco metabólico para preparar análogos más resistentes a la degradación enzimática, por efectos electrónicos, estructurales o estéricos.



# Capítulo 1. Marco Teórico

## 1.1 Mecanismos de defensa de las plantas

Las plantas para defenderse de los factores que perturban su metabolismo, tales como el ataque de microorganismos, producen una serie de sustancias para preservar su bioquímica normal o activar sus niveles de defensa y por ejemplo, detener patógenos potenciales. Estas sustancias incluyen moléculas estructural y funcionalmente muy diferentes, incluyendo las provenientes del metabolismo primario y otras sustancias más clásicas del metabolismo secundario. (Mendgen, et al. 1996)

Antes de que una lesión fúngica se desarrolle exitosamente en un tejido de la planta, una serie de eventos tienen que ocurrir en una secuencia dada. Un paso crucial es la penetración, ya que se deben superar las diversas barreras presentes en hojas, tallos o raíces, por lo que los hongos han desarrollado estrategias de invasión asombrosamente diversas. (Mendgen et al., 1996) Una de estas es la producción de estructuras de infección (toxinas, enzimas y efectores) que permiten que el hongo penetre los diferentes tipos de pared celular presentes en la planta y establecer una nueva infección dentro del huésped susceptible. (Faulkner & Robatzek, 2012). Es entonces cuando los síntomas de la enfermedad se hacen evidentes y son seguidos por la reproducción posterior del patógeno (Kahter et al., 2016).

La planta, sin embargo, puede resistir el ataque del patógeno proporcionando barreras mecánicas en la superficie para que la penetración no ocurra, o generando sustancias químicas antimicrobianas (fitoalexinas, especies reactivas de oxígeno) rápidamente y alrededor del sitio de la penetración, para que el hongo no se pueda establecer apropiadamente dentro de los tejidos del huésped (Oliveira et al., 2016). Estas barreras mecánicas incluyen la capa de cutícula, la cual a su vez es de naturaleza química, la

presencia de vellosidades, revestimientos de cera, cierre de los estomas, entre otras (Curvers et al., 2010; Luna et al., 2011). Sumado a estas barreras mecánicas, aparecen barreras químicas mucho más específicas que contribuyen a la modificación de las paredes celulares del huésped, la producción de taninos y melaninas, compuestos asociados a los fenilpropanoides, enzimas relacionadas con la patogénesis algunas de las cuales tienen propiedades antimicrobianas y la producción de antibióticos para la defensa (Oliveira, Varanda, & Félix, 2016).

La primera modificación se presenta cuando las paredes celulares de la planta son recubiertas con una serie de polímeros altamente resistentes de cutina, suberina, callosa, celulosa, lignina, proteínas estructurales, entre otras (Curvers et al., 2010; Luna et al., 2011), que actúan como barreras físicas y químicas para la germinación y penetración de los hongos. La deposición masiva de estos polímeros y el incremento en el espesor de las paredes ha sido asociado con la resistencia en algunos sistemas huésped-parásito. Esta clase de polímeros, sin embargo, son hidrolizados efectivamente por enzimas fúngicas (Vidal et al., 1998). De igual forma, la necrosis asociada con la resistencia específica de razas, normalmente está caracterizada por la formación de pigmentos marrón a negro (melanina) a través de las paredes celulares que frecuentemente es mayor en plantas resistentes, sugiriendo que las melaninas o sus precursores contribuyen a la resistencia (Bell, 1981). Además de las ligninas, taninos y melaninas, las plantas producen enzimas líticas ( $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas) que disuelven las paredes celulares fúngicas, inhibidores de enzimas proteasas y virus (Netzer et al., 1979).

Adicionalmente, las plantas generan cientos de productos naturales, muchos de los cuales son característicos de grupos taxonómicos específicos y son tóxicos a las plagas. Así, la planta puede sintetizar agentes antimicrobianos para prevenir la germinación de esporas o su habilidad para proliferar y penetrar los tejidos de la planta; estos antibióticos constitutivos son denominados fitoanticipinas y pueden ser sintetizados completamente y almacenados en depósitos estratégicamente ubicados, cuya función es prevenir la colonización de los tejidos (Chagas et al., 2018). Estos mecanismos de defensa preformados son indudablemente importantes en la limitación del desarrollo del patógeno, sin embargo, para el éxito de la infección, las reacciones bioquímicas dinámicas activadas por la penetración del hongo son probablemente las más significativas (Oliveira et al., 2016). Estas defensas celulares inducidas provenientes de la colonización de los tejidos, se han denominado mecanismos de defensa inducidos, debido a que son una respuesta a

un patógeno invasor y responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance del patógeno (Heath, 2000). Estos mecanismos incluyen principalmente la muerte celular por reacción hipersensible, la acumulación de enzimas hidrolíticas (glucanasas y quitinasas), la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis, la producción de especies con oxígeno activo, y la síntesis y acumulación de fitoalexinas (Heath, 2000; Oliveira et al., 2016). Entre las respuestas inducidas, la producción *de novo* de fungitoxinas (fitoalexinas), usando materiales de partida disponibles en los tejidos del huésped es quizás la más importante (Agrios, 2013).

## 1.2 Fitoalexinas

La respuesta a la invasión de hongos y bacterias por parte de las plantas radica inicialmente en el reconocimiento de la presencia del organismo invasor en su sistema, esto desencadena la producción de metabolitos secundarios (fitoalexinas) cuyo propósito es constituir la defensa secundaria de la planta ante dicho ataque. (García Mateos et al, 2003; Bonaldo et al., 2007)

Estos sistemas de defensa de las plantas y su interacción con organismos patógenos se presentan como un modelo que consta de dos fases.(Newman et al., 2013) La primera, encargada del reconocimiento de moléculas características que permiten discriminar entre lo propio y lo ajeno, al momento de iniciar la producción de aquellos compuestos que constituyen el sistema inmune de la planta y así poder evitar la infección del organismo por patógenos. Esta función de diferenciación es llevada a cabo por compuestos capaces de reconocer componentes y patrones específicos en la estructura de cada fitopatógeno conocidos como elicitores. (Molina & Palenzuela, 2008) En todos los casos estas moléculas son indispensables para el desarrollo, por esta razón se conservan en todos los organismos independiente del tipo de interacción que tengan con la planta.(Newman et al., 2013) La segunda fase de la respuesta es inducida por la presencia de estos elicitores y consiste en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, también llamado el estallido oxidativo), especies reactivas de nitrógeno tales como óxido nítrico (NO), alteraciones en la pared celular vegetal, la inducción de compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular (fitoalexinas) y la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis.(Newman et al., 2013)

Finalmente una de las bases de la resistencia de las plantas al ataque de patógenos, hongos y bacterias; está relacionada directamente con la síntesis de metabolitos secundarios participantes en los procesos infecciosos como inhibidores de crecimiento de dichos organismos. Los cambios bioquímicos que acontecen en la planta después de una infección se han asociado en gran parte con la expresión de su mecanismo de defensa, en el proceso de producción de sustancias llamadas fitoalexinas (García Mateos & Pérez Leal, 2003).

Las fitoalexinas se han definido como sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular que son producidas en las plantas como consecuencia del ataque de microorganismos (Chagas et al., 2018). En este sentido, las fitoalexinas se catalogan como metabolitos de estrés, que generalmente se producen en cantidades del orden de microgramos y como una compleja mezcla de sustancias químicamente relacionadas. En las plantas sanas es posible hallarlas en concentraciones muy bajas, pero dicha concentración se incrementa dramáticamente como resultado de la infección (García Pineda & Castro Mercado, 2014). Para que las fitoalexinas presenten un papel en la resistencia a enfermedades, éstas deben ser acumuladas en niveles inhibitorios en el lugar de la infección y restringir posteriormente el desarrollo del patógeno.

El concepto de fitoalexinas se introdujo hace más de 70 años con ensayos sobre *Solanum tuberosum* (papa) previamente expuesta al hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* causante del tizón tardío o mildiu de la papa, en donde se observó la inhibición del crecimiento del microorganismo, debido a la biosíntesis de sustancias que dificultaban su desarrollo no solo manteniendo, sino mejorando a su vez la salud de la planta al ser protegida contra ataques posteriores (Ahuja et al., 2012).

Las fitoalexinas son químicamente muy diversas; se han caracterizado más de 350 en aproximadamente 30 familias de plantas, siendo el mayor número, 130, en la familia Leguminosae (Grayer & Harborne, 1994; Agrios 2013). Estas sustancias están presentes tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas incluyendo arroz, maíz, sorgo, trigo, cebada, cebolla y lirios, y se han aislado de todas las partes de la planta, aunque no todos los órganos producen necesariamente el o los mismos compuestos (Grayer & Harborne, 1994; Sakai & Nakagawa, 1988). Las fitoalexinas del tipo fenilpropanoide están distribuidas en familias tan diversas como Leguminosae, Solanaceae, Convolvulaceae,

Umbelliferaceae y Poaceae (Grayer & Harborne, 1994; Sakai & Nakagawa, 1988). Los compuestos fenantrénicos son característicos de Orchidaceae y los acetilénicos de Asteraceae.

Aparentemente hay una correlación entre la clase de fitoalexina y la quimiotaxonomía para un género o familia. Por ejemplo, los isoflavonoides son comunes en la familia Leguminosae, pero no han sido reportados en Solanaceae, mientras que las fitoalexinas sesquiterpenoides son comunes en Solanaceae pero no han sido reportadas en Leguminosae (Grayer & Harborne, 1994). Al interior de una familia, también es evidente un nivel de especificidad; por ejemplo el sesquiterpenoide rishitina se encuentra en papa y tabaco, pero no en ají, mientras la fitoalexina sesquiterpenoide capsidiol se produce en tabaco y ají, pero no en papa (Moesta & Grisebach, 1980). Estos compuestos se constituyen entonces como un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que muestran actividad biológica contra gran variedad de patógenos acorde con cada familia de plantas; por tal motivo al encontrarse que a pesar de la gran diversidad de compuestos, se comparten núcleos estructurales básicos entre las especies pertenecientes a una misma familia de plantas; empezaron a ser considerados como marcadores moleculares de resistencia a enfermedades (Ahuja et al., 2012; Croteau et al., 2000; Dewick, 2009; Dotor & Cabezas, 2014).

Finalmente, teniendo en cuenta que se acumulan en el sitio de la infección e inhiben el desarrollo de microorganismos *in vitro*, es lógico considerarlas como posibles compuestos de defensa de las plantas contra enfermedades causadas por hongos y bacterias. Es por ello que actualmente se plantea la posibilidad de usar las fitoalexinas como sustitutos de los fungicidas tradicionales empleados en la agricultura (Yang, Jiang, & Yang, 2002) (Pacher et al., 2001), dadas las siguientes ventajas:

#### **Actividad antimicrobiana a bajas concentraciones**

Se ha demostrado en pruebas *in vivo* e *in vitro* que concentraciones en el rango de 3,0 µg a 50,0 µg bastan para obtener resultados satisfactorios mediante la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos como *Cladosporium herbarum* en plantas del género *Glycosmis* (Pacher et al., 2001). Inclusive estos niveles bastan para dar protección durante períodos de tiempo relativamente largos (Wiens, 1978). Además, se ha demostrado que la

acción de las fitoalexinas no sólo se ejerce sobre hongos, sino que también pueden ser tóxicas para bacterias, virus, plantas y herbívoros.

### **Mecanismo antimicrobiano diversificado**

Las bases de la toxicidad de las fitoalexinas se encuentran relacionadas con gran variedad de procesos fisiológicos y bioquímicos involucrados con la interrupción en las membranas y cambios en la permeabilidad de la pared celular de los microorganismos invasores, así como en diferentes etapas de su desarrollo (Agrios, 2013).

### **Diversidad estructural**

Generalmente se producen mezclas de compuestos con gran variedad estructural, por ejemplo en frijol se acumulan fitoalexinas de la clase isoflavonas, isoflavanonas, coumestanos, pterocarpanos, e isoflavanos. Esto puede dificultar los procesos de resistencia desarrollados por los microorganismos (Agrios, 2013; García Pineda & Castro Mercado, 2014).

Entre las fitoalexinas de interés se encuentran las pertenecientes a las familias Fabaceae, Rutaceae y Musaceae cuyas especies cuentan con fitoalexinas que comparten los núcleos estructurales de 1,4-benzopirona, 1,2-benzopirona y perinaftenona respectivamente.

#### **1.2.1 Fitoalexinas tipo 1,4-benzopirona: familia Fabaceae**

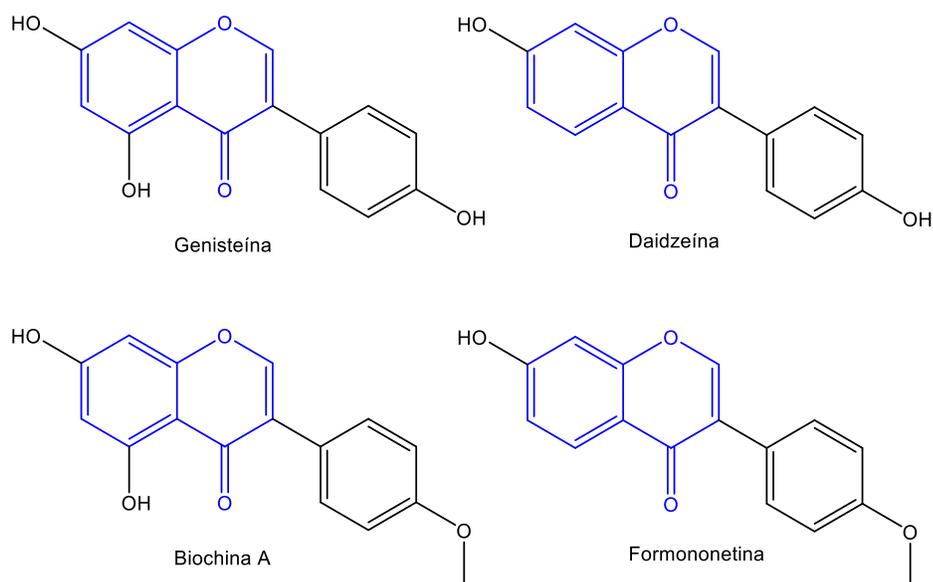
Se constituye como una amplia familia con 730 géneros y aproximadamente 19400 especies entre las cuales se encuentran *Pisum sativum* L. (arveja) *Lens culinaris* Medik. (lenteja) *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) *Glycine max* (L.) Merr.(soja) *Arachis hypogaea* L. (maní) como algunos ejemplares comestibles y siendo la familia con mayor presencia en los ecosistemas de bosque seco tropical y mayor incidencia en Colombia. (Rodríguez et al., 2012)

Entre las fitoalexinas propias de esta familia se encuentran la daidzeína y genisteína, presentes en el frijol o soja roja (*Vigna angularis* (Wild.) Ohwi & H. Ohashi) (Harada & Kondo, 2009).

La isoflavona daidzeína es el precursor de las principales fitoalexinas incluyendo medicarpina, gliceolinas y phaseollina, las cuales son producidas en alfalfa, soya, y frijól respectivamente. La isoflavona genisteína es el precursor de la fitoalexina kievitona de *Phaseolus vulgaris* L. Las isoflavonas daidzeína y genisteína se encuentran en cuatro formas químicamente relacionadas, como agliconas (daidzeína y genisteína), 7-O-glucósidos (daidzina y genistina), 6'-O-acetilglucósidos (6'-O-acetildaizina y 6'-O-acetilgenistina), y 6'-O-malonilglucósidos (6'-malonildaizina y 6'-malonilgenistina) (Ludueña et al., 2007). A su vez la daidzeína es el precursor metabólico de la formononetina y la genisteína de la biochanina A.

La actividad de las isoflavonas contra hongos fitopatógenos ha sido reportada por diferentes autores (Wiens, 1978; Hindorf et al., 1989). La genisteína y biochanina A inhibieron el crecimiento y desarrollo del hongo fitopatógeno *Phytophthora sojae* a concentraciones de 60-120  $\mu\text{M}$  y fueron fungicidas a 240  $\mu\text{M}$  (Wiens, 1978; Rivera Vargas et al., 1993).

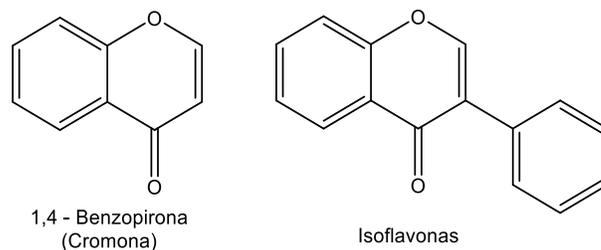
**Figura 1.** Fitoalexinas propias de la familia Fabaceae.



Se tiene entonces como uno de los núcleos estructurales presentes en la familia Fabaceae y base en la síntesis biológica de fitoalexinas a partir de la ruta del Shikímico precursora

de los fenilpropanoides, la 1,4-benzopirona (Figura 2) (Dotor & Cabezas, 2014; Ordenhana, 1998).

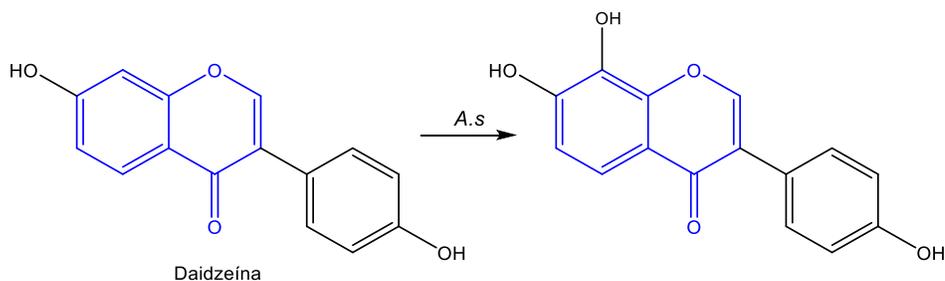
**Figura 2.** Núcleo estructural fitoalexinas de la familia Fabaceae.



Los hongos fitopatógenos han demostrado tener la capacidad de detoxificar las fitoalexinas producidas por especies de la familia Leguminosae y Fabaceae, permitiéndoles de esta forma superar las barreras defensivas de la planta. Algunos autores han demostrado la relación entre la patogenicidad del hongo y su capacidad para metabolizar las isoflavonas, tal es el caso de los cambios estructurales dados en procesos de bioconversión de fitoalexinas que se encuentra en la transformación metabólica de la daidzeína y algunos de sus análogos estructurales por acción del hongo fitopatógeno *Aspergillus saitoi* (Pedras & Ahiahonu, 2005; Pedras et al., 2009).

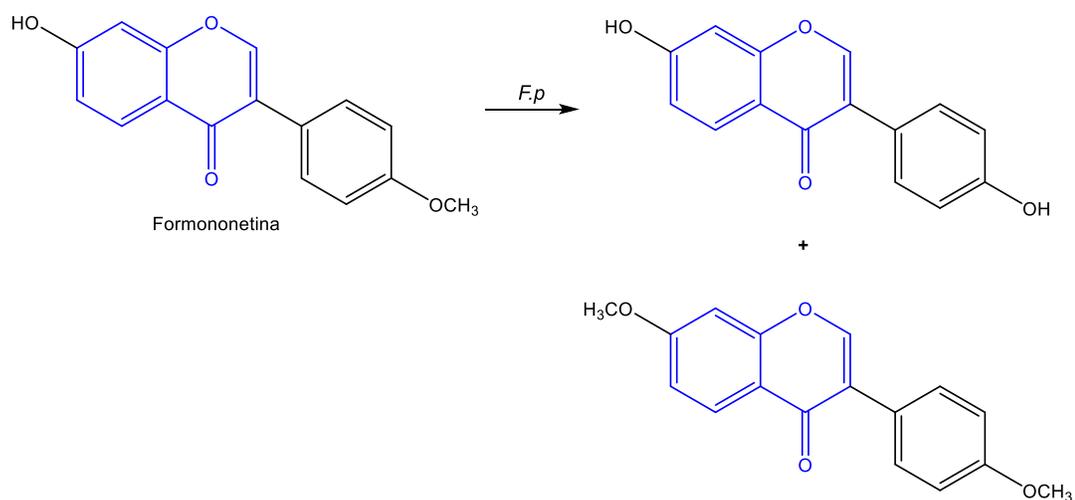
Tal y como se evidencia en la figura 3, inicialmente se observa la adición de un grupo hidroxilo en el carbono 8 de la molécula por acción del hongo, dando como resultado la reducción en la toxicidad de la fitoalexina favoreciendo la diseminación del patógeno y a su vez la síntesis de un compuesto con actividad antioxidante como es el caso de la 8-hidroxidaidzeína (Figura 3) (Pedras & Ahiahonu, 2005).

**Figura 3.** Transformación metabólica de daidzeína por acción de *Aspergillus saitoi* (A.s).

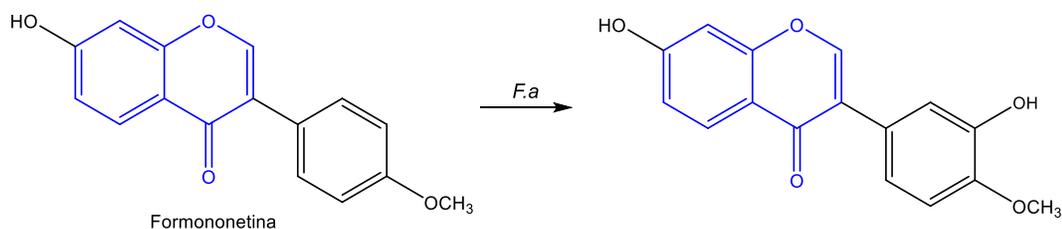


A su vez la detoxificación de la fitoalexina formononetina por acción metabólica de los fitopatógenos *Fusarium proliferatum* y *Fusarium avenaceum* da como resultado nuevamente la obtención de daidzeina, calicosina entre otros análogos de este compuesto (Figuras 4 y 5) (Pedras & Ahiahonu, 2005).

**Figura 4.** Bioconversión de formononetina por acción de *Fusarium proliferatum* (*F.p.*).



**Figura 5.** Bioconversión de formononetina por acción de *Fusarium avenaceum* (*F.a.*).



Es importante resaltar que los productos de reacción obtenidos en este caso tienen potencial biológico. Por su parte la daidzeína es una fitoalexina que a pesar de no representar mayor toxicidad para *Fusarium proliferatum* si hace parte de los metabolitos secundarios sintetizados por plantas de la familia Fabaceae como respuesta ante el ataque de gran variedad de patógenos por lo que su acción antimicrobiana no debe despreciarse. (Harada & Kondo, 2009)

## 1.2.2 Fitoalexinas tipo 1,2-benzopirona: familias Rutaceae y Apiaceae

En las plantas, las cumarinas contribuyen a la defensa contra patógenos, la respuesta al estrés abiótico, la regulación del estrés oxidativo, y probablemente como moléculas señalizantes. Estas pueden ser subclasificadas en cumarinas simples (benzo- $\alpha$ -pironas), cumarinas 7-oxigenadas (furanocumarinas), piranocumarinas (benzodipiran-2-onas), y fenilcumarinas (benzo-benzopironas) (Medina et al., 2015). Las furanocumarinas por su parte son características de las familias Rutaceae y Apiaceae (Umbeliferaceae), aunque también se encuentran en miembros de otras familias de plantas. Las furanocumarinas lineales son frecuentemente llamadas psoralenos. Los cítricos, como miembros de la familia Rutaceae, pueden sintetizar tanto cumarinas como furanocumarinas (Nebo et al., 2014). Aunque las cumarinas están presentes constitutivamente en bajos niveles, su concentración en los tejidos de la planta incrementa notablemente a medida que progresa la infección. La inducción de su producción por hongos y su fungitoxicidad son evidencias de que las cumarinas actúan como compuestos de defensa (fitoalexinas) en algunas plantas (Gnonlonfin et al., 2012).

### Familia Rutaceae

La familia Rutaceae comprende alrededor de 1600 especies de arbustos y árboles, predominando en los países cálidos (Coy Barrera et al, 2013). La utilidad en diferentes campos de las especies de esta familia es numerosa, por ejemplo en la industria alimentaria se encuentra el género *Citrus* sp al que corresponden los cítricos como la naranja, mandarina y el limón. En farmacología el género *Haplophyllum* sp es ampliamente estudiado dada su riqueza en alcaloides, y en la industria ornamental el género *Hortia* sp por sus flores (Coy Barrera et al., 2013).

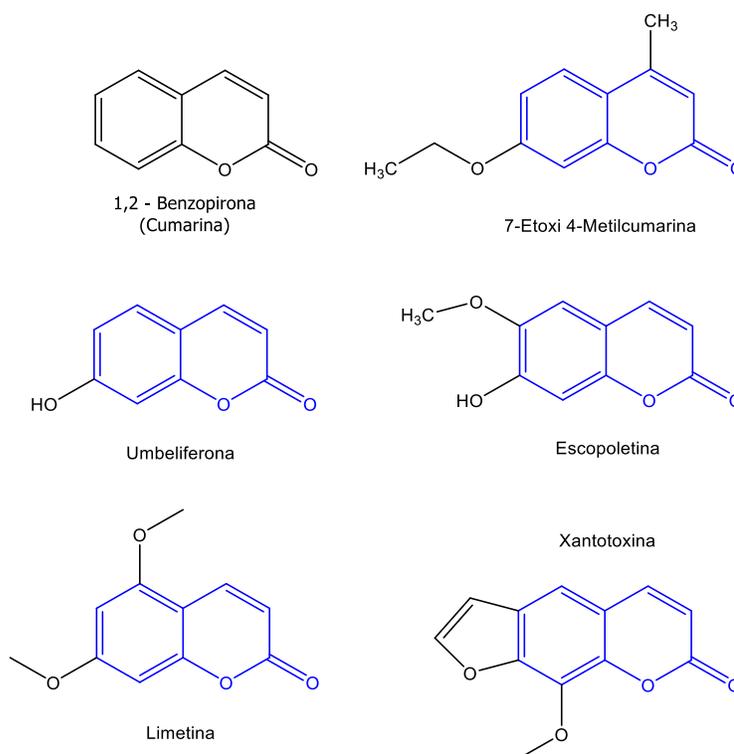
Las especies de esta familia se encuentran ubicadas en regiones tropicales y subtropicales, y algunas especies se encuentran más distribuidas en las zonas templadas del planeta. En Colombia se encuentra ampliamente distribuida, sobre todo en la cordillera central con 19 de sus géneros (Coy Barrera et al., 2013).

En la familia Rutaceae las cumarinas han sido uno de los metabolitos más representativos en casi todas sus especies. Numerosos estudios han demostrado una marcada producción

de diferentes tipos de núcleos de cumarina con patrones de oxigenación distintos, lo cual resulta interesante, debido a sus propiedades y actividad biológica (Coy Barrera et al., 2013).

Entre las cumarinas encontradas en plantas de la familia Rutaceae se encuentran las fitoalexinas 7-etoxi-metil-cumarina, escopoletina y la umbeliferona (Figura 6) (Ahuja et al., 2012; Nigam, Rao, & Jayashree, 2013):

**Figura 6.** Plantilla estructural y fitoalexinas propias de las familias Rutaceae.



### Familia Apiaceae

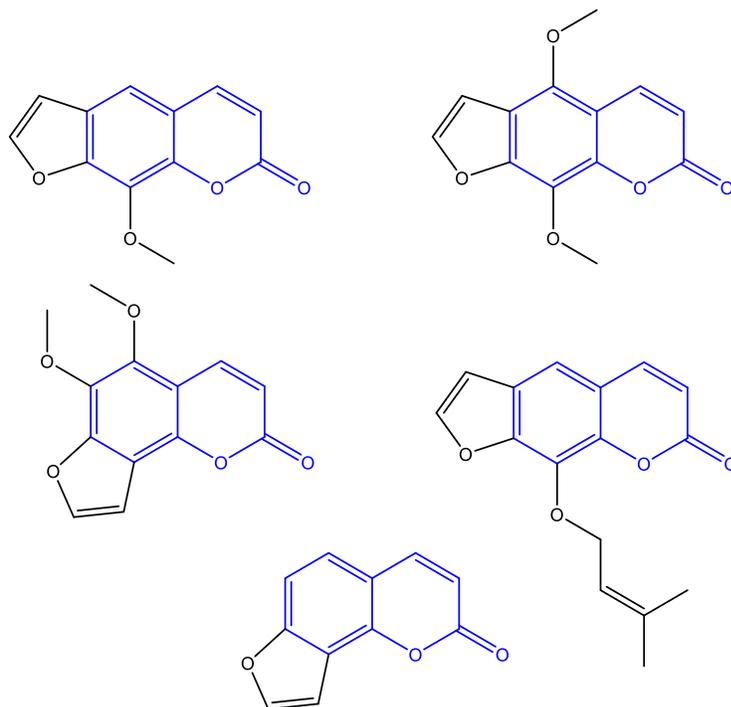
La familia de Apiaceae proporciona una gran cantidad de plantas que se usan para diferentes propósitos a nivel mundial, incluyendo nutrición, medicina, repelentes, tintes, cosméticos y fragancias. Adicional a esto, investigaciones previas sobre plantas de la familia Apiaceae revelan su importancia como fuente potencial de agroquímicos naturales así como sus actividades biológicas tales como propiedades antitumorales, antimicrobianas, antiinflamatorias, analgésicas, depuradoras de radicales, diuréticas,

gastrointestinales y antiobesidad; al constituirse como plantas ricas en metabolitos secundarios como terpenoides, saponinas triterpenoides, flavonoides, cumarinas, poliacetilenos y esteroides (Sayed-Ahmad et al., 2017) .

Es importante destacar que las cumarinas cumplen un papel importante en la actividad biológica de las Apiaceas, tal es el caso del potencial antibacteriano de los extractos de semilla de eneldo contra bacterias Gram-positivas y cuatro bacterias Gram-negativas atribuida a la presencia de furanocumarinas. Así mismo las cumarinas presentes en los extractos de hojas de perejil demuestran actividad antimicrobiana en *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. aureus* y *S. cerevisiae in-vitro* (Sayed-Ahmad et al., 2017).

A continuación algunos ejemplos de cumarinas con actividad antimicrobiana encontradas en la familia Apiaceae (Figura 7) (ONeill et al., 2013; Walasek et al., 2015).

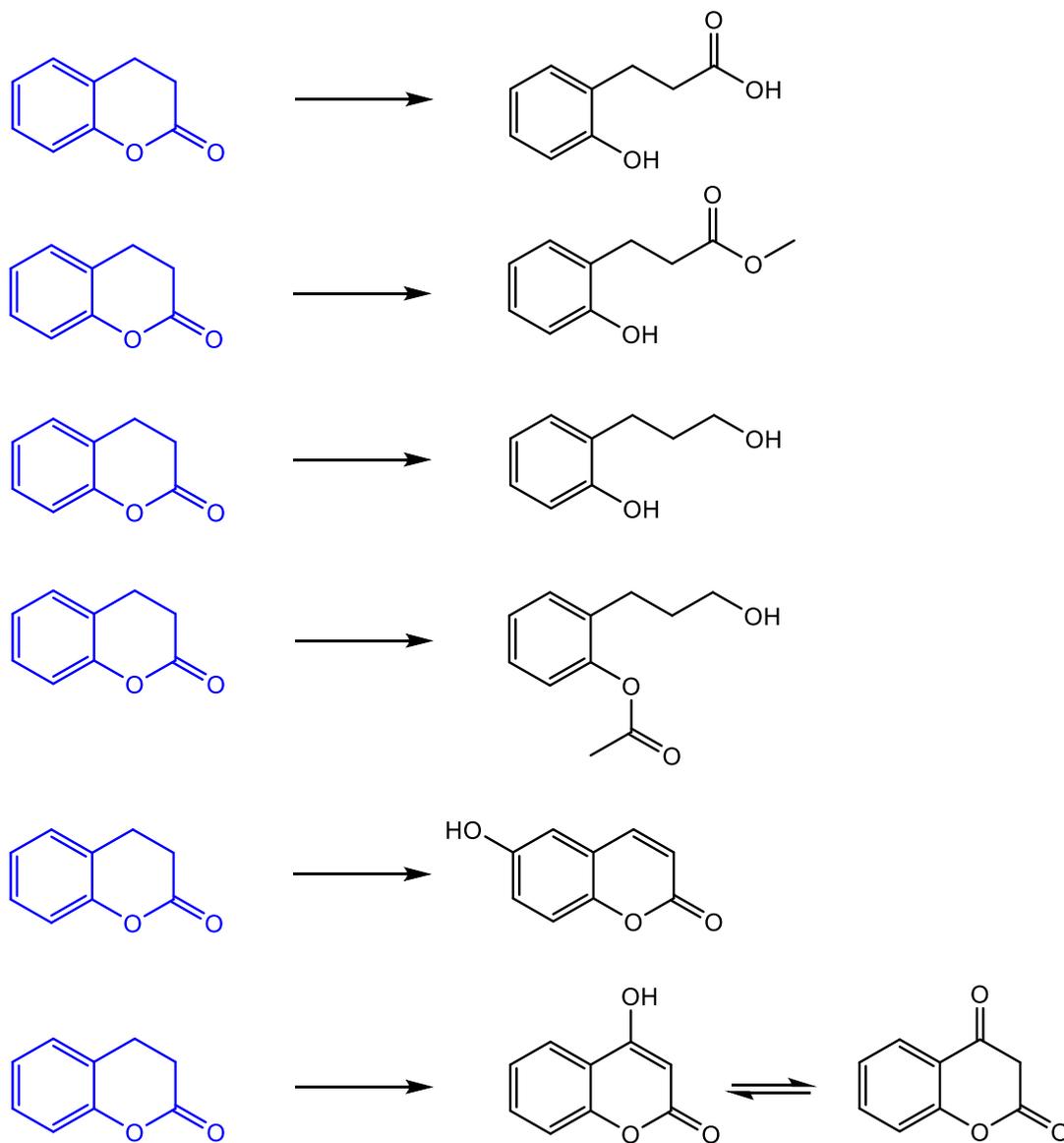
**Figura 7** Cumarinas con actividad antimicrobiana de la familia Apiaceae



Algunos ejemplos de la interacción de hongos fitopatógenos con cumarinas y su relación directa con la patogenicidad de estos organismos es la necesidad evidente de transformar metabólicamente estas sustancias con el propósito de reducir su toxicidad. Como es el

caso de la bioconversión de la dihidroumarina por acción del fitopatógeno *Aspergillus niger* (Figura 8) (Aguirre-Pranzoni et al., 2011).

**Figura 8.** Metabolitos obtenidos por biotransformación de dihidroumarina por acción metabólica de *A. niger* (Aguirre-Pranzoni et al., 2011).



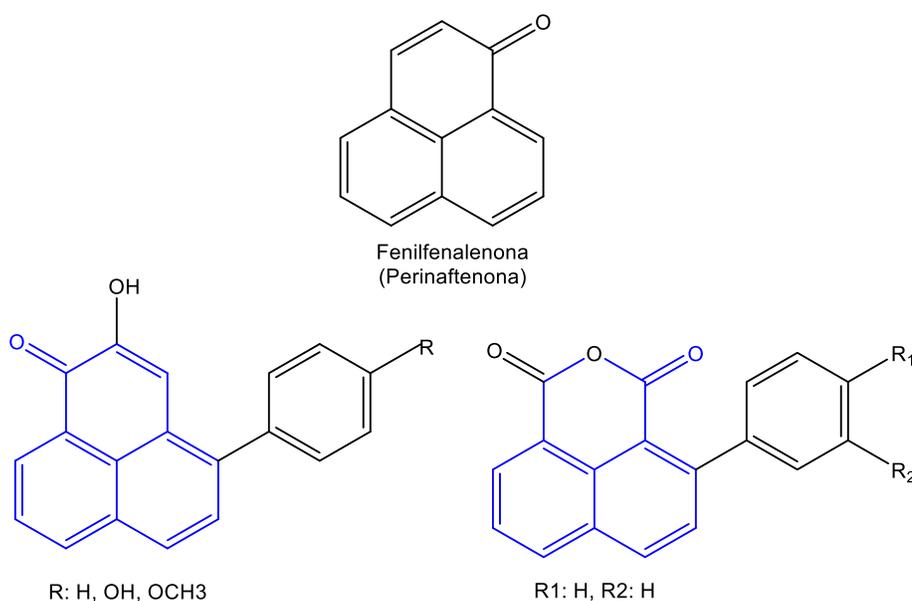
### 1.2.3 Fitoalexinas tipo fenilfenalenonas: Familia Musaceae

La Colección Colombiana de Musáceas (CCM) cuenta con 140 cultivares de plátanos y bananos pertenecientes al género *Musa* sp (Martínez C., et al., 2015).

Entre los metabolitos secundarios encontrados en esta familia se encuentran las fenilfenalenonas reportadas como fitoalexinas propias de banano y plátano en sus diferentes especies (Otálvaro et al., 2010).

El término fenilfenalenona deriva del sistema principal tricíclico de fenaleno, de donde se obtiene la fenalenona (perinaftenona), cuya estructura es la base de más de 30 fitoalexinas aisladas de plantas de la familia Musaceae (Figura 9) (Hidalgo Bucheli, 2009) :

**Figura 9.** Plantilla estructural de las fenilfenalenonas y fitoalexinas encontradas en la familia Musaceae.



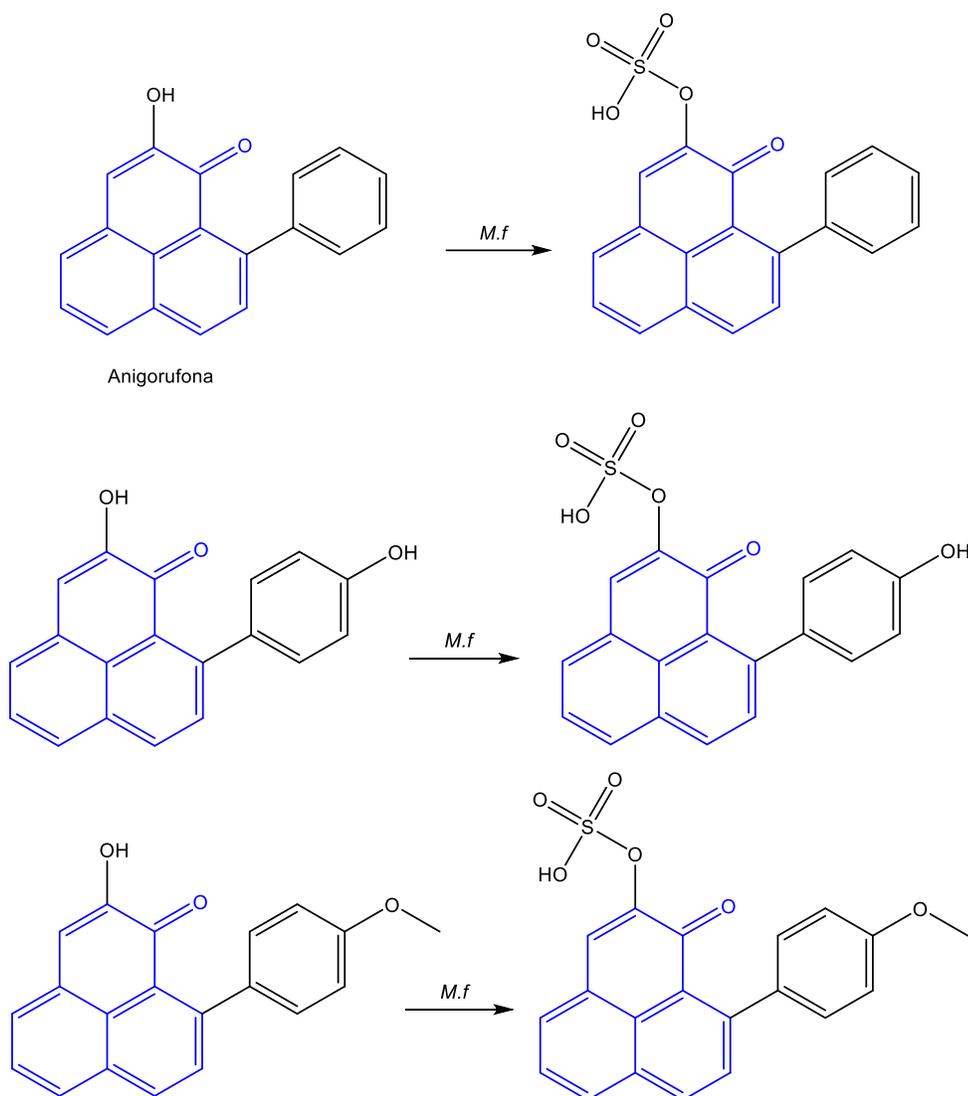
La bioconversión se entiende como el proceso mediante el cual se produce la transformación de un compuesto químico en otro mediante el uso de un sistema biológico, que puede ser un organismo completo, una enzima o un sistema enzimático. Si la conversión química de la sustancia se lleva a cabo con la ayuda de una enzima libre o inmovilizada, se emplea el término biocatálisis. Por su parte, si se lleva a cabo con la ayuda de una célula completa usualmente un microorganismo que contiene la enzima o complejo

de enzimas necesario para la bioconversión se habla entonces de biotransformación (Velasco B et., 2009).

A continuación se ilustran algunos ejemplos de estos procesos de bioconversión realizados por diferentes hongos en compuestos cuyo núcleo estructural es la perinaftenona.

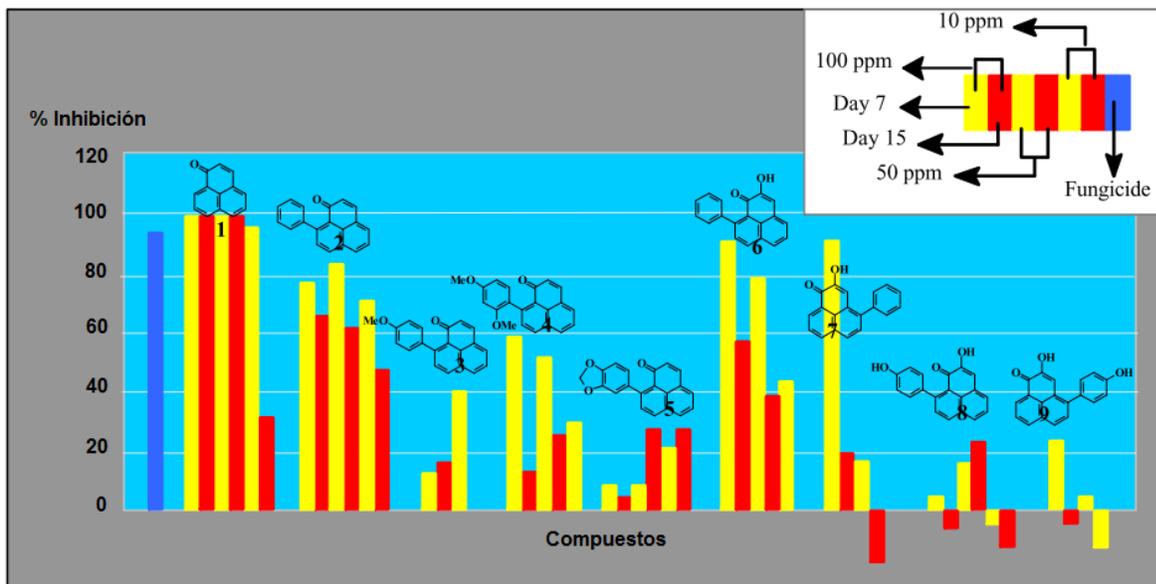
Se evaluó la incubación a escala *M. fijensis* con fenilfenalenonas derivadas de anigorufona sintética evidenciando disminución hasta 5,00 mg/L de sustrato por procesos metabólicos (Figura 10) (Jena, Fernando, & Bucheli, 1981).

**Figura 10.** Sulfatos de fenilfenalenona identificados en extractos metanólicos con micelios de *M. fijensis* (*M.f*) (Jena et al., 1981).



Es importante destacar la actividad antimicrobiana reportada para este tipo de compuestos. Tal es el caso de la evaluación de perinaftena y algunos de sus derivados estructurales en dosis de 10,0; 50,0 y 100,0  $\mu\text{g/mL}$  contra el fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis* en periodos comprendidos de 7 a 15 días (Figura 11). Aquí es posible observar como la perinaftena representa la mayor actividad respecto a sus derivados sintéticos con algún tipo de sustitución (Quiñones et al., 2000).

**Figura 11.** . Actividad antifúngica de perinaftena y derivados estructurales frente a *M. fijiensis* (Quiñones et al., 2000).



### 1.3 Fitopatógenos y Enfermedades Asociadas

Los hongos y organismos fúngicos que causan enfermedades en las plantas son miembros del grupo Eukaryota (poseen un núcleo organizado) y en su mayoría poseen un cuerpo vegetativo filamentosos llamado micelio que se ramifica en todas direcciones. Las ramas individuales del micelio se denominan hifas y son generalmente uniformes en espesor (2 a 10 micrómetros de diámetro), la longitud del micelio puede ser desde micrómetros hasta metros en algunos casos y su crecimiento ocurre en las puntas de las hifas donde se albergan cuerpos reproductivos de una o pocas células llamados esporas que permiten su reproducción (Agrios, 2013).

Durante su fase parásita, los hongos asumen diversas posiciones en relación con las células y tejidos de las plantas. Aquellos que causan marchitamiento vascular, como *Fusarium* sp, crecen dentro de los vasos del xilema de plantas infectadas, mientras que los llamados hongos endofíticos, crecen principalmente en plantas asintomáticas y existen intercelularmente en sus diversos órganos, los parásitos obligados (biotróficos) pueden crecer sólo en asociación con células vivas, mientras que el micelio de algunos parásitos no obligados nunca entra en contacto con las células vegetales vivas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, independientemente de la posición del micelio en el huésped, los cuerpos reproductores (esporas) del hongo se producen en o muy cerca de la superficie de los tejidos del huésped para asegurar su pronta y eficiente diseminación (Agrios, 2013). La supervivencia y el rendimiento de la mayoría de los hongos patógenos de las plantas depende en gran medida de las condiciones imperantes de temperatura y humedad en su medio ambiente (Agrios, 2013).

Los hongos fitopatógenos causan síntomas locales o generales en sus huéspedes y tales síntomas pueden ocurrir por separado, simultáneamente o pueden seguir uno al otro. En general, los hongos causan necrosis local o general de los tejidos vegetales, y a menudo pueden causar crecimiento reducido o excesivo de los órganos de las plantas enteras (Agrios, 2013).

### 1.3.1 *Botryodiplodia theobromae*

La familia de hongos Botryosphaeriaceae abarca un grupo morfológicamente diverso de hongos patógenos, endófitos o saprobas, principalmente en huéspedes leñosos. Puede encontrarse en todos los ámbitos geográficos y zonas climáticas del mundo, con la excepción de las regiones polares (A.J.L.Phillips et al., 2013).

Por su parte *Lasiodiplodia theobromae* (Sinónimo: *Botryodiplodia theobromae*) se constituye como una forma teleomórfica de *Botryosphaeria Rhodina* y es considerado un hongo omnipresente y plurívoro, capaz de infectar a más de 500 especies de plantas; causando síntomas que van desde la pudrición de la semilla, hasta la decoloración de la madera (Cardoso & Wilkinson, 2008). La infección causada por este organismo generalmente se limita a plantas heridas o debilitadas por el estrés, encontrándose entre las especies afectadas por este fitopatógeno el aguacate, algodón, cacao, café, piña, caña de azúcar, caucho, mango, maní, palma africana, pino, tabaco, cítricos, entre otros (Luc et al., 2009).

*Botryodiplodia theobromae* se encuentra normalmente en la corteza y madera muertas, y se le considera un invasor secundario u oportunista, de heridas ocasionadas por insectos, debilitamiento de los brotes por frío extremo, daños mecánicos o ataque de otros patógenos (Luc et al., 2009).

Como parte de las medidas de protección y erradicación empleadas actualmente para el control del patógeno se encuentran, el tratamiento de los cortes o heridas con pastas fungicidas, fertilizaciones constantes, control del exceso de humedad en tallos por plantas de cobertura y eliminación de ramas afectadas (Alarcón et al., 2012).

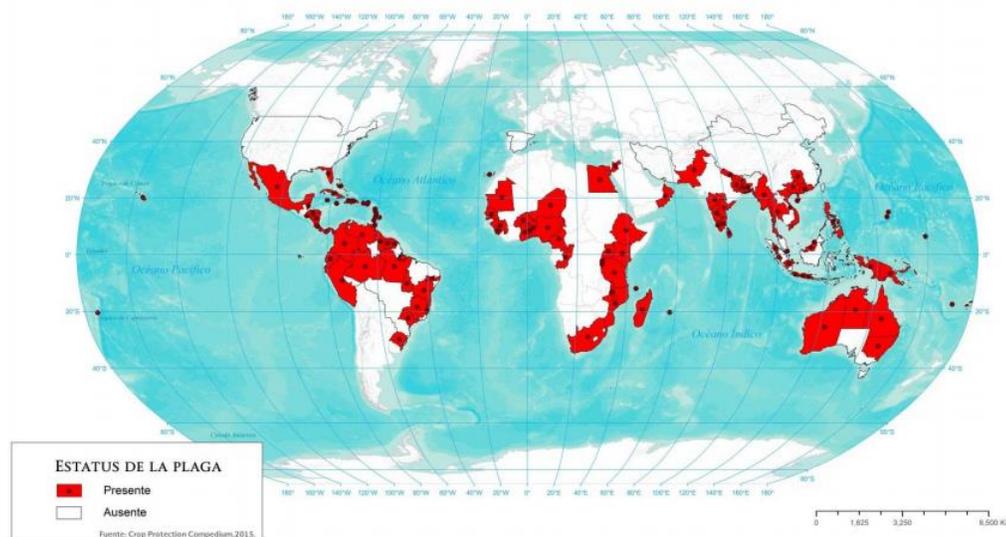
### 1.3.2 *Fusarium oxysporum*

Perteneciente a la familia Nectriaceae, el género *Fusarium* sp se constituye como saprófito de amplia distribución a nivel mundial, habitante natural del suelo y de material orgánico en descomposición. Este género es conocido por su capacidad fitopatógena que afecta

gran variedad de cultivos (Elliott, 2010), entre las enfermedades causadas por este organismo se encuentra el

mal de Panamá o marchitez vascular (*Fusarium oxysporum*), es considerada una de las enfermedades más destructivas del plátano y banano a nivel mundial (Figura 12), por lo que se ha considerado un problema de la industria bananera durante años (Elliott, 2010).

**Figura 12.** Distribución geográfica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Mal de Panamá) (Martínez-Bolaños, 2013).



Existen cuatro razas de *Fusarium oxysporum* que a nivel mundial atacan cultivos de interés económico como el plátano, banano, heliconias, tomate, uchuva, arroz y maíz. (Cotes et al., 2012)

En América el mal de Panamá asociado a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* fue reportado por primera vez en Panamá en la década de 1940, afectando más de 50.000 ha de cultivo. (Martínez-Bolaños, 2013)

Actualmente se encuentran implementadas diversas estrategias de control a nivel nacional para este fitopatógeno como son: control por exclusión, control cultural (distancias de siembra, rotación de cultivos entre otras), control físico y finalmente control químico mediante el uso de productos como carbendazim, polietoxi etanol, carboxin y thiram que

aumentan los costos de producción y afectan el medio ambiente (Cotes et al., 2012; Ploetz, 2015).

### 1.3.3 *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinérea* es un fitopatógeno ampliamente diseminado a nivel mundial gracias a su amplia variabilidad genética. Hace parte de la familia Moniliaceae y se constituye como un hongo filamentos, necrótrofo que se reproduce asexualmente por conidias.(Sanhueza Rios, 2015)

Conocido comúnmente como moho gris, *Botrytis cinérea* es uno de los causantes de las enfermedades más comunes y distribuidas en verduras, ornamentales, frutas e incluso algunos cultivos de campo en todo el mundo y hace parte de los causantes típicos de enfermedad en cultivos de invernadero. Las enfermedades ocasionadas por este fitopatógeno aparecen inicialmente como añublo y pudrición de la fruta, pero también como canchales de tallos o pudriciones, manchas foliares y pudriciones de tubérculos, cormos y bulbos(Agrios, 2013) (M. C. A. Rodrigo, 2013). Tiene hospedantes en monocotiledóneas, dicotiledóneas y, ocasionalmente, en pteridofitas. Las demás especies de *Botrytis sp* atacan con alguna especificidad monocotiledóneas de las familias Iridaceae, Amarilidaceae y Liliaceae y dicotiledóneas de la familia Ranunculaceae (M. C. A. Rodrigo, 2013) (Garcés de Granada, 1992)

Algunas de las enfermedades causadas en cultivos de alto interés económico por este microorganismo son el moho gris de la fresa, frijol y uvas, la pudrición del extremo del cáliz de la manzana, explosión de cebolla y rotura del cuello, tizón o moho gris de plantas ornamentales y podredumbres secundarias de frutas y verduras en almacenamiento, tránsito y mercado.(Agrios, 2013)

Los distintos métodos de control pueden clasificarse en reguladores, culturales, biológicos, físicos y químicos, dependiendo de la naturaleza de los agentes que se empleen (Moreno, 2012). Entre los compuestos químicos comúnmente utilizados para el control de *Botrytis cinerea* se encuentran las hydroxianilidas (fenhexamid), anilinoimidazoles (cyprodinil y pyrimethanil), dicarboximidazoles (iprodione), carboxamidas (boscalid), estrobilurinas,

phenylpirroles (fludioxonil) y algunos inhibidores de la biosíntesis del ergosterol como tebuconazole.(Sanhueza Rios, 2015) (M. C. A. Rodrigo, 2013)

## Capítulo 2. Actividad antifúngica y metabolismo de perinaftenona y derivados

Artículo 1. Luisa M. Castaño, Andrés F. Gómez, Diego Durango

### 2.1 Abstract

The metabolism and *in vitro* fungitoxicity of perinaphthenone against the phytopathogenic fungi *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* were investigated. Significant antifungal activity (around 30% inhibition) was found for perinaftenone from 25  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and greater than 90% inhibition for a concentration of 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

Metabolic studies revealed that the microbial transformation of perinaphthenone by *F. oxysporum* shows an almost total reduction in the amount of substrate in the culture medium and the occurrence of two major products, whose concentration increased progressively during the twelve days of the test. Two reduction products in the  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl system were detected after purification processes by conventional chromatographic techniques and elucidation structural analysis by nuclear magnetic resonance. Studies on the influence of some substituents in the perinaphthenone system on the antifungal activity against *B. theobromae* were also carried out. Results indicate that the presence of the  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl system is an important structural requirement for the antifungal activity. It is concluded that perinaphthenone could be suggested as feasible structural template for the development of new antifungal agents.

**Keywords:** Phenalenones, *Fusarium oxysporum*, antifungal activity.

## 2.2 Resumen

Se investigó el metabolismo y la fungitoxicidad *in vitro* de la perinaftenona contra los hongos fitopatógenos *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinérea* y *Fusarium oxysporum*; encontrándose actividad antifúngica significativa (alrededor del 30% de inhibición) para la perinaftenona a partir de 25 µg/mL y superior al 90% de inhibición para una concentración de 200 µg/mL.

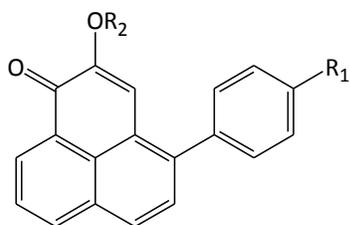
Los estudios metabólicos revelaron que la transformación microbiana de la perinaftenona por el hongo *F. oxysporum* muestran una reducción casi total del sustrato en el medio de cultivo y la formación de dos productos mayoritarios, cuya concentración incrementó progresivamente durante los doce días de evaluación. Luego de procesos de purificación y análisis de elucidación estructural por resonancia magnética nuclear, se encontró que los dos metabolitos corresponden a productos de reducción del sistema carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado. También se llevaron a cabo estudios sobre la influencia de sustituyentes en el sistema perinaftenona en la actividad antifúngica contra *B. theobromae*. Los resultados indican que la presencia del sistema carbonílico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado es un requerimiento estructural importante para la actividad antifúngica. Se concluye que la perinaftenona podría ser sugerida como una plantilla estructural potencial para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos.

**Palabras clave:** Fenalenonas, *Fusarium oxysporum*, actividad antifúngica.

## 2.3 Introducción

1-*H*-Fenalen-1-onas (perinaftenonas) son una clase de compuestos con un sistema de tres anillos fusionados (Figura 13). La perinaftenona es la base de muchos metabolitos secundarios antimicrobianos aislados de hojas, frutos y rizomas de banano y plátano (Musaceae), así como también de productos naturales relacionados de Strelitziaceae, Pontederiaceae y Haemodoraceae (Greca & Lanzetta, 1992; Dirk Holscher & Schneider, 2000)(Hölscher & Schneider, 2005; Opitz & Schneider, 2002) En la familia Musaceae, estos compuestos actúan como fitoalexinas; fitoquímicos protectores antimicrobianos que son sintetizados en respuesta a infecciones por patógenos (por ejemplo, *Mycosphaerella fijiensis*, un agente causante de la enfermedad conocida como Sigatoka Negra en el banano y plátano), daño mecánico y tratamientos químicos (por ejemplo, con aminoglucósidos) (Echeverri, Lanau, & Pelaez, 1985) Algunos análogos de fenalenona son también fitoalexinas defensivas en plantas de banano atacadas por nematodos (D. Holscher et al., 2014). Las fenalenonas naturales, así como también sus derivados y análogos estructurales exhibieron actividad antifúngica, antiplasmodial y antiprotozoaria y capacidad secuestradora de radicales (Gutiérrez et al, 2013; Rosquete et al., 2010; Schneider et al., 2011; Freijo et al, 2018). También se han desarrollado derivados de fenalenonas como medicamentos odontológicos para la inactivación fotodinámica de bacterias orales (Spath et al. 2014). Algunos análogos de fenalenonas sustituidas 9-fenil y 2-hidroxi tienen actividad potencial contra áfidos de frijol caupí (Zhang, Feng, Li, & Shao, 2017). En la presencia de luz, las fenalenonas han desplegado toxicidad contra larvas de *Aedes albopictus* y el nematodo *Meloidogyne incognita*, mientras la actividad se redujo en la oscuridad (Song et al., 2017). Las fenalenonas 2-hidroxi-1H-fenalen-1-ona y 2-metoxi-1H-fenalen-1-ona exhibieron una actividad mejorada significativamente contra *M. fijiensis* en comparación con las fenilfenalenonas (Otálvaro et al., 2007). Por lo anterior, las fenalenonas han atraído la atención de científicos de varios campos, en particular de los agroquímicos quienes están buscando nuevos compuestos potenciales para el control de plagas. En el presente artículo, se evaluó el efecto inhibitorio de la perinaftenona (**1**) contra tres hongos aislados de lima Tahití y su metabolismo. Adicionalmente, se llevó a cabo la evaluación del efecto de algunos sustituyentes en el sistema perinaftenona sobre la actividad fungicida contra *B. theobromae*.

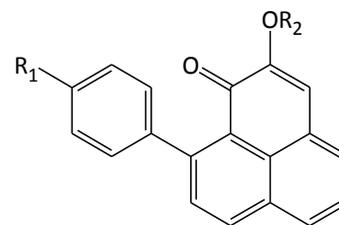
**Figura 13.** Estructuras químicas de derivados de perinaftenona sintéticos y naturales (*Musa spp.*)



R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H; Irenolona

R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H; 4-*O*-metilirenolona

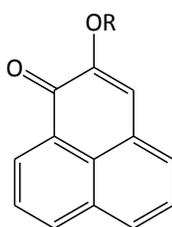
R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; 2-metoxi-4-fenilfenalen-1-ona



R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H; Anigorufona

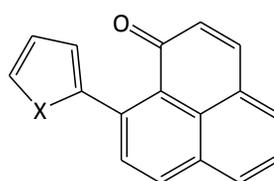
R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H; Hidroxianigorufona

R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; Metoxianigorufona



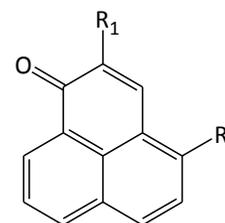
R = H

R = CH<sub>3</sub>



X = S

X = O



R<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub>; R<sub>2</sub> = H

R<sub>1</sub> = NO<sub>2</sub>; R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>

Compuestos sintéticos

## 2.4 Metodología

### 2.4.1 Materiales químicos y biológicos

Se aislaron los hongos fitopatógenos *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinérea*, y *Fusarium oxysporum* desde frutos de lima Tahiti (*Citrus latifolia* T.) infectados y con síntomas evidentes de la enfermedad, y se caracterizaron morfológicamente. Los hongos se conservaron en medio Agar Papa Dextrosa (PDA; Merck-KGaA, Darmstadt, Alemania) a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y se subcultivaron mensualmente en cajas Petri (9,0 cm de diámetro y 15,0 mL de medio). Para la evaluación de la actividad antifúngica, fueron inoculados en cajas Petri estériles de 9,0 cm de diámetro, discos con micelio de 6 mm. Fue empleada para el ensayo la 1-H-fenalen-1-ona (perinaftenona) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los ingredientes del medio de cultivo para el estudio metabólico se adquirieron de Oxoid Ltd. (Hampshire, Inglaterra).

## 2.4.2 Equipos y métodos analíticos

El aislamiento y manipulación de los microorganismos se realizó en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar (CBS 180A) clase II tipo A. Para todos los materiales empleados se garantizó inocuidad completa por medio de esterilización en autoclave horizontal automática (marca Centricol AUA 80L). El seguimiento del metabolismo microbiano de perinaftenona se realizó por cromatografía de capa fina (CCF) en cromatoplasas Merck Kiesegel 60 F<sub>254</sub> (0.25 mm espesor) usando como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo, y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) en un equipo Shimadzu, Prominense con detector de arreglo de diodos (SPD-M20A) y Software LabSolutions Lite versión 1.22 SP1 y las columnas RP-C18 Zorbax Eclipse Plus (150 mm x 4,6 mm – 5 µm) Agilent Technologies y Pinnacle II (100 mm x 4,6 mm-5 µm) Restek con gradiente de solventes acetonitrilo-agua en proporciones específicas. Para la purificación de los productos metabólicos y de síntesis se emplearon diferentes técnicas cromatográficas (cromatografía de columna, CC, y capa fina preparativa). Para la CC se emplearon como fases estacionarias sílica gel 60 (0.040-0.063 mm; Merck) y Sephadex LH-20. Los compuestos se detectaron en CCF por fluorescencia bajo la lámpara UV (254 y 366 nm), con vapores de yodo, o por aspersion con reveladores seguido de calentamiento suave. Para la identificación de los productos metabólicos y de síntesis se empleó espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H (300 MHz) y <sup>13</sup>C (75 MHz) mono- y bidimensional (COSY, HMQC y HMBC) en un espectrómetro Bruker AMX 300 con deuterocloroformo (CDCl<sub>3</sub>) como solvente. Los desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (J) son expresados en ppm y Hertz, respectivamente. La atribución de las multiplicidades para los carbonos se llevaron a cabo empleando el experimento JMOD. Notaciones: s = singlete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete, dd = doble de doblete, q = quinteto.

### 2.4.3 Actividad antifúngica de la perinaftenona y derivados

Para investigar la toxicidad de la perinaftenona (**1**) contra *B. theobromae*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*, se usó el método de envenamiento del medio de cultivo (Velasco, 2010; Gonzalez et al., 2009). Diferentes concentraciones de perinaftenona (12,5, 25, 50 y 100 µg/mL) disueltas en etanol (menos del 0,2 %, v/v) se diluyeron en cajas Petri con agar PDA. Todas las concentraciones se evaluaron por triplicado, y los resultados se muestran como valores crecimiento micelial medio correspondiente a los diámetros de la colonia ( $\pm$  desviación estándar, DE). Las cajas Petri sin compuesto se usaron como control negativo, conteniendo sólo medio de cultivo (Blanco absoluto) y adición de etanol 0.2%, v/v (Blanco solvente), mientras que para verificación de inhibición de crecimiento fueron empleados timol y carbendazim como control positivo en concentraciones de 200 y 50 µg/mL respectivamente. Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente con luz difusa y el diámetro del crecimiento micelial se midió cada 24 horas. La incubación se detuvo cuando el micelio en los controles absoluto y de solvente ocuparon la totalidad del espacio (aproximadamente 3,5 días para *B. theobromae*, 10 días para *B. cinérea* y 11 días para *F. oxysporum*). La fungitoxicidad de (**1**) en términos de porcentaje de inhibición del crecimiento radial se calculó usando la fórmula:  $\% \text{ inhibición} = (1 - (T/C)) \times 100$  donde,  $C = \text{diámetro de la colonia (mm) del blanco abcoluto}$  y  $T = \text{diámetro de la colonia (mm) de los tratamientos (perinaftenona y derivados)}$ .

Adicionalmente, para el compuesto (**1**), se determinó preliminarmente la concentración que inhibe 50% del crecimiento micelial fúngico ( $IC_{50}$ ) para todos los hongos de acuerdo con la metodología de (Rivillas-Acevedo & Soriano-García, 2007).

Los porcentajes de inhibición obtenidos para cada compuesto en los diferentes tiempos de análisis fueron evaluados con el software Statgraphics y análisis de Multiple Sample Comparission con el fin de establecer diferencias significativas entre los compuestos evaluados en un mismo tiempo.

### 2.4.4 Metabolismo de la perinaftenona

#### a. Precultivo

Los hongos se inocularon en Erlenmeyer de 1,0 L, conteniendo 500 mL de medio líquido Czapek-Dox (solución A: Glucosa 5%, extracto de levadura 0,1%; solución B:  $K_2HPO_4$  0,5%,  $NaNO_3$  0,2%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,001%). Los Erlenmeyer se

agitaron (agitador orbital, 120 rpm; Centricol serie 0239) a temperatura ambiente durante 10 días. El micelio se colectó por filtración, se lavó con agua y se empleó en la biotransformación preparativa y los experimentos en el curso del tiempo (Cangerana et al., 2012).

#### **b. Experimentos en el curso del tiempo**

Los hongos *B. theobromae*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* precultivados se reinocularon en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio Czapeck-Dox y perinaftenona (**1**) a concentración final de 25 µg/mL. Los hongos fitopatógenos se cultivaron a 120 rpm por 12 días. El medio de cultivo se tomó de cada matraz cada tres días; luego se saturó con NaCl y se extrajo con acetato de etilo y diclorometano; posteriormente el solvente se evaporó. Estos extractos se analizaron por CCF y HPLC-DAD. La relación entre el sustrato y los productos metabólicos se determinó con base en el área de los picos de HPLC-DAD; los resultados se expresaron como abundancias relativas. Los controles (sin sustrato) se llevaron a cabo para verificar la presencia de compuestos similares en los cultivos de los hongos.

#### **c. Metabolismo a escala preparativa**

El micelio de *F. oxysporum* de un cultivo de 3 días de antigüedad se transfirió a 10 matraces Erlenmeyer de 1,0 L conteniendo 0,5 L de medio líquido Czapek-Dox y perinaftenona a concentración final de 100 µg/mL disuelta en etanol (< 0,2%, v/v). El cultivo se llevó a cabo agitando (agitador orbital, 120 rpm) a temperatura ambiente por 9 días. Después del período de incubación, el medio de cultivo y el micelio se separó por filtración. El micelio se descartó y el medio de cultivo se usó para el aislamiento de los productos metabólicos. El control se llevó a cabo para verificar la presencia de compuestos similares en los cultivos de los hongos (sin sustrato).

### **2.4.5 Aislamiento e identificación de los productos metabólicos**

El medio de cultivo se saturó con NaCl y se extrajo con Acetato de etilo (3 x 2,0L). Posteriormente, el medio fue acidulado a pH 2,0 con HCl 1,0 M, y se extrajo nuevamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 2,0 L). Los dos extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentraron al vacío. El extracto fue llevado a cromatografía de columna usando como fase estacionaria sílica gel. La elución se realizó con un sistema en gradiente de hexano - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos del metabolismo de perinaftenona por *F. oxysporum* se fraccionaron para arrojar doce fracciones, agrupadas de acuerdo con su perfil de TLC, las cuales permitieron evidenciar mayor separación de productos en las fracciones 1 y 4 que fueron seleccionadas para purificación por columna cromatográfica de SiO<sub>2</sub> así: la primera fracción (hexano - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10:1) se pasó por columna sobre SiO<sub>2</sub> usando como eluyente hexano - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15:1 para dar el producto metabólico (2). La cuarta fracción (hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 8:2) se llevó a columna sobre SiO<sub>2</sub> usando como eluyente hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10:1 para arrojar el producto metabólico (3). La identificación de estos metabolitos se basó en la interpretación de sus espectros de RMN.

**Producto metabólico (2):** UV (MeOH-H<sub>2</sub>O, 1:1) λ<sub>max</sub> (nm): 222, 286. <sup>1</sup>H RMN: δ 7.85 (d, J = 8.1, 1H, H-6), 7.76 (d, J = 8.4, 1H, H-7), 7.62 (d, J = 6.9, 1H, H-9), 7.53 (dd, J = 7.1 y 8.1, 1H, H-5), 7.47 (dd, J = 7.2 y 8.4, 1H, H-8), 7.35 (d, J = 7.1, 1H, H-4), 5.17 (dd, J = 4.5 y 5.7, 1H, H-1), 3.42-3.34 (m, 1H, H-3ax), 3.20-3.10 (m, 1H, H-3ec), 2.26 (m, 2H, H-2). <sup>13</sup>C RMN: δ 137.4 (C-9a), 135.1 (C-6a), 133.8 (C-3a), 129.0 (C-9b), 128.1 (C-8), 125.9 (C-5), 125.7 (C-4), 125.6 (C-9), 124.4 (C-7), 123.5 (C-6), 69.4 (C-1), 31.3 (C-2), 26.3 (C-3)(Anexo 1).

**Producto metabólico (3):** UV (MeOH-H<sub>2</sub>O, 1:1) λ<sub>max</sub> (nm): 213, 246, 332. <sup>1</sup>H RMN: δ 8.25 (d, J = 6.9, 1H, H-9), 8.15 (d, J = 8.1, 1H, H-6), 7.85 (d, J = 7.8, 1H, H-7), 7.66 (dd, J = 7.5 y 8.1, 1H, H-8), 7.53 (m, 2H, H-4, H-5), 3.50 (t, J = 7.2, 2H, H-3), 3.04 (t, J = 7.2, 2H, H-2). <sup>13</sup>C RMN: δ 191.1 (C-1), 136.2 (C-3a), 134.2 (C-6), 133.3 (C-7), 131.6 (C-6a), 130.8 (C-9a), 128.3 (C-9b), 126.3 (C-5), 125.7 (C-4), 125.6 (C-9), 125.1 (C-8), 38.6 (C-2), 28.6 (C-3)(Anexo 1).

## 2.4.6 Cuantificación

La cuantificación de los productos metabólicos se realizó usando curvas de calibración elaboradas en Excel 2013 en donde se evaluó el área del pico vs concentración del compuesto, para diferentes concentraciones del mismo. Para este propósito se prepararon cinco soluciones de trabajo para cada compuesto en acetonitrilo conteniendo (1), (2) o (3)

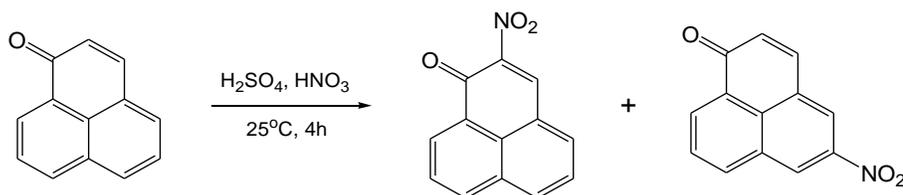
a 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL. Todas las curvas de calibración presentaron alta linealidad (coeficientes de correlación  $R^2 > 0,98$ ). Los datos para cada pico se colectaron usando la longitud de onda que proporcionó la máxima respuesta.

## 2.4.7 Preparación de derivados

**a. Nitración:** 2-nitro-1*H*-fenalen-1-ona (**4**) y 6-nitro-1*H*-fenalen-1-ona (**5**).

La perinaftenona (**1**, 100 mg) se nitró usando una mezcla de ácido sulfúrico concentrado (96%) y ácido nítrico (65%) llevados a agitación por 4 horas a 25°C, para producir (**4**) y (**5**) (Figura 14). Luego se neutralizó con solución de NaOH al 10%, se realizó una extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró, y evaporó a sequedad. El residuo se pasó por columna cromatográfica usando sílica gel 60 (0,040 – 0,063 mm; Merck), eluyendo con gradiente de hexano - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

**Figura 14.** Nitración de perinaftenona



**6-nitro-1*H*-fenalen-1-ona (4):** <sup>1</sup>H RMN: δ 8.91 (d, J = 8.4, 1H, H-7), 8.71 (d, J = 7.5, 1H, H-9), 8.33 (d, J = 7.8, 1H, H-5), 8.01 (dd, J = 7.5 y 8.4, 1H, H-8), 8.13 (d, J = 8.1, 1H, H-4), 7.80 (d, J = 9.9, 1H, H-3), 6.87 (d, J = 9.9, 1H, H-2); <sup>13</sup>C RMN: δ 185.05 (C-1), 148.34 (C-6), 140.46 (C-3), 132.89 (C-3a), 132.90 (C-9a), 131.47 (C-9), 131.24 (C-2), 130.37 (C-7), 129.87 (C-8), 129.14 (C-4), 128.33 (C-9b), 124.29 (C-5), 124.00 (C-6a) (**Anexo 1**).

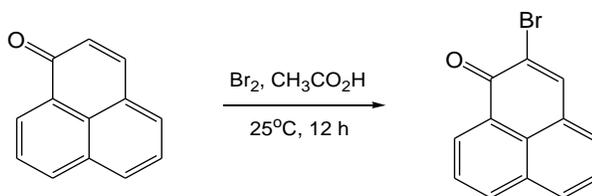
**2-nitro-1*H*-fenalen-1-ona (5):** <sup>1</sup>H RMN: δ 8.85 (dd, J = 0.9 y 7.5, 1H, H-9), 8.57 (s, 1H, H-3), 8.39 (d, J = 8.1, 1H, H-7), 8.32 (d, J = 8.0, 1H, H-4), 8.13 (d, J = 6.9, 1H, H-6), 7.95 (dd, J = 6.9 y 8.0, 1H, H-5), 7.80 (dd, J = 7.5 y 8.1, 1H, H-8); <sup>13</sup>C RMN: δ 174.05 (C-1), 150.14 (C-2), 138.94 (C-3), 136.46 (C-7), 136.26 (C-6), 135.87 (C-9), 134.56 (C-9a),

132.60 (C-4), 132.12 (C-6a), 129.97 (C-3a), 128.19 (C-8), 127.36 (C-5), 124.13 (C-9b) (**Anexo 1**).

**b. Bromación:** 2-Bromo-1*H*-fenalen-1-ona (**6**).

La perinaftenona (**1**, 50 mg) se bromo con una mezcla de bromo y ácido acético glacial que se mantuvo en agitación a 25°C durante 12 h (Figura 15). Posteriormente la solución resultante se neutralizó con NaOH al 10% y se sometió a extracción líquido-líquido con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se pasó por columna cromatográfica de sílica gel y fue eluida con gradiente de hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

**Figura 15.** Bromación de perinaftenona



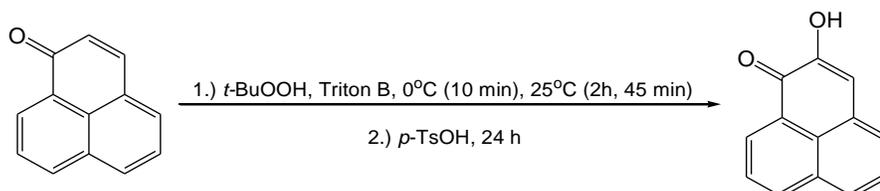
**2-Bromo-1*H*-fenalen-1-ona (6):** <sup>1</sup>H RMN: δ 8.79 (d, J = 7.5, 1H, H-9), 8.31 (d, J = 8.1, 1H, H-7), 8.29 (s, 1H, H-3), 8.14 (d, J = 8.1, 1H, H-4), 7.87 (t, J = 7.8, 1H, H-5), 7.81 (d, J = 6.9, 1H, H-6), 7.68 (dd, J = 7.8 y 7.5, 1H, H-8); <sup>13</sup>C RMN: δ 178.88 (C-1), 143.15 (C-3), 135.65 (C-7), 132.52 (C-6), 132.34 (C-9), 132.20 (C-6a), 131.54 (C-5), 128.72 (C-9a), 127.95 (C-3a), 127.56 (C-4), 126.96 (C-8), 126.74 (C-9b), 125.90 (C-2) (**Anexo 1**).

**c. Hidroxilación:** 2-Hidroxi-1*H*-fenalen-1-ona (**7**).

En un baño de hielo se disolvieron 100 mg de perinaftenona (**1**) en tolueno; posteriormente se adicionaron 50 μL de *ter*-butilhidroperoxido acuoso (70% en agua, Alfa-Aesar, Heysham, Lancs) y 50 μL de Triton B (40% en metanol). Pasados 10 min se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se mantuvo en agitación constante hasta una segunda adición de *ter*-butilhidroperoxido acuoso y Triton B. Pasadas 2 h de la segunda adición de reactivos se agregaron cristales de ácido *p*-toluensulfónico y se dejó

la mezcla a temperatura ambiente y agitación constante por 24 h (Figura 16). El sólido naranja obtenido fue purificado con columna cromatográfica de sílica gel.

**Figura 16.** Hidroxilación de perinaftenona

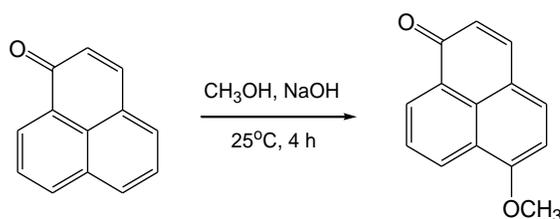


**2-hidroxi-1H-fenalen-1-ona (7):**  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.78 (d,  $J = 7.5$ , 1H, H-9), 8.32 (d,  $J = 7.8$ , 1H, H-7), 7.98 (d,  $J = 7.8$ , 1H, H-6), 7.85 (dd,  $J = 6.9$  y  $7.8$ , 1H, H-5), 7.76 (d,  $J = 6.9$ , 1H, H-4), 7.65 (dd,  $J = 7.5$  y  $7.8$ , 1H, H-8), 7.21 (s, 1H, H-3), 7.06 (s, 1H, OH).  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  180.5 (C-1), 149.5 (C-2), 136.6 (C-7), 132.0 (C-6a), 131.2 (C-6), 130.6 (C-9), 129.9 (C-5), 128.4 (C-9b), 127.5 (C-9a), 127.2 (C-4), 126.9 (C-8), 124.4 (C-3a), 113.9 (C-3) (Anexo 1).

**d. Metoxilación:** 6-Metoxi-1H-fenalen-ona (8).

Se disolvió perinaftenona (1, 50 mg) en metanol y se agregó una perla de NaOH. La mezcla se mantuvo en agitación constante y a temperatura ambiente durante 4 h (Figura 17). La solución se tornó verde-café. Posteriormente, se procedió a neutralizar la solución con HCl al 10%. La solución resultante se sometió a extracción líquido-líquido con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró a gravedad y se evaporó a sequedad en un rotoevaporador.

**Figura 17.** Metoxilación de perinaftenona



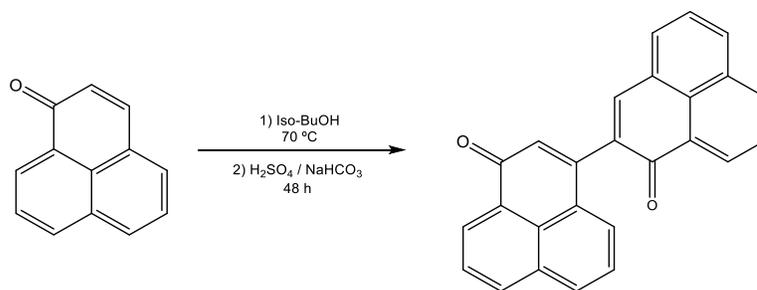
**6-Metoxi-1H-fenalen-ona (8):**  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.71 (dd,  $J = 0.9$  y  $7.5$ , 1H, H-9), 8.65 (dd,  $J = 0.9$  y  $8.1$ , 1H, H-7), 7.80 (dd,  $J = 7.5$  y  $8.1$ , 1H, H-8), 7.71 (d,  $J = 9.6$ , 1H, H-3), 7.70 (d,

$J = 8.1$ , 1H, H-4), 6.90 (d,  $J = 8.1$ , 1H, H-5), 6.67 (d,  $J = 9.6$ , 1H, H-2), 4.13 (-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN:  $\delta$  185.8 (C-1), 159.9 (C-6), 141.9 (C-3), 133.4 (C-4), 130.9 (C-9), 129.5 (C-9b), 129.3 (C-7), 129.0 (C-9a), 126.4 (C-8), 126.3 (C-2), 125.0 (C-3a), 121.0 (C-6a), 104.6 (C-5), 56.1 (-OCH<sub>3</sub>) (**Anexo 1**).

**e. Dimerización:** [1, 2']-Bifenalenil-[3, 1']-diona (**9**).

Se disolvieron 20 mg de perinaftenona (**1**) en alcohol isopropílico; la solución se calentó a 70 °C. Posteriormente se adicionaron algunas gotas de ácido sulfúrico concentrado y se dejó la solución en agitación constante durante 48 horas (Figura 18). Finalmente la solución resultante se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub> y sometió a extracción líquido-líquido con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró a gravedad y se evaporó a sequedad en rotaevaporador. El residuo obtenido se pasó por columna cromatográfica de sílica gel y se eluyó con gradiente de hexano - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

**Figura 18.** Dimerización de perinaftenona



**[1, 2']-Bifenalenil-[3, 1']-diona (9):** <sup>1</sup>H RMN:  $\delta$  8.75 (d,  $J = 6.3$ , 1H, H-9), 8.74 (d,  $J = 7.8$ , 1H, H-4), 8.37 (d,  $J = 7.8$ , 1H, H-9'), 8.29 (d,  $J = 8.1$ , 1H, H-4'), 8.20 (d,  $J = 8.1$ , 1H, H-7'), 8.09 (d,  $J = 8.1$ , 1H, H-7), 8.02 (s, 1H, H-3), 7.95 (d,  $J = 7.2$ , 1H, H-6), 7.92 (d,  $J = 7.8$ , 1H, H-6'), 7.86 (dd,  $J = 7.5$  y 7.8, 1H, H-5), 7.79 (dd,  $J = 6.9$  y 7.8, 2H, H-8, H-5'), 7.56 (dd,  $J = 7.8$  y 7.8, 1H, H-8), 6.86 (s, 1H, H-2). <sup>13</sup>C RMN: 185.4 (C-1'), 183.6 (C-1), 152.3 (C-3'), 151.0 (C-3a'), 150.2 (C-3a), 141.7 (C-3), 138.0 (C-9b'), 135.5 (C-7), 135.4 (C-7'), 132.7 (C-6), 132.5 (C-6'), 132.3 (C-9), 132.4 (C-9a'), 132.2 (C-6a), 131.5 (C-9'), 131.0 (C-4), 130.4 (C-5'), 129.6 (C-4'), 129.3 (C-9b), 127.9 (C-6a'), 127.8 (C-9a), 127.6 (C-5), 127.2 (C-2), 127.1 (C-8), 127.0 (C-8'), 126.5 (C-2') (**Anexo 1**).

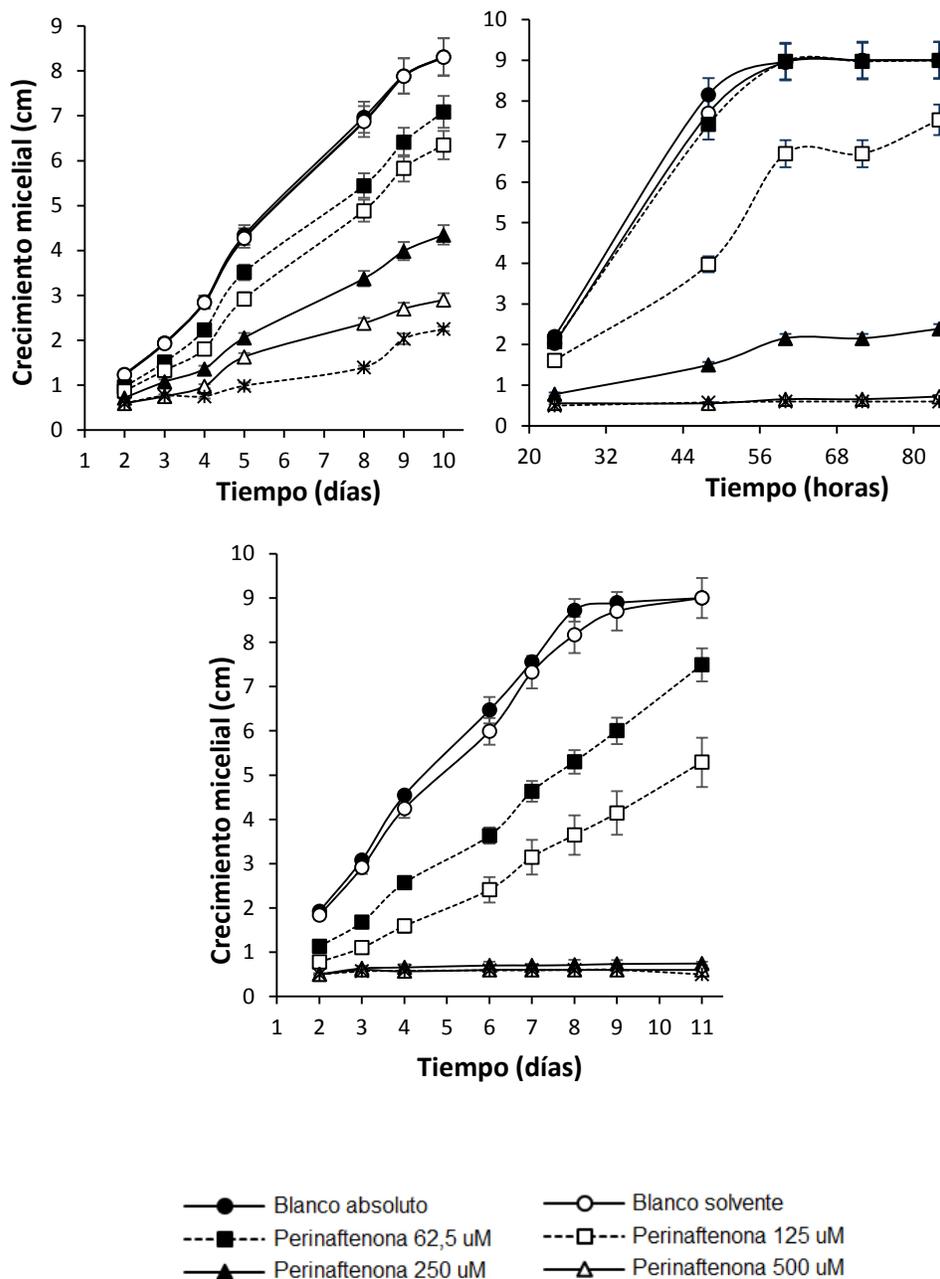


## 2.5 Resultados y discusión

### 2.5.1 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de (1) se analizó por su habilidad para inhibir el crecimiento micelial usando la técnica del alimento envenenado. Los efectos inhibitorios de (1) contra *F. oxysporum*, *B. cinérea*, y *B. theobromae* se muestran en la Figura 19 a, 19 b, y 19 c, respectivamente. En general, el compuesto (1) mostró una actividad antifúngica significativa contra todos los hongos. Como se puede ver en la figura 19, el crecimiento micelial de estos fue dependiente de la concentración de (1) en el medio de cultivo. A 500  $\mu\text{M}$  e inferior, el compuesto (1) inhibió el crecimiento radial de *B. theobromae* y *F. oxysporum* completamente y este efecto permaneció, respectivamente, durante los 3,5 y 11 días de duración del experimento. Además, el desarrollo de la colonia de *B. cinérea* se inició sólo 4 días después de la inoculación, cuando se trató con (1) a 1000  $\mu\text{M}$ . En adición, los porcentajes de inhibición de (1) a 250  $\mu\text{M}$  contra *B. cinerea*, *F. oxysporum*, y *B. theobromae* oscilaron entre 60,0 a 48,7; 96,5 a 88,5; y 87,9 a 76,3%; respectivamente. En general, los resultados revelan que (1) exhibió una acción antifúngica significativa hacia *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *B. theobromae* con valores  $\text{IC}_{50}$  de 201,1 (al tercer día), 73,9 (al tercer día), y 216,7  $\mu\text{M}$  (a las 60 horas), respectivamente.

**Figura 19.** Efecto de la perinaftenona (**1**) en el crecimiento radial micelial de *B. cinerea* (**19a**), *B. theobromae* (**19b**) y *F. oxysporum* (**19c**). Los resultados se muestran como valores promedio de tres réplicas del diámetro del micelio; bar =  $\pm$  DE.



Estos resultados están en concordancia con aquellos reportados previamente por (Quiñones et al., 2000), quienes encontraron que el compuesto (**1**) tiene una actividad

antifúngica muy fuerte contra *Mycosphaerella fijiensis* (el agente causal de la Sigatoka Negra). De acuerdo con los autores, el compuesto (**1**) despliega una inhibición del crecimiento micelial completa entre 250 y 500  $\mu\text{M}$  y su acción permaneció durante 15 días; esta acción fue similar a la del fungicida comercial Benomil. Algunos autores sugieren que el grupo carbonilo y el doble enlace conjugado son características importantes para exhibir una acción antifúngica fuerte en cetonas aromáticas policíclicas, debido a la capacidad de formación de oxígeno singlete de estas estructuras y que se conoce genera efectos negativos en moléculas biológicas como ADN, proteínas y ácidos grasos, sin embargo la información sobre su mecanismo de acción es escasa (Quiñones et al., 2000) (Hidalgo Bucheli, 2009).

### 2.5.2 Metabolismo

Una comparación de los perfiles cromatográficos de HPLC-DAD obtenidos de la biotransformación se presenta en la Figura 20. Como se muestra en la Figura 20 c, *B. theobromae* promovió la biosíntesis de tres compuestos mayoritarios a partir de (**1**) (tiempos de retención,  $t_R = 13,5; 13,8$  y  $16,0$  minutos;  $t_R$  de (**1**) =  $13,3$  minutos) y no evidenciados en el control. Los perfiles HPLC-DAD del metabolismo de (**1**) con *F. oxysporum* y *B. cinerea* fueron ligeramente similares, mostrando sólo dos picos. Ambos compuestos se aislaron y purificaron por medio de cromatografía de columna y capa fina preparativa, y sus estructuras se determinaron por interpretación de los datos espectroscópicos ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN), y comparación con muestras auténticas.

**Compuesto (2):** En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observan señales para 11 protones. Una señal multiplete a campo alto ( $\delta$  2,26 ppm) que integra para dos protones; estos dos hidrógenos están acoplados con el hidrógeno que produce la señal a  $\delta$  5,17 ppm, y cuyo desplazamiento a campo bajo resulta de su enlazamiento a carbono carbinólico. Estos tres protones no equivalentes proporcionan un sistema ABX. A campo más bajo se observan dos señales multipletes ( $\delta$  3,14 y 3,33 ppm) correspondiente a los dos protones químicamente no equivalentes (diasterotópicos) de un grupo metileno; este desplazamiento corresponde con la presencia del grupo metileno enlazado a anillo aromático. Estas señales permiten inferir que hubo una reducción tanto del doble enlace como del grupo carbonilo de la perinaftenona. A campos más bajos ( $\delta$  7,30 a 7,86 ppm) se observan señales para seis

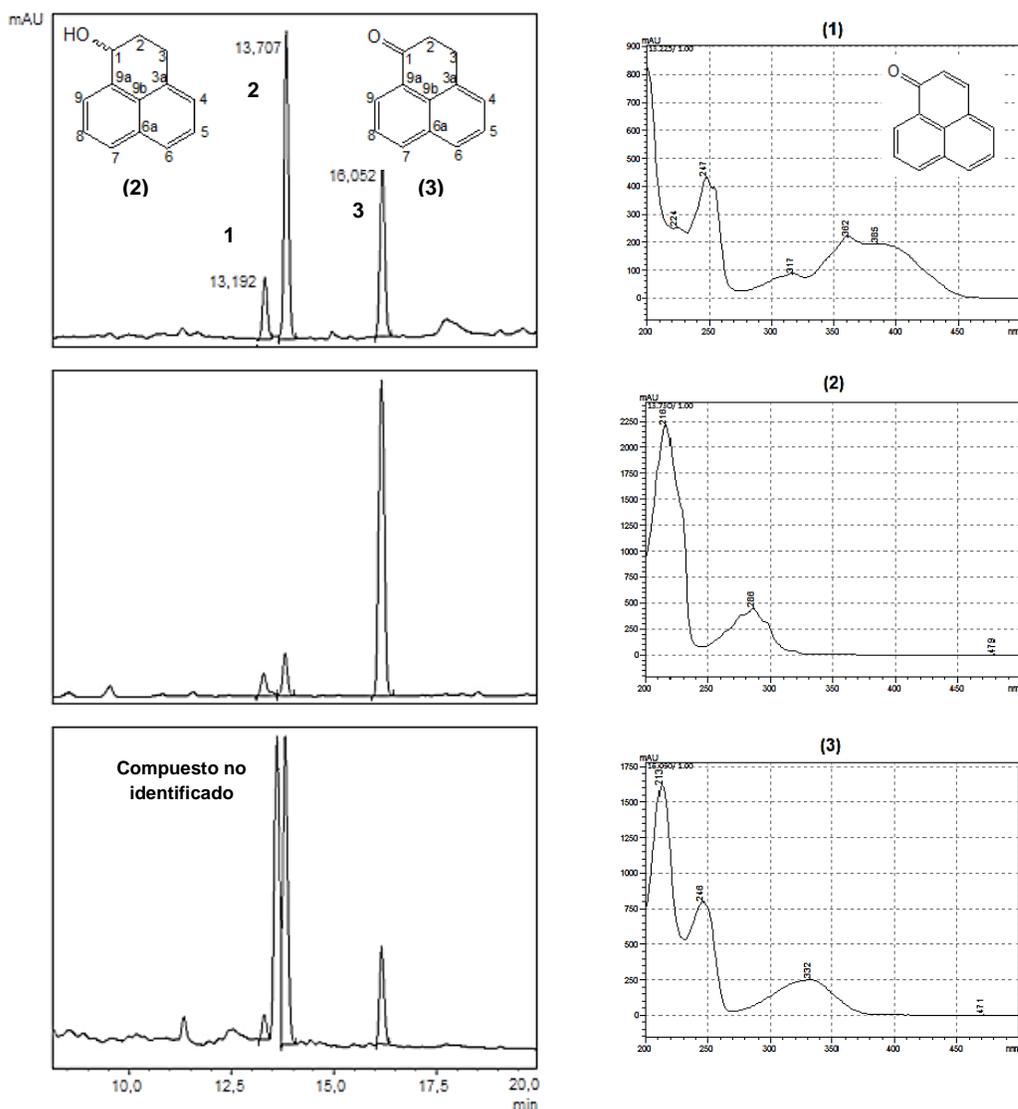
protones aromáticos (dos sistemas ABC), correspondientes al sistema naftalénico. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN se observan 13 señales correspondientes a trece carbonos. Las señales a campo bajo,  $\delta$  26,3 y 31,3 ppm, corresponden a los carbonos metilénicos C-3 y C-2, respectivamente. Adicionalmente, se observa una señal a  $\delta$  69,4 ppm, cuyo desplazamiento a campo bajo corresponde con un carbono oxigenado (carbono carbinólico), C-1. A campos más bajos, se observan seis carbonos metínicos ( $\delta$  123,5; 124,4; 125,6; 125,7; 125,9 y 128,1 ppm) del sistema naftalénico. Además se observan 4 señales a  $\delta$  137,4; 135,1; 133,8 y 129,0 ppm, que corresponden a los carbonos cuaternarios C-9b, C-3a, C-6a y C-9a, respectivamente. A partir de los datos espectroscópicos, el producto metabólico (**2**) se identificó como 2,3-dihidro-1H-fenalen-1-ol ( $t_R = 13,8$  minutos).

**Compuesto (3):** El espectro de  $^1\text{H}$  RMN muestra la presencia de dos señales a campo alto (triplete a  $\delta$  3,04 y multiplete a 3,52 ppm) que integran para dos protones; estas señales corresponde a dos grupos metileno acoplados. Además se observa señales que integran para 6 hidrógenos a campo bajo ( $\delta$  7,53 a 8,26 ppm), correspondientes al sistema naftaleno. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN se observan 13 señales. Dos señales a campo alto ( $\delta$  28,58 y 38,55 ppm) correspondientes a dos grupos metileno (uno bencílico y otro adyacente a carbono carbonílico). A campos bajos ( $\delta$  125,1, 125,6, 125,7, 126,3, 133,3 y 134,2 ppm) se observan seis señales de buena intensidad, pertenecientes a los carbonos metínicos del sistema naftaleno. A partir de los datos espectroscópicos, el producto metabólico (**3**) se identificó como 2,3-dihidro-fenalen-1-ona ( $t_R = 16,0$  minutos). El tercer producto metabólico ( $t_R = 13,5$  min), detectado sólo en la transformación microbiana de (**1**) usando *B. theobromae*, no pudo ser purificado e identificado. Estos compuestos no se detectaron por análisis mediante CCF y HPLC a partir de un cultivo de los hongos carente del compuesto (**1**).

De acuerdo con los resultados, todos los hongos tienen la capacidad de reducir el doble enlace y el grupo carbonilo para producir los productos metabólicos. Estudios acerca de la relación estructura-actividad antifúngica muestran que los compuestos que contienen un grupo carbonilo y un doble enlace conjugado poseen una actividad antifúngica fuerte; allí se asocia la actividad biológica a la facilidad de formación de radicales libres en su estructura gracias a la presencia del grupo  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado que generan mayor afectación en biomoléculas, lo que podría resultar en una mayor actividad (Quiñones et al., 2000). Así, la formación de (**2**) y (**3**) a partir de (**1**) por *B. theobromae*, *B. cinerea*, y *F. oxysporum* podría

sugerir un posible mecanismo de detoxificación en el cual el sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado es afectado.

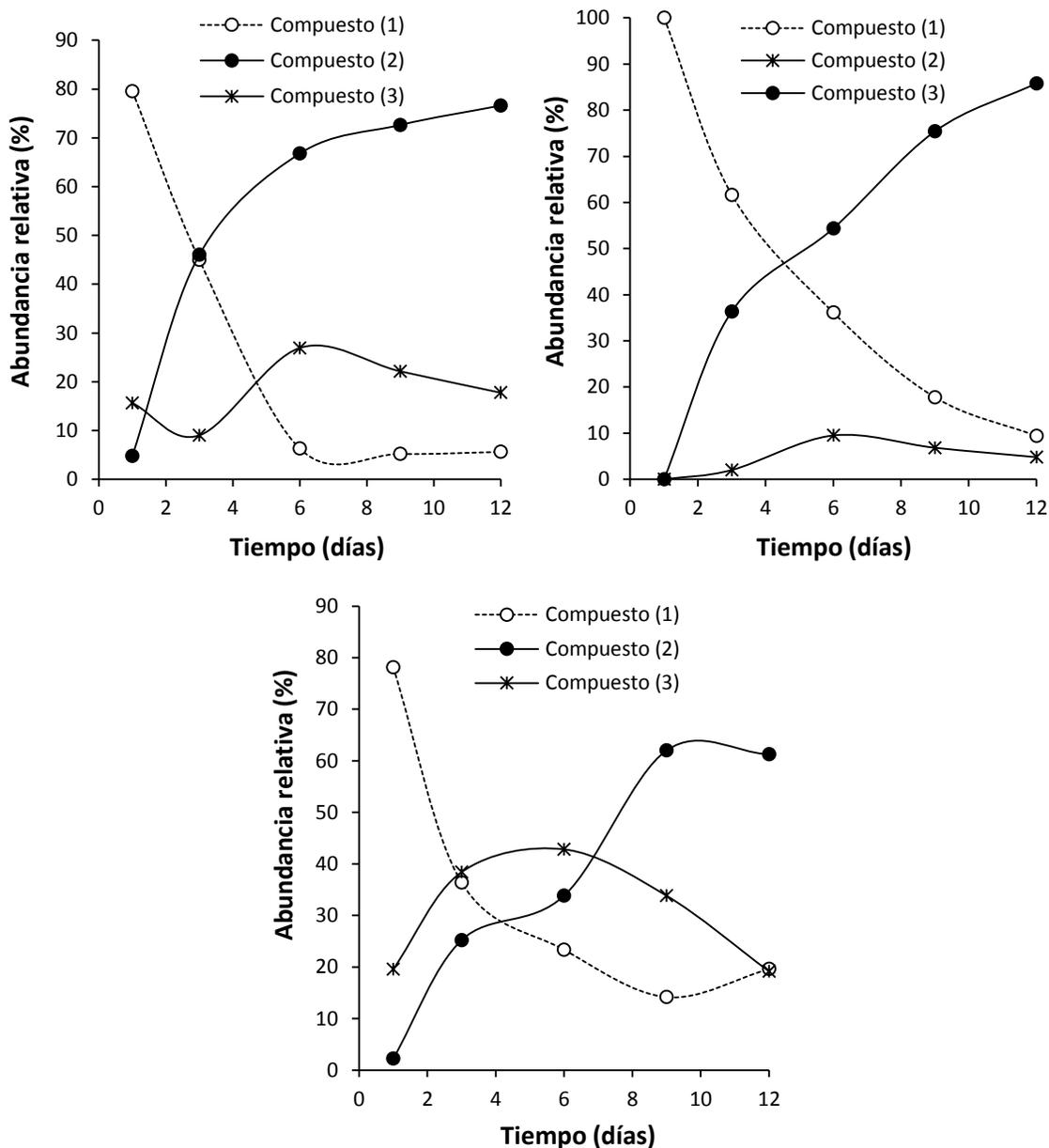
**Figura 20.** Perfil HPLC-DAD del metabolismo de (1) por *B. cinerea* (arriba), *F. oxysporum* (medio) y *B. theobromae* (abajo). Los espectros UV se presentan en el lado derecho para (1) (arriba) y sus metabolitos, (2) (medio) y (3) (abajo). Longitud de onda: 254 nm. Día 6.



El metabolismo del compuesto (1) con *B. theobromae*, *B. cinérea*, y *F. oxysporum* se monitoreó por 12 días tomando muestras cada 1, 3, 6, 9 y 12 días. La relación entre el sustrato (1) y los productos metabólicos (2) y (3) en el curso del tiempo se determinó inicialmente con base en el área de los picos de HPLC (Pedras & Minic, 2014). Los resultados, expresados como abundancias relativas, son mostrados en la Figura 20. Teniendo en cuenta que durante los doce días de monitoreo no se evidenció la aparición de los compuestos (2) y (3) en los controles evaluados sin (1) y que la totalidad de

patógenos evaluados evidencia la formación de ambos productos en el curso del tiempo se determina que los microorganismos en estudio consumieron el compuesto (1) rápidamente en las condiciones del ensayo (Pedraset al., 2004). Después de 6 días, cerca del 94, 44 y 77% de (1) se modificó por *B. theobromae*, *F. oxysporum* y *B. cinérea* respectivamente, siendo convertido principalmente a (2). La abundancia relativa de (3) fue siempre menor al 42%, tal y como se muestra en la Figura 20, esto posiblemente debido a que sea un producto de transición en la transformación del compuesto de partida, bajo las condiciones usadas, el compuesto (2) alcanzó cerca del 80% de los productos en 12 días para *B. theobromae* y *F. oxysporum*.

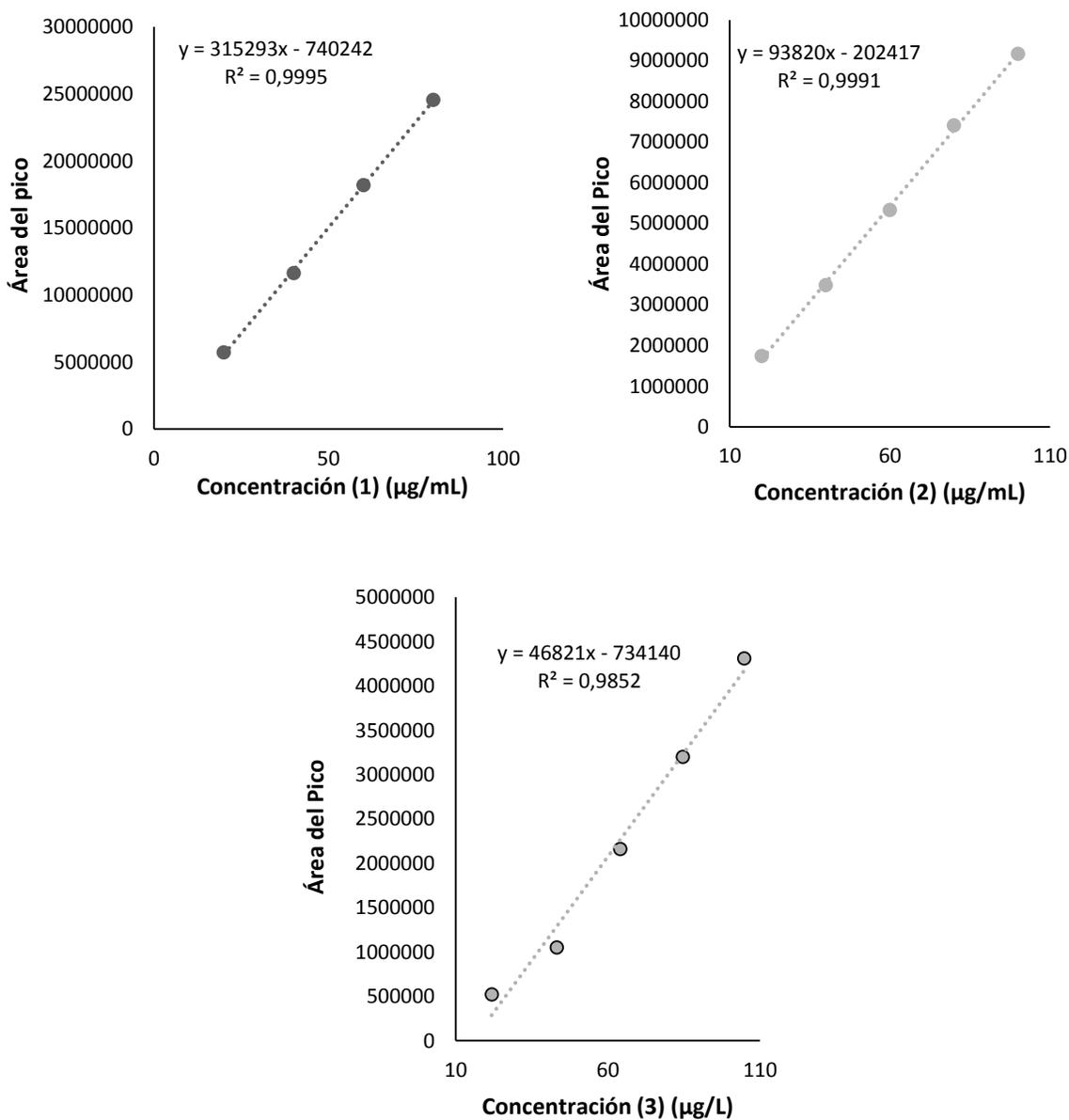
**Figura 21.** Abundancia relativa en el curso del tiempo para la transformación microbiana de (1) por *B. theobromae* (arriba-izq.), *B. cinerea* (arriba-der.) y *F. oxysporum* (abajo). Compuesto (1), perinaftenona; compuesto (2), 2,3-dihidro-1*H*-fenalen-1-ol; y compuesto (3), 2,3-dihidro-fenalen-1-ona. Longitud de onda de análisis: 254 nm.



Luego, las determinaciones cuantitativas de (1), (2) y (3) se llevaron a cabo usando curvas de calibración con el fin de establecer claramente la disminución del sustrato de partida en el tiempo por acción del hongo (Pedras & Minic, 2014), tal y como se evidencia en la figura 23 en donde a partir del tercer día la concentración de (1) es inferior a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y como los productos de biotransformación permanecieron o se incrementaron en el tiempo, dado que algunos de estos productos pueden presentarse solo temporalmente o en concentraciones muy bajas finalizada la reacción al ser precursores de otros compuestos, tal es el caso de (3) que presenta inicialmente un incremento en los ensayos con *B.theobromae* y *B.cinerea* y que posteriormente disminuye; mientras que con *F. oxysporum* presenta un incremento

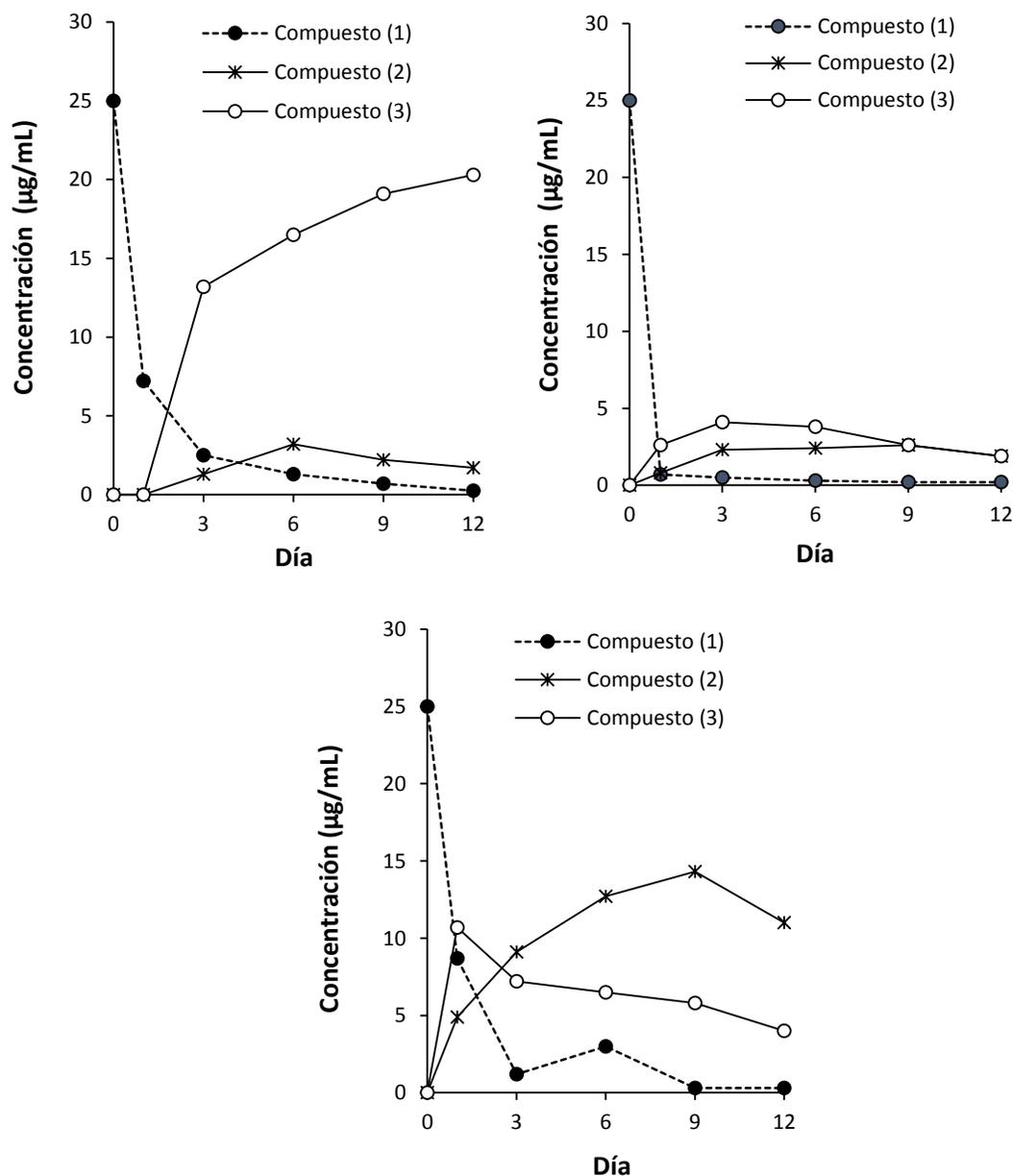
constante durante los 12 días . Las ecuaciones de regresión lineal fueron: compuesto (1),  $y = 315293x - 740242$  ( $R^2 = 0,9995$ ); compuesto (2),  $y = 93820x - 202417$  ( $R^2 = 0.9842$ ), y compuesto (3),  $y = 46821x - 734140$  ( $R^2 = 0.9852$ ). Las curvas de calibración para la perinaftenona (1) y sus productos metabólicos (2 y 3) se presentan a continuación:

**Figura 22.** Curvas de calibración para la perinaftenona (1) (arriba-izq.), 2,3-dihidro-1*H*-fenalen-1-ol (2) (arriba-der.) y 2,3-dihidro-fenalen-1-ona (3) (abajo).



La concentración de perinaftenona (**1**) y los productos de biotransformación (**2** y **3**) en el curso del tiempo, para las biotransformaciones con los diferentes hongos se presenta en la Figura 23:

**Figura 23.** Concentración en el curso del tiempo de la biotransformación de perinaftenona (**1**) por los hongos *F. oxysporum* (arriba-izq.), *B. cinerea* (arriba-der.), y *B. theobromae* (abajo).



Se observa que el compuesto **(1)** se consumió en aproximadamente un 90% durante las primeras 72 h del proceso. El producto metabólico **(2)** alcanzó las mayores concentraciones al día 6 (3,2 µg/mL para *F. oxysporum*) y 9 (2,6 µg/mL para *B. cinerea* y 14,3 µg/mL para *B. theobromae*). Por su parte, el compuesto **(3)** presentó una concentración creciente durante el tiempo de análisis para el hongo *F. oxysporum* hasta alcanzar 20,3 µg/mL para el día 12. Los otros dos hongos alcanzaron concentraciones menores, obteniendo el mayor nivel del compuesto **(3)** al día 3 (4,1 µg/mL para *B. cinerea*) y 1 (10,7 µg/mL para *B. theobromae*). La formación mayoritaria del compuesto **(3)** muestra la alta eficiencia de *F. oxysporum* para reducir el doble enlace activado, mediante la acción, posiblemente, de una enzima enoato reductasa (ER) tal y como se evidencia en la formación del citronelol a partir del geraniol por acción metabólica de *A. nigger* en Cortez Ávila et al, 2016. Mientras que *B. theobromae* transformó tanto el doble enlace C-C como el grupo carbonilo, para formar el producto mayoritario **(2)**. Lo anterior muestra que el microorganismo posee la habilidad de reducir el doble enlace mediante la acción de la enzima ER, para formar **(3)** seguido de la conversión de la cetona a alcohol, lo que puede atribuirse a la acción de enzimas del tipo alcohol deshidrogenasa (ADH) y las coenzimas NADH y NADPH (V. B. Rodrigo, Diego, Carlos, Jesús, & Diego, 2010), a partir de las cuales un ion hidruro es transferido al grupo carbonilo de **(3)** para producir **(2)** un compuesto finalmente reducido y que de acuerdo con (Quiñones et al., 2000) al no contar con el sistema  $\alpha, \beta$  – insaturado constituiría menor actividad biológica.

La producción mayoritaria de **(3)** por *F. oxysporum* es una evidencia de la quimioselectividad de la biotransformación de **(1)** hacia la reducción del doble enlace carbono-carbono, y un indicativo de que la velocidad de hidrogenación del doble enlace carbono-carbono es mayor que la reducción del grupo carbonilo (no se detectó el alcohol alílico). Esta quimioselectividad resulta interesante, ya que se ha que la quimioselectividad en procesos de biorreducción de sistemas carbonílicos  $\alpha, \beta$ -insaturados es frecuentemente pobre, debido a la competencia de la enzima ER con enzimas ADH, ya que ambas dependen del mismo cofactor nicotinamida.(Velasco R et al., 2010)

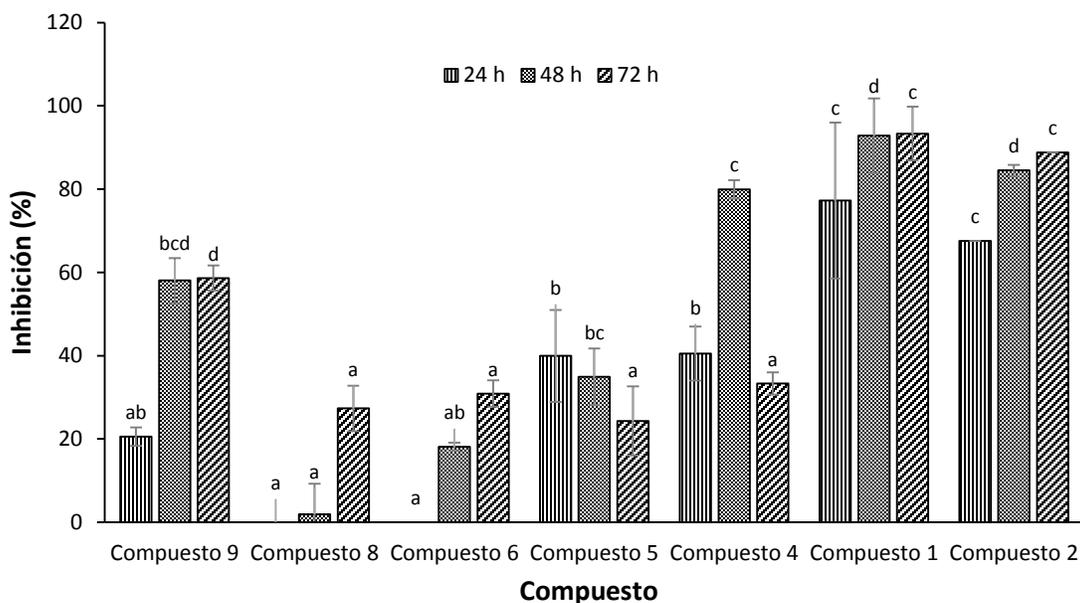
Finalmente la conversión de **(1)** por acción del fitopatógeno *B.cinerea* en los productos metabólicos **(2)** y **(3)** ocurre en un tiempo inferior a 3 días y en concentraciones no mayores a 5 µg/mL de producto, lo que implica la conversión del compuesto de partida a otros productos que no fueron detectados en el presente trabajo.

En general, todos los hongos mostraron una conversión rápida de la perinaftenona (**1**). Lo anterior explicaría el decrecimiento en la actividad antifúngica con el tiempo, lo que supone un posible mecanismo de detoxificación de (**1**) por parte de los microorganismos. No obstante, esta reducción en el porcentaje de inhibición fue relativamente leve, lo que supone que los productos metabólicos también exhibirían un efecto inhibitorio. (Velasco R et al., 2010)

### 2.5.3 Actividad antifúngica de derivados de perinaftenona

Los estudios que involucran la preparación de derivados sintéticos de compuestos bioactivos permiten obtener información valiosa acerca de la relación entre la estructura del compuesto y la actividad biológica en cuestión. Tal es el caso de la evaluación de actividad antifúngica de análogos estructurales de camalexina y brassinina frente a los hongos fitopatógenos *Leothosphaeria maculans* y *Sclerotinia sclerotiorum* respectivamente (Pedras et al., 2009; Pedras & Hossain, 2007). Este conocimiento resulta de mucha utilidad a la hora de optimizar la actividad encontrada. Una serie de derivados de perinaftenona se prepararon mediante métodos químicos convencionales y se evaluó su actividad antifúngica a 1000  $\mu\text{M}$  contra el hongo *B. theobromae*. Entre los derivados se incluyó el producto de biotransformación (**2**). Debido a las cantidades insuficientes obtenidas del compuesto (**3**), no fue incluido en el análisis. Los porcentajes de inhibición del crecimiento radial se muestran en la Figura 24.

**Figura 24.** Inhibición (%) del crecimiento radial de *B. theobromae* con perinaftenona y derivados. Letras diferentes para un mismo tiempo corresponden a diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (Software: statgraphics, Multiple Sample Comparission).



Una comparación de la actividad antifúngica de la perinaftenona (**1**) y el producto metabólico (**2**) muestra que no hay diferencias significativas. No obstante, se aprecia una ligera reducción en el efecto inhibitorio para el compuesto (**2**) probablemente debida a la pérdida del sistema carbonílico  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado, lo que demostraría que la conversión de los compuestos (**1**) a (**2**) puede ser el resultado de un mecanismo de desintoxicación por parte del hongo. Este efecto también se observó para *F. oxysporum* (*datos no mostrados*). El hecho de que los hongos metabolizan la perinaftenona a un compuesto que también posee una actividad antifúngica significativa, demostraría el fuerte efecto inhibitorio de la estructura de la perinaftenona.

De otro lado se observa que la metoxilación (en C-6, compuesto **8**) y nitración (en C-5, compuesto **5**) del sistema naftalénico de la perinaftenona (**1**) reduce significativamente la actividad antifúngica contra *B. theobromae*. No obstante, la presencia del grupo metoxilo (donador de electrones) ocasionó la mayor reducción en la actividad inhibitoria, esta disminución de la actividad con grupos donadores de electrones se evidenció de igual manera en estudios con camalexina en donde la sustitución en posiciones 5 y 6 con grupos halógeno representó una disminución en la actividad antifúngica correspondiente al 80 y 20% de inhibición respectivamente (Pedras & Hossain, 2007). Lo anterior sugiere que los efectos electrónicos sobre el sistema, son importantes para la actividad.

La presencia de sustituyentes en la posición C-2 (compuestos **4**, **6** y **9**) también redujo significativamente el efecto inhibitorio sobre *B. theobromae*. Sin embargo, la menor actividad antifúngica la presentó el compuesto **6**, con un grupo donador de electrones en el sistema. Los compuestos (**4**) y (**9**) con grupos atrayentes de electrones en el C-2, presentaron una actividad inhibitoria moderada en comparación con (**1**). En general, la incorporación de los grupos donadores de electrones, bromo y metoxilo en el C-2 y sistema naftaleno respectivamente, causó la mayor pérdida de actividad antifúngica. Por otra parte las similitudes estructurales entre los compuestos (**1**) y (**2**) y su mayor actividad antifúngica en comparación con los otros derivados, indicarían que el efecto fungiestático sería el resultado de requisitos estéricos, así como de un balance lipofílico/hidrofílico estricto, lo cual puede afectar la interacción inicial con la membrana (Lado et al., 2011). Adicionalmente, una comparación entre los derivados conteniendo el sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado permite inferir que la presencia de grupos donadores de electrones tanto en C-2 como en el sistema naftalénico, decrece en mayor medida la actividad antifúngica si se compara con la de los derivados con grupos atrayentes de electrones. Esto demostraría que efectos de naturaleza electrónica también pueden ser importantes para el efecto inhibitorio, sin embargo para el caso de la perfinaftenona, la simple inclusión de grupos adicionales a la estructura genera disminución en la actividad antifúngica tal y como se evidencia en la figura 24, y en estudios con derivados estructurales diferentes (Quiñonez et al., 2000) (Jena et al., 1981). Estudios con más derivados son necesarios.

## Capítulo 3. Metabolismo y actividad antifúngica de la cumarina y derivados

Artículo 2. Luisa M. Castaño, José E. Cuellar, Diego Durango

### 3.1 Abstract

In the present article, the inhibitory activity against the fungi *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* of the coumarin was evaluated. The results show that the coumarin exhibited a significant antifungal activity against the three fungi, with percentages of inhibition between between 88.9 to 75.0%, 66.4 to 24.8% and 78.8 to 55.5% at 3.5 mM for *B. cinerea*, *B. theobromae* and *F. oxysporum*, respectively. In addition, the metabolism of coumarin with all fungi was studied. It was found that coumarin was transformed into two major metabolic products, which were purified by chromatographic techniques and identified by spectroscopic methods ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR), corresponding to dihydrocoumarin and 3-(2-hydroxyphenyl) propanoic acid. The reduced antifungal activity of the metabolic products would indicate a possible microbial mechanism of detoxification, which affects the  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl system. Additionally, the effect of different substituents on the  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl system in the antifungal activity was evaluated. The results show that the presence of groups 3-acetyl and 3-ethyl carboxylate on the moiety of the double bond significantly increases the inhibitory effect of the radial growth of the fungi.

**Keywords:** Fungitoxicity, *Botrytis cinerea*, biorreduction, dihydrocoumarin.

## 3.2 Resumen

En el presente artículo se evaluó la actividad inhibitoria contra los hongos *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* de la cumarina. Los resultados muestran que la cumarina exhibió una actividad antifúngica significativa contra los tres hongos, con porcentajes de inhibición de 88.9 a 75.0%, 66.4 a 24.8%, y 78.8 a 55.5% a una concentración de 3.5 mM para *B. cinerea*, *B. theobromae* y *F. oxysporum*, respectivamente. Además, se estudió el metabolismo de la cumarina con todos los hongos. Se encontró que la cumarina se transformó en dos productos metabólicos mayoritarios, los cuales se purificaron por técnicas cromatográficas y se identificaron por métodos espectroscópicos ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN), correspondiendo con la dihidrocumarina y el ácido 3-(2-hidroxifenil) propanoico. La actividad antifúngica reducida de los productos metabólicos indicaría un posible mecanismo microbiano de detoxificación, que afecta el sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado. Adicionalmente, se evaluó el efecto de diferentes sustituyentes sobre el sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado en la actividad antifúngica. Los resultados muestran que la presencia de los grupos 3-acetil y 3-carboxilato de etilo sobre la porción del doble enlace incrementa significativamente el efecto inhibitorio del crecimiento radial de los hongos.

**Palabras clave:** Fungitoxicidad, *Botrytis cinerea*, biorreducción, dihidrocumarina.

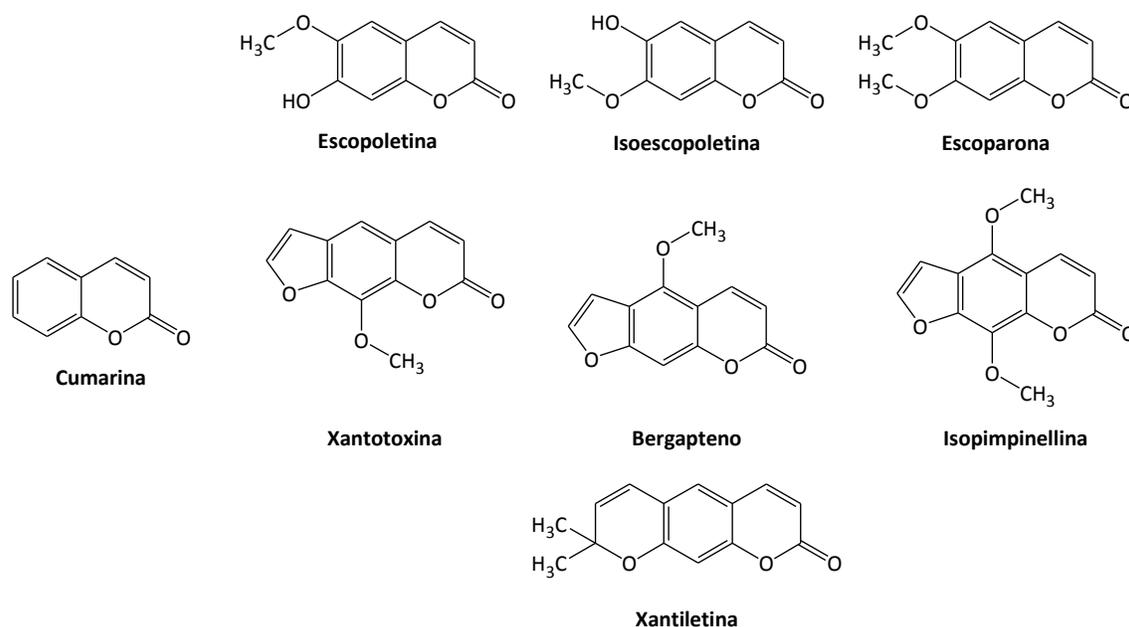
## 3.3 Introducción

Las cumarinas (1,2-benzopironas) son un grupo de moléculas altamente activas, especialmente contra hongos y bacterias (Brooker, Windorski, & Bluml, 2008). Algunas cumarinas han sido consideradas como fitoalexinas: compuestos de bajo peso molecular que son biosintetizados *de novo* por las plantas luego de la exposición a estrés biótico (infección por hongos y bacterias) o abiótico (heridas, radiación, congelamiento) (Mansfield, 2000). Otras cumarinas son compuestos antimicrobianos constitutivos (llamados fitoanticipinas) y actúan como una primera barrera química defensiva de la planta (Lay and Anderson, 2005). Por ejemplo, las cumarinas simples hidroxiladas en C-7 pueden presentar un papel defensivo contra el parásito *Orobanche cernua*, previniendo la germinación, penetración y conexión con el sistema vascular del huésped (Serghini et al., 2001). Por lo

anterior, se ha postulado que los compuestos defensivos naturales de las plantas pueden ser un punto de partida para la exploración de nuevos derivados que posean actividad antifúngica mejorada.

En la familia Apiaceae (Umbelliferae) se han reportado fitoalexinas tipo-cumarina, particularmente furanocumarinas, tales como xantotoxina, isopimpinellina y bergapteno (Figura 25). También se han reportado las cumarinas simples isoescopoletina, umbelliferona y la cumarina. Mientras que en la familia Rutaceae (por ejemplo en los cítricos) se han reportado las cumarinas escoparona, escopoletina, xantiletina, entre otras. Como las plantas han desarrollado fitoalexinas que limitan el crecimiento de hongos en sus tejidos, los hongos se han adaptado, en muchos casos, mediante la evolución de los tejidos para tolerar las fitoalexinas de sus huéspedes. Se ha demostrado la importancia de la capacidad de los hongos fitopatógenicos para metabolizar, y así desintoxicar, fitoalexinas en la patogénesis. En el presente trabajo, se evaluó el efecto fungiestático de la cumarina contra tres hongos aislados de lima Tahití (*Citrus latifolia* T.), junto con su metabolismo. Adicionalmente, se evaluó el efecto de diferentes sustituyentes en la cumarina sobre la actividad antifúngica.

**Figura 25.** Fitoalexinas cumarina de Apiaceae y Rutaceae.



## 3.4 Materiales y métodos

### 3.4.1 Materiales químicos y biológicos

Los hongos fitopatógenos *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinérea*, y *Fusarium oxysporum* fueron aislados de frutos de lima Tahiti (*Citrus latifolia* T.) infectados y con síntomas evidentes de la enfermedad, y se caracterizaron morfológicamente. Los hongos se conservaron en medio Agar Papa Dextrosa (PDA; Merck-KGaA, Darmstadt, Alemania) a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y se subcultivaron mensualmente en cajas Petri (9,0 cm de diámetro y 15,0 mL de medio). La evaluación de la actividad antifúngica se realizó en cajas Petri esteriles de 9,0 cm de diámetro que se inocularon mediante discos de 6,0 mm de diámetro con micelio de aproximadamente 72 horas. La cumarina (1,2-benzopirona), umbeliferona, ácido cumarin-3-carboxílico y 4-hidroxycumarina se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los ingredientes del medio de cultivo para el estudio metabólico se adquirieron de Oxoid Ltd. (Hampshire, Inglaterra).

### 3.4.2 Equipos y métodos analíticos

El aislamiento y manipulación de los microorganismos se llevó a cabo en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar (CBS 180A) clase II tipo A. Para todos los materiales empleados se garantizó inocuidad completa por medio de esterilización en autoclave horizontal automática (marca Centricol AUA 80L). El seguimiento del metabolismo microbiano de la cumarina se realizó por cromatografía de capa fina (CCF) en cromatoplasas Merck Kiesegel 60 F<sub>254</sub> (0.25 mm espesor) usando como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo, y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) en un equipo Shimadzu, Prominense con auto muestreador (SIL-20A) equipado con bombas recíprocas Shimadzu (LC-20AT) conectadas a un degasificador (DGU 20A5), integrador (CBM 20A), detector de arreglo de diodos (SPD-M20A) y Software LabSolutions Lite versión 1.22 SP1 y las columnas RP-C18 Zorbax Eclipse Plus (150 mm x 4,6 mm – 5  $\mu\text{m}$ ) Agilent Technologies y Pinnacle II (100 mm x 4,6 mm-5  $\mu\text{m}$ ) Restek con gradiente de solventes acetonitrilo-agua en proporciones específicas. Para la purificación de los productos

metabólicos y de síntesis se emplearon diferentes técnicas cromatográficas (cromatografía de columna, CC, y capa fina preparativa). Para la CC se usaron como fases estacionarias sílica gel 60 (0.040-0.063 mm; Merck) y Sephadex LH-20. Los compuestos se detectaron en CCF por fluorescencia bajo la lámpara UV (254 y 366 nm) o por aspersion con reveladores seguido de calentamiento suave. Para la identificación de los productos metabólicos y de síntesis se empleó espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  (300 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) mono- y bidimensional (COSY, HMQC y HMBC) en un espectrómetro Bruker AMX 300 con deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento (J) son expresados en ppm y Hertz, respectivamente. La atribución de las multiplicidades para los carbonos se llevó a cabo empleando el experimento JMOD. Notaciones: s = singlete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete, dd = doble de doblete, q = quinteto.

### 3.4.3 Actividad antifúngica de la cumarina y derivados

La actividad antimicrobiana de la cumarina (**1**) contra *B. theobromae*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* se determinó usando el método de envenenamiento del medio de cultivo (González, Triana, Coca, Ramírez, & Pedroso, 2009) (Velasco, 2010). Diferentes concentraciones de cumarina (0,5, 1,0, 1,5, 3,0 mM) disueltas en etanol (menos del 0,2%, v/v) se diluyeron en cajas Petri con agar PDA. Todas las concentraciones se evaluaron por triplicado, y los resultados se muestran como crecimiento micelial medio ( $\pm$  desviación estándar, DE). Las cajas Petri sin compuesto se usaron como control negativo, con etanol 0,2% v/v en el medio (blanco de solvente) y agua (blanco absoluto). Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente con luz difusa y el diámetro del crecimiento micelial se midió cada 24 horas. La incubación se detuvo cuando el micelio de las cajas correspondientes a blanco absoluto ocupó el espacio disponible (aproximadamente 3,5 días para *B. theobromae*, 10 días para *B. cinerea* y 11 días para *F. oxysporum*). La fungitoxicidad de la cumarina en términos de porcentaje de inhibición del crecimiento radial se calculó usando la fórmula:  $\% \text{ inhibición} = (1 - (T/C)) \times 100$  donde,  $C$  = diámetro de la colonia (mm) del blanco absoluto y  $T$  = diámetro de la colonia (mm) de los tratamientos (perinaftena y derivados). Adicionalmente, para el compuesto (**1**), se determinó

preliminarmente la concentración que inhibe 50% del crecimiento micelial fúngico ( $IC_{50}$ ) para todos los hongos de acuerdo con la metodología de (Rivillas-Acevedo & Soriano-García, 2007).

### 3.4.4 Metabolismo de la cumarina

#### a. Precultivo

Los hongos se inocularon en matraces Erlenmeyer de 1.0 L, conteniendo 500 mL de medio líquido Czapek-Dox (Solución A: Glucosa 5%, extracto de levadura 0.1%; solución B:  $K_2HPO_4$  0.5%,  $NaNO_3$  0.2%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001%). Los matraces Erlenmeyer se agitaron (agitador orbital, 120 rpm; Centricol serie 0239) a temperatura ambiente durante 10 días. El micelio se colectó por filtración, se lavó con agua y se empleó en la biotransformación preparativa y los experimentos en el curso del tiempo.

#### b. Experimentos en el curso del tiempo

Los hongos *B. theobromae*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* precultivados se transplantaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio Czapeck-Dox y la cumarina a concentración final de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Los hongos fitopatógenos se cultivaron a 120 rpm por 12 días. El medio de cultivo se tomó de cada matraz cada tres días, se saturó con NaCl y se extrajo con acetato de etilo y  $CH_2Cl_2$ ; posteriormente el solvente se evaporó. Estos extractos se analizaron por CCF y HPLC-DAD. La relación entre el sustrato y los productos metabólicos se determinó con base en el área de los picos de HPLC-DAD; los resultados se expresaron como abundancias relativas. Los controles (sin sustrato) se llevaron a cabo para verificar la presencia de compuestos similares en los cultivos de los hongos.

#### c. Metabolismo a escala preparativa

El micelio de *B. theobromae* de un cultivo de 3 días de antigüedad se transfirió a seis matraces Erlenmeyer de 1.0 L conteniendo 0.5 L de medio líquido Czapek-Dox y cumarina a concentración final de 250  $\mu\text{g/mL}$  disuelta en 96% de etanol (< 0.2%, v/v). El cultivo se realizó agitando (agitador orbital, 120 rpm) a temperatura ambiente por 9 días. Después del período de incubación, el medio de cultivo y el micelio se separaron por filtración. El micelio se descartó y el medio de cultivo se usó para el aislamiento de los productos metabólicos.

El control se llevó a cabo para verificar la presencia de compuestos similares en los cultivos de los hongos (sin sustrato).

### 3.4.5 Aislamiento e identificación de los productos metabólicos

El medio de cultivo se saturó con NaCl y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 2,0 L). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, y se concentraron al vacío. El extracto se pasó por columna cromatográfica usando como fase estacionaria sílica gel. La elusión se realizó con un sistema en gradiente de hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Los extractos del metabolismo de la cumarina por *B. theobromae* se fraccionaron para arrojar seis fracciones, agrupadas de acuerdo con su perfil de CCF. La segunda fracción (hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 10:1) se llevó a columna cromatográfica sobre  $\text{SiO}_2$  usando como eluyente hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 10:1 para dar el producto metabólico (2). La cuarta fracción (hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 7:3) se purificó por columna sobre  $\text{SiO}_2$  usando como eluyente hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 8:2 para arrojar el producto metabólico (3). La identificación de estos metabolitos se basó en la interpretación de sus espectros de RMN.

**Producto metabólico (2):** se aisló como un líquido aceitoso. UV (MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1)  $\lambda_{\text{max}}$  (nm): 273 nm.  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  7.32-7.22 (m, 2H, H-5, H-7), 7.19-7.10 (m, 2H, H-6, H-8), 3.05-2.90 (t, J = 7.2, 2H, H-4), 2.86-2.81 (t, J = 7.2, 2H, H-3).  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  168.9 (C-2), 152.0 (C-8a), 128.3 (C-7), 128.1 (C-5), 127.0 (C-6), 124.5 (C-4a), 117.0 (C-8), 29.3 (C-3), 23.7 (C-4) (**Anexo 2**).

**Producto metabólico (3):** se aisló como un sólido cristalino. UV (MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1)  $\lambda_{\text{max}}$  (nm): 269 nm.  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  7.31-7.11 (m, 2H, H-6', H-4'), 6.94-6.87 (m, 2H, H-5', H-3'), 5.80 (s, 1H, -OH), 2.96 (t, 2H, J = 6.9, H-3), 2.81 (t, 2H, J = 6.9, H-2).  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  179.6 (C-1), 154.0 (C-2'), 130.5 (C-6'), 128.0 (C-4'), 126.9 (C-1'), 121.0 (C-5'), 116.6 (C-3'), 34.5 (C-2), 24.7 (C-3) (**Anexo 2**).

### 3.4.6 Cuantificación

La cuantificación de los productos metabólicos se realizó mediante la relación de áreas de los picos a 254 nm usando los resultados de análisis en el tiempo en HPLC-DAD.

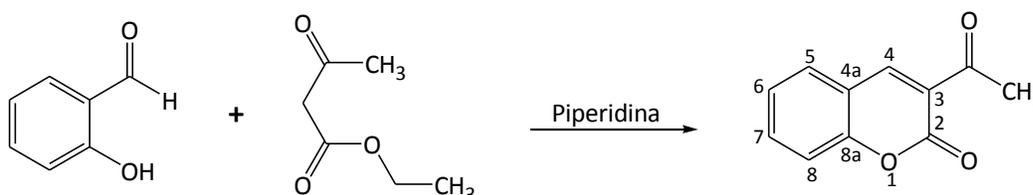
### 3.4.7 Preparación de derivados

#### a. 3-acetilcumarina (4)

Salicilaldehído (2-hidroxibenzaldehído, 2 mmol), acetoacetato de etilo (2 mmol) y unas pocas gotas de piperidina, se mezclaron por 5 min a temperatura ambiente y sin solvente. La reacción se neutralizó con HCl (1M) y finalmente el producto se aisló por filtración. Posteriormente, el compuesto final se recristalizó en etanol (**Figura 26**).

**3-acetilcumarina (4):** Rendimiento: 95%. Sólido amarillo pálido.  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.55 (s, 1H, H-4), 7.73-7.67 (m, 2H, H-5, H-7), 7.43-7.36 (m, 2H, H-6, H-8), 2.77 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  195.6 (-C=O), 160.3 (C-2), 155.4 (C-8a), 147.6 (C-4), 134.5 (C-7), 130.3 (C-5), 125.0 (C-6), 124.5 (C-3), 118.3 (C-4a), 116.7 (C-8), 30.6 (- $\text{CH}_3$ ).

**Figura 26.** Síntesis de 3-acetilcumarina



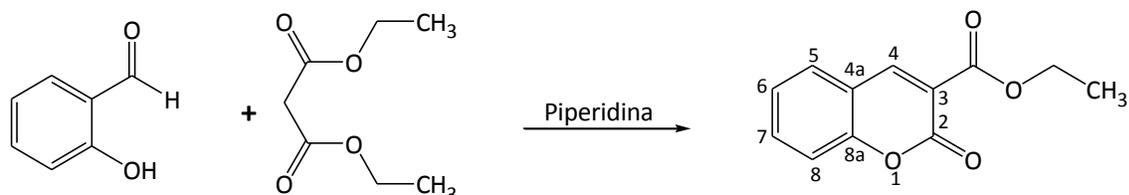
#### b. Cumarina-3-carboxilato de etilo (5)

Salicilaldehído (2-hidroxibenzaldehído, 2 mmol), ester malónico (2 mmol) y unas cuantas gotas de piperidina, se mezclaron por 5 min a temperatura ambiente y sin solvente. La reacción se neutralizó con HCl (1M) y finalmente el producto se aisló por filtración. Posteriormente, el compuesto final se recristalizó en etanol (**Figura 27**).

**Cumarina-3-carboxilato de etilo (5):** Rendimiento 90%. Sólido amarillo pálido.  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.57 (s, 1H, H-4), 7.72-7.64 (m, 2H, H-5, H-7), 7.41-7.31 (m, 2H, H-6, H-8), 4.45 (q, 2H,

-CH<sub>2</sub>-), 1.45 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN: δ 163.1 (-C=O), 156.8 (C-2), 155.2 (C-8a), 148.7 (C-4), 134.4 (C-7), 129.5 (C-5), 124.9 (C-6), 118.3 (C-3), 117.9 (C-4a), 116.8 (C-8), 62.0 (-CH<sub>2</sub>-), 14.27 (-CH<sub>3</sub>).

**Figura 27.** Síntesis de la cumarina-3-carboxilato de etilo.

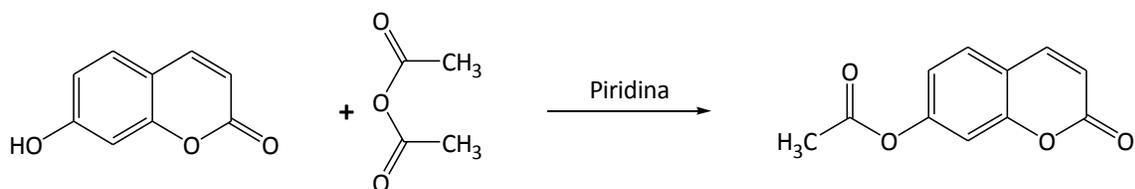


### c. 7-acetiloxi cumarina (6)

Una mezcla de umbeliferona (1 mmol), anhídrido acético (2 mmol) y unas cuantas gotas de piridina se colocó a reflujo por 30 min. La reacción se neutralizó con NaOH (0.1 M) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se destiló a presión reducida en un rotoevaporador. (**Figura 28**).

**7-acetiloxi cumarina (6):** Rendimiento: 88%. Sólido cristalino blanco. <sup>1</sup>H RMN: δ 7.74 (d, J = 9.6, 1H, H-4), 7.54 (d, J = 8.4, 1H, H-5), 7.16 (d, J = 2.3, 1H, H-8), 7.10 (dd, J = 8.4, 1H, H-6), 6.45 (d, J = 9.6, 1H, H-3), 2.39 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN: δ 168.8 (-C=O), 160.4 (C-2), 154.2 (C-8a), 153.2 (C-7), 142.9 (C-4), 128.6 (C-5), 118.5 (C-6), 116.7 (C-4a), 116.1 (C-3), 110.5 (C-8), 21.2 (CH<sub>3</sub>).

**Figura 28.** Síntesis de la 7-acetiloxi cumarina

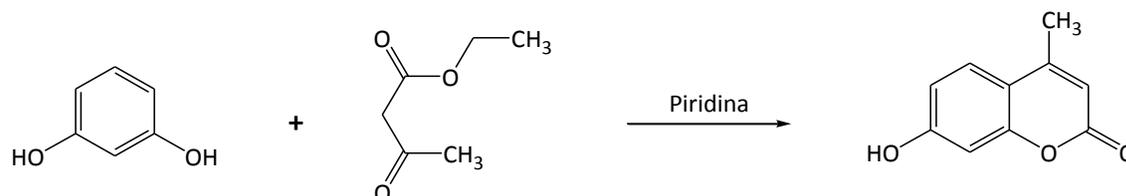


### d. 7-hidroxi-4-metil cumarina (7)

Una mezcla de resorcinol (1 mmol), acetoacetato de etilo (1 mmol) y unas cuantas gotas de piperidina, se mezclaron por 5 min a temperatura ambiente y sin solvente. La reacción se neutralizó con HCl (1M) y finalmente el producto se aisló por filtración (**Figura 29**).

**7-hidroxi-4-metil cumarina (7):**  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  7.55 (d,  $J = 8.4$ , 1H, H-5), 6.99 (d,  $J = 2.1$ , 1H, H-8), 6.90 (dd,  $J = 8.4, 2.1$ , 1H, H-6), 6.21 (s, 1H, H-3), 2.47 (s,  $-\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  162.1 (C-2), 159.5 (C-7), 154.9 (C-8a), 153.1 (C-4), 126.0 (C-5), 114.2 (C-4a), 113.0 (C-3), 111.8 (C-6), 103.4 (C-8), 18.8 ( $-\text{CH}_3$ ).

**Figura 29.** Síntesis de la 7-hidroxi-4-metil cumarina

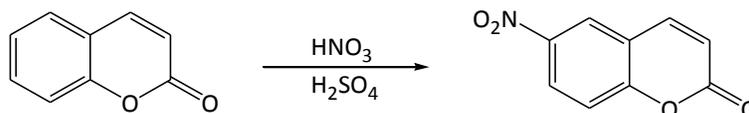


### e. 6-Nitrocumarina (8)

La cumarina (1, 1 mmol) se nitró usando una mezcla de ácido sulfúrico concentrado (96%) y ácido nítrico (65%) en agitación por 1 hora a 25°C (**Figura 30**). Luego de la neutralización con solución de NaOH al 10%, se realizó una extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró, y se evaporó a sequedad

**6-Nitrocumarina (8):** (Rendimiento: 75%).  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  8.48 (dd,  $J = 2.4, 9.0$ , 1H, H-7), 8.43 (d,  $J = 2.4$ , 1H, H-5), 7.85 (d,  $J = 9.6$ , 1H, H-4), 7.52 (d,  $J = 9.0$ , 1H, H-8), 6.64 (d,  $J = 9.6$ , 1H, H-3).  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  158.9 (C-2), 157.6 (C-8a), 144.1 (C-6), 142.3 (C-4), 126.7 (C-7), 123.8 (C-5), 118.9 (C-4a), 118.8 (C-8), 118.2 (C-3).

**Figura 30.** Síntesis de 6-Nitro cumarina

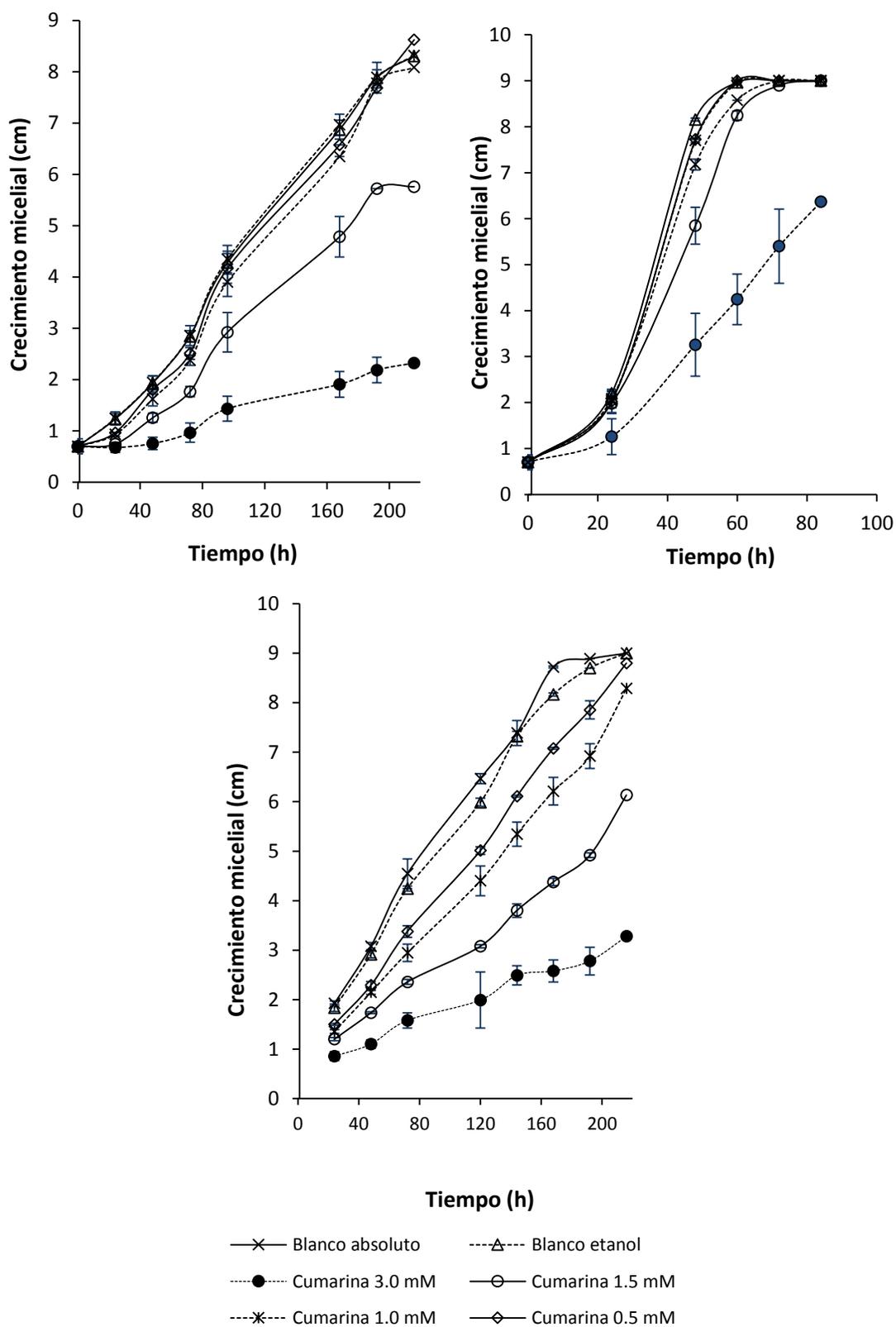


## 3.5 Resultados y discusión

### 3.5.1 Actividad antifúngica

. Los efectos inhibitorios de (1) contra *F. oxysporum*, *B. cinérea*, y *B. theobromae* se muestran en la Figura 31a, 31b, y 31c, respectivamente. En general, el compuesto (1) mostró una actividad antifúngica significativa contra todos los hongos a concentraciones de 1.5 mM y mayores. Como se puede ver, el crecimiento micelial de estos hongos fue dependiente de la concentración de (1) en el medio de cultivo. A 3.0 mM, los porcentajes de inhibición de (1) contra *B. cinerea*, *B. theobromae* y *F. oxysporum* oscilaron de 88,9 (día 1) a 75,6 (día 9), 66,4 (día 1) a 24,8 (día 3), y 78,8 (día 1) a 55,5% (día 9), respectivamente. En general, los resultados revelan que (1) exhibió una acción antifúngica entre moderada y baja hacia *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *B. theobromae* con valores IC<sub>50</sub> de 2,19 (al cuarto día), 1,78 (al tercer día), y 2,81 mM (a las 48 horas), respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados por (Montagner et al., 2008) quienes reportaron una actividad baja de (1) contra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium solani*. En general para todos los hongos, el efecto inhibitorio de (1) disminuyó con el tiempo, un hecho que sugiere que el hongo tiene un mecanismo de desintoxicación. Para estudiar este mecanismo, se incubó el microorganismo con (1) a 250 µg/mL durante 9 días.

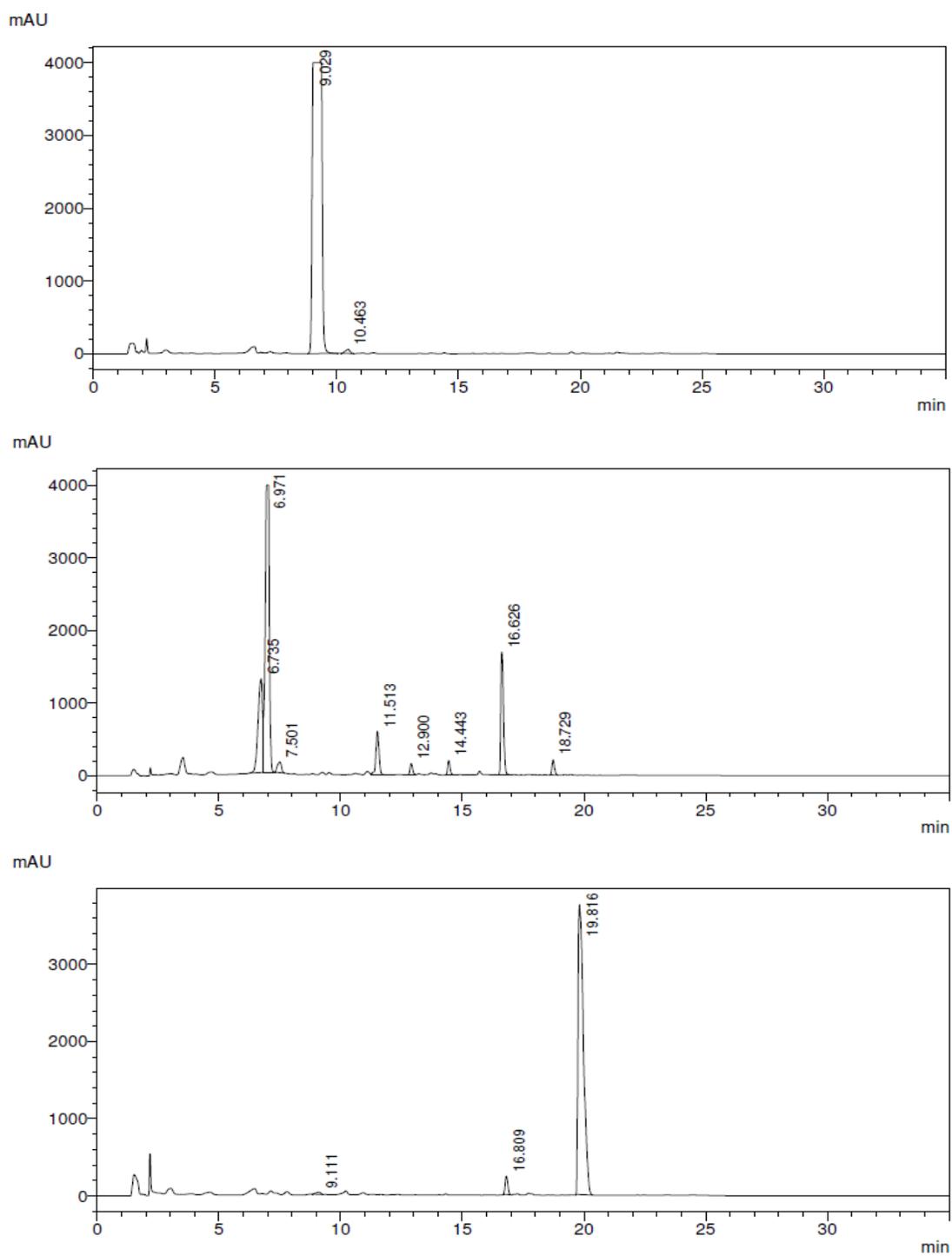
**Figura 31.** Inhibición del crecimiento micelial de los hongos *B. cinerea* (arriba-izq, a), *B. theobromae* (arriba-der, b) y *F. oxysporum* (abajo, c) con cumarina (1)



### 3.5.2 Metabolismo

Una comparación de los perfiles cromatográficos de HPLC-DAD obtenidos de la biotransformación se presenta en la Figura 32. Como se muestra, todos los hongos metabolizaron (1) en varios productos metabólicos, permitiendo realizar una aproximación al metabolismo de los tres fitopatógenos en las condiciones de cultivo dadas. *B. theobromae* transformó (1) en aproximadamente 8 productos metabólicos. Los productos con mayor abundancia corresponden a los picos con tiempos de retención de 6,6, 11,5, y 16,6 min. El pico con tiempo de retención de 6,8 min se detectó en los controles, por lo que correspondería a un metabolito propio del hongo. Los perfiles HPLC-DAD del metabolismo de (1) con *F. oxysporum* y *B. cinerea* fueron ligeramente similares, mostrando varios picos.

**Figura 32.** Perfil HPLC-DAD del metabolismo de (1) por *F. oxysporum* (arriba), *B. theobromae* (medio) y *B. cinerea* (abajo). Longitud de onda: 254 nm. Día 6.



Para aislar los principales productos metabólicos, se realizó una incubación a escala preparativa de (1) en medio líquido Czapeck-Dox usando el hongo *B. theobromae*. Se aislaron y purificaron por medio de cromatografía de columna y capa fina preparativa dos productos metabólicos (2) y (3), y sus estructuras se elucidaron por interpretación de los datos espectroscópicos.

**Compuesto (2):** En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observan señales para 8 protones. Una señal triplete a campo alto ( $\delta$  2,86-2,81 ppm) que integra para dos protones y que se encuentran acoplados con la señal para dos hidrógenos a campos más bajos ( $\delta$  3,05-2,90 ppm). Estos cuatro protones no equivalentes proporcionan un sistema  $A_2B_2$ . A campos más bajos se observan dos señales multipletes ( $\delta$  7,32-7,22 y 7,19-7,10 ppm), correspondientes a los cuatro protones aromáticos. Estas señales permiten inferir que hubo una reducción en el doble enlace de la cumarina. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN se observan 9 señales correspondientes a nueve carbonos. De acuerdo con el espectro DEPT-135, las señales a campo bajo,  $\delta$  29,3 y 23,7 ppm, corresponden a los carbonos metilénicos C-3 y C-4, respectivamente. Adicionalmente, se observa a campos más bajos, cuatro carbonos metínicos ( $\delta$  117,0, 124,5, 128,1 y 128,3 ppm) del anillo aromático.

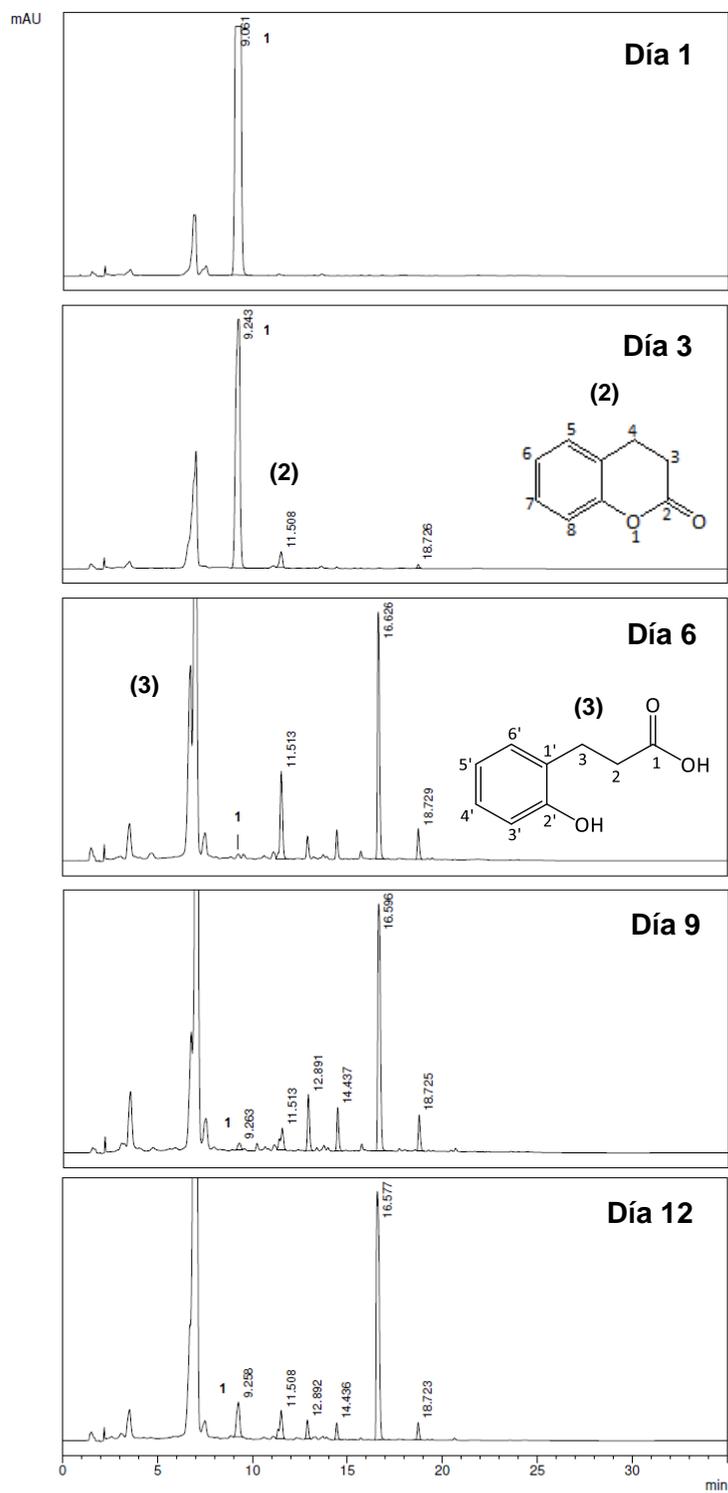
Además se observan 3 señales a  $\delta$  168,9, 152,0, 124,5 ppm, que corresponden a los carbonos cuaternarios C-2, C-8a y C-4a, respectivamente. A partir de los datos espectroscópicos, el producto metabólico (2) se identificó como dihidrocumarina ( $t_R = 11,5$  minutos).

**Compuesto (3):** En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observan señales para 9 protones. Una señal multiplete a campo alto ( $\delta$  2,81 ppm) que integra para dos protones; estos dos hidrógenos están acoplados con el hidrógeno que produce la señal a  $\delta$  2,96 ppm. Una señal singlete amplia, se observa entre 5,6 y 6,2 ppm, que asocia a la presencia de grupos  $-\text{OH}$ . A campo más bajo se observan dos señales multipletes ( $\delta$  7,31-7,11 y 6,94-6,87 ppm) correspondiente a los cuatro protones aromáticos. Las dos señales a campo alto permiten inferir que hubo una reducción del doble enlace de la cumarina, mientras que la presencia del singlete amplio sugiere que el sistema lactona sufrió una apertura. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN se observan 9 señales correspondientes a nueve carbonos. De acuerdo con el espectro DEPT-135, las señales a campo bajo,  $\delta$  24,7 y 34,5 ppm, corresponden a los carbonos metilénicos C-3 y C-2, respectivamente. A campos más bajos, se observan cuatro

carbonos metínicos ( $\delta$  116,6, 121,0, 128,0, 130,5 ppm) del anillo aromático. Además se observan 3 señales a  $\delta$  179,6, 154,0 y 126,9 ppm, que corresponden a los carbonos cuaternarios C-1, C-2', C-1', respectivamente. A partir de los datos espectroscópicos, el producto metabólico (**3**) se identificó como Ácido 3 (2- hidroxifenil) propanoico ( $t_R$  = 6,6 minutos).

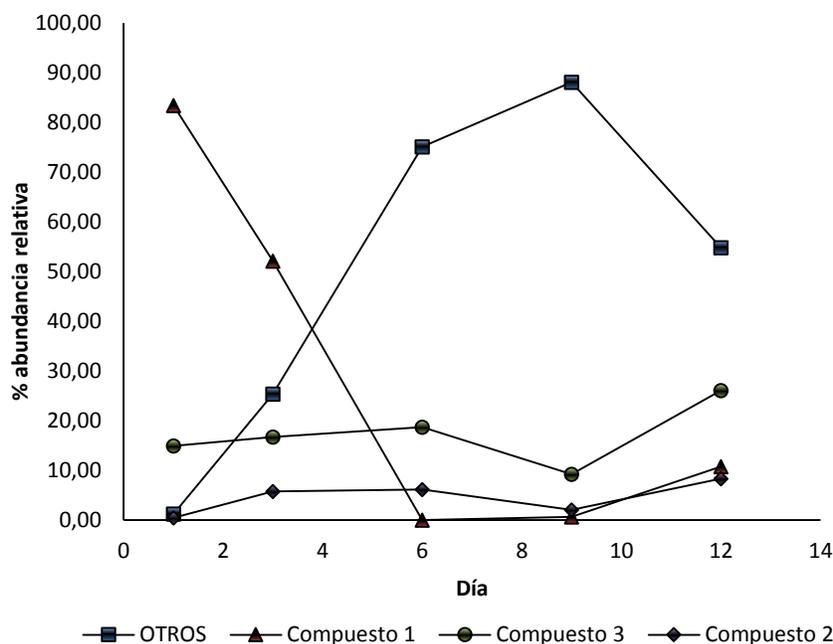
El metabolismo del compuesto (**1**) con *B. theobromae*, se monitoreó por 12 días tomando muestras cada 1, 3, 6, 9 y 12 días (**Figura 33**).

**Figura 33.** Estudio en el curso del tiempo para el metabolismo de cumarina (1) por *B. theobromae*. Longitud de onda: 254 nm



La relación entre el sustrato (1) y los productos metabólicos (2) y (3) en el curso del tiempo se determinó con base en el área de los picos de HPLC.

**Figura 33.** Abundancia relativa en el curso del tiempo para la transformación microbiana de (1) por *B. theobromae*. Compuesto (1), cumarina; compuesto (2), dihidrocumarina; y compuesto (3), ácido 3 (2- hidroxifenil) propanoico. Longitud de onda de análisis: 254 nm.



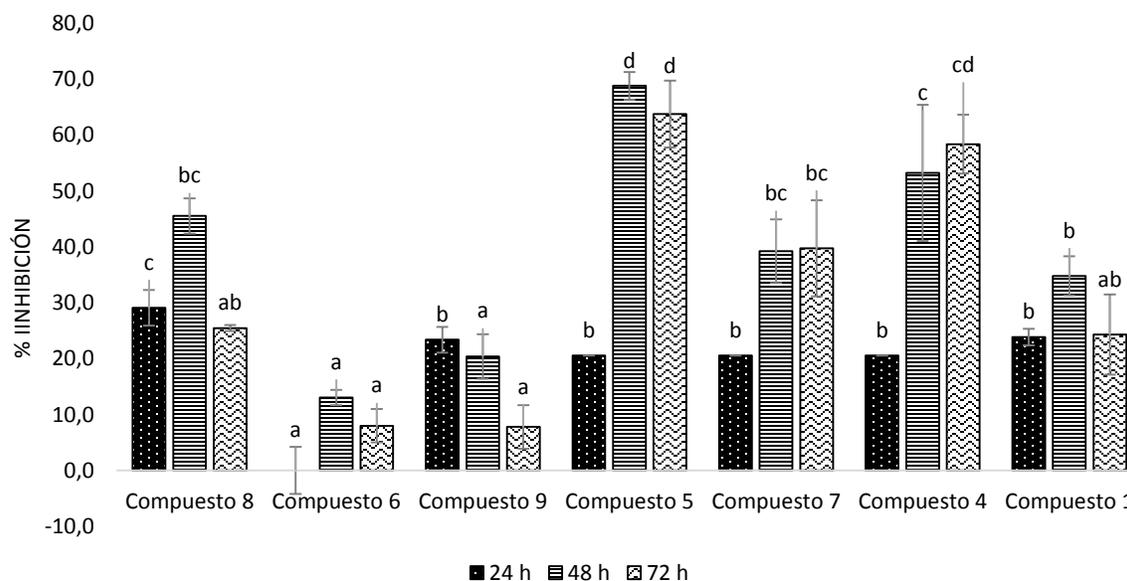
Los resultados, expresados como abundancias relativas, son mostrados en la Figura 34, evidenciando que *B. theobromae* consumió el compuesto (1) casi en su totalidad en un periodo aproximado de 6 días siendo convertida inicialmente a los producto 2 y 3. Sin embargo a partir del día 6 se evidencia la aparición de productos diferentes en tiempos de retención entre 12 y 18 minutos que no lograron ser identificados, siendo el compuesto con tiempo de retención alrededor de 16,6 minutos quien representa la mayor proporción en la transformación. Después de 6 días, más del 95% de (1) se modificó por *B. theobromae*.

La abundancia relativa de los productos 2 y 3 fue siempre menor al 30%. Como se muestra en la Figura 34 posiblemente debido a que en la medida que la transformación metabólica avanza estos productos se transforman nuevamente dando lugar a compuestos diferentes, por otro lado la sumatoria de los demás compuestos alcanzaron una abundancia alrededor del 90% bajo las condiciones usadas.

### 3.5.3 Actividad antifúngica de derivados de cumarina

Teniendo en cuenta que la transformación microbiana de la cumarina nos permitió evidenciar cambios estructurales significativos producidos por el fitopatógeno *B. theobromae*, es importante considerar la posibilidad de que el estudio de derivados sintéticos de este compuesto bioactivo permitan obtener información acerca de la relación entre la estructura del compuesto y la actividad biológica en cuestión. Esto con el fin de potenciar la actividad de la molécula inicial. Una serie de derivados de cumarina se preparó mediante métodos químicos convencionales y se evaluó su actividad antifúngica a 1000  $\mu\text{M}$  contra el hongo *B. theobromae*. Los porcentajes de inhibición del crecimiento radial se muestran en la Figura 35.

**Figura 34.** Inhibición (%) del crecimiento radial de *B. theobromae* con cumarina y derivados. Letras diferentes para un mismo tiempo corresponden a diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%, (Software: Statgraphics, análisis: Multiple sample comparission).



Una comparación de la actividad antifúngica de la cumarina (1) con respecto a 6 derivados sintéticos permite inferir que el sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado no es la única característica estructural que puede ser responsable de la actividad antifúngica de este núcleo estructural.

Por otra parte se evidencia que los compuestos sustituidos en el carbono C-7 (Compuestos 6 y 9, acetilación e hidroxilación) presentan una disminución significativa de la actividad con respecto a la cumarina con porcentajes de inhibición de 5 a 20% aproximadamente.

A su vez los compuestos 4 y 5 que presentan sustituciones en el carbono C-2 mostraron un aumento significativo en la actividad antifúngica para los días 2 y 3 del ensayo (48 y 72 horas), evidenciando un incremento del 30% aproximadamente en los % de inhibición de crecimiento con respecto a la cumarina en las mismas condiciones, permitiendo inferir que la adición de grupos funcionales en los carbonos del sistema  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado puede mejorar considerablemente la actividad de este tipo de compuestos al evitar la reducción evidenciada en el metabolismo de este segmento por parte del hongo,

Por su parte el compuesto 7 sustituido en C-3 y C-7 con grupos metilo e hidroxilo respectivamente, no mostró variaciones significativas en la actividad. El compuesto 8 (Nitración en C-6) solo mostró un leve aumento de la actividad en los tiempos de ensayo correspondientes a 24 y 48h, disminuyendo su efecto considerablemente para el tercer día, por tal razón estos compuestos no se consideran potenciales derivados activos.

Las semejanzas estructurales presentes en los compuestos 6 y 9 (Sustituciones en C-7, menor actividad) y los compuestos 4 y 5 (Sustituciones en C-2, mayor actividad) y su relación con la actividad antifúngica permiten inferir que características estéricas pueden influenciar positiva y negativamente la actividad.

## Capítulo 4. Actividad antifúngica de la cromona y compuestos relacionados estructuralmente

**Artículo 3:** Luisa Castaño, Samuel Vizcaíno, Diego Durango

### 4.1 Abstract

In the present paper, the fungistatic activity of the chromone was evaluated against the fungi *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*, along with its metabolism. The results show that the chromone showed a moderate inhibitory activity against the three fungi. Metabolic studies reveal that none of the three fungi efficiently converted the chromone into different products. Additionally, the inhibitory effect of mycelial growth of a series of compounds structurally related to chromone was evaluated. The results show that some of the compounds displayed a promising antifungal activity.

**Keywords:** *B. theobromae*, *B. cinerea*, fungistatic properties, chalcones, lima Tahiti.

### 4.2 Resumen

En el presente artículo se evaluó la actividad fungiestática de la cromona contra los hongos *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, junto con su metabolismo. Los resultados muestran que la cromona presentó una actividad moderada contra los tres hongos. Los estudios metabólicos revelan que ninguno de los tres hongos convirtió eficientemente la cromona en diferentes productos. Adicionalmente, se evaluó el efecto inhibitorio del crecimiento micelial de una serie de compuestos relacionados estructuralmente con la cromona. Los resultados muestran que algunos de los compuestos presentaron una actividad antifúngica promisoriosa.

**Palabras clave:** *B. theobromae*, *B. cinerea*, propiedades fungiestáticas, chalconas, lima Tahití.

## 4.3 Introducción

Actualmente, los cítricos son una de las clases de frutas más consumidas en todo el mundo. A esta clase pertenecen las naranjas, limones, limas, toronjas, pomelos, mandarinas, entre otras. Además de su agradable sabor, los cítricos son una fuente importante de vitaminas, minerales y fibra dietaria, que son esenciales para el crecimiento y desarrollo normal (Cano et al., 2008). Los cítricos también contienen flavonoides, los cuales han sido propuestos por proporcionar importantes beneficios a la salud (Khan, et al. 2014). En Colombia los cítricos, después del banano, son los frutales de mayor importancia. La amplia variedad de climas y buena calidad de frutas cítricas para el mercado durante la mayor parte del año, hacen que la actividad cítrica en Colombia tenga grandes perspectivas de producción (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005). No obstante, las características inherentes del trópico, como la alta precipitación y temperatura constante, así como el uso de variedades susceptibles al ataque de patógenos, se constituyen en factores limitantes para la obtención de frutos cítricos de buena calidad que puedan competir con los mercados extranjeros (Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola, 2000). Por lo anterior, hoy en día se requiere de sustancias nuevas y mejores para el control de patógenos.

Los derivados de cromona (4*H*-Benzopiran-4-ona o 4*H*-cromen-4-ona), por ejemplo flavonas e isoflavonas, hacen parte de las sustancias de defensa de las plantas. Algunos de estos compuestos han demostrado poseer actividad antifúngica in vitro, y su biosíntesis en las plantas ha sido relacionada con la resistencia de algunos cultivares a patógenos (Khan, et al. 2014). En el presente artículo se evaluaron las propiedades fungiestáticas de la cromona contra los hongos fitopatógenos *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* aislados de frutos de Lima Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka), así como también su metabolismo. Adicionalmente, se evaluó la actividad inhibitoria de una serie de compuestos relacionados estructuralmente con la cromona.

## 4.4 Materiales y métodos

### 4.4.1. Materiales químicos y biológicos

Se aislaron los hongos fitopatógenos *Botryodiplodia theobromae*, *Botrytis cinerea*, y *Fusarium oxysporum* desde frutos de lima Tahiti (*Citrus latifolia* T.) infectados y con síntomas evidentes de la enfermedad, y se caracterizaron morfológicamente. Los hongos se conservaron en medio Agar Papa Dextrosa (PDA; Merck-KGaA, Darmstadt, Alemania) a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y se subcultivaron mensualmente en cajas Petri (9,0 cm de diámetro y 15,0 mL de medio). Para la evaluación de la actividad antifúngica, en cajas Petri estériles de 9,0 cm de diámetro se inocularon discos con micelio de 6 mm de diámetro. La 1,4-benzopirona (cromona), tiocromanona y el ácido cromona-3-carboxílico se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los ingredientes del medio de cultivo para el estudio metabólico se adquirieron de Oxoid Ltd. (Hampshire, Inglaterra).

### 4.4.2 Equipos y métodos analíticos

El aislamiento y manipulación de los microorganismos se realizó en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar (CBS 180A) clase II tipo A. Para todos los materiales empleados se garantizó inocuidad completa por medio de esterilización en autoclave horizontal automática (marca Centricol AUA 80L). El seguimiento del metabolismo microbiano de la cromona se llevó a cabo por cromatografía de capa fina (CCF) en cromatoplasas Merck Kiesegel 60 F<sub>254</sub> (0.25 mm espesor) usando como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo, y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) en un equipo Shimadzu, Prominense con auto muestreador (SIL-20A) equipado con bombas recíprocas Shimadzu (LC-20AT) conectadas a un degasificador (DGU 20A5), integrador (CBM 20A), detector de arreglo de diodos (SPD-M20A) y Software LabSolutions Lite versión 1.22 SP1 y las columnas RP-C18 Zorbax Eclipse Plus (150 mm x 4,6 mm – 5  $\mu\text{m}$ ) Agilent Technologies y Pinnacle II (100 mm x 4,6 mm-5  $\mu\text{m}$ ) Restek con gradiente de solventes acetonitrilo-agua en proporciones específicas. Para la purificación de los productos metabólicos y de síntesis se emplearon diferentes técnicas cromatográficas (cromatografía de columna, CC, y capa fina preparativa). Para la CC se emplearon como fases

estacionarias sílica gel 60 (0,040-0,063 mm; Merck) y Sephadex LH-20. Los compuestos se detectaron en CCF por fluorescencia bajo la lámpara UV (254 y 366 nm), con vapores de yodo, o por aspersión con reveladores seguido de calentamiento suave. Para la identificación de los productos metabólicos y de síntesis se empleó espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  (300 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) mono- y bidimensional (COSY, HMQC y HMBC) en un espectrómetro Bruker AMX 300 con deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento (J) son expresados en ppm y Hertz, respectivamente. La atribución de las multiplicidades para los carbonos se llevó a cabo empleando el experimento JMOD. Notaciones: s = singlete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete, dd = doble de doblete, q = quinteto.

#### 4.4.3 Actividad antifúngica de cromona

La toxicidad de la cromona (y compuestos relacionados estructuralmente) contra *B. theobromae*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* se determinó usando la técnica del alimento envenenado (Velasco et al, 2010). Diferentes concentraciones de la cromona (0,5, 1,0, 1,7 y 3,4 mM) disueltas en etanol (menos del 0.2%, v/v) se diluyeron en cajas Petri con agar PDA. Todas las concentraciones se evaluaron por triplicado, y los resultados se muestran como los valores medios de los diámetros de la colonia ( $\pm$  desviación estándar, DE). Los compuestos relacionados estructuralmente se evaluaron a una concentración aproximada de 1,7 mM. Las cajas Petri sin compuesto se usaron como control negativo, las cuales contenían sólo medio de cultivo (Blanco absoluto) y adición de etanol 0.2%, v/v (Blanco solvente). Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente con luz difusa y el diámetro del crecimiento micelial se midió cada 24 horas. Para los compuestos relacionados estructuralmente, la lectura se realizó a las 48 horas. La incubación se detuvo cuando el micelio de las cajas Petri ocupó el espacio disponible (aproximadamente 3.5 días para *B. theobromae*, 10 días para *B. cinérea* y 11 días para *F. oxysporum*). La fungitoxicidad de la cromona (y compuestos relacionados estructuralmente) en términos de porcentaje de inhibición del crecimiento radial se calculó usando la fórmula  $inhibición = (1 - (T/C)) \times 100$ , donde,  $C =$  diámetro de la colonia (mm) del blanco absoluto y  $T =$  diámetro de la colonia (mm) de los tratamientos (cromona o compuestos relacionados estructuralmente).

#### 4.4.4 Metabolismo de la cromona

##### a. Precultivo

Los hongos se inocularon en matraces Erlenmeyer de 1,0 L, conteniendo 500 mL de medio líquido Czapek-Dox (Solución A: Glucosa 5%, extracto de levadura 0,1%; solución B:  $K_2HPO_4$  0,5%,  $NaNO_3$  0,2%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,001%). Los matraces Erlenmeyer se agitaron (agitador orbital, 120 rpm; Centricol serie 0239) a temperatura ambiente durante 10 días. El micelio se colectó por filtración, se lavó con agua y se empleó en la biotransformación preparativa y los experimentos en el curso del tiempo.

##### b. Experimentos en el curso del tiempo

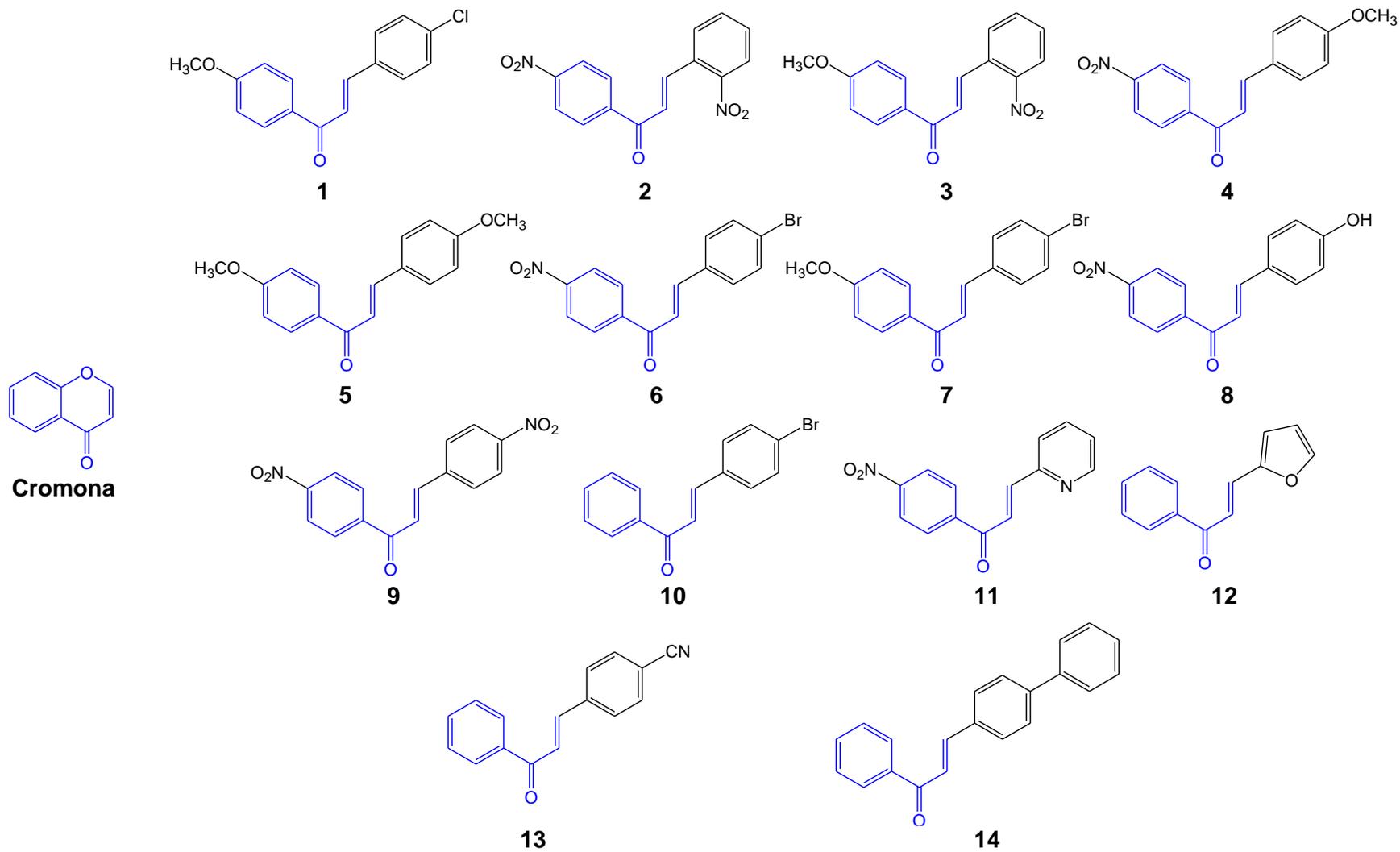
Los hongos *B. theobromae*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* precultivados se re-inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio Czapeck-Dox y cromona a concentración final de 1.7 mM. Los hongos Fitopatógenos se cultivaron a 120 rpm por 12 días. El medio de cultivo se colectó de cada matraz cada tres días. Luego, el medio de cultivo se saturó con NaCl y se extrajo con acetato de etilo y diclorometano; posteriormente el solvente se evaporó. Estos extractos se analizaron por CCF y HPLC-DAD. La relación entre el sustrato y los productos metabólicos se determinó con base en el área de los picos de HPLC. Los controles (sin sustrato) se llevaron a cabo para verificar la presencia de compuestos similares en los cultivos de los hongos.

#### 4.4.5 Compuestos relacionados estructuralmente

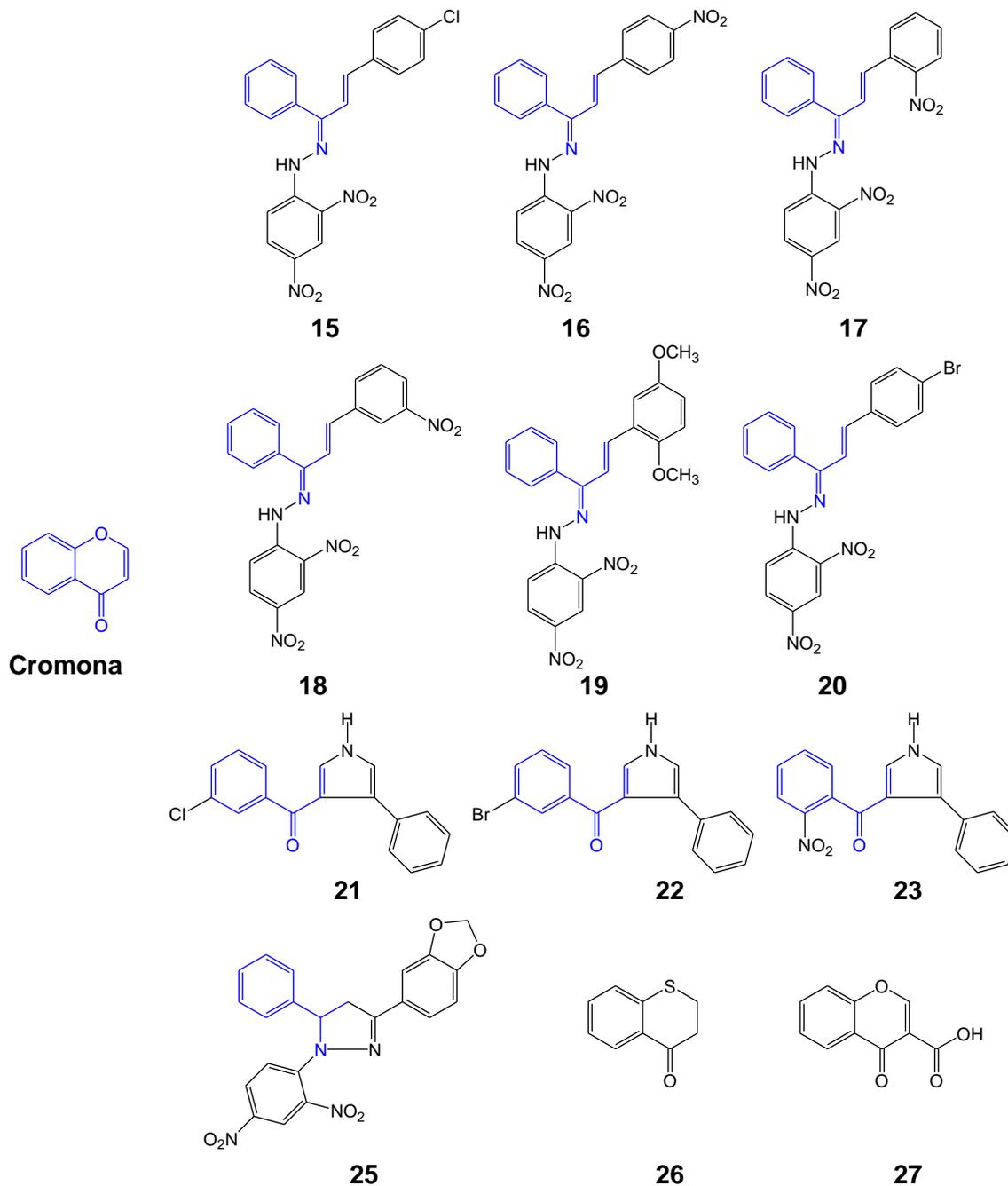
La síntesis de chalconas se realizó mediante la reacción de Claisen-Schmidt. Las chalconas se prepararon por la reacción de cantidades equimolares de acetofenona (y derivados) y derivados de benzaldehído en etanol usando una solución de NaOH al 40% como catalizador. Para la síntesis de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas, se combinaron las chalconas preparadas anteriormente con 2,4-dinitrofenilhidrazina en cloroformo acidulado con ácido acético. La mezcla se colocó a reflujo durante 2 horas. Posteriormente, la solución se neutralizó con solución de NaOH al 10% y se refrigeró. El producto se purificó por filtración. Los pirroles (3-acilpirroles) se sintetizaron por reacción de las chalconas con toluenosulfonilmetil isocianuro (TOSMIC) en relación 1:1.3, en una mezcla bifásica de

dimetilsulfóxido-eter etílico, y se agregó hidruro de sodio. La reacción se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. La estructura se confirmó por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mono- y bidimensional. Las estructuras de los compuestos sintetizados se presentan en la Figura 35. La actividad antifúngica se evaluó para todos los compuestos a 1,7 mM.

Figura 345a. Estructura de la cromona y compuestos relacionados estructuralmente sintetizados



**Figura 35b.** Estructura de la cromona y compuestos relacionados estructuralmente sintetizados

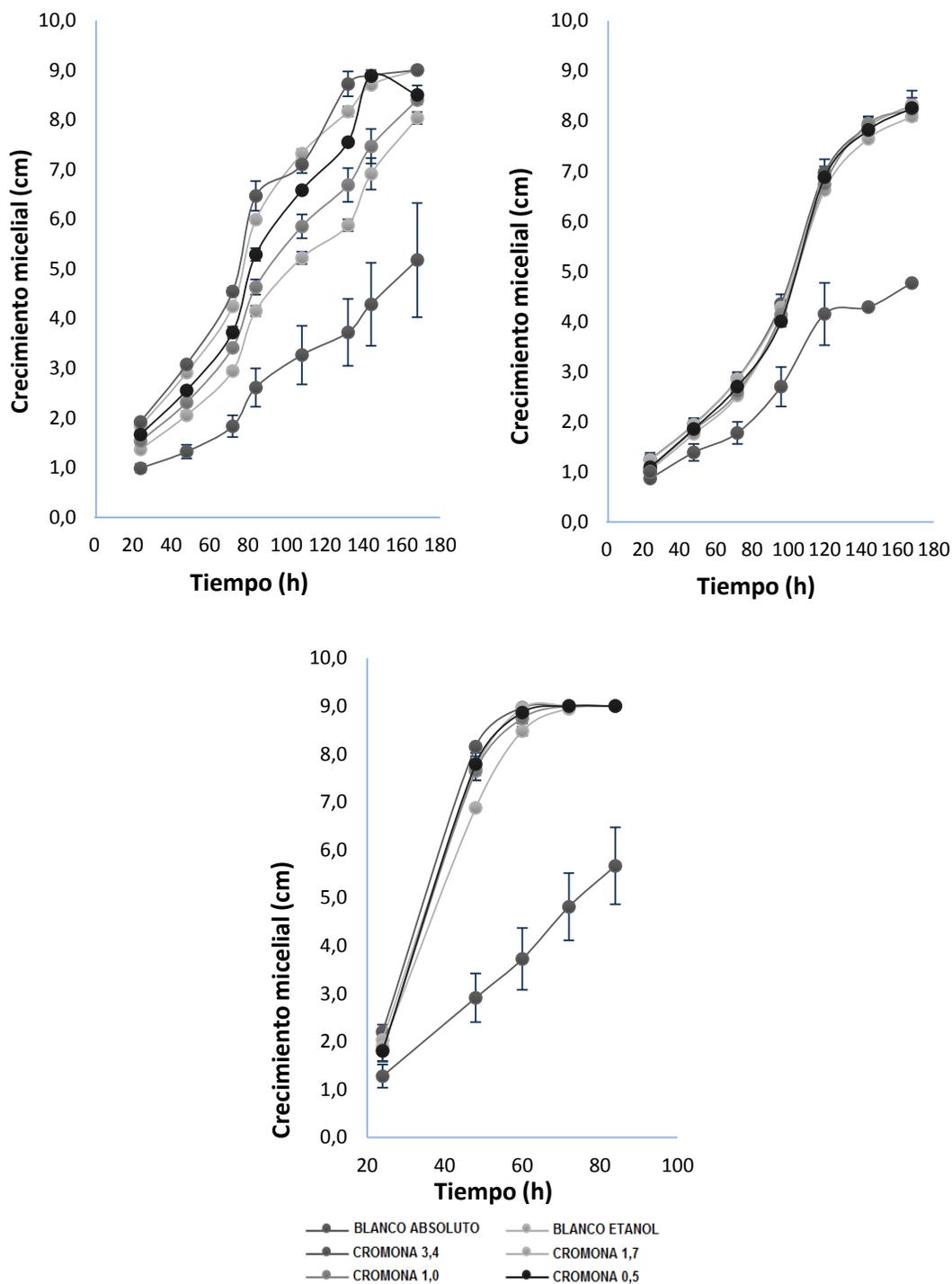


## 4.5 Resultados y discusión

### 4.5.1 Actividad antifúngica de la cromona

Las propiedades fungiestáticas de la cromona se analizaron usando la técnica del alimento envenenado. Los efectos inhibitorios de la cromona contra *F. oxysporum*, *B. cinérea*, y *B. theobromae* se muestran en la Figura **36a**, **36b**, y **36c**, respectivamente. En general, el compuesto mostró una actividad antifúngica moderada contra todos los hongos. Solo los tratamientos con la cromona a 3,4 mM presentaron diferencias significativas con respecto al control. Como se puede ver, el crecimiento micelial de estos hongos fue dependiente de la concentración en el medio de cultivo. A 3,4 mM, los porcentajes de inhibición contra *B. cinérea* y *B. theobromae* oscilaron entre el 50 y 20% a lo largo del ensayo, mientras que para *F. oxysporum* se ubicaron entre un 70% y 40%. En general para todos los hongos, el efecto inhibitorio disminuyó con el tiempo, un hecho que sugiere que el hongo tiene un mecanismo de desintoxicación. Para estudiar este mecanismo, se incubó el microorganismo con el compuesto a 1,7 mM durante 12 días.

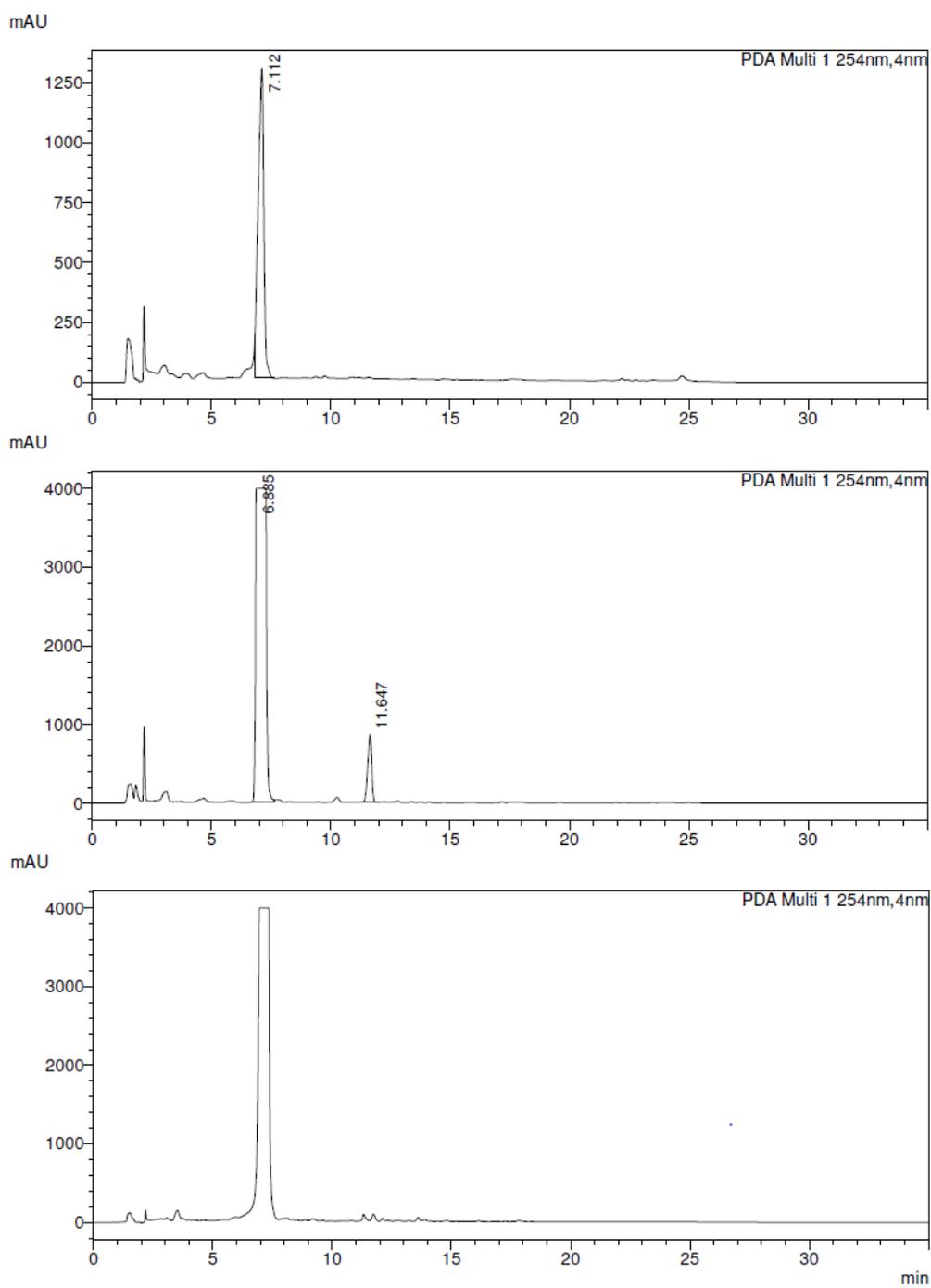
**Figura 36.** Inhibición del crecimiento micelial de los hongos *B. cinerea* (arriba-izq.), *B. theobromae* (arriba-der.) y *F. oxysporum* con cromona



### 4.5.2 Metabolismo

Una comparación de los perfiles cromatográficos de HPLC-DAD obtenidos de la biotransformación se presenta en la Figura 37. Como se muestra, ninguno de los fitopatógenos en estudio metabolizó significativamente el compuesto (cromona, tiempo de retención = 6,9 min), lo que permite inferir que tal y como se detectó en los ensayos de actividad antifúngica, el compuesto no representa toxicidad significativa para ninguno de los hongos, razón por la cual no se hace necesario metabolizarlo. Solo en el caso de la transformación realizada con *Fusarium oxysporum* (Figura 37b) se evidencia la aparición de un producto metabólico en menor proporción que el sustrato para el día 6 de ensayo, demostrando que de acuerdo con los resultados de actividad para este patógeno, la cromona no representa mayor toxicidad, razón por la cual se metaboliza parcialmente.

**Figura 37.** Perfil HPLC-DAD del metabolismo de cromona por *B. cinerea* (arriba, a), *F. oxysporum* (medio, b), *B. theobromae* (abajo, c). Longitud de onda: 254 nm. Día 6.



### 4.5.3 Actividad antifúngica de compuestos relacionados estructuralmente con la cromona

Se sintetizó y purificó una serie de 27 compuestos relacionados estructuralmente con la cromona. Los compuestos se elucidaron mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . El análisis de las constantes de acoplamiento de  $^1\text{H}$ -RMN para las chalconas indicó que todos los átomos de hidrógeno del enlace carbono-carbono olefínico tienen una conformación *trans* ( $J > 12$  Hz) (**Figura 38**). La existencia de un grupo carbonilo conjugado con el doble enlace carbono-carbono se evidenció por el desplazamiento del carbono (espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN) entre  $\delta$  180 y 190 ppm (**Figura 39**).

**Figura 38.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la 1,3-Bis (4-metoxifenil) propenona

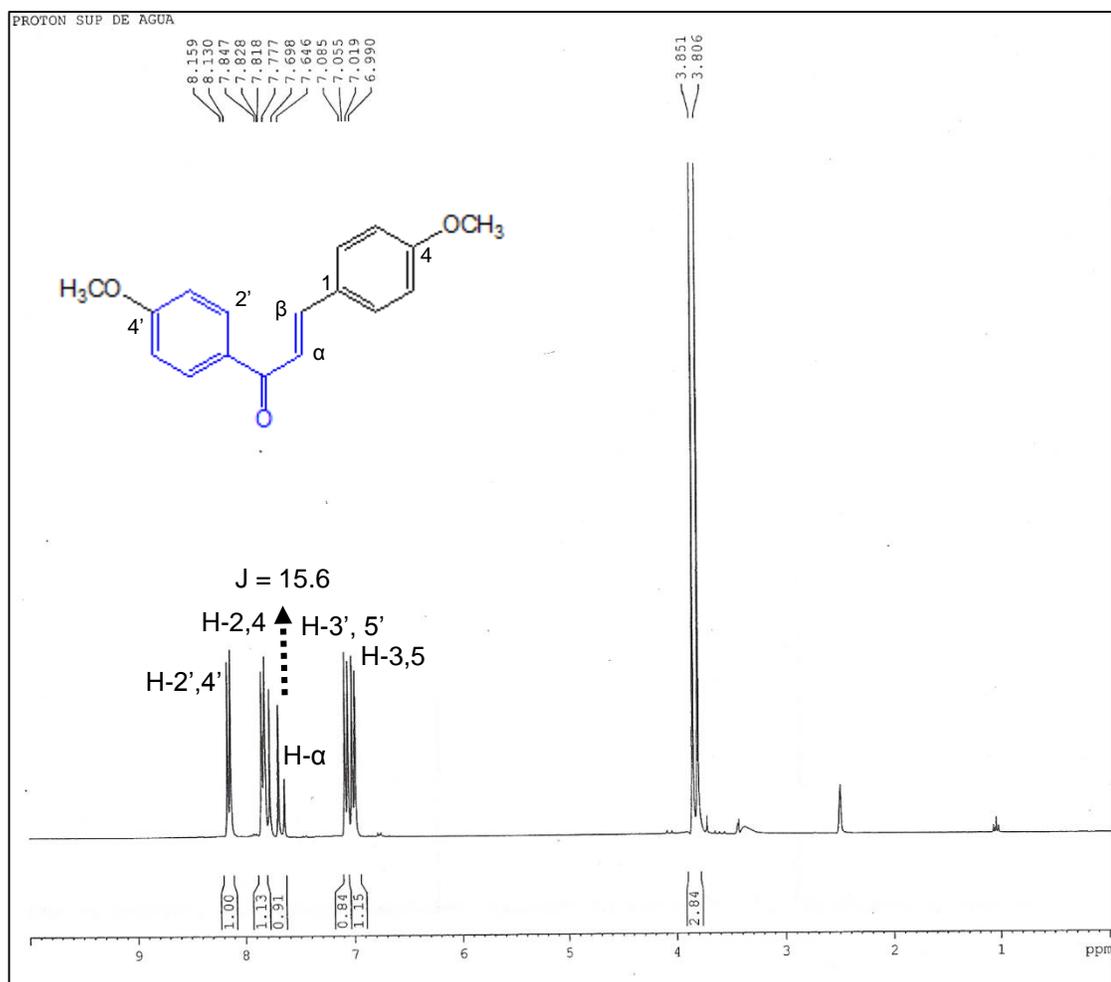
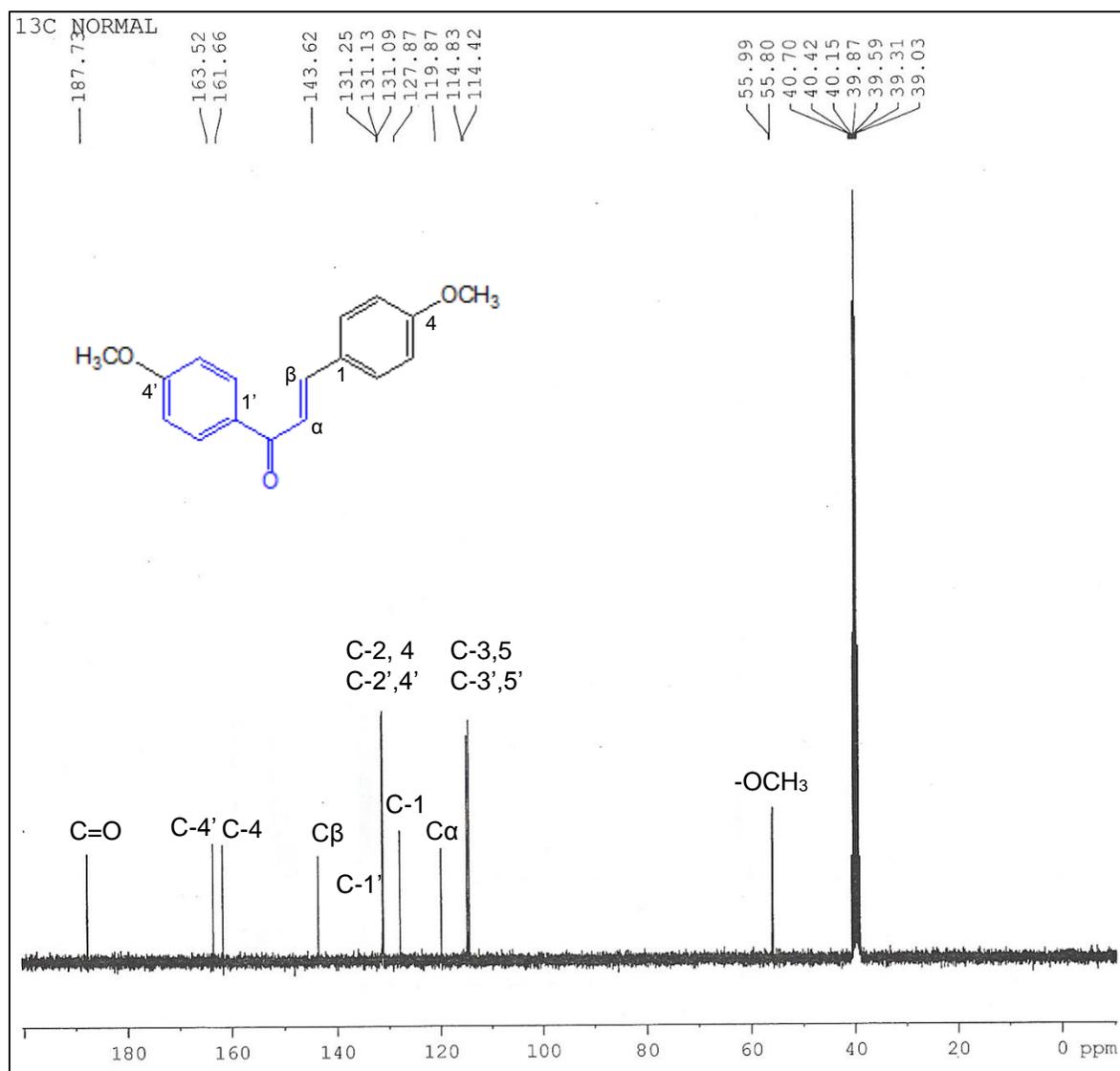
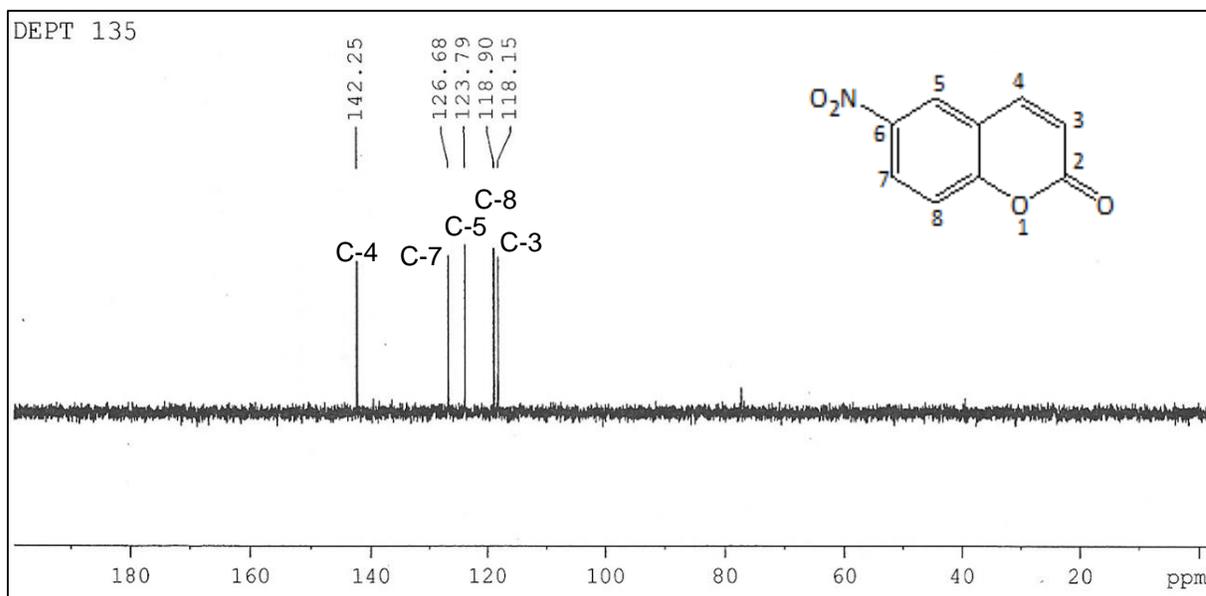


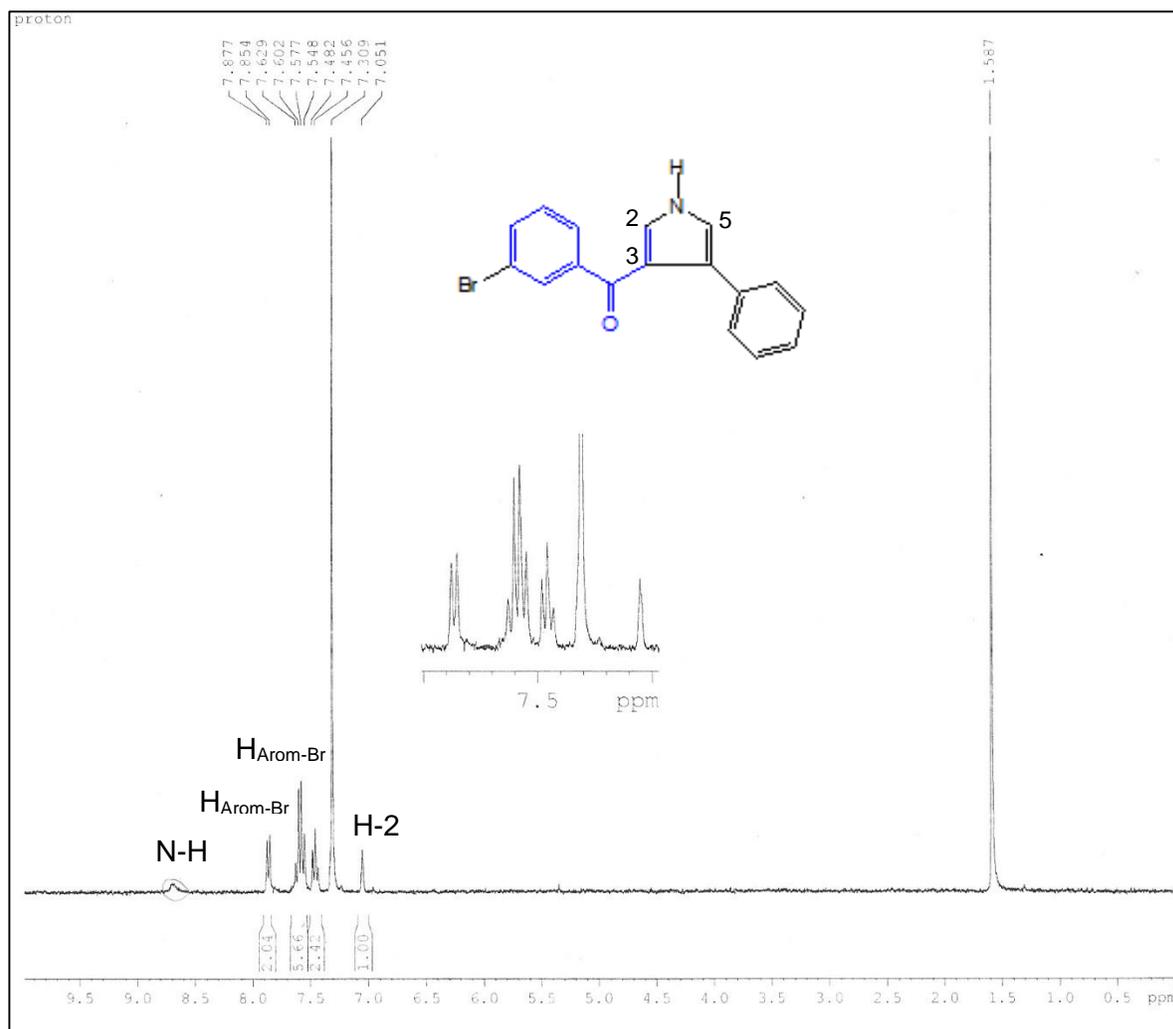
Figura 39. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la 1,3-Bis (4-metoxifenil) propenona





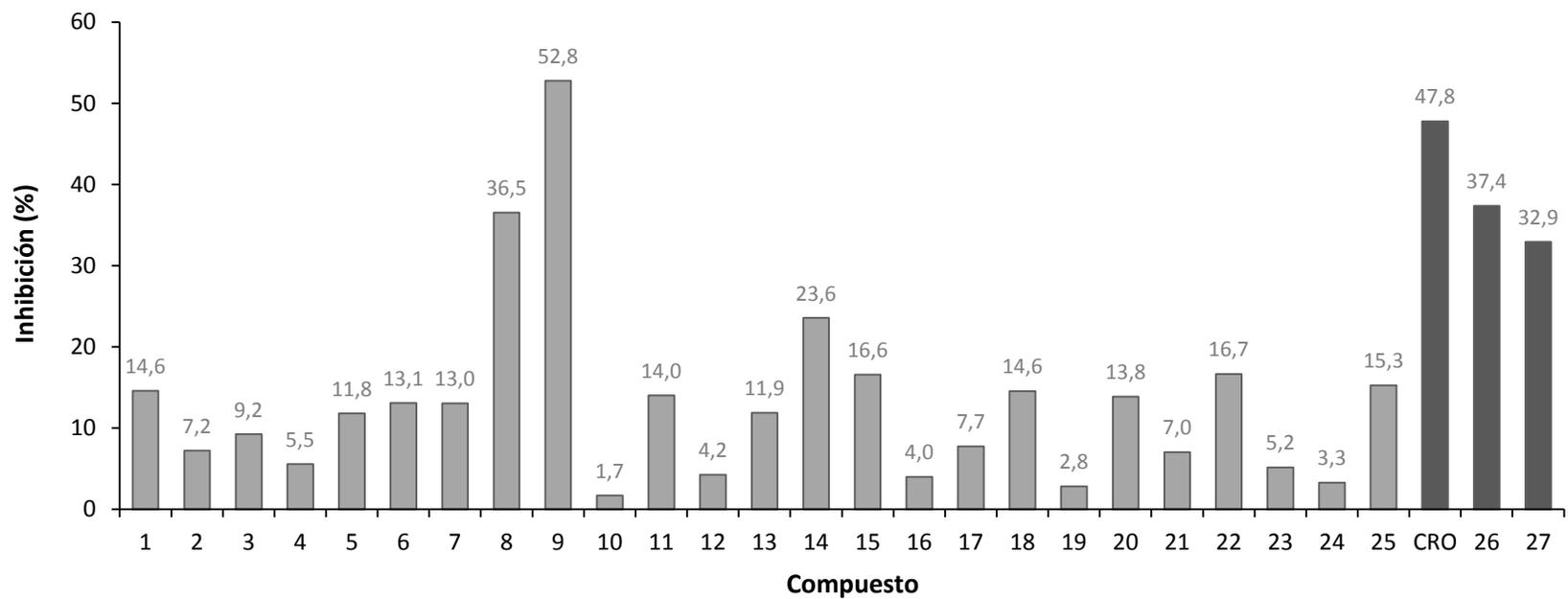
Los pirroles (3-acilpirroles) se prepararon por reacción de las chalconas con tosilmetilisocianuro bajo condiciones básicas. Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN mostraron la presencia del protón H-2 entre  $\delta$  6,8 y 7,0 ppm y el protón H-5 entre  $\delta$  7,3 y 7,6 ppm del pirrol. El hidrógeno N-H se observó entre  $\delta$  8,5 y 9,0 ppm (**Figura 40**). En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN se observó la señal del carbono carbonílico entre  $\delta$  190 y 195 ppm. Los carbonos del anillo pirrol se detectaron entre  $\delta$  118 y 126 ppm.

**Figura 40.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la 1,3-Bis (4-metoxifenil) propenona



Los resultados de la actividad antifúngica de los compuestos relacionados estructuralmente con la cromona se presentan en la **Figura 41**. Se encontró que la mayor actividad inhibitoria fue desplegada por el compuesto 9, la 1,3-Bis (4-nitrofenil) propenona (**9**), con un porcentaje de inhibición de 52,8%. Le siguieron en orden de actividad antifúngica la cromona (**CRO**, 47,8%), tiocromanona (**26**, 37,4%), 3-(4-hidroxifenil)-1-(4-nitrofenil) propenona (**8**, 36,5%), y ácido cromona-3-carboxílico (**27**, 32,9%).

**Figura 41.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de la cromona y compuestos relacionados estructuralmente contra *B. theobromae*. Tiempo de evaluación: 48 h.





La mayor actividad de la 1,3-Bis (4-nitrofenil) propenona, con un grupo nitro atractor de electrones en los dos anillos aromáticos, permite concluir que factores de tipo electrónico pueden ser importantes para la actividad antifúngica. Adicionalmente, los factores estéricos también afectan considerablemente la actividad antifúngica. Así, una comparación entre las chalconas 1,3-Bis (4-nitrofenil) propenona (**9**) y 3-(2-nitrofenil)-1-(4-nitrofenil) propenona (**2**) muestra que el cambio en la posición del sustituyente  $-\text{NO}_2$  de la posición *para* a la posición *orto* del anillo B, reduce dramáticamente el efecto fungiestático (de 52,8 a 7,2%). La presencia del hidroxilo en posición 4 del anillo B (compuesto **8**) aumenta la actividad antifúngica, en comparación con los sustituyentes  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$ , y  $-\text{OMe}$ . Lo anterior sugiere que el hidrógeno fenólico tiene un efecto importante para la inhibición del crecimiento micelial. Una vez se metila el grupo hidroxilo del compuesto **8** para formar el compuesto **4**, la actividad antifúngica prácticamente se pierde (de 36,5 a 5,5%).

En general, las 2,4-dinitrofenilhidrazonas (**16** a **21**) mostraron una actividad antifúngica baja, con porcentajes de inhibición menores al 15%. Una comparación entre la chalcona 3-(4-bromo-*o*-fenil)-1-(4-metoxifenil) propenona (**7**) y su 2,4-dinitrofenilhidrazona (**21**), demuestra que la incorporación de la hidrazona reduce la actividad inhibitoria (de 13,0 a 7,0 %). Similarmente, los pirroles (**22**, **23** y **24**) presentaron un porcentaje de inhibición bajo, lo que indicaría que la presencia del grupo carbonilo es una característica estructural valiosa para la actividad antifúngica. La presencia del sistema heterocíclico, compuestos **CRO**, **26** y **27**, aumenta la actividad antifúngica.

## 5. Conclusiones

La perinaftenona exhibió un efecto fungiestático significativo contra los tres hongos evaluados y así mismo una leve disminución de la actividad en los productos de biotransformación debidos a los cambios estructurales ocasionados por acción metabólica de los hongos.

Estudios metabólicos muestran que la perinaftenona es rápidamente metabolizada por los tres microorganismos patogénicos, para formar mayoritariamente 2,3-dihidro-1H-fenalen-1-ol y 2,3-dihidro-fenalen-1-ona. A partir de un medio con 25  $\mu\text{g/mL}$  de perinaftenona, se alcanzaron niveles máximos de 2,3-dihidro-1H-fenalen-1-ol en el día 9 (14,3  $\mu\text{g/mL}$  para *B. theobromae*) y de 2,3-dihidro-fenalen-1-ona en el día 12 (20,3  $\mu\text{g/mL}$  para *F. oxysporum*). Lo anterior demuestra la capacidad de los tres hongos para convertir el sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado.

Un análisis de la actividad antifúngica de derivados de la perinaftenona reveló que la formación de 2,3-dihidro-1H-fenalen-1-ol a partir de perinaftenona obedece a un proceso de desintoxicación por parte de los hongos. No obstante, la reducción del sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado no afecta significativamente la actividad antifúngica, por lo que persistiría el efecto inhibitorio del medio. La inclusión de grupos sustituyentes en la perinaftenona, tanto en el C-2 como en el sistema naftaleno, redujo la actividad antifúngica contra *B. theobromae*. Esta reducción del efecto fungiestático fue mayor para los sustituyentes donadores de electrones.

La evaluación del metabolismo de la cumarina muestra que los fitopatógenos en estudio afectan el sistema  $\alpha, \beta$ - insaturado y que una vez dicho sistema se protege en el carbono C-3, la actividad antifúngica se ve potenciada

Se concluye que cromona posee un efecto fungiestático moderado contra los hongos evaluados. Así mismo, se encontró que los hongos metabolizan lentamente la cromona, lo que puede ser un indicativo de su baja actividad fungiestática. La evaluación de la actividad antifúngica de una serie de compuestos relacionados estructuralmente con la cromona, mostró que la chalcona 1,3-Bis (4-nitrofenil) propenona posee una actividad superior que

la cromona. La presencia de grupos nitro en posición *para* puede ser un requisito estructural importante para la actividad antifúngica. Efectos de tipo electrónico y estérico deben ser considerados a la hora de diseñar nuevos agentes antifúngicos relacionados con la cromona.



## Anexo A: Espectros de resonancia magnética nuclear (Compuestos - Capítulo 2)

Compuesto (2): 2,3-dihidro-1H-fenalen-1-ol

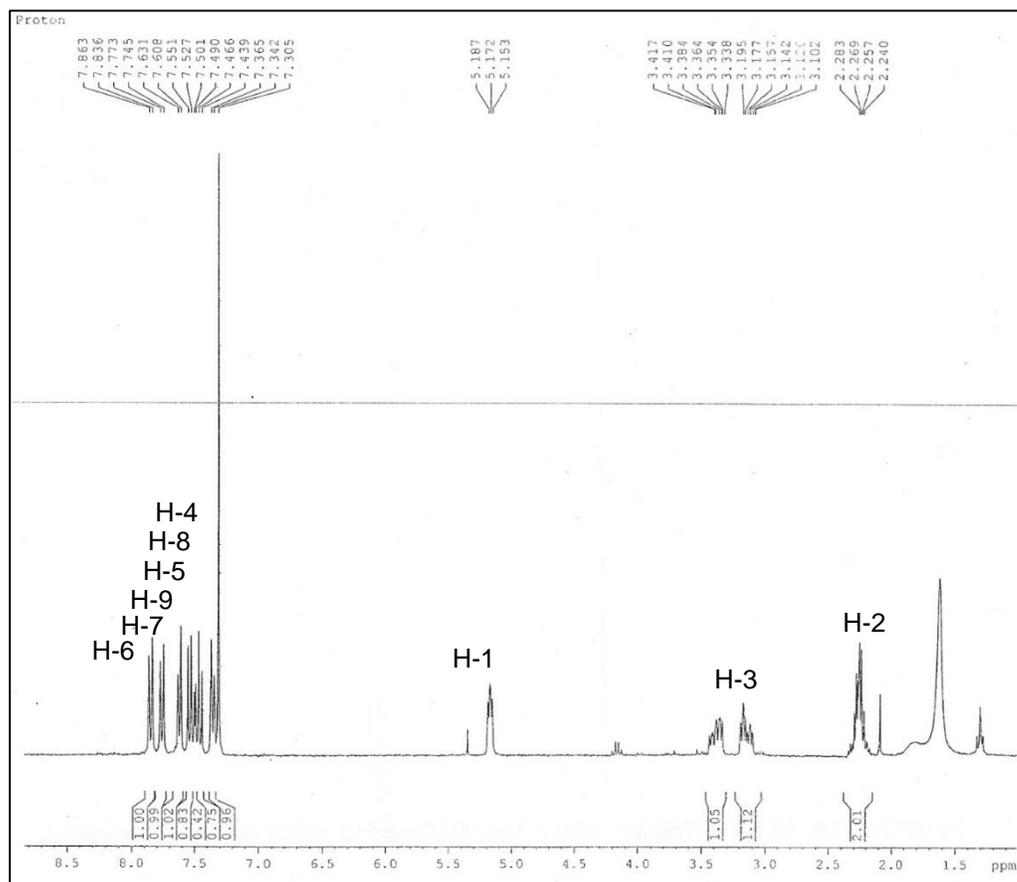
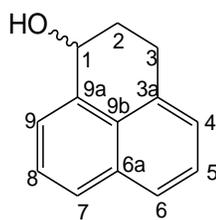


Figura 2a. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del 2,3-dihidro-1H-fenalen-1-ol

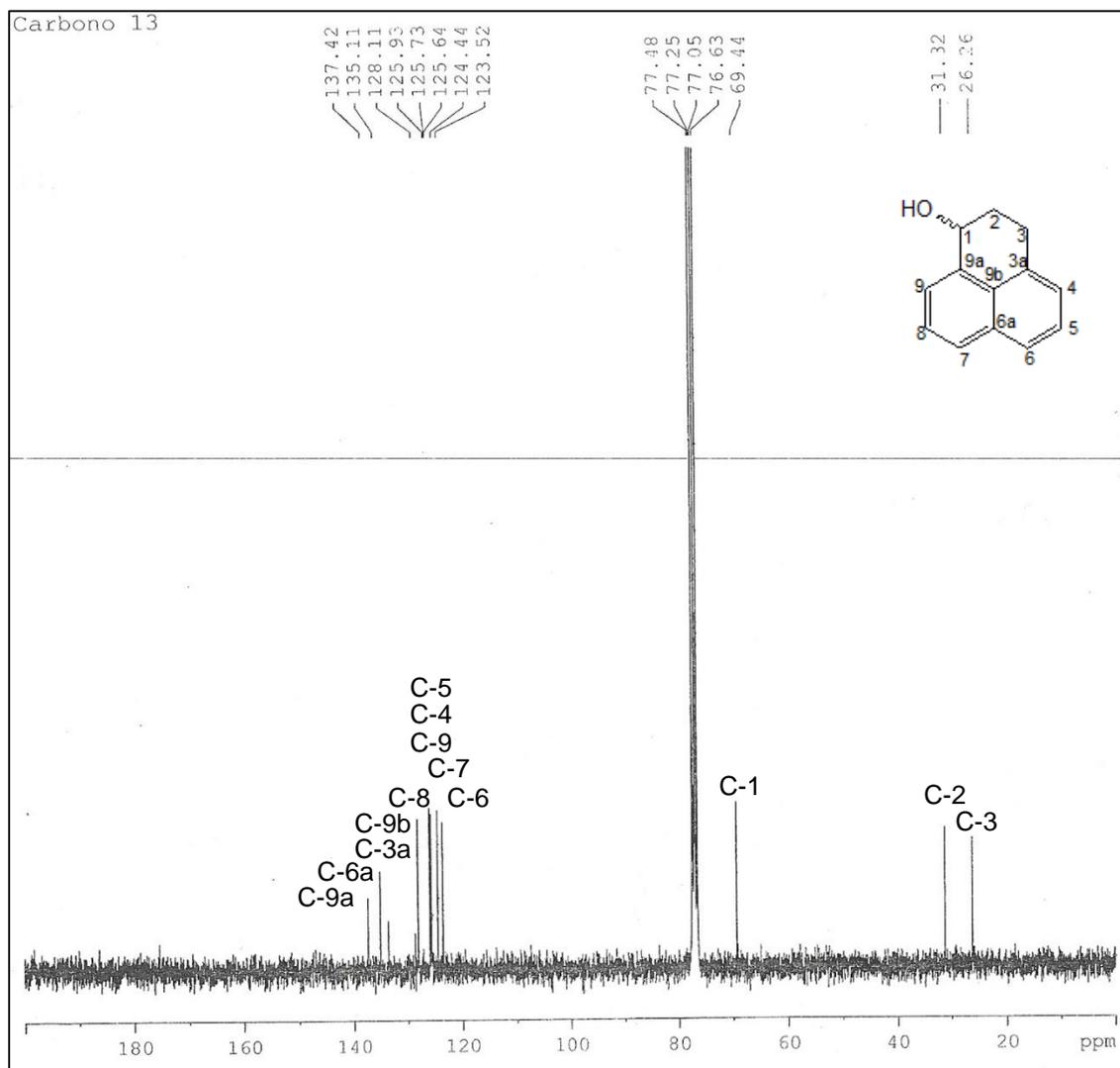


Figura 2b. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del 2,3-dihidro-1H-fenalen-1-ol

**Compuesto (3):** 2,3-dihidro-fenalen-1-ona

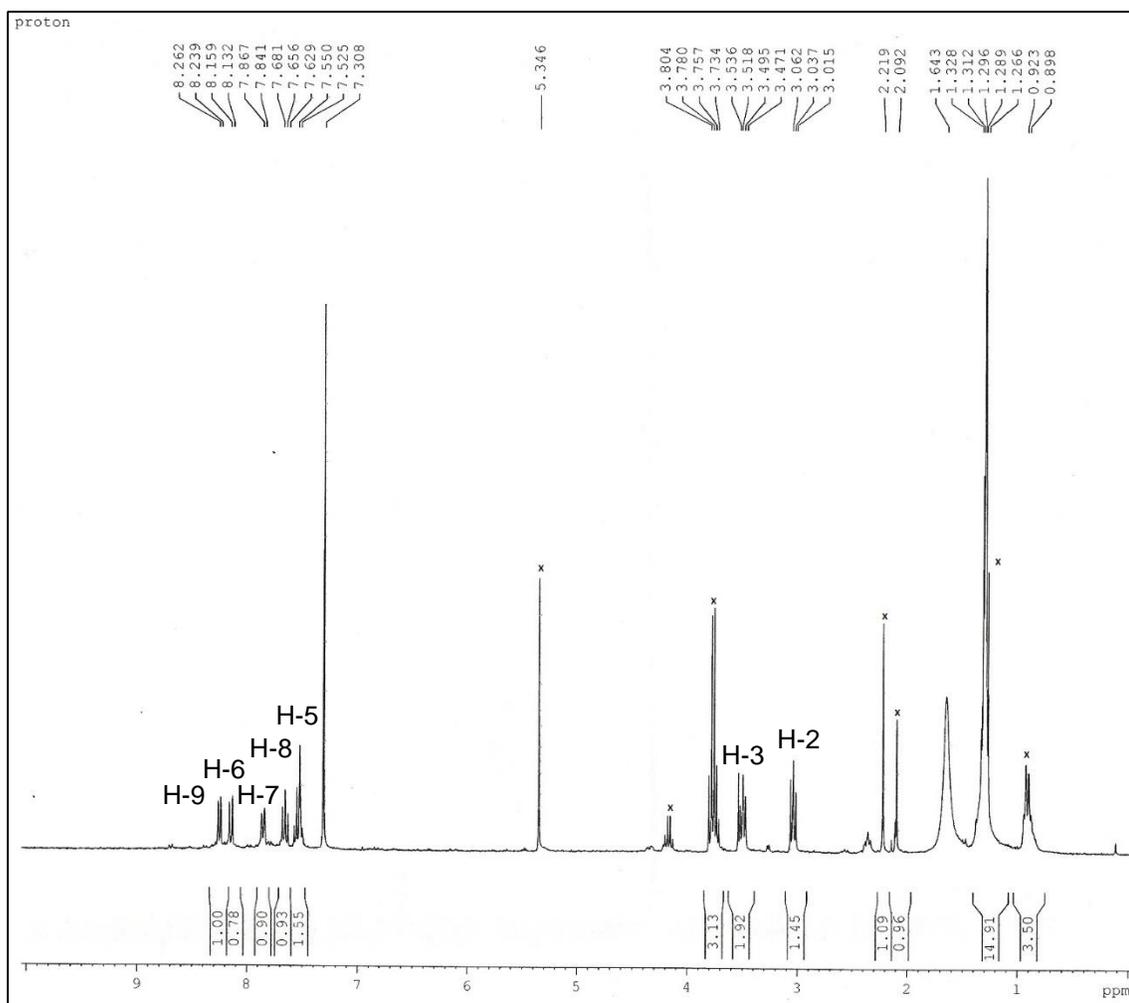
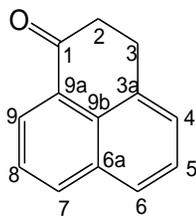


Figura 3a. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del 2,3-dihidro-fenalen-1-ona

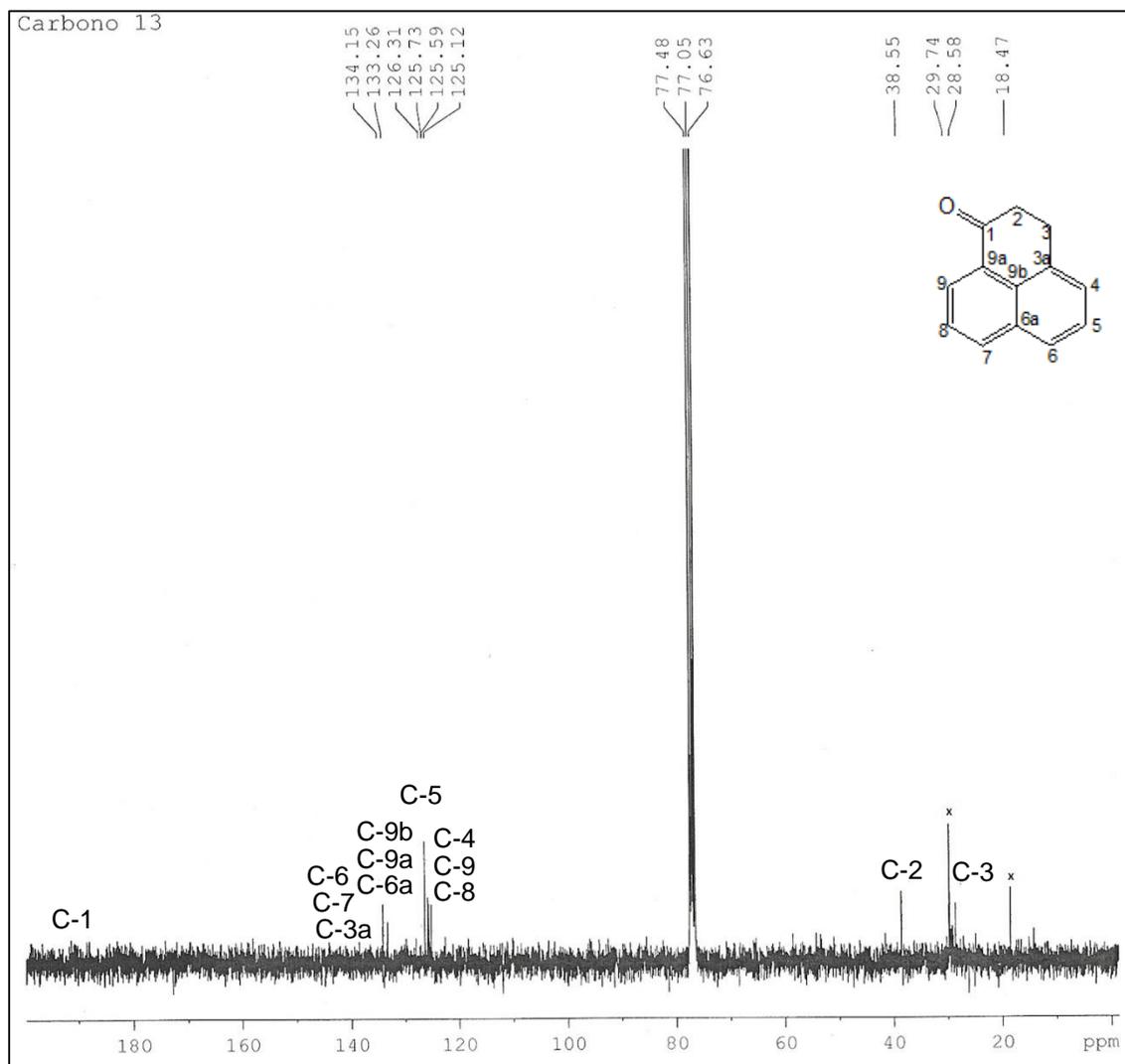
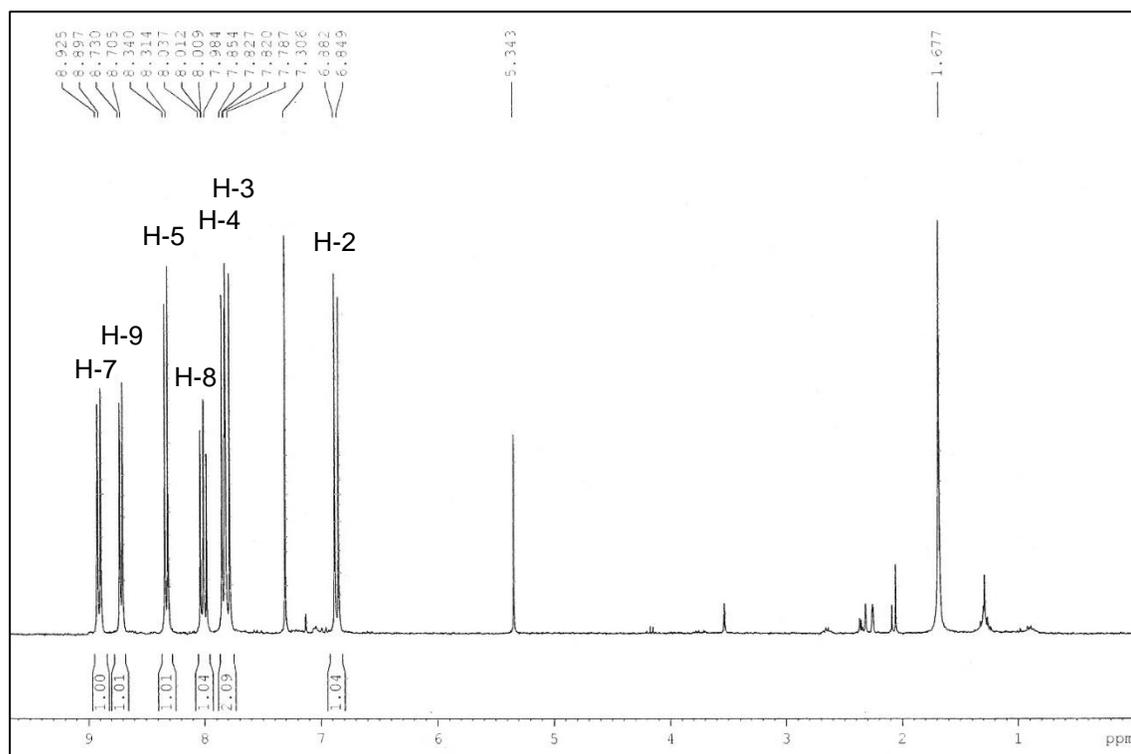
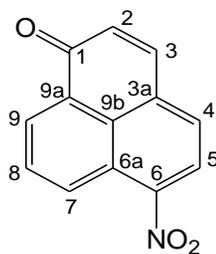


Figura 3b. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del 2,3-dihidro-fenalen-1-ona

**Compuesto (4):** 6-Nitro-1*H*-fenalen-1-ona**Figura 4a.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del 6-Nitro-1*H*-fenalen-1-ona

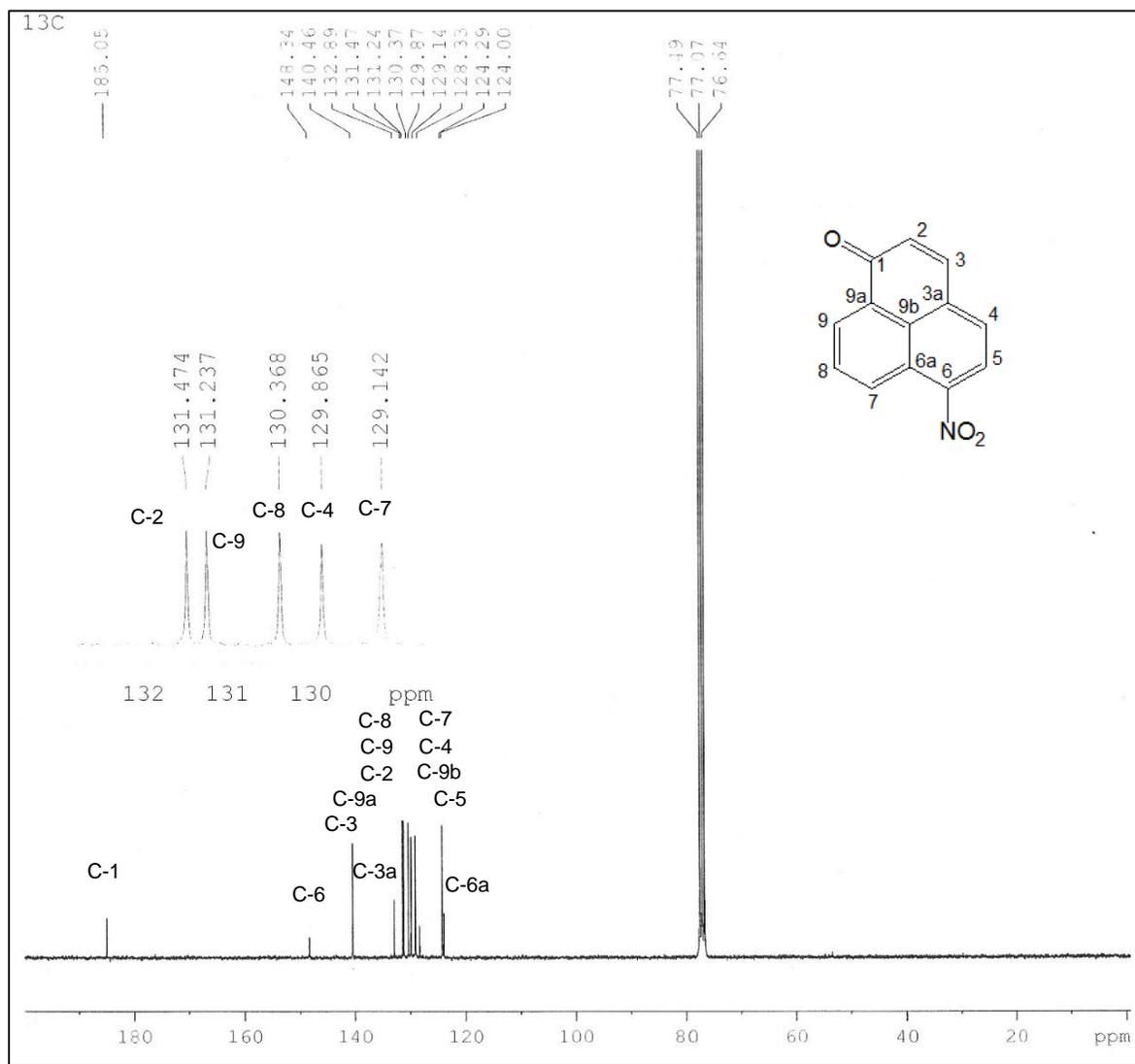
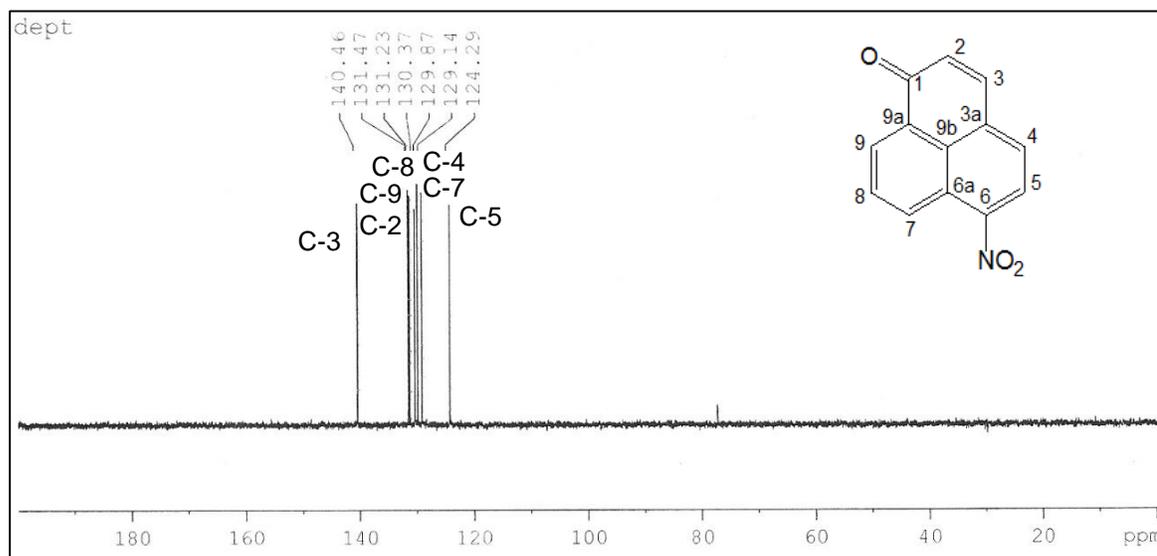
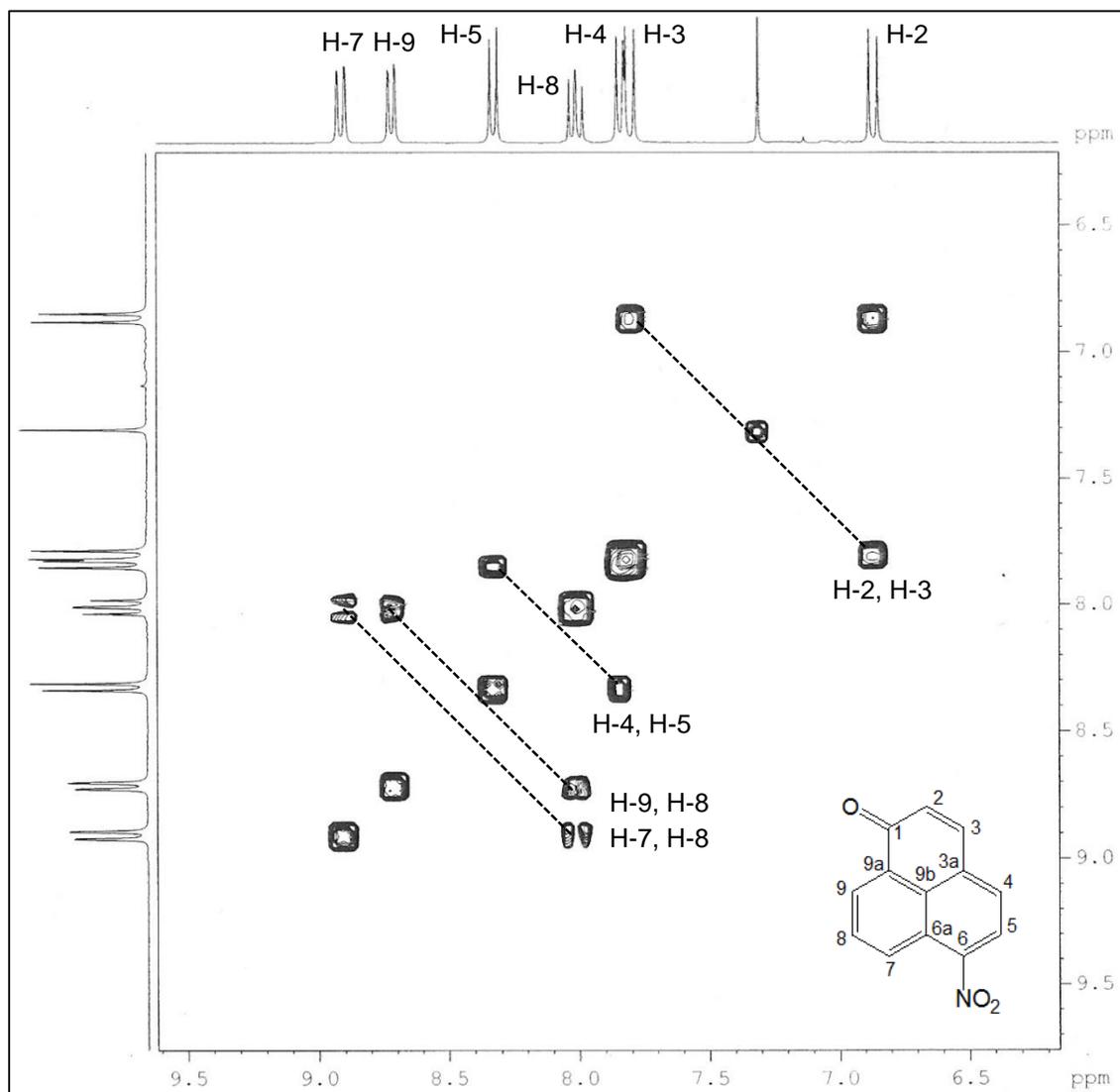


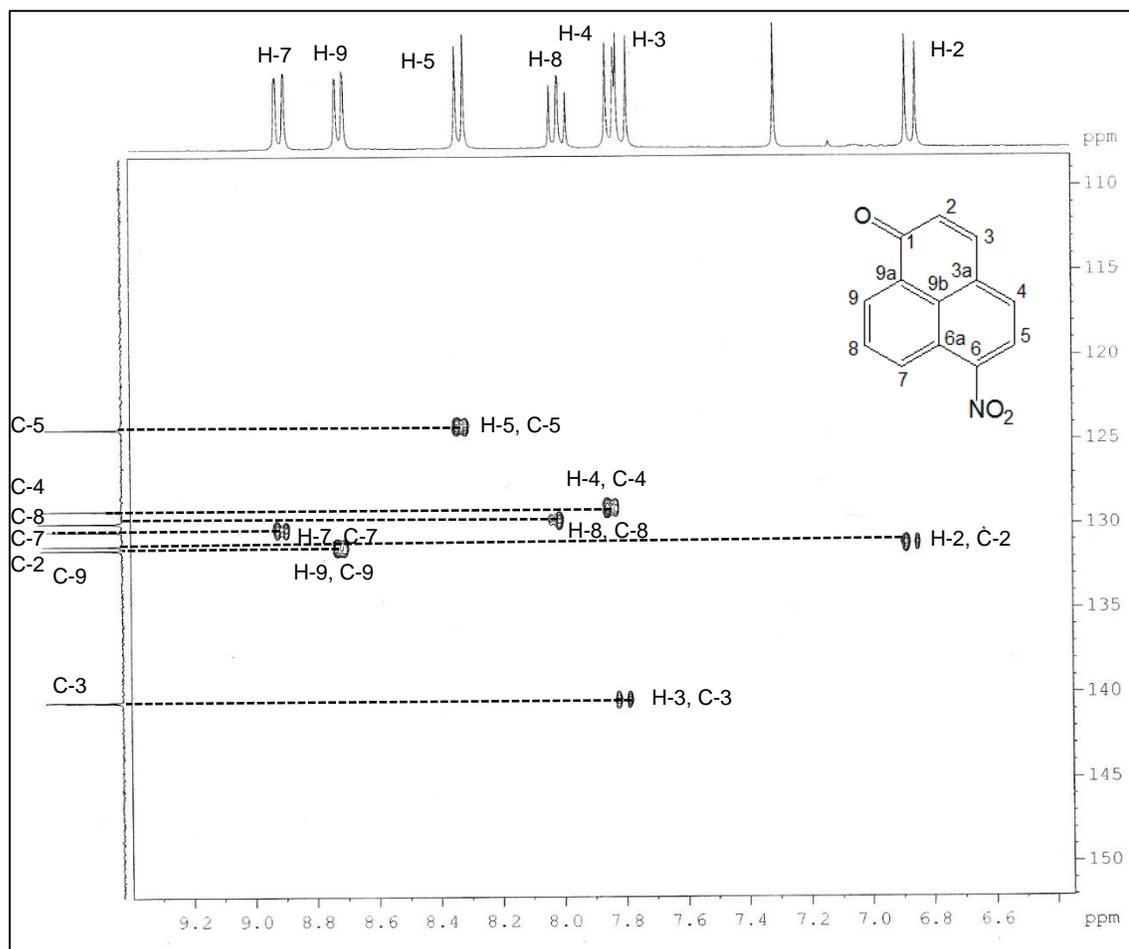
Figura 4b. Espectro de <sup>13</sup>C RMN del 6-Nitro-1*H*-fenalen-1-ona



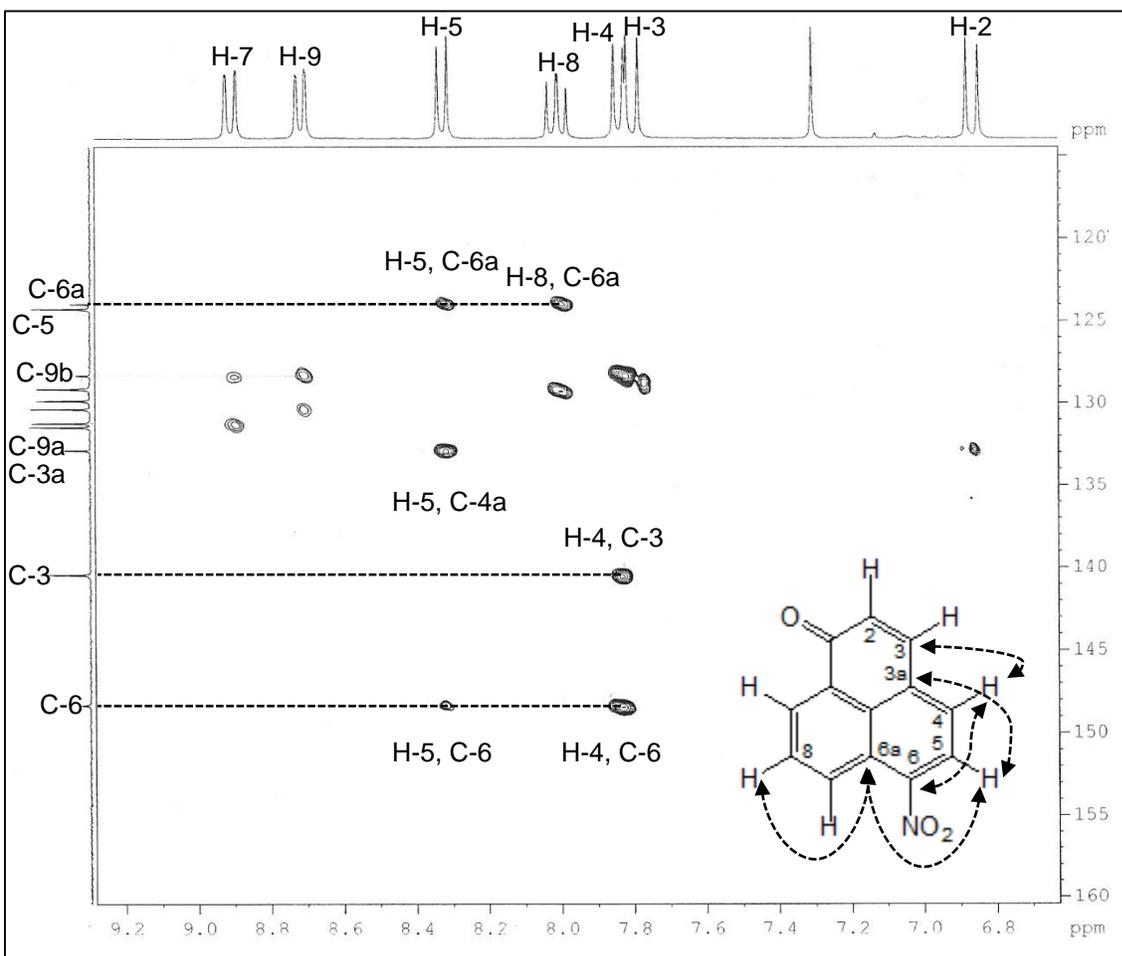
Espectro 4c. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) RMN del 6-Nitro-1H-fenalen-1-ona



Espectro **4d**. Espectro de Correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del 6-Nitro-1H-fenalen-1-ona



Espectro 4e. Espectro de Correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC del 6-Nitro-1H-fenalen-1-ona



Espectro **4f**. Espectro de Correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC del 6-Nitro-1H-fenalen-1-ona

**Compuesto (5): 2-Nitro-1*H*-fenalen-1-ona**

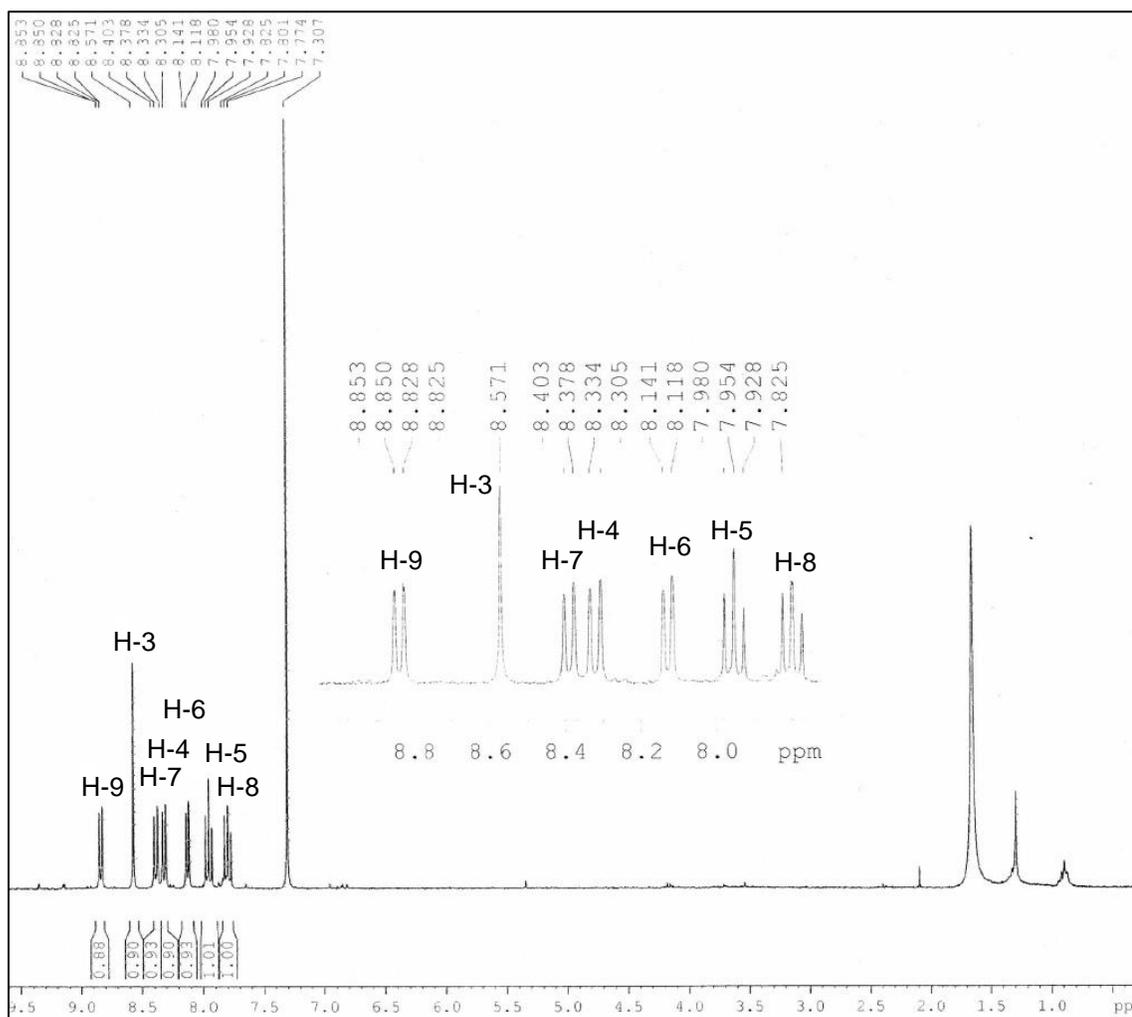
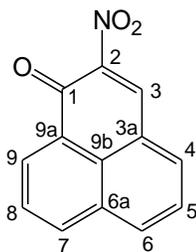


Figura 5a. Espectro de <sup>1</sup>H RMN del 2-Nitro-1*H*-fenalen-1-ona

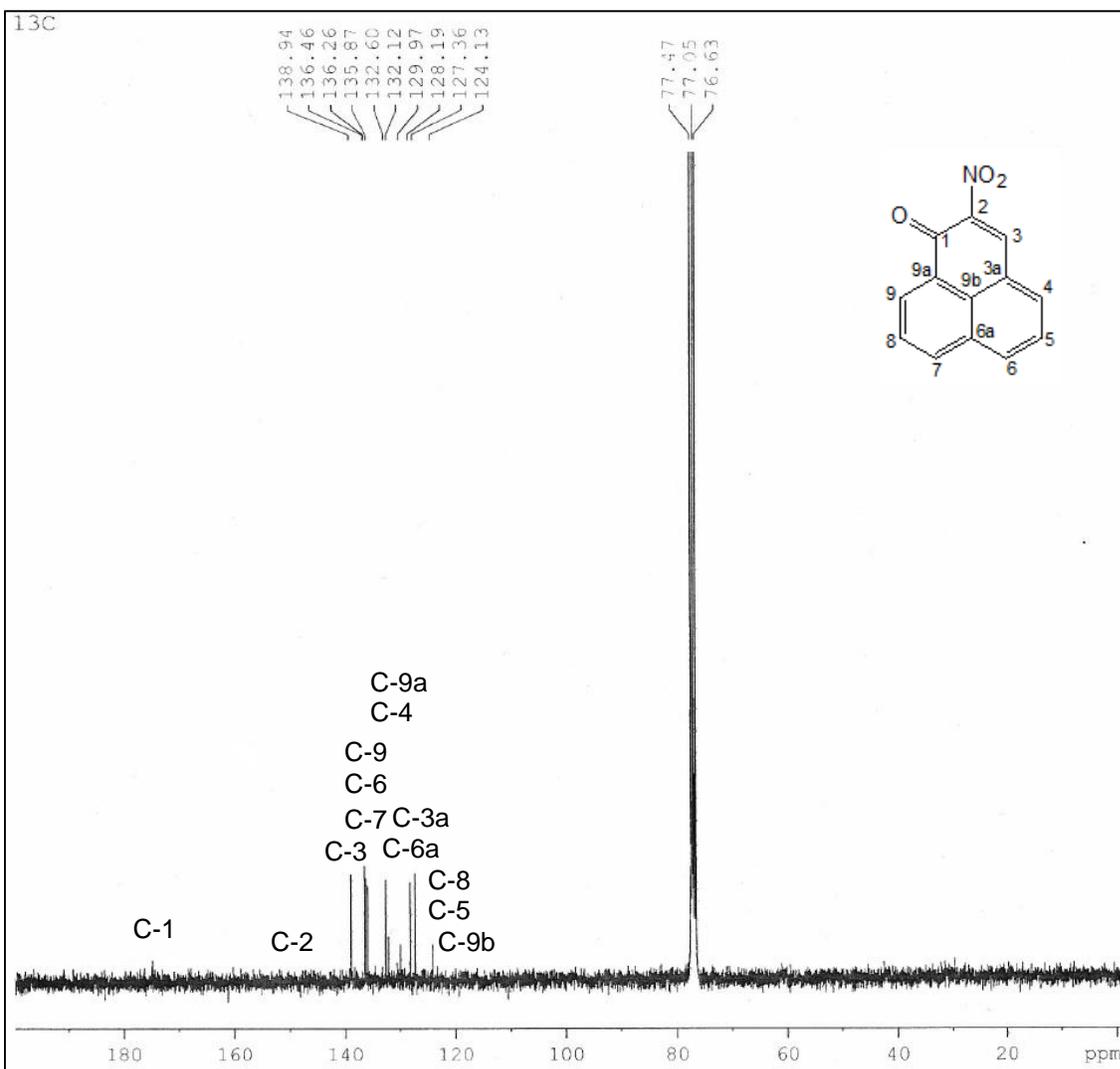


Figura 5b. Espectro de <sup>13</sup>C RMN del 2-Nitro-1H-fenalen-1-ona

Compuesto (6): 2-Bromo-1*H*-fenalen-1-ona

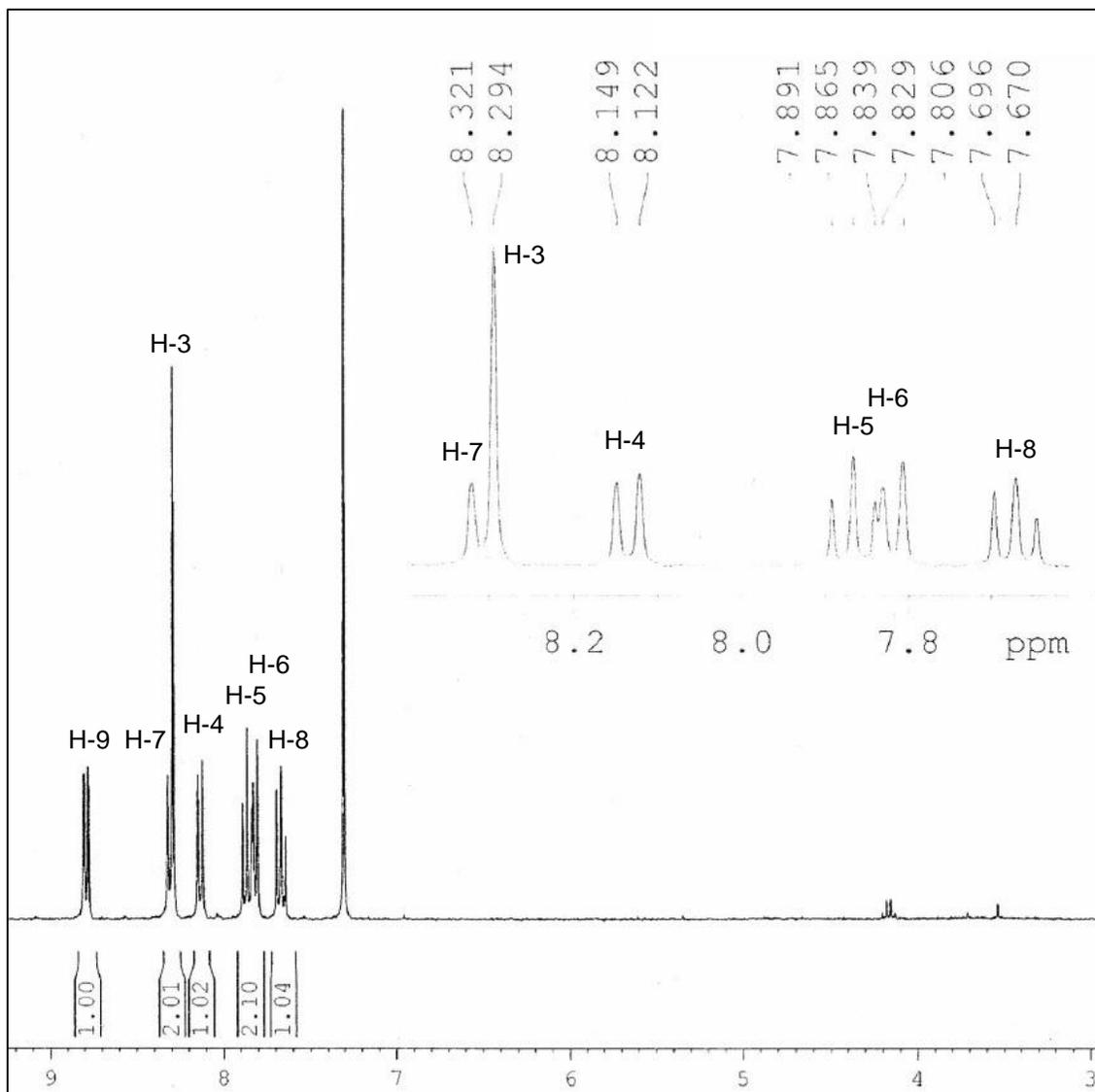
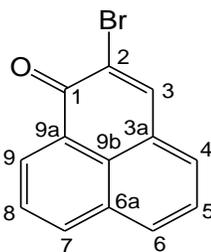


Figura 6a. Espectro de <sup>1</sup>H RMN del 2-Bromo-1*H*-fenalen-1-ona

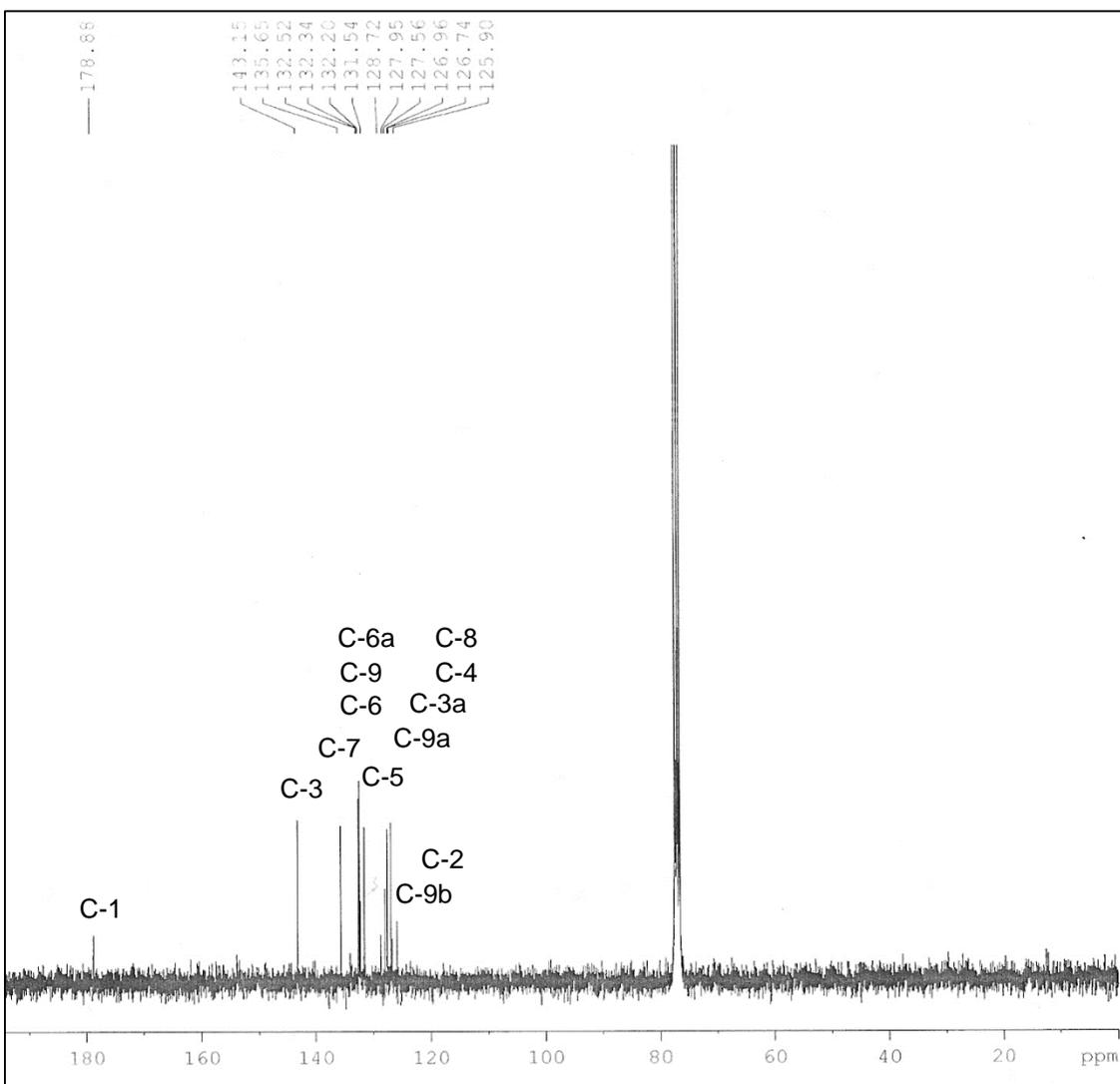
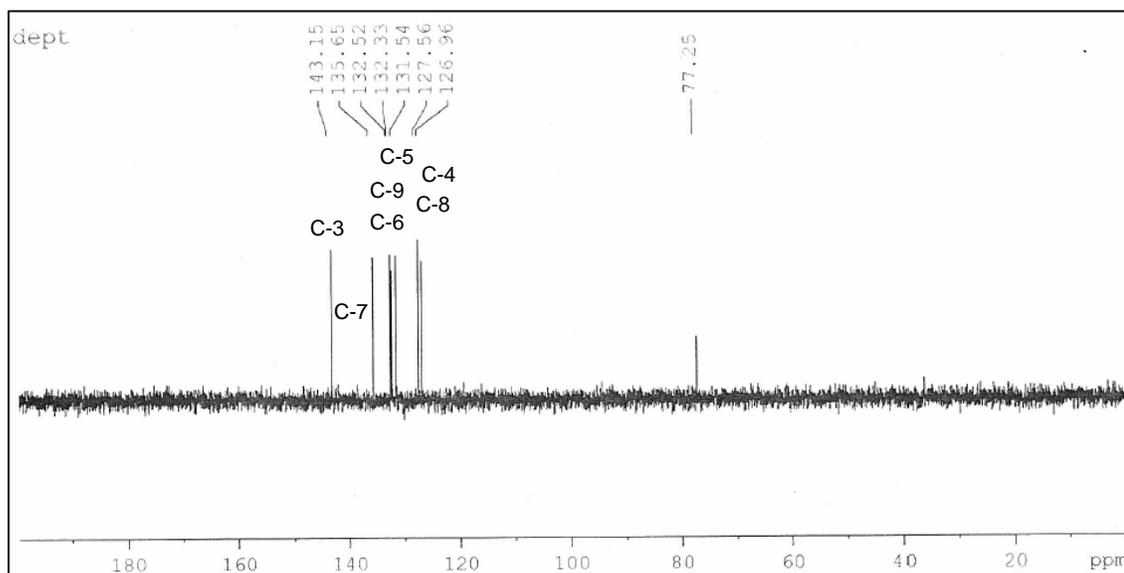
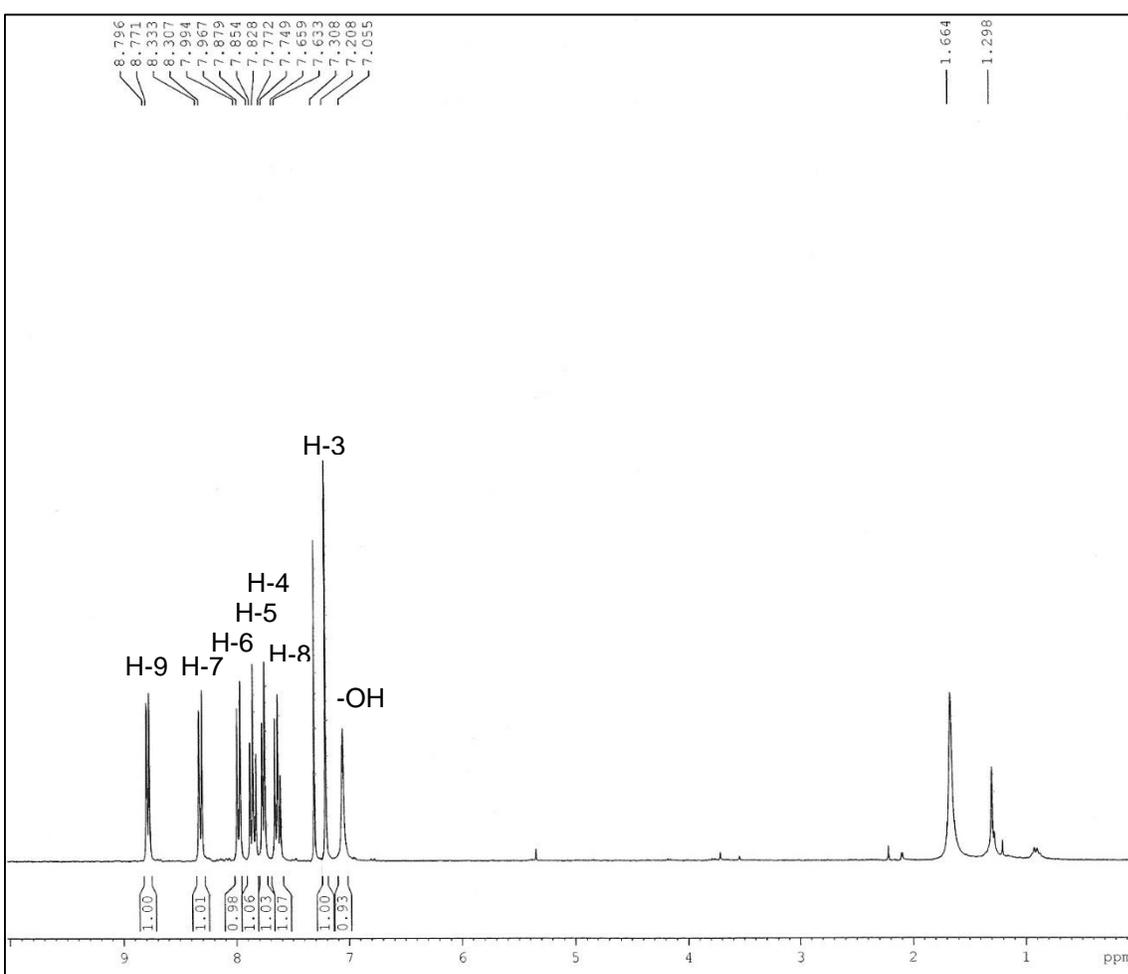
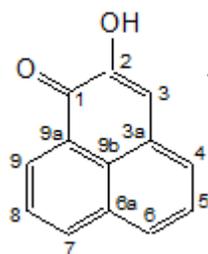


Figura 6b. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del 2-Bromo-1*H*-fenalen-1-ona



Espectro 6c. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) RMN del 2-Bromo-1*H*-fenaalen-1-ona

**Compuesto (7):** 2-Hidroxi-1*H*-fenalen-1-onaFigura 7a. Espectro de <sup>1</sup>H RMN del 2-Hidroxi-1*H*-fenalen-1-ona

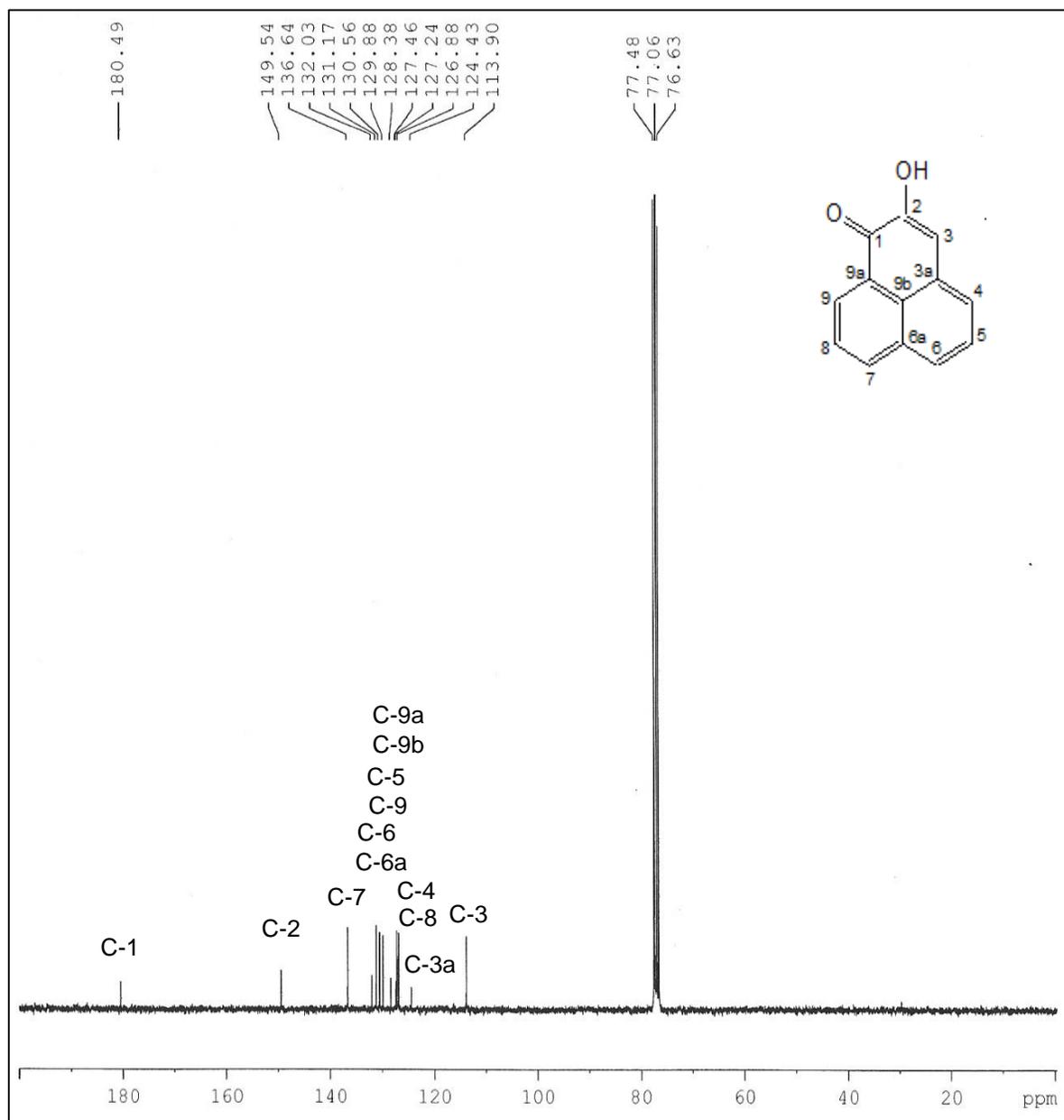
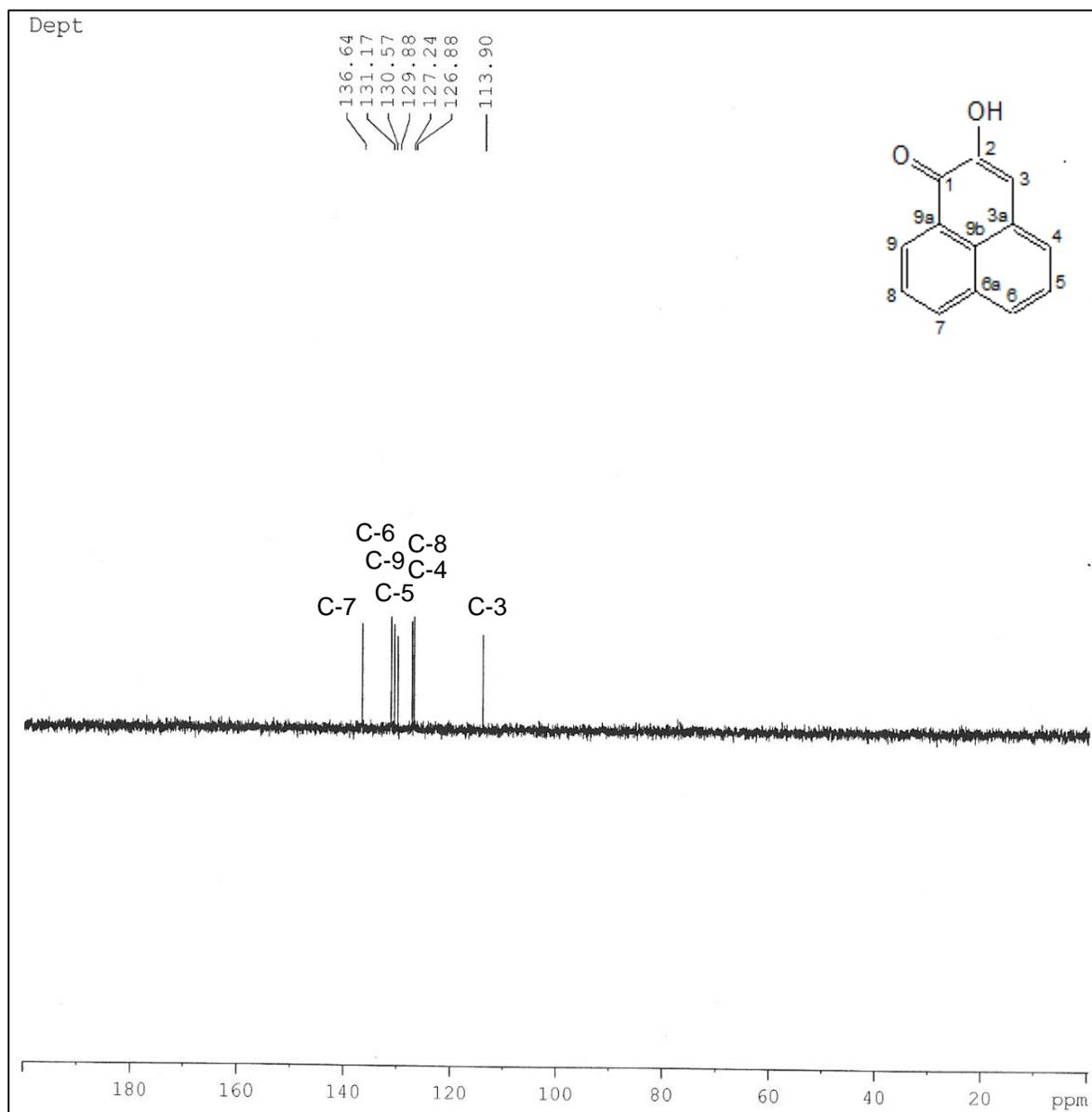
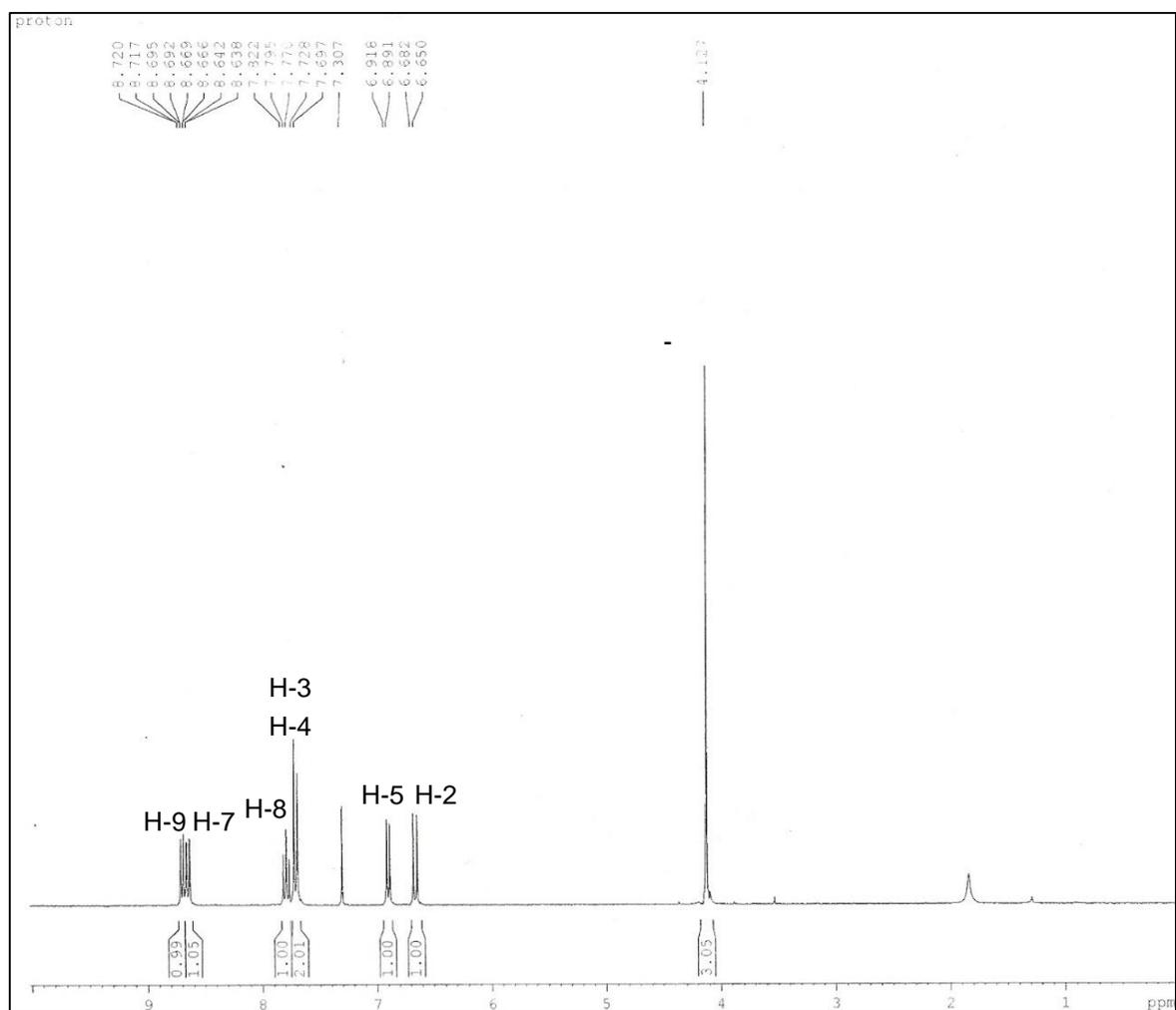
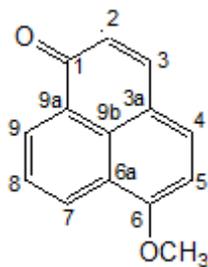


Figura 7b. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del 2-Hidroxi-1*H*-fenalen-1-ona



Espectro **7c**. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) RMN del 2-Hidroxi-1*H*-fenalen-1-ona

**Compuesto (8):** 6-Metoxi-1*H*-fenalenonaFigura 8a. Espectro de <sup>1</sup>H RMN del 6-Metoxi-1*H*-fenalenona

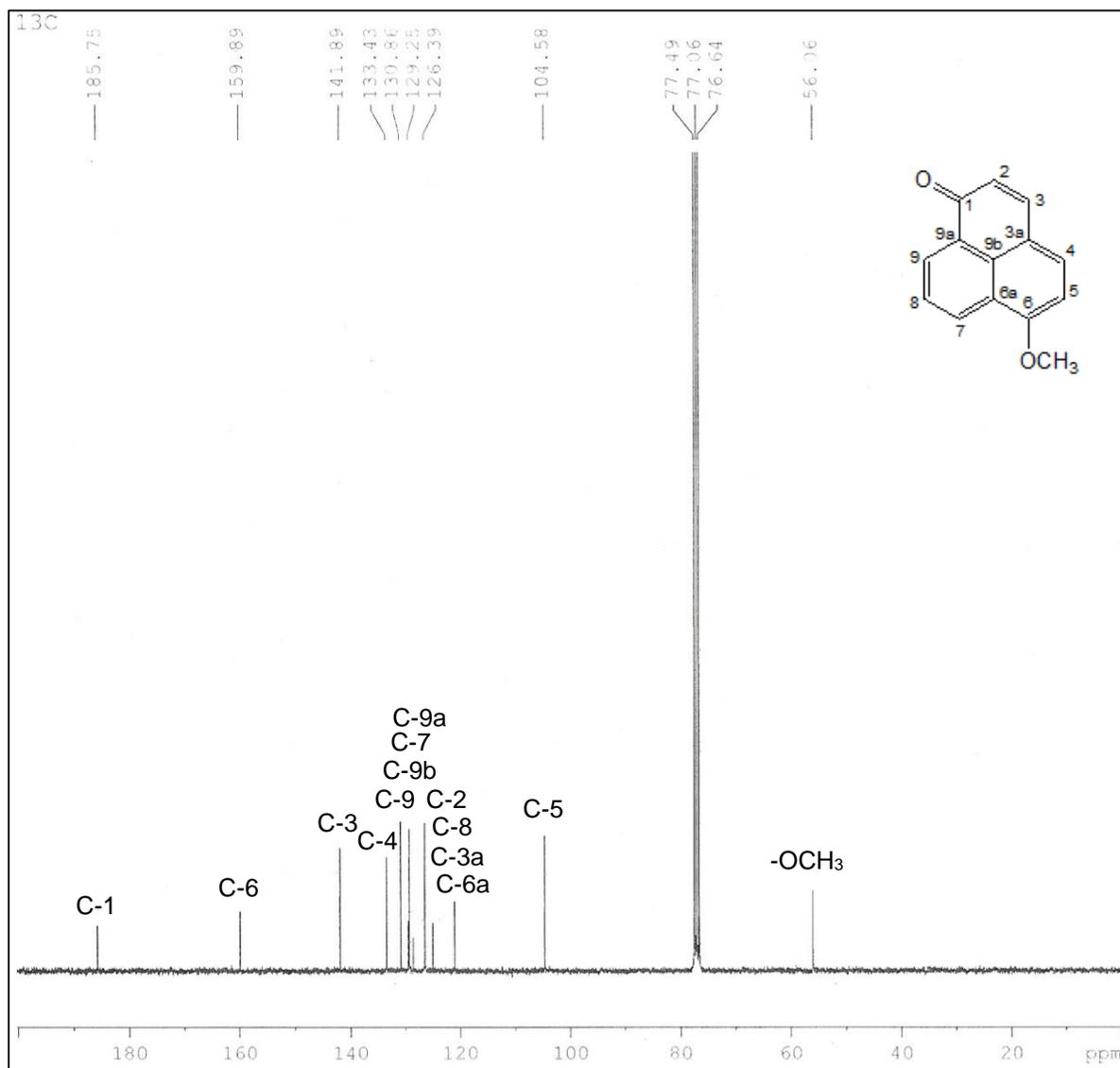


Figura 8b. Espectro de <sup>13</sup>C RMN del 6-Metoxi-1H-fenalen-ona

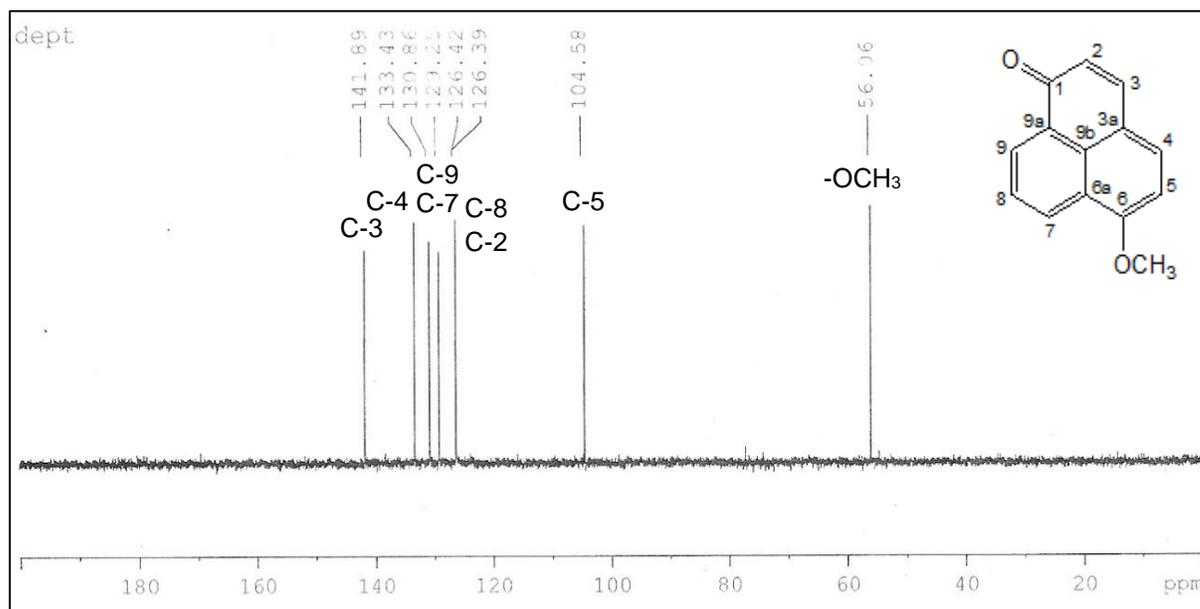


Figura 8c. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) RMN del 6-Metoxi-1*H*-fenalen-ona

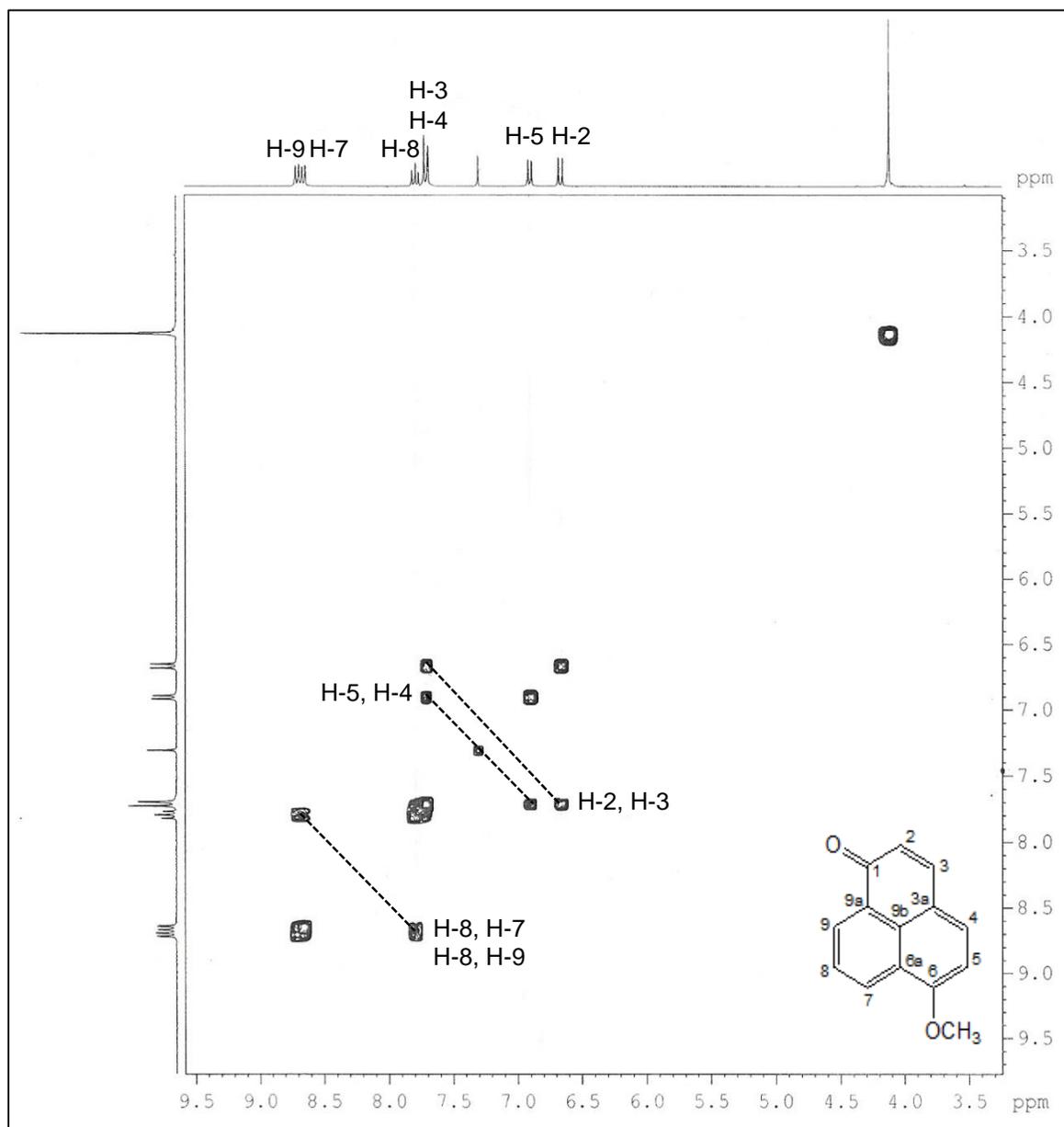
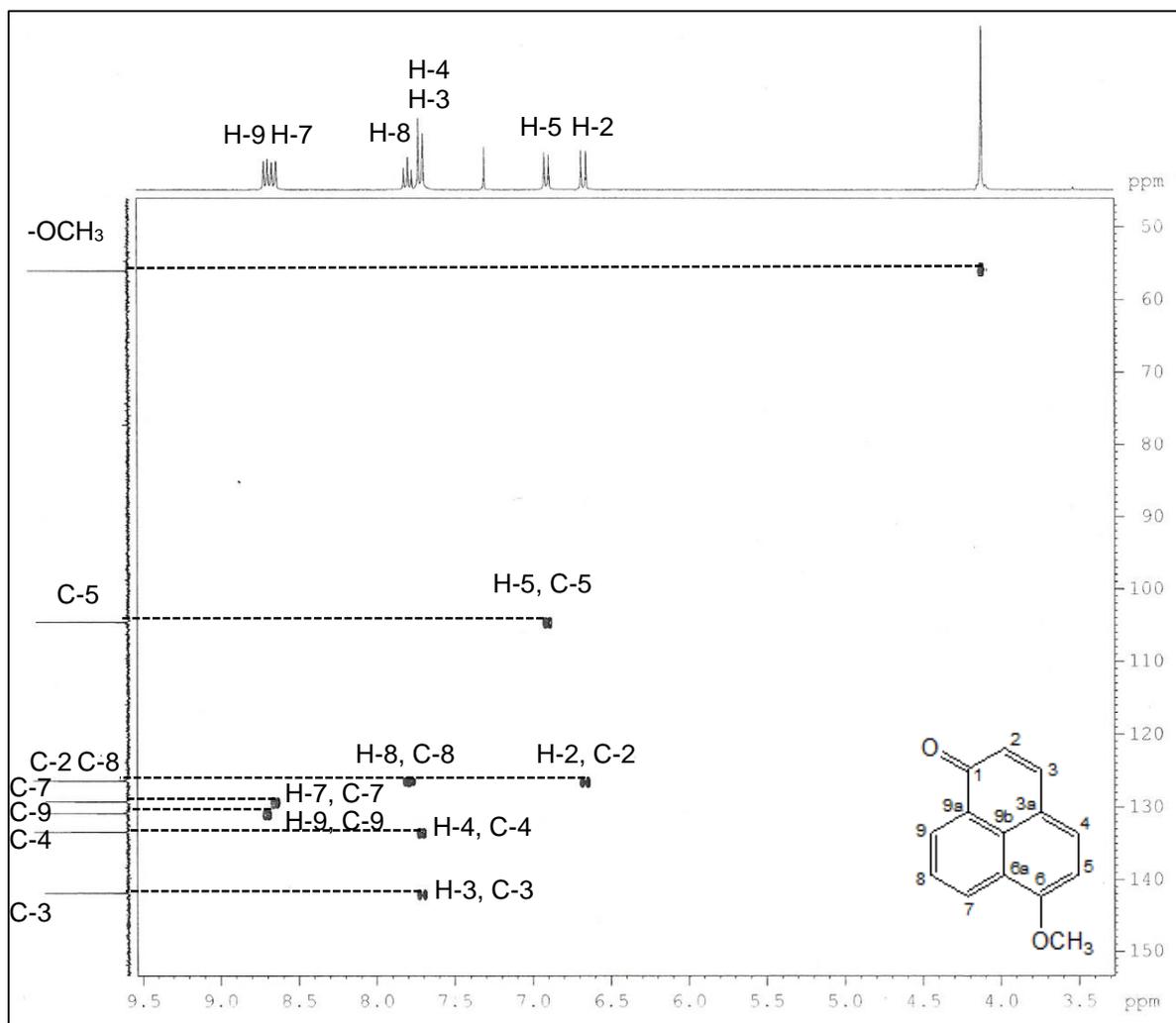
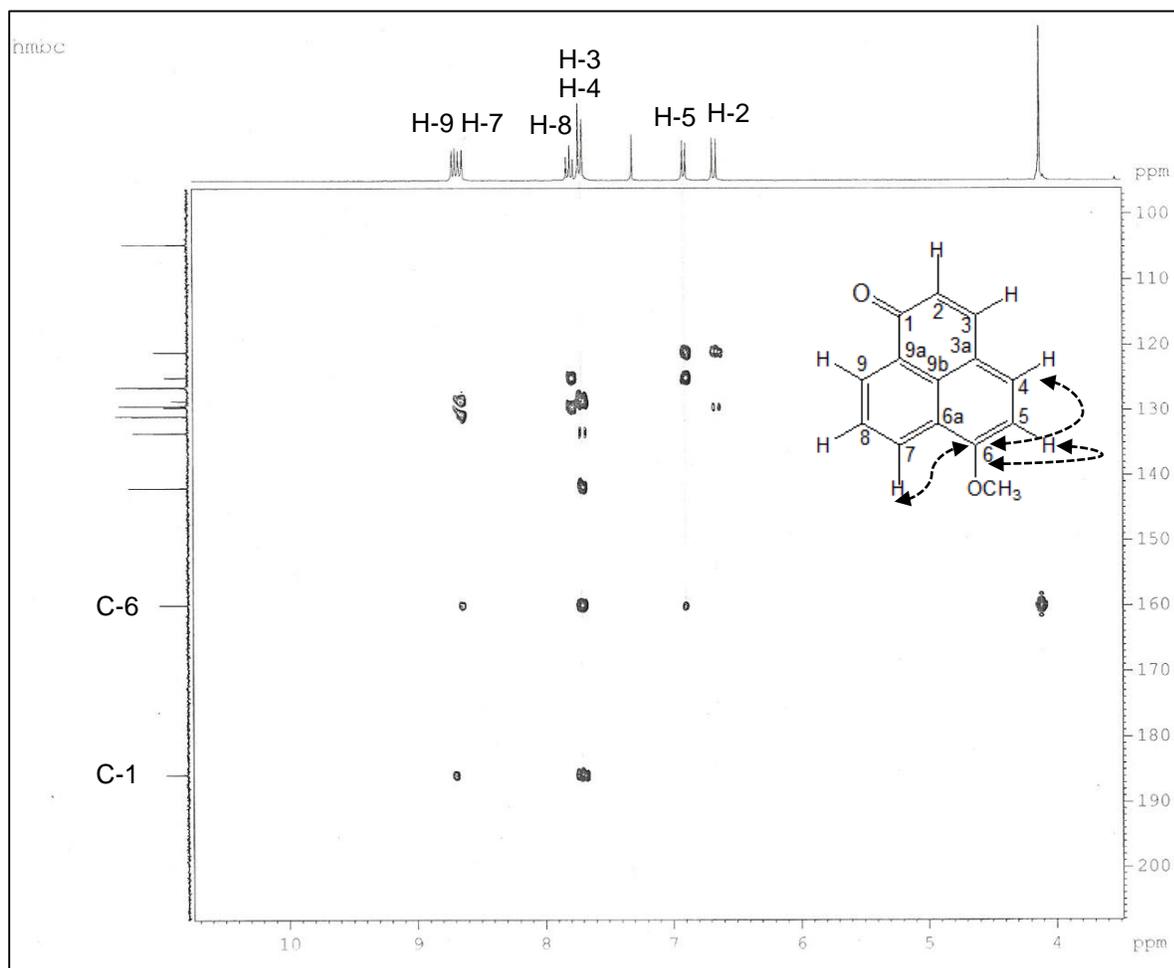


Figura 8d. Espectro de Correlación <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY del 6-Metoxi-1*H*-fenalen-ona



Espectro **8e**. Espectro de Correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC del 6-Metoxi-1*H*-fenalen-ona



Espectro **8f**. Espectro de Correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC del 6-Metoxi-1*H*-fenalen-ona



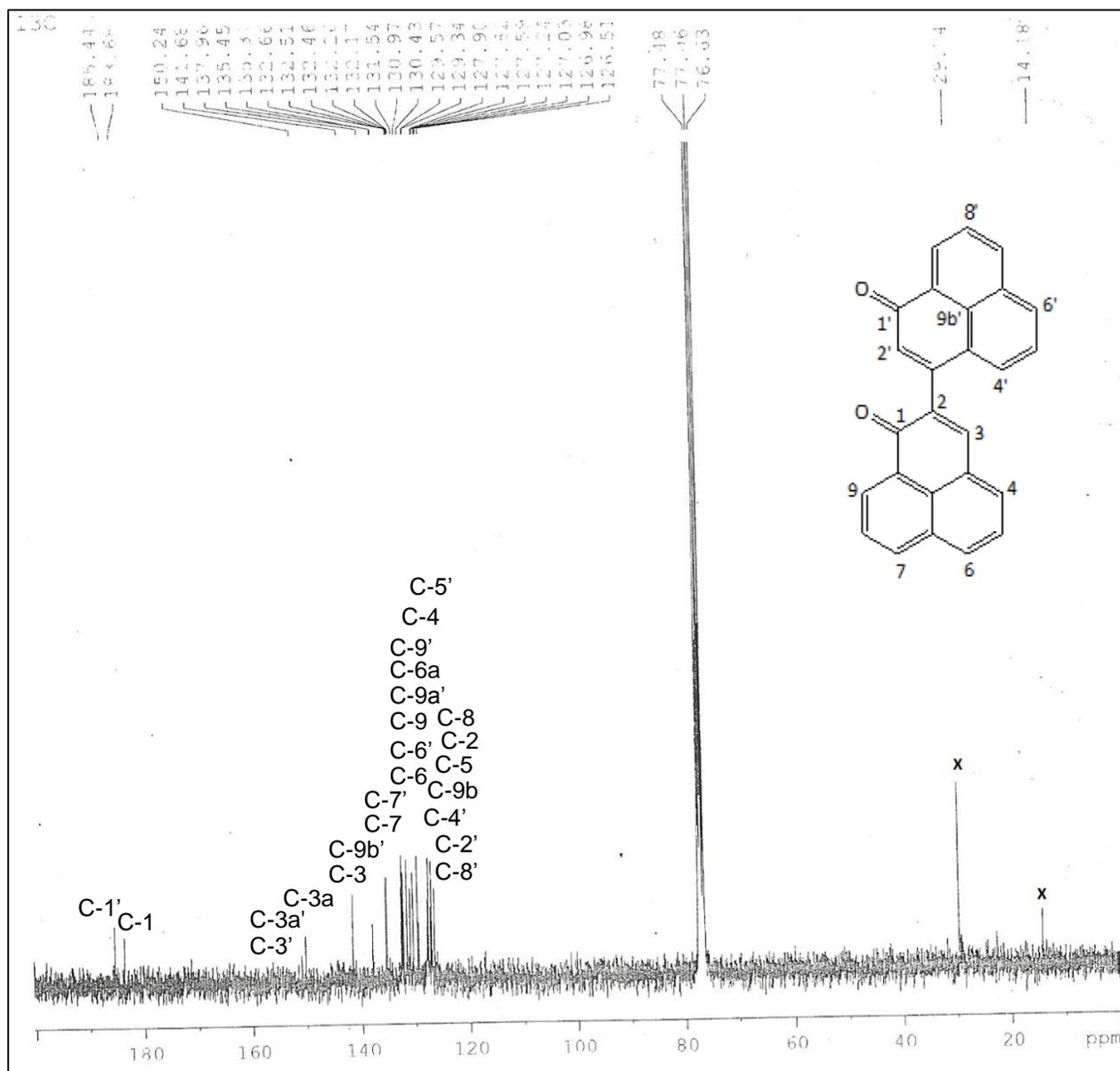


Figura 9b. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del [1, 2']-Bifenalenil-[3, 1']-diona

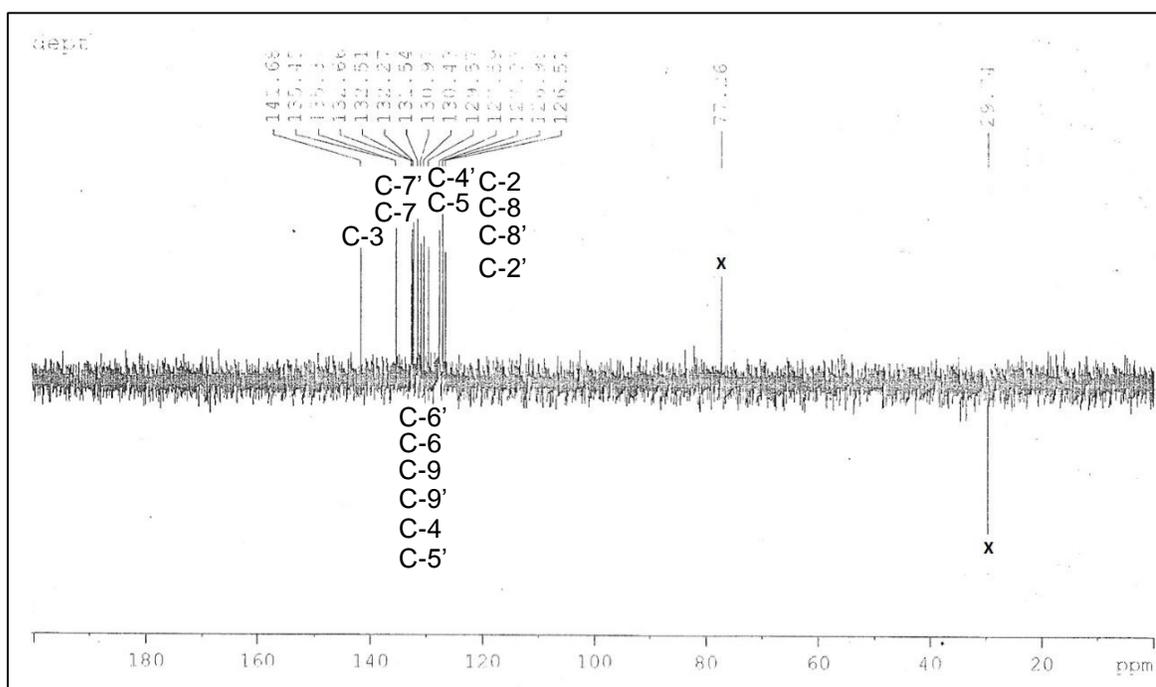
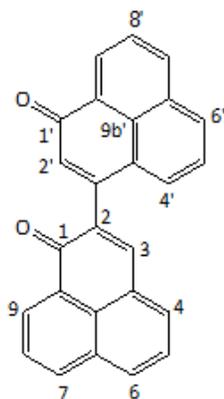


Figura 9c. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) RMN del [1, 2']-Bifenalenil-[3, 1']-diona

# Anexo B: Espectros de resonancia magnética nuclear (Compuestos - Capítulo 3)

Compuesto (2): Dihidrocumarina

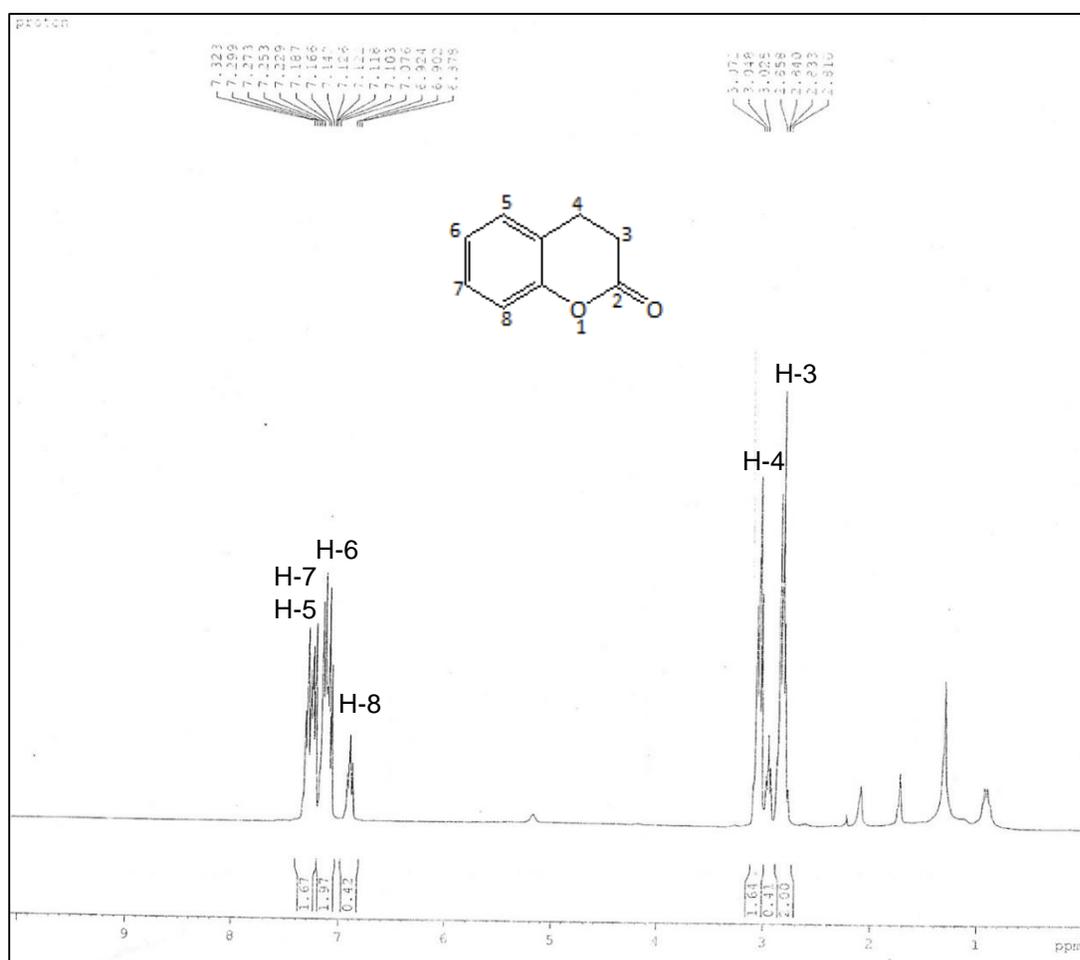
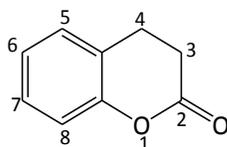


Figura 2a. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la dihidrocumarina

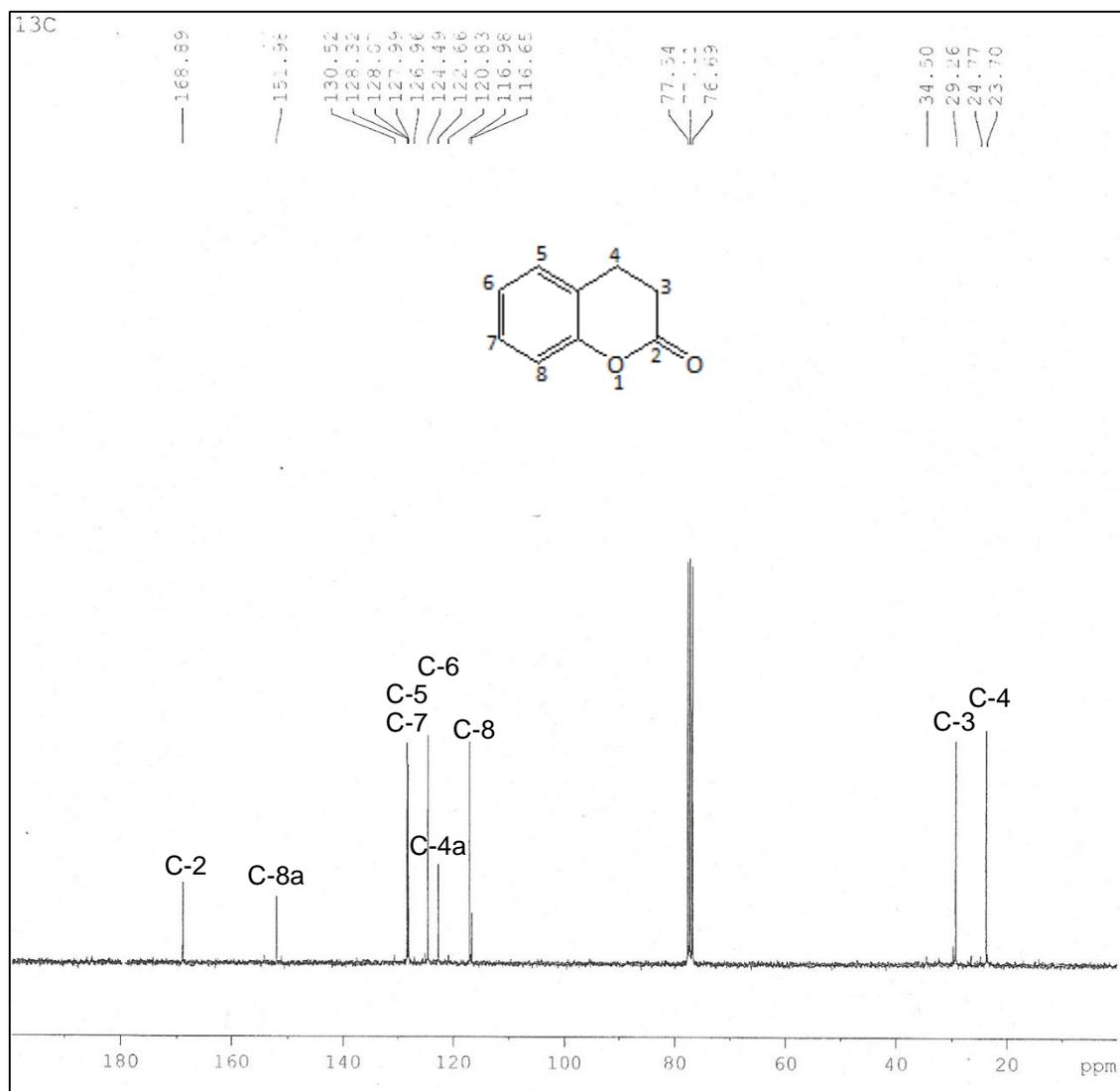


Figura 2b. Espectro de <sup>13</sup>C RMN de la dihidrocoumarina

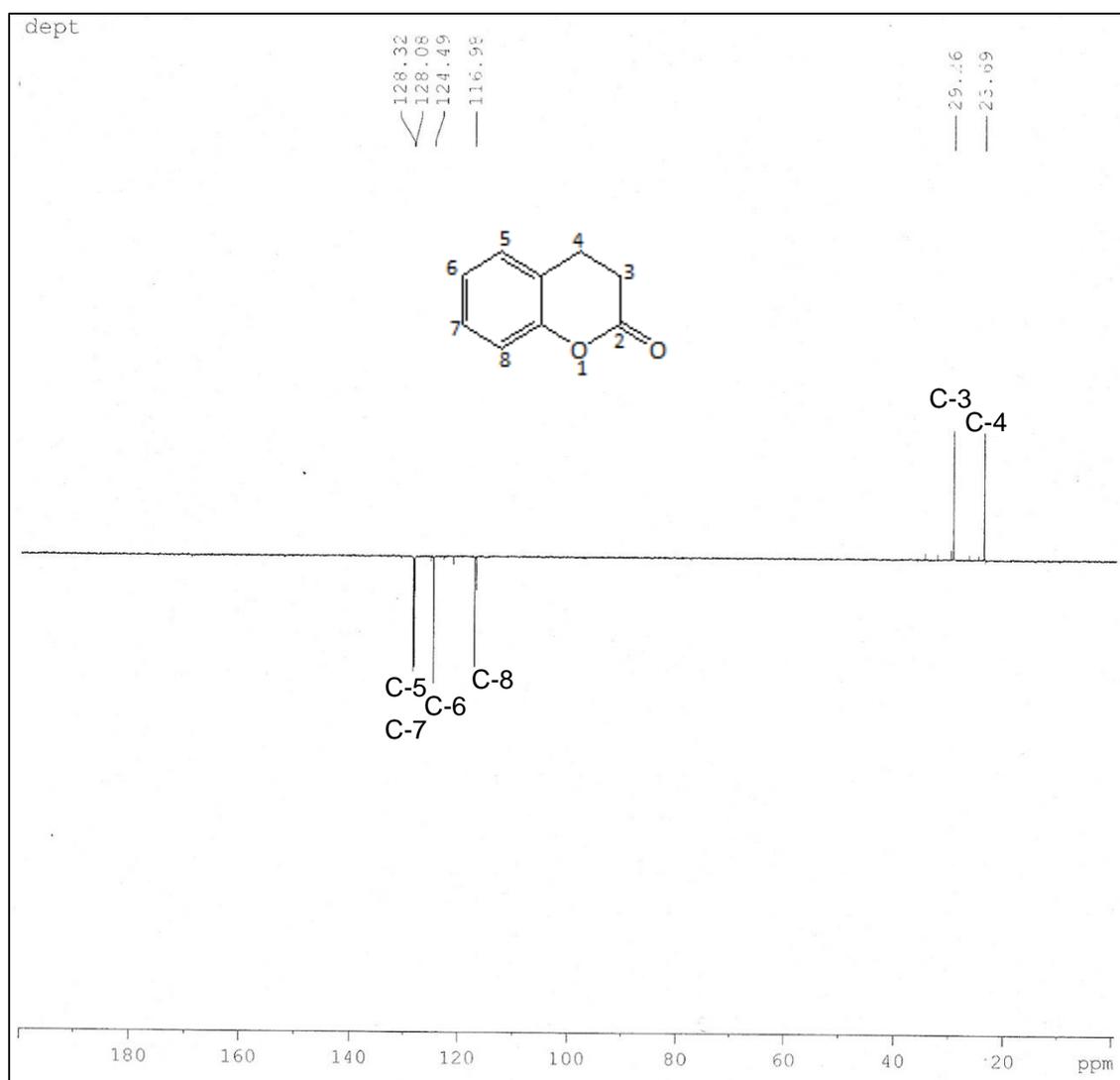
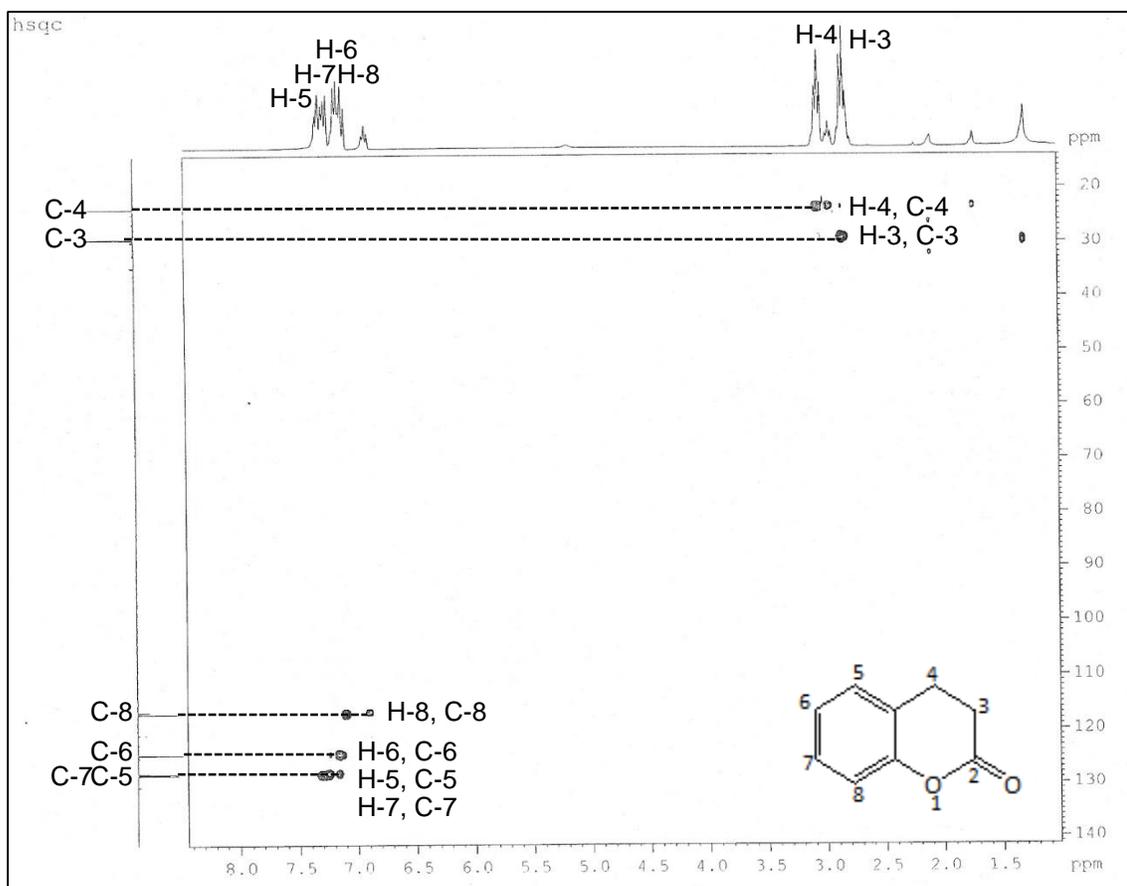


Figura 2c. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) RMN de la dihidrocoumarina



Espectro **2d**. Espectro de Correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de la dihidrocoumarina

**Compuesto (3):** Ácido 3 (2- hidroxifenil) propanoico

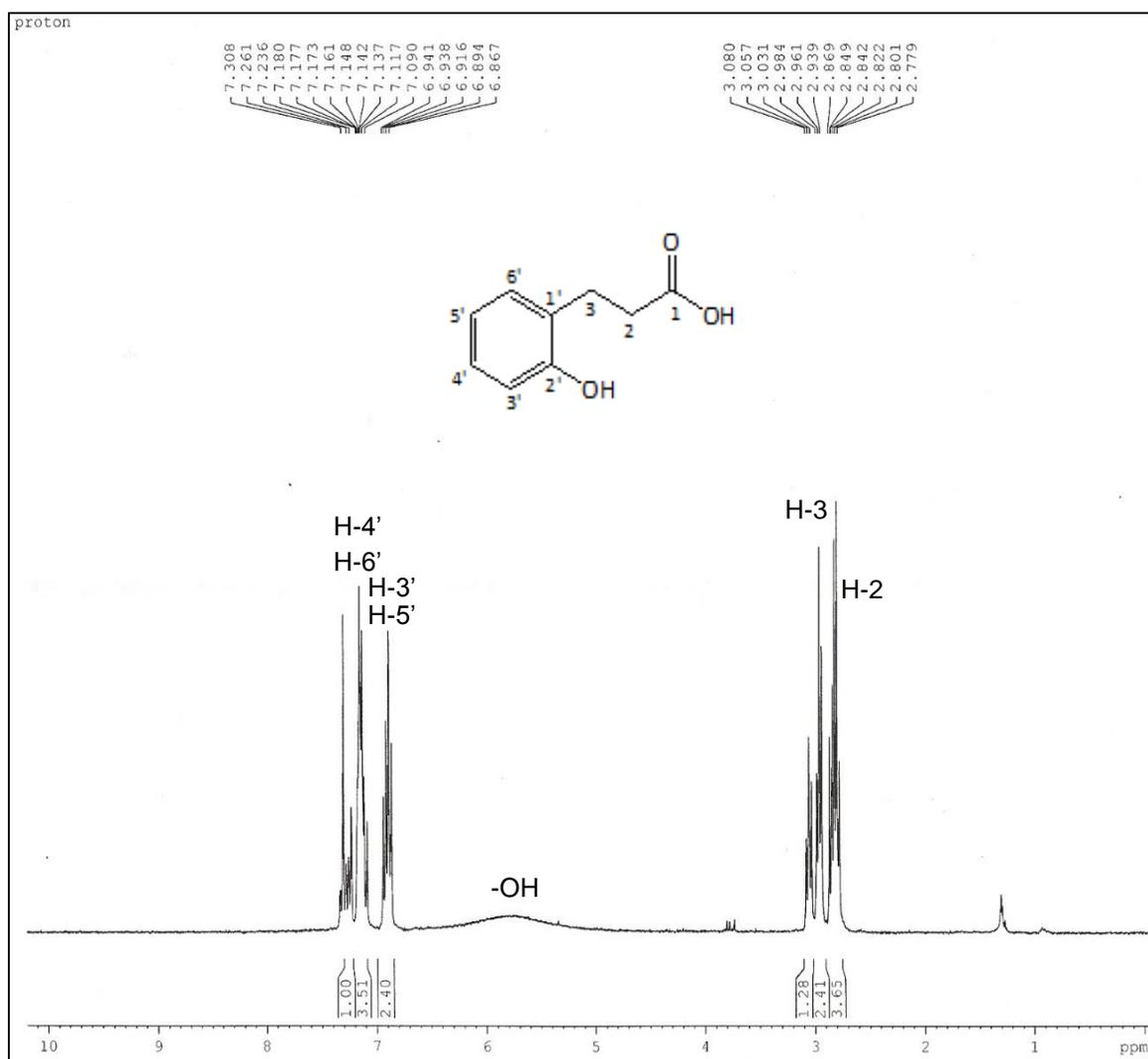
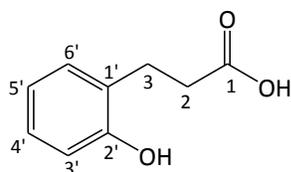


Figura 3a. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del ácido 3 (2- hidroxifenil) propanoico

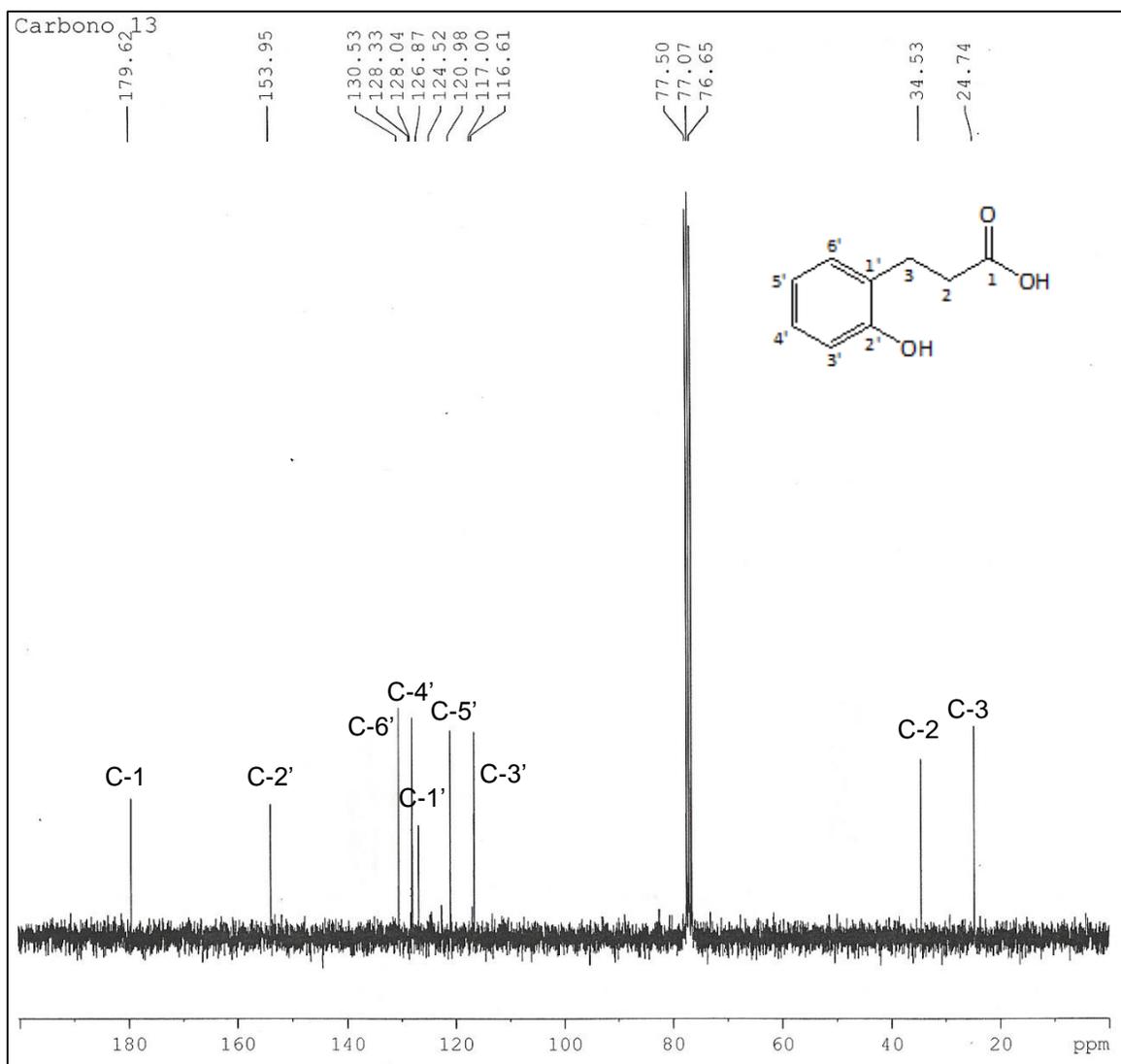


Figura 3b. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del ácido 3 (2- hidroxifenil) propanoico

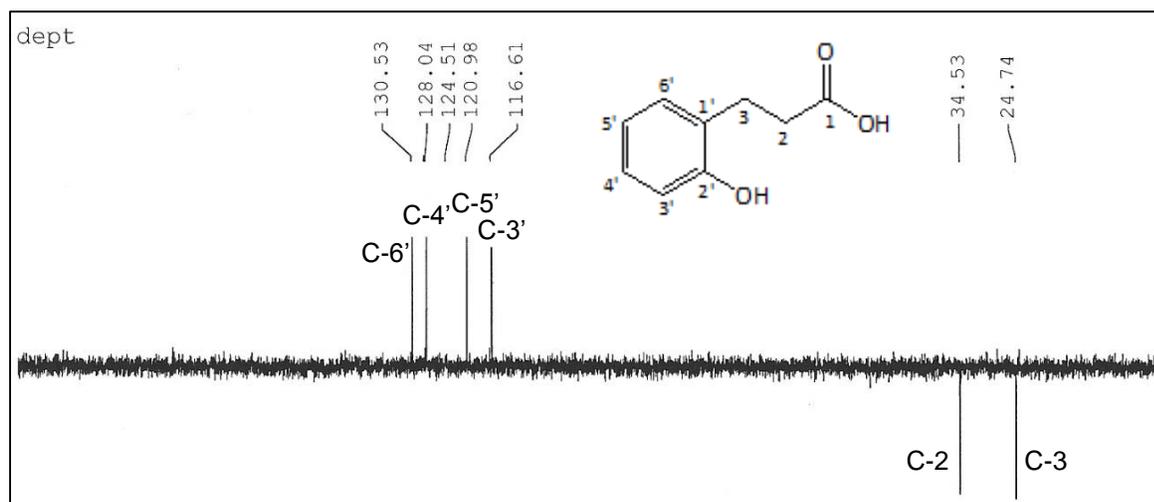
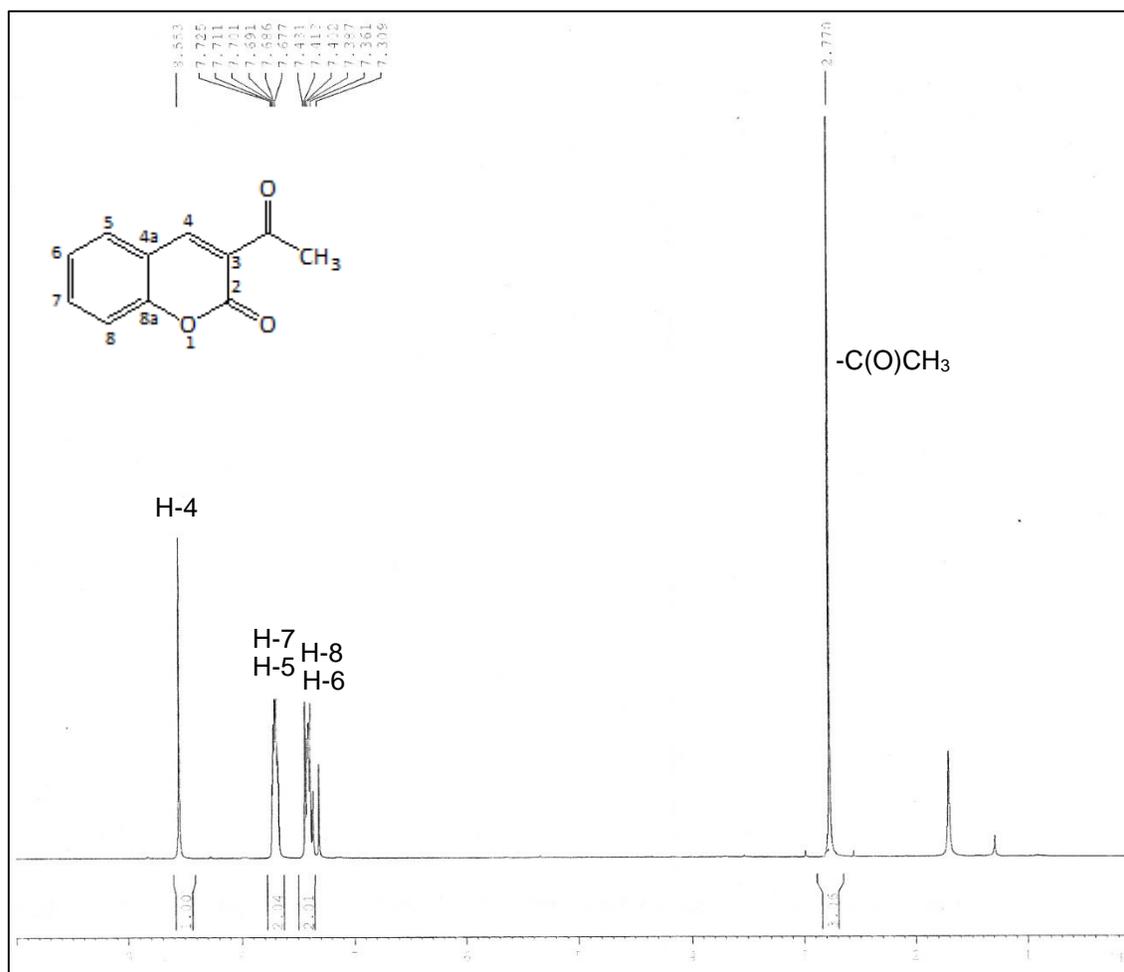
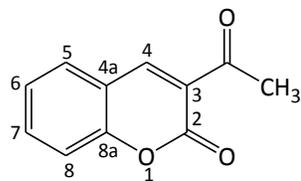


Figura 3c. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) RMN del ácido 3 (2- hidroxifenil) propanoico

**Compuesto (4): 3-acetilcumarina**Figura 4a. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la 3-acetilcumarina

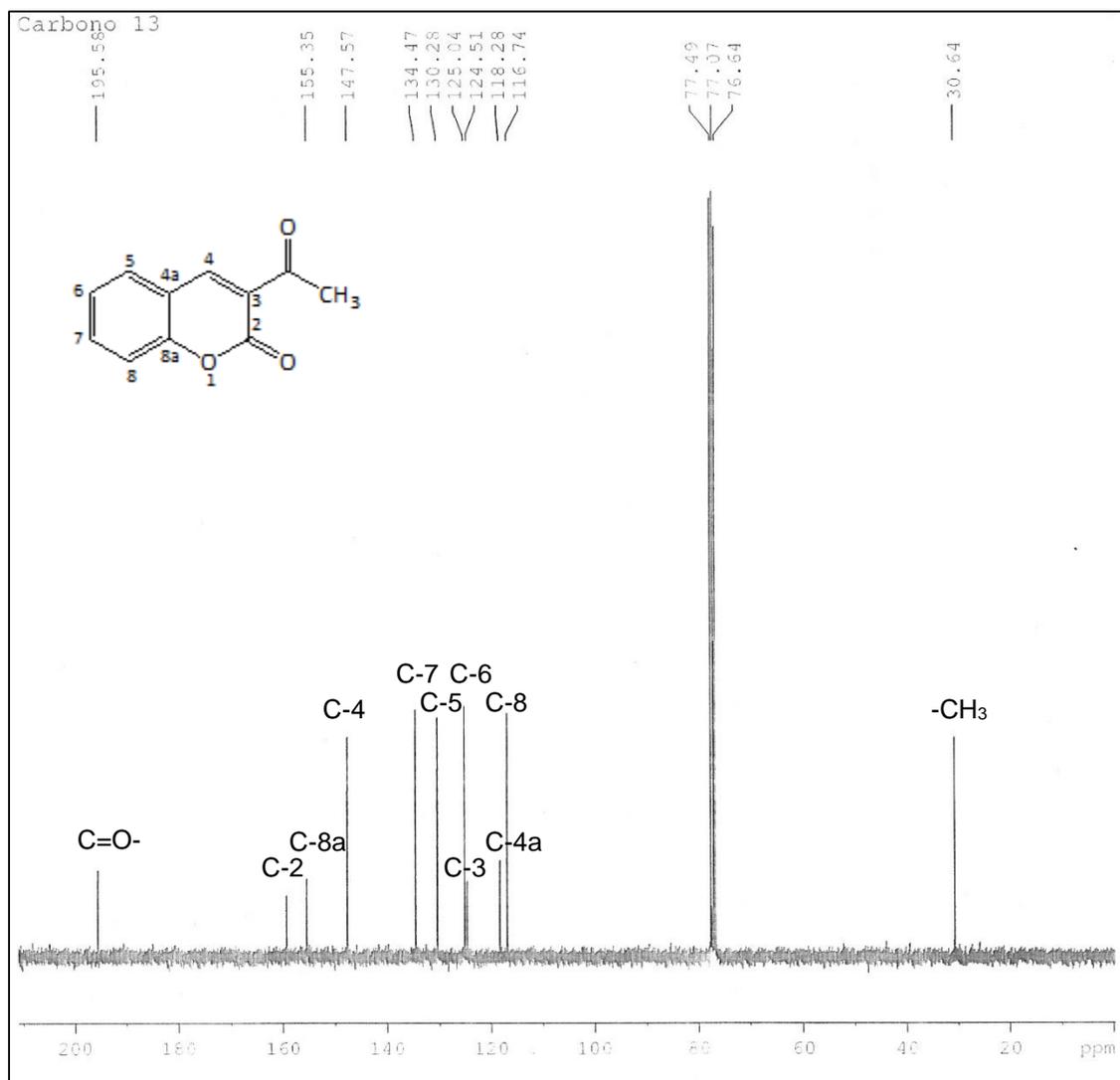
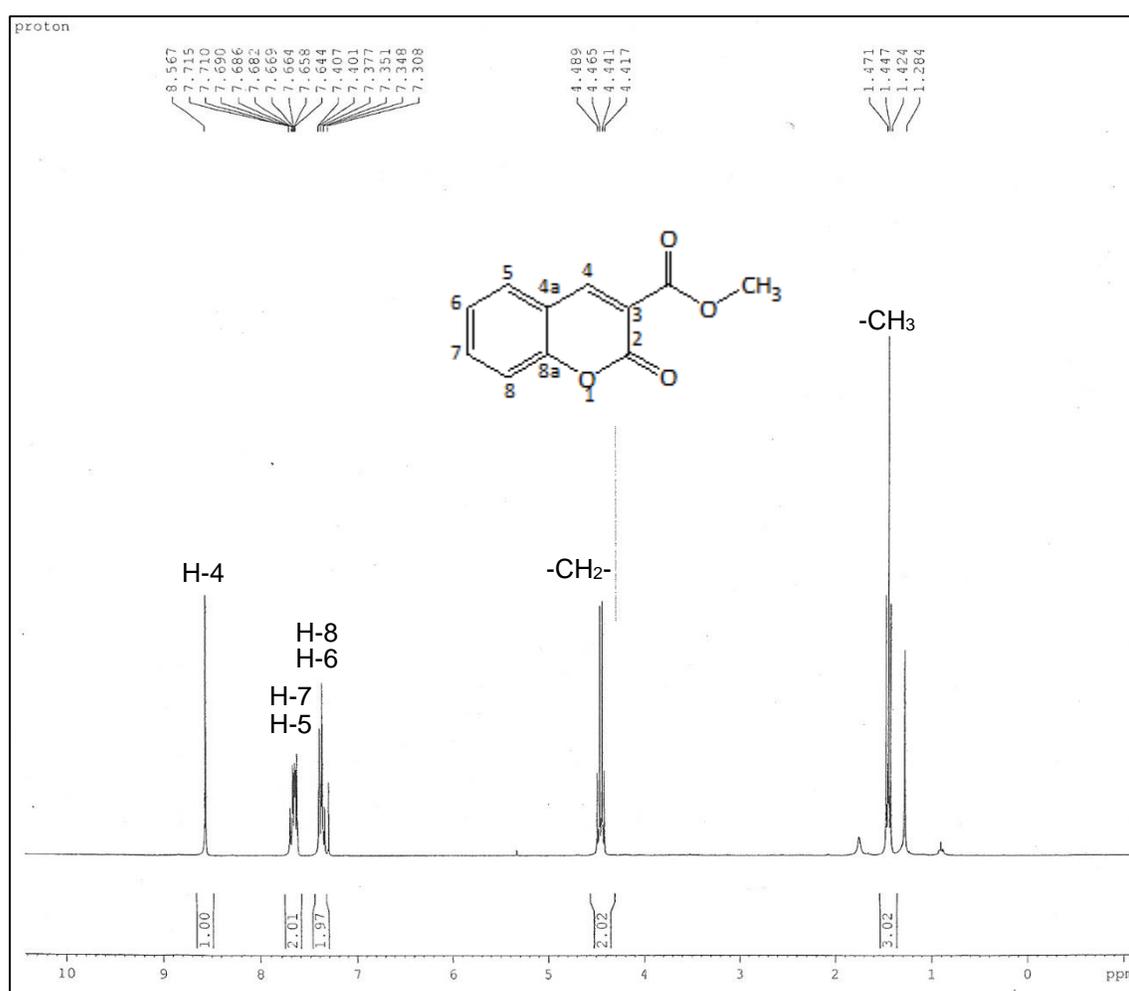
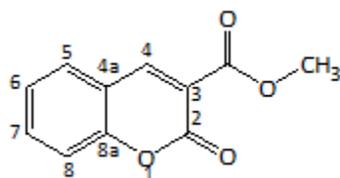


Figura 4b. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la 3-acetilcumarina

**Compuesto (5):** cumarina-3-carboxilato de etiloFigura 5a. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la cumarina-3-carboxilato de etilo

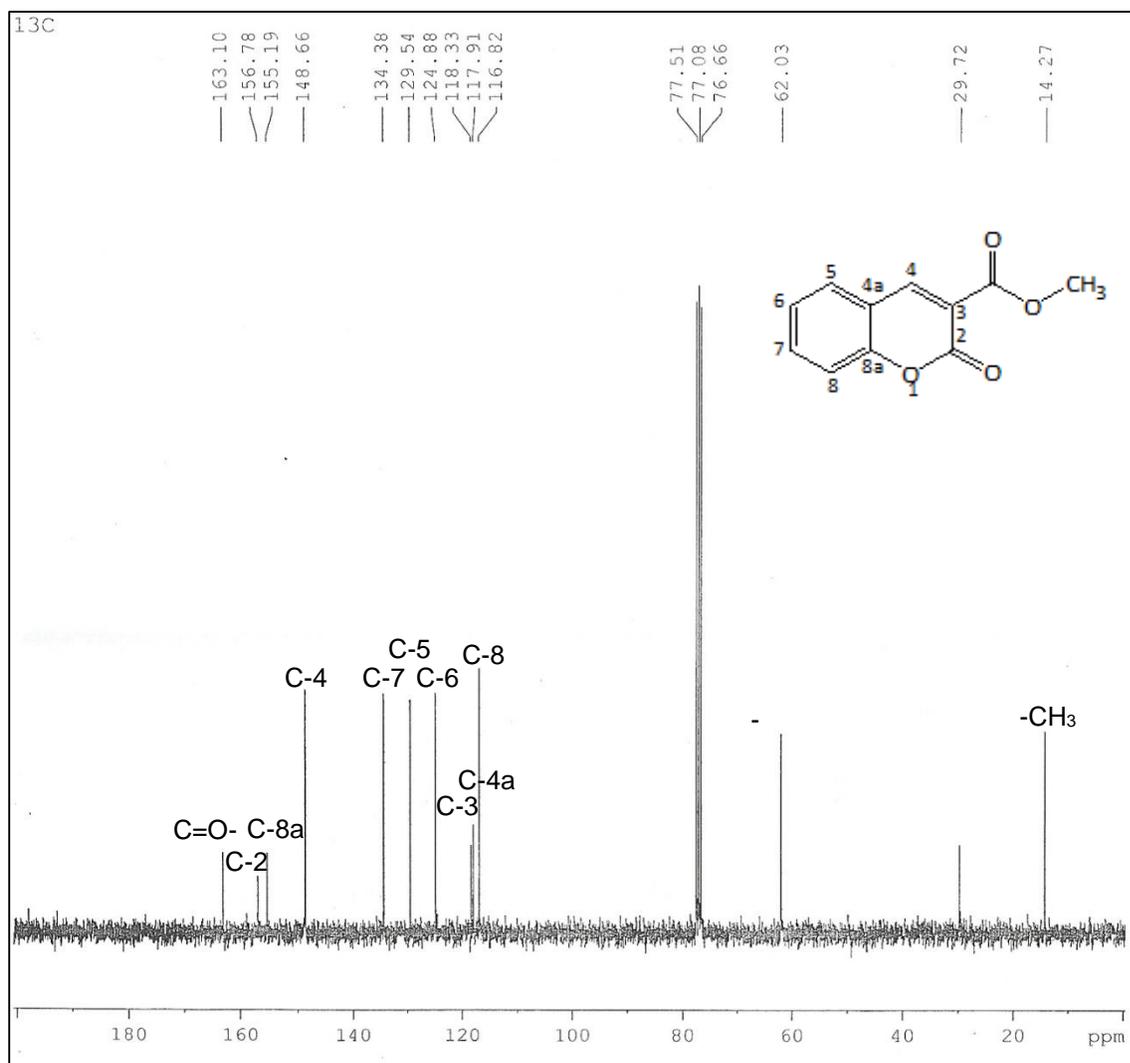


Figura 5b. Espectro de <sup>13</sup>C RMN de la cumarina-3-carboxilato de etilo

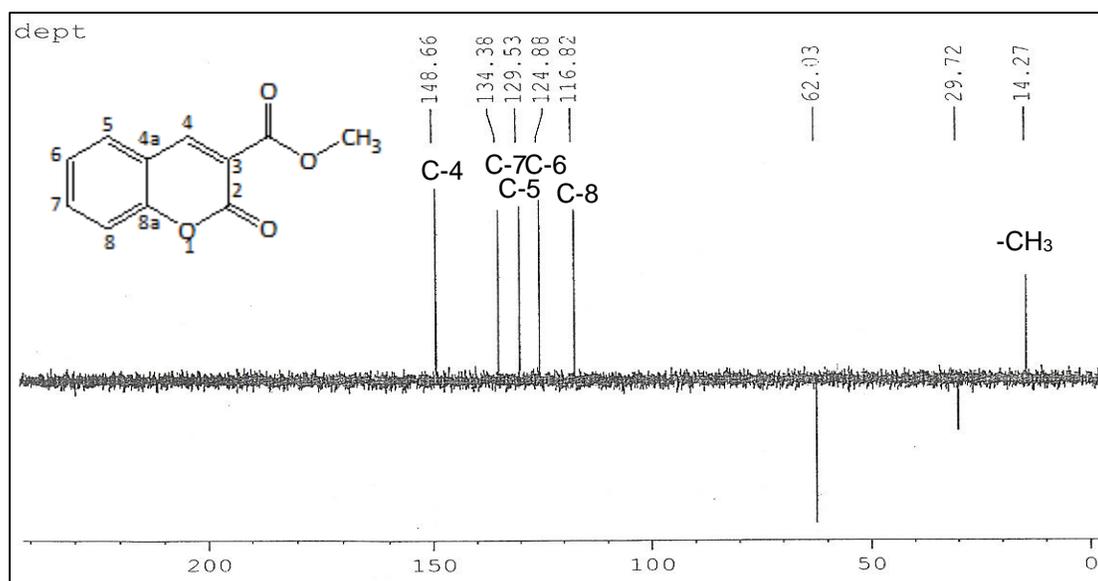
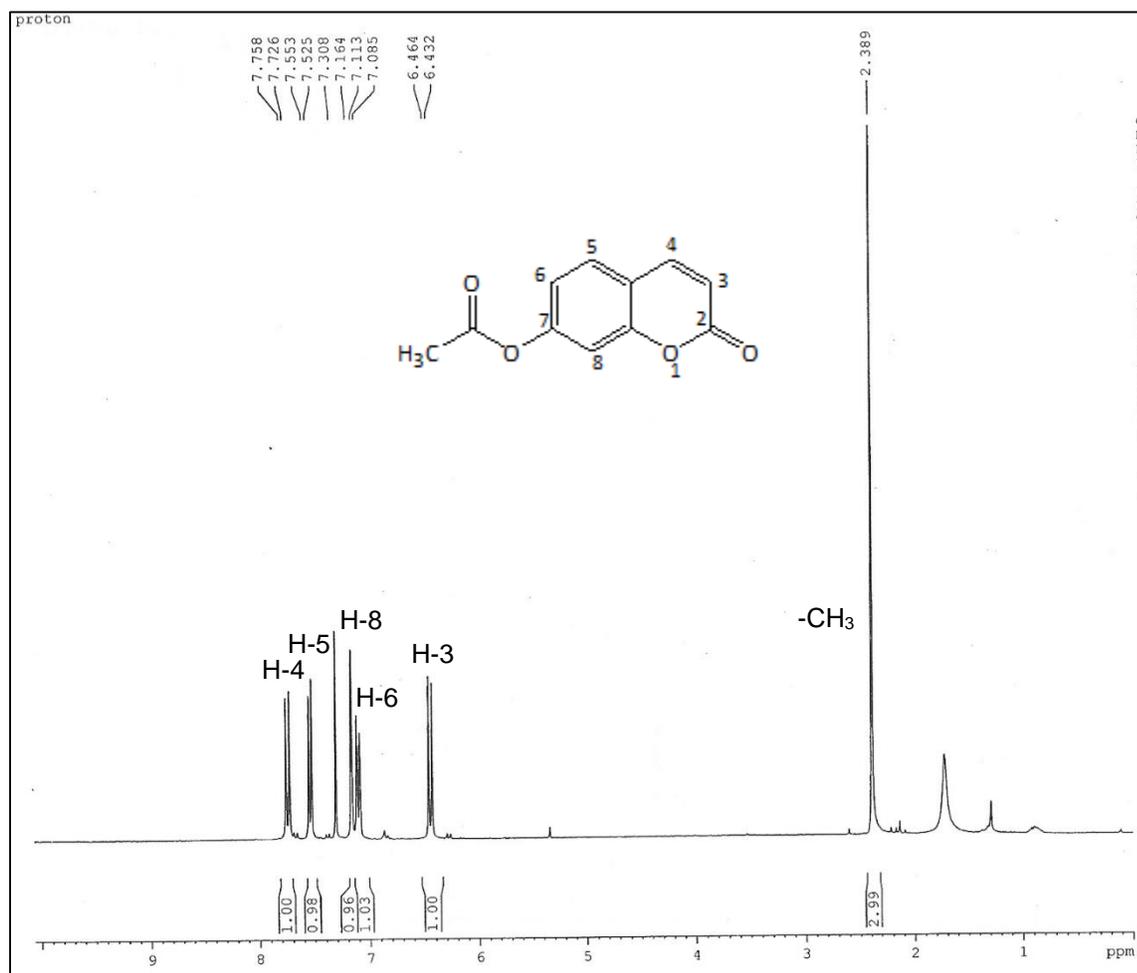
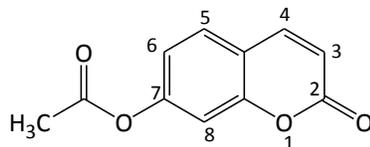


Figura 5c. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) RMN de la cumarina-3-carboxilato de etilo

## Compuesto (6): acetiloxi cumarina

Figura 6a. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la 7-acetiloxi cumarina

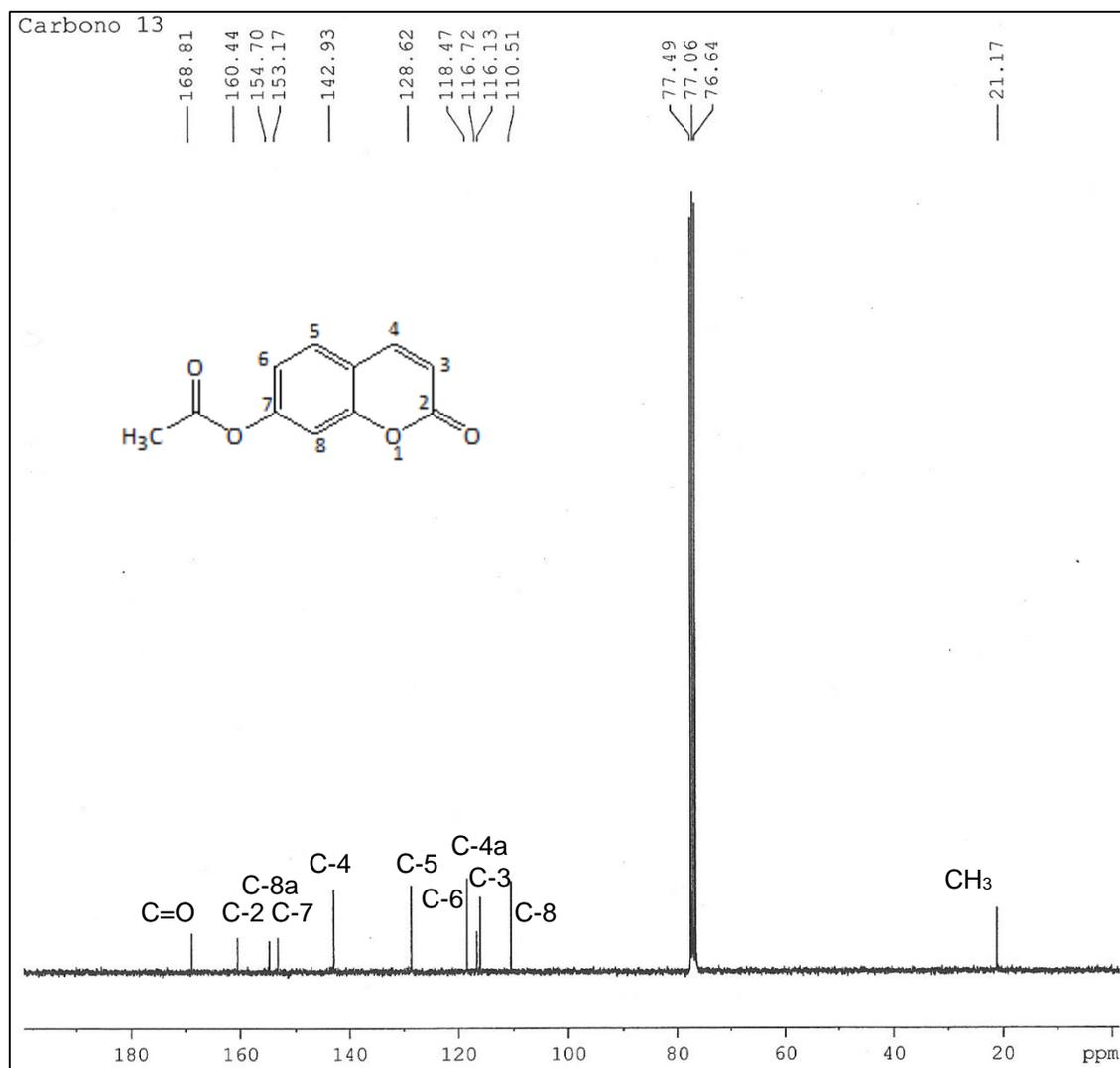
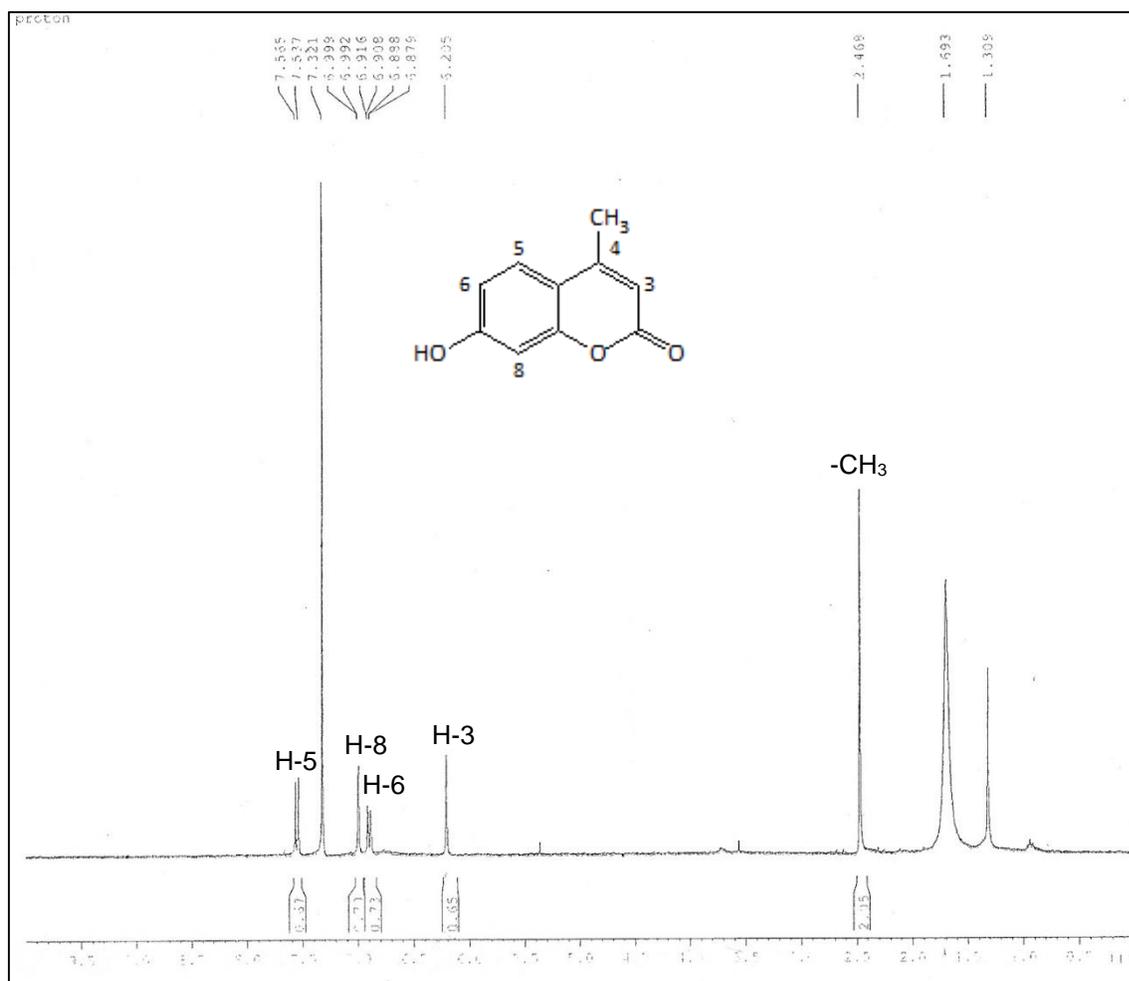
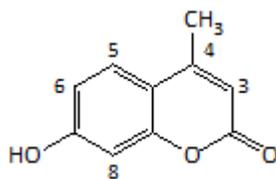


Figura 6b. Espectro de <sup>13</sup>C RMN de la 7-acetiloxi cumarina

**Compuesto (7):** 7-hidroxi-4-metil cumarinaFigura 7a. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la 7-hidroxi-4-metil cumarina

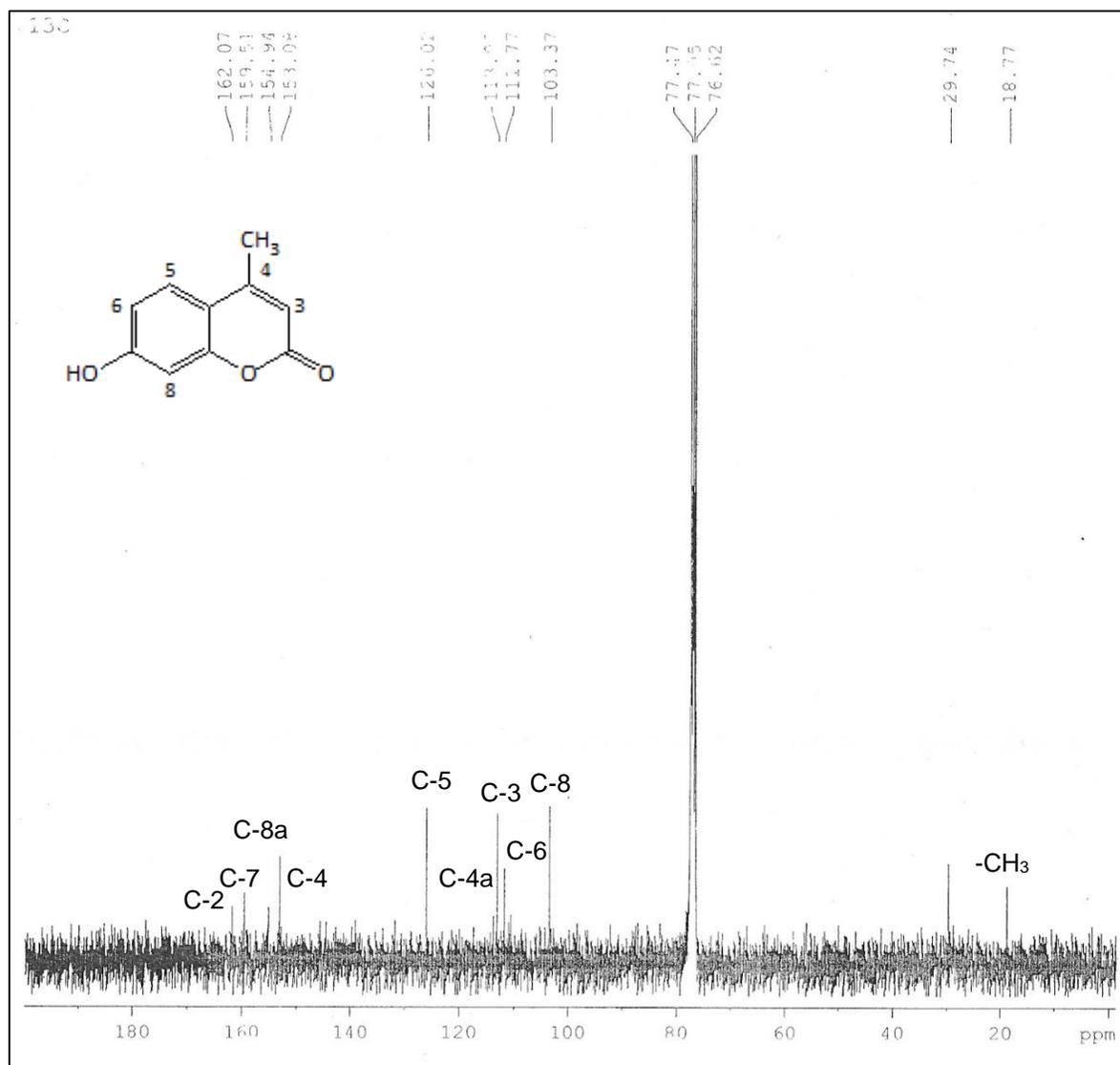
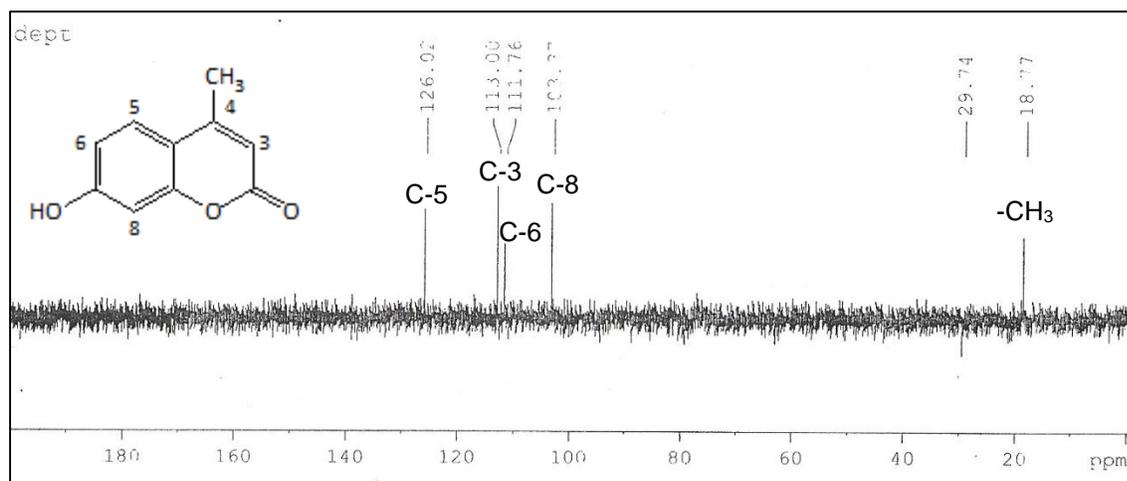
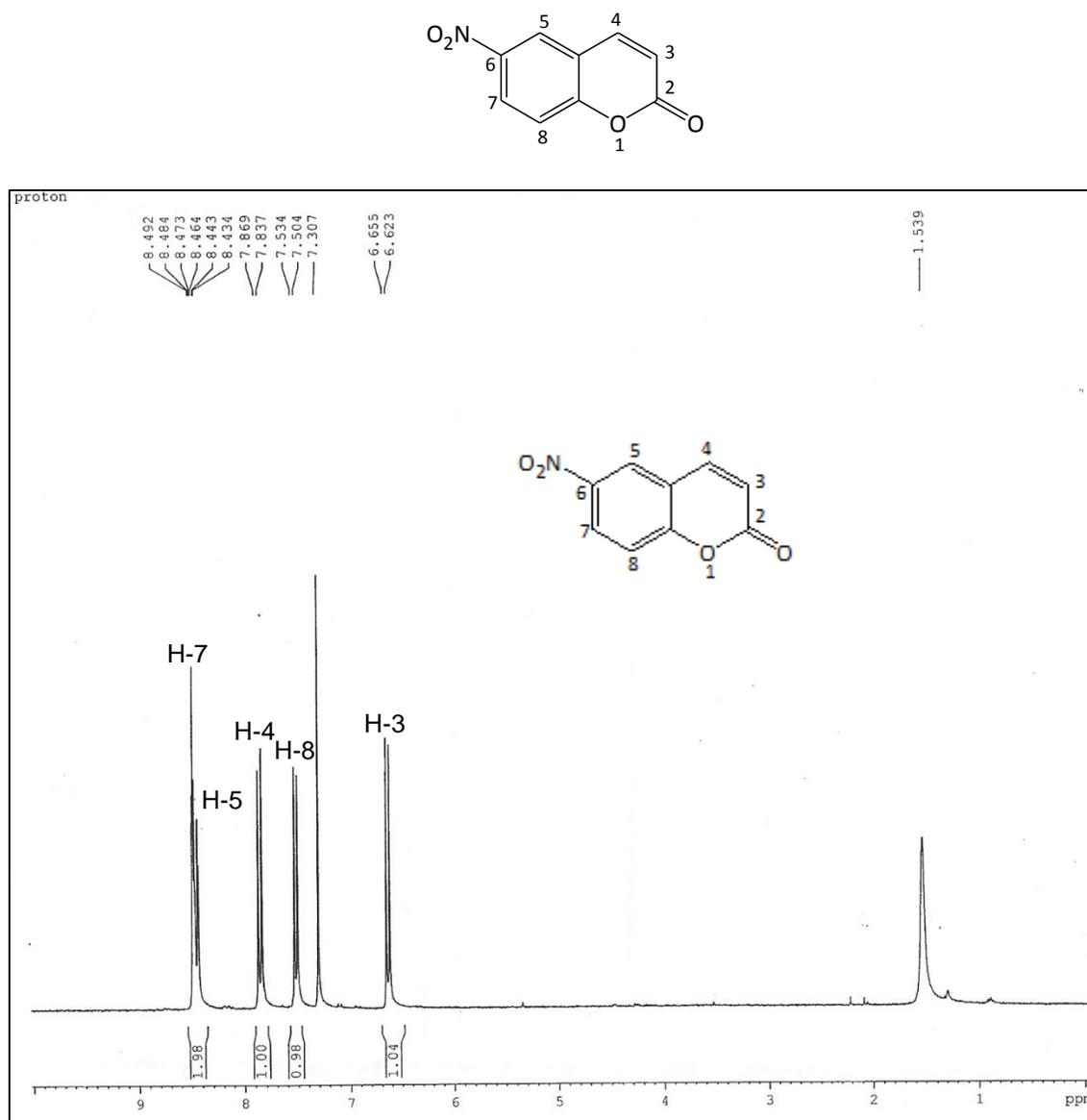


Figura 7b. Espectro de <sup>13</sup>C RMN de la 7-hidroxi-4-metil cumarina



162.1 (C-2), 159.5 (C-7), 154.9 (C-8a), 153.1 (C-4), 126.0 (C-5), 114.2 (C-4a), 113.0 (C-3), 111.8 (C-6), 103.4 (C-8), 18.8 (-CH<sub>3</sub>).

Figura 7c. Espectro de <sup>13</sup>C (DEPT-135) RMN de la 7-hidroxi-4-metil cumarina

**Compuesto (8):** 6-Nitro cumarinaFigura 8a. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la 6-Nitro cumarina

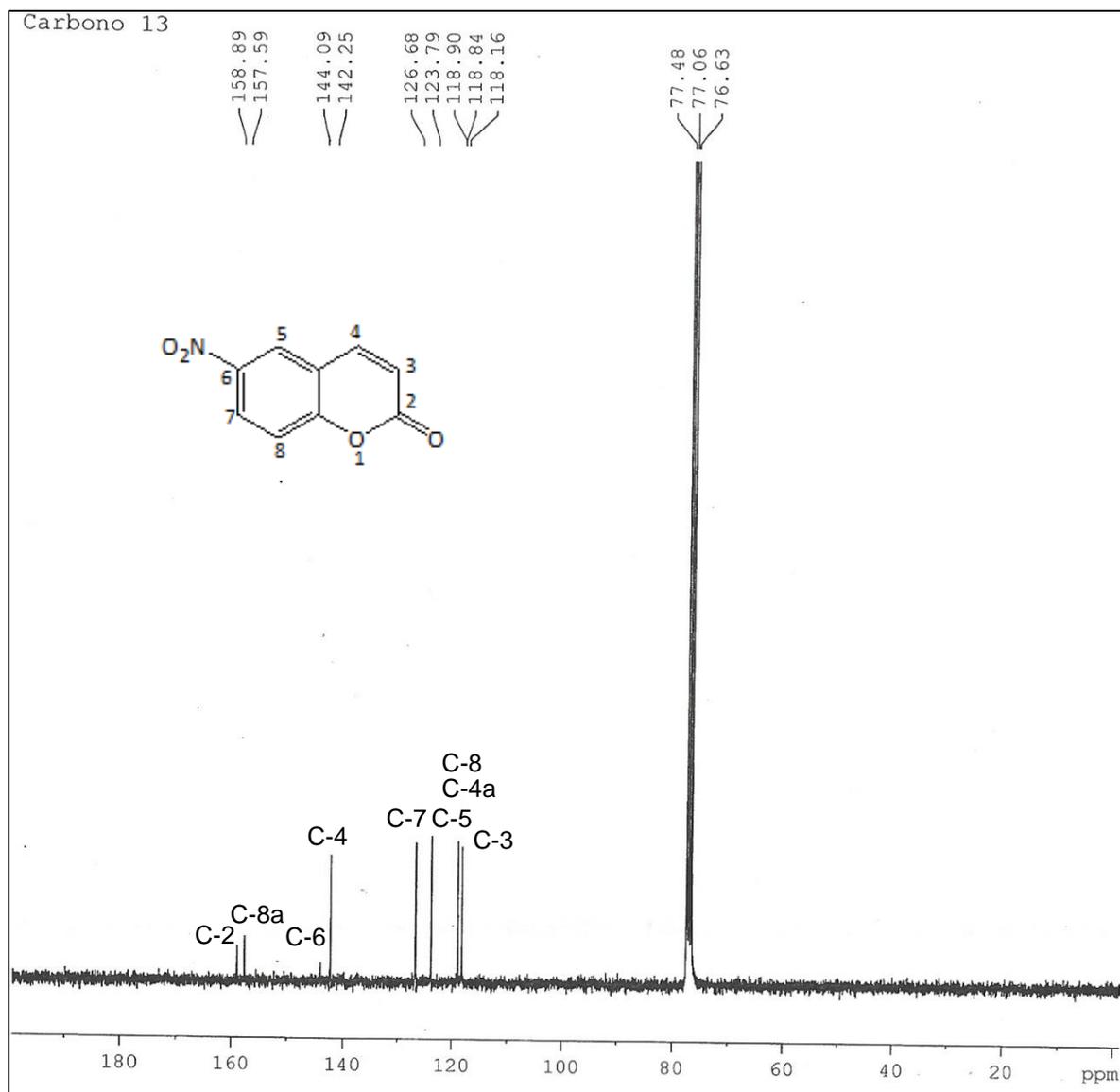


Figura 8b. Espectro de <sup>13</sup>C RMN de la 6-Nitro cumarina

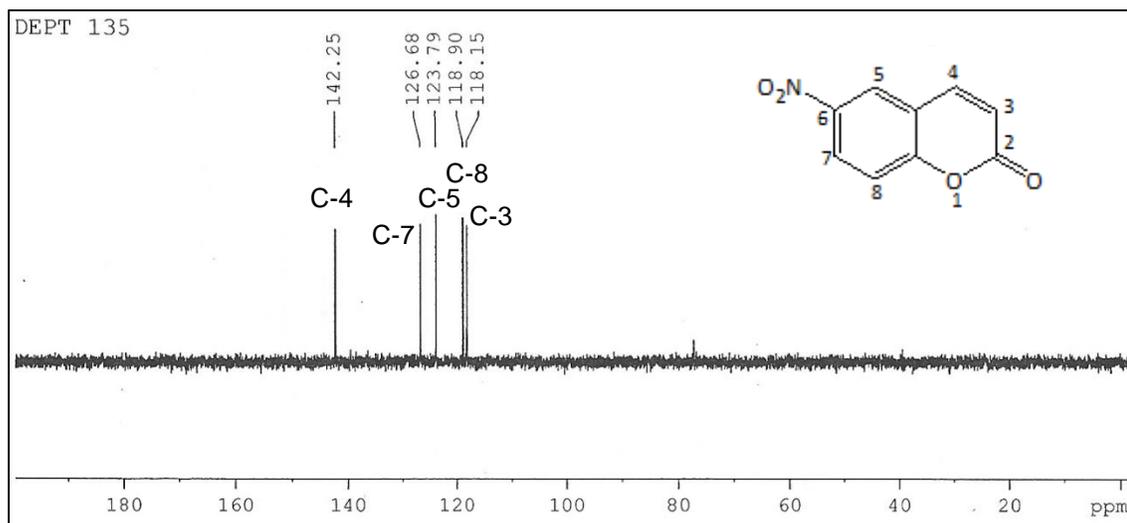


Figura 8c. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) RMN de la 6-Nitro cumarina

## Bibliografía

- A.J.L. Phillips, A. Alves, J. Abdollahzadeh, B. Slippers, M.J. Wingfield, J. Z. G. & P. W. C. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51–167.
- Agrios, G. N. (2013). Plant Pathology. *Journal of Chemical Information and Modeling* (53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aguirre-Pranzoni, C. B., Furque, G. I., Ardanaz, C. E., Pacciaroni, A., Sosa, V., Tonn, C. E., & Kurina-Sanz, M. (2011). Biotransformation of dihydrocoumarin by *Aspergillus niger* ATCC 11394. *Arkivoc*. <http://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.715>
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science* (17). Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138511002457>
- Alarcón, J. Jairo, Arevalo, E., Díaz, A. L., Alberto, A., & Galindo, J. R. (2012). Manejo Integrado de plagas enfermedades en el cultivo del caucho, 75. Retrieved from <http://www.ica.gov.co/getattachment/47f3dbff-348d-4f63-968b-4cd196db8e4f/-nbspc;Manejo-integrado-de-plagas-y-enfermedades-en.aspx>
- Bell, A. A. (1981). Biochemical Mechanisms of Disease Resistance. *Annual Review of Plant Physiology*, 32, 21–81. <http://doi.org/10.1146/annurev.pp.32.060181.000321>
- Bonaldo, S. M., Schwan Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Cruz, M. E. S., & Fiori Tutida, A. C. G. (2007). Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). *Summa Phytopathologica*, 33(4), 383–387. <http://doi.org/10.1590/S0100-54052007000400011>
- Brooker, N., Windorski, J., & Bluml, E. (2008). Halogenated coumarin derivatives as novel seed protectants. *Commun Agric Appl Biol Sci*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19226745>
- Cangerana Hilário, V., Blascke Carrão, D., Barth, T., Bastos Borges, K., Araújo Jacometti Cardoso Furtado, N., Tallarico Pupo, M., & Rodrigo Moraes de Oliveira, A. (2012). Assessment of the stereoselective fungal biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Journal of Pharmaceutical and Biomedical*, 61, 100–107. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.012>
- Cano A., Medina A, Bermejo A. 2008. Bioactive compounds in different citrus varieties.

- Discrimination among cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 377-381.
- Cardoso, J. E., & Wilkinson, M. J. (2008). Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Summa Phytopathologica*, 34, 55–57. <http://doi.org/10.1590/S0100-54052008000100010>
- Cortez Ávila, M. et al. (2016). Enzymatic activity of xylanase immobilized in sodium alginate beads in citral hydrogenation using liquid medium. *Acta Universitaria*, 26(1), 48–55. <http://doi.org/10.15174/au.2016.852>
- Cotes, A., Jiménez, P., Rodríguez, M., Díaz, A., Zapata, J., Gomez, M., Cruz, L. (2012). Estrategias de control biológico de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*).
- Coy Barrera, C. A., Cuca Suárez, L. E., & Quintero Londoño, C. (2013). Farmacognosia y farmacobotánica de especies pertenecientes a los géneros *Esenbeckia* y *Raputia* (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18, 638–653.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Secondary Metabolites. In *Biochemistry Molecular Biology of Plants*, 7, 1250–1318. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.10.011>
- Curvers, K., Seifi, H., Mouille, G., de Rycke, R., Asselbergh, B., Van Hecke, A., ... Hofte, M. (2010). Abscisic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 154, 847–860. <http://doi.org/10.1104/pp.110.158972>
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*.
- Dotor, M. & Cabezas, M. (2014). Mecanismos de Resistencia Sistémica en Plantas. *Acta Iguazu*, 3, 1–19.
- Echeverri, F., Lanau, J., & Pelaez, C. (1985). INDUCCION DE LA PRODUCCION DE FITOALEXINAS CON AMINOGLICOSIDOS EN EL CULTIVO DE BANANO.pdf.
- Elliott, M. L. (2010). Marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* Introducción. *Palmas*, 31(1), 366–375.
- Faulkner, C., & Robatzek, S. (2012). Plants and pathogens putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 699:707.
- Freijo, M. B., López-Arencibia, A., Piñero, J. E., McNaughton-Smith, G., & Abad-Grillo, T. (2018). Design, synthesis and evaluation of amino-substituted 1H-phenalen-1-ones as anti-leishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1312–

1324. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.032>
- Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola. 2000. Enfermedades de los cítricos en Colombia. Bogotá, D.C. 101 p.
- Garcés de Granada, E. (1992). Consideraciones sobre *Botrytis cinerea* Pers., agente causal de la pudrición de las flores. *Agronomía Colombiana*, 9, 196–201.
- García Mateos, R., & Pérez Leal, R. (2003). FITOALEXINAS: MECANISMO DE DEFENSA DE LAS PLANTAS. Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, 9, 5–10.
- García Pineda, E., & Castro Mercado, E. (2014). Las fitoalexinas: antimicrobianos de plantas con efectos benéficos sobre la salud humana. In *¿YA TE ENTERASTE?* (p. 96).
- Gina M. Rodríguez M., Karina Banda-R., S. P. R. B. y A. C. E. G. (2012). Lista comentada de las plantas vasculares de bosques secos prioritarios para la conservación en los departamentos de Atlántico y Bolívar (Caribe colombiano). *Biota Colombiana*, 13, 7–39. <http://doi.org/0124-5376>
- Gnonlonfin, G. J. B., Sanni, A., & Brimer, L. (2012). Review Scopoletin - A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 47–56. <http://doi.org/10.1080/07352689.2011.616039>
- González, D. R., Triana, A. C., Coca, B. M., Ramírez, M. Á., & Pedroso, A. T. R. (2009). Sigma Frente a Hongos Fitopatógenos Causantes Del Manchado Del Grano En El Cultivo De Arroz ( *Oryza Sativa* L .). *Fitosanidad*, 13(2), 101–107.
- Grayer, R. J., & Harborne, J. B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*, 37(1), 19–42. Greca, M. Della & Lanzetta, R. (1992). Phenalene metabolites from *eichhornia crassipes*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2(4), 311–314.
- Grover RK, Moore JD. 1962. Toxicometric studies of fungicides against the browning organisms *Sclerotinia fructicola* and *S. lava*. *Phytopathology* 52: 876-880.
- Gutiérrez, D., Flores, N., Abad-Grillo, T., & McNaughton-Smith, G. (2013). Evaluation of substituted phenalenone analogues as antiplasmodial agents. *Experimental Parasitology*, 135(2), 456–458.
- Harada, G., & Kondo, N. (2009). Induction of phytoalexins in adzuki bean after inoculation with *Phytophthora vignae* f. sp. *adzukicola*. *Journal of General Plant Pathology* (75: 432-436). Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s10327-009-0203-z>

- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*, 44(3), 321–334.
- Hidalgo Bucheli, W. (2009). Exploración de las relaciones estructura-actividad de compuestos tipo perinaftenona en el sistema biológico *Mycosphaerella fijiensis*.
- Hindorf, H., Jha, H., & Weidenborner, M. (1989). ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ISOFLAVONOIDS AGAINST STORAGE FUNGI OF THE GENUS ASPERGILLUS, 28(12), 3317–3319.
- Holscher, D., Dhakshinamoorthy, S., Alexandrov, T., Becker, M., Bretschneider, T., Buerkert, A., ... Swennen, R. L. (2014). Phenalenone-type phytoalexins mediate resistance of banana plants (*Musa* spp.) to the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 105–110.
- Holscher, D. & Schneider, B. (2000). Phenalenones from *Strelitzia reginae*. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1027–1028.
- Hölscher, D. & Schneider, B. (2005). The biosynthesis of 8-phenylphenalenones from *Eichhornia crassipes* involves a putative aryl migration step. *Phytochemistry*, 66(1), 59–64.
- Jena, D. F., Fernando, W., & Bucheli, H. (1981). Biosynthesis of phenylphenalenone-type compounds in Haemodoraceae plants and their phytopathological role in the interaction *Musa - Mycosphaerella fijiensis* Zur Erlangung des akademischen Grades vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultä.
- Khan M.K., Huma Z.E., Dangles, O. 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 33: 85-104.
- K, M. L. (2012). Para el control de patógenos postcosecha en fruto de manzana (*Malus domestica*) como cultivo modelo , COAH-2012-C20-187470 del Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del estado de Coahuila .
- Lado, J., Luque, E., Blanco, O., & Pérez Faggiani, E. (2011). Evaluation of alternatives for *Penicillium digitatum* imazalil resistant strains postharvest management. *Agrociencia Uruguay*, 22, 55–63.
- Luc, B., Cient, I., Alfred, L., Leguizam, J. E., Cenical, I. P., Consultor, I., Jos, B. (n.d.). Enfermedades de los cítricos en Colombia.
- Ludueña, B., Mastandrea, C., Chichizola, C., & Franconi, M. C. (2007). Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica. *Bioquímica Y*

- Patología Clínica, 71(1), 54–66. Retrieved from <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=65111118009>
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J. (2011). Callose Deposition: A multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 183–193.
- Martínez-Bolaños, L. (2013). Ficha Técnica No. 2 Mal de Panamá *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, raza 4 Schlecht, (2), 19.
- Martínez C., C., Cayón S., G., & Ligarreto M., G. (2015). Physiological attributes of banana and plantain cultivars of the Colombian Musaceae Collection. *Agronomía Colombiana*, 33(1), 29–35.
- Mendgen, K., Hahn, M., & Deising, H. (1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 367–386.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2005. Observatorio Agrociencias Colombia. Documento de trabajo No. 66. La cadena de los cítricos en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1999-2005. Bogotá D.C. 64p.
- Moesta, P. & Grisebach, H. (1980). Effects of biotic and abiotic elicitors on phytoalexin metabolism in soybean. *Nature*.
- Molina, A., & Palenzuela, R. (2008). *RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA: ¿ UNA HERRAMIENTA BIO-ECOLÓGICA?*
- Montagner, C., De Souza, S. M., Groposo, C., Delle Monache, F., Smânia, E. F. A., & Smânia, A. (2008). Antifungal activity of coumarins. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*.
- Nebo, L., Varela, R. M., Molinillo, J. M. G., Sampaio, O. M., Severino, V. G. P., Casal, C. M., ... Macías, F. A. (2014). Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. *Phytochemistry Letters*, 8(1), 226–232. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.02.010>
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–15.
- Nigam, S., Rao, J. V., & Jayashree, B. S. (2013). Microbial biotransformation-A novel approach for modification on coumarin substrates. *Indian Journal of Biotechnology* (12: 379-385).

- Oliveira, M. D. M., Varanda, C. M. R., & Félix, M. R. F. (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters*, 15, 152–158. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.12.011>
- ONeill, T., Johnson, J. A., Webster, D., & Gray, C. A. (2013). The Canadian medicinal plant *Heracleum maximum* contains antimycobacterial diynes and furanocoumarins. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(1), 232–237. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.009>
- Opitz, S. & Schneider, B. (2002). Organ-specific analysis of phenylphenalenone-related compounds in *Xiphidium caeruleum*. *Phytochemistry*, 61(7), 819–825. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00359-X](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00359-X)
- Ordenhana. (1998). Mecanismos de defensa en las interacciones. *Manejo Integrado de Plagas*, (63), 22–32.
- Otálvaro, F., Jitsaeng, K., Munde, T., Echeverri, F., Quiñones, W., & Schneider, B. (2010). O-Methylation of phenylphenalenone phytoalexins in *Musa acuminata* and *Wachendorfia thyriflora*. *Phytochemistry*, 71(2–3), 206–213. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.10.019>
- Otálvaro, F., Nanclares, J., Vásquez, L. E., Quiñones, W., Echeverri, F., Arango, R., & Schneider, B. (2007). Phenalenone-type compounds from *Musa acuminata* var. “Yangambi km 5” (AAA) and their activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of Natural Products*, 70(5), 887–890. <http://doi.org/10.1021/np070091e>
- Pacher, T., Bacher, M., Hofer, O., & Greger, H. (2001). Stress induced carbazole phytoalexins in *Glycosmis* species. *Phytochemistry*, 58(1), 129–135. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00186-8](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00186-8)
- Pedras, M. S. C., & Ahiahonu, P. W. K. (2005). Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry* (66: 391-411). Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942204006636>
- Pedras, M. S. C., Ahiahonu, P. W. K., & Hossain, M. (2004). Detoxification of the cruciferous phytoalexin brassinin in *Sclerotinia sclerotiorum* requires an inducible glucosyltransferase. *Phytochemistry*, 65(19), 2685–2694.
- Pedras, M. S. C., & Hossain, M. (2007). Design, synthesis, and evaluation of potential inhibitors of brassinin glucosyltransferase, a phytoalexin detoxifying enzyme from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(17), 5981–5996.
- Pedras, M. S. C., & Minic, Z. (2014). The phytoalexins brassilexin and camalexin inhibit

- cyclobrassinin hydrolase, a unique enzyme from the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(1), 459–467.
- Pedras, M. S. C., Minic, Z., & Sarma-Mamillapalle, V. K. (2009). *Synthetic inhibitors of the fungal detoxifying enzyme brassinin oxidase based on the phytoalexin camalexin scaffold*. *Journal of agricultural and food chemistry* (Vol. 57). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243099>
- Ploetz, R. C. (2015). Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection*, 73, 7–15.
- Quiñones, W., Escobar, G., Echeverri, F., Torres, F., Rosero, Y., Arango, V., ... Gallego, A. (2000). Synthesis and antifungal activity of Musa phytoalexins and structural analogs. *Molecules*. <http://doi.org/10.3390/50700974>
- Rivera-Vargas, L. I., Schmitthenner, A. F., & Graham, T. L. (1993). Soybean Flavonoid Effects on and Metabolism by *Phytophthora-Sojae*. *Phytochemistry*, 32(4), 851–857.
- Rivillas-Acevedo, L. A., & Soriano-García, M. (2007). Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10156–10161. <http://doi.org/10.1021/jf072069x>
- Rodrigo, M. C. A. (2013). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. *Tesis*, 1–100. <http://doi.org/10.20868/UPM.thesis.39079>
- Rodrigo, V. B., Diego, A. A., Carlos, M. G. P., Jesús, H. G. G., & Diego, L. D. R. (2010). Biotransformación de trans-cinamaldehído con el hongo filamentoso *Aspergillus sp. Vitae*, 17(3), 281–290.
- Rosquete, L. I., Cabrera-Serra, M. G., Piñero, J. E., Martín-Rodríguez, P., Fernández-Pérez, L., Luis, J. G., Abad-Grillo, T. (2010). Synthesis and in vitro antiprotozoal evaluation of substituted phenalenone analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(12), 4530–4534.
- Sakai, T., & Nakagawa, Y. (1988). Diterpenic stress metabolites from cassava roots. *Phytochemistry*, 27(12), 3769–3779. [http://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)83015-2](http://doi.org/10.1016/0031-9422(88)83015-2)
- Sanhueza Rios, G. adolfo. (2015). Determinación de resistencia de diez aislamientos de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., obtenidos de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), a cinco fungicidas, 37. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2014/bmfciu.41i/doc/bmfciu.41i.pdf>
- Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., & Merah, O. (2017). The Apiaceae:

- Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops and Products*, 109, 661–671.
- Schneider, B., Duque, L., Zapata, C., & Ot, F. (2011). Radical Scavenging Capacity of of 2,4-Dihydroxy-9-phenyl-1H-phenalen-1-one: A Functional Group Exclusion Approach. *Organic Letters*, (3), 10–13.
- Song, R., Feng, Y., Wang, D., Xu, Z., Li, Z., & Shao, X. (2017). Phytoalexin phenalenone derivatives inactivate mosquito larvae and root-knot nematode as type-II photosensitizer. *Scientific Reports*, 7, 1–9.
- UNNE. (2010). Familia Fabaceae o Leguminosae, 1: 122-141. Retrieved from [http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Rosideas/Eurosides I/3-Clado de los fijadores de Nitr%F3geno/2-Fabales/1-Fabaceae.pdf](http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Rosideas/Eurosides%20I/3-Clado%20de%20los%20fijadores%20de%20Nitr%20geno/2-Fabales/1-Fabaceae.pdf)
- Velasco, R. (2010). BIOTRANSFORMACIÓN DE trans-CINAMALDEHÍDO CON EL HONGO FILAMENTOSO *Aspergillus* sp. VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA, 17(3), 281–290.
- Velasco, R., Montenegro M., D. L., Vélez S., J. F., García P., C. M., & Durango R., D. L. (2009). BIOTRANSFORMATION OF COMPOUNDS AROMATIC SUBSTITUTED BY FILAMENTOUS PHYTOPATOGENIC FUNGUS OF THE GENERA *Botryodiplodia* and *Colletotrichum*. (*English*), 75, 94–111. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=43446077&lang=es&site=ehost-live>
- Velasco R, Gil JH, García CM, Durango DL. 2010. Production of 2-phenylethanol in the biotransformation of cinnamyl alcohol by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*. *Vitae* 17: 272-280.
- Vidal, S., Eriksson, A. R. ., Montesano, M., Denecke, J., & Palva, E. T. (1998). Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-independent induction of a plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(1), 23–32.
- Walasek, M., Grzegorzcyk, A., Malm, A., & Skalicka-Woźniak, K. (2015). Bioactivity-guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae) fruits by high-performance counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 186, 133–138.
- Wiens, N. (1978). EVALUATION OF PHYTOALEXINS A N D O T H E R PLANT NATURAL PRODUCTS AS PROTECTIVE FUNGICIDES AND INSECT

## REPELLENTS

- Yang, G., Jiang, X., & Yang, H. (2002). Development of novel pesticides based on phytoalexins: Part 2. Quantitative structure-activity relationships of 2-heteroaryl-4-chromanone derivatives. *Pest Management Science*, 58(10), 1063–1067. h
- Zhang, Y. N., Feng, Y. A., Li, Z., & Shao, X. S. (2017). Synthesis and insecticidal evaluation of phytoalexin phenalenones derivatives. *Chinese Chemical Letters*, 28(6), 1228–1231.