



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Safrol y Apiol: metabolismo, preparación de derivados y actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*

Samuel Vizcaíno Páez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Química
Medellín, Colombia
Año 2013

Safrol y Apiol: metabolismo, preparación de derivados y actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*

Samuel Vizcaíno Páez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Química

Director:

PhD. Carlos Mario García Pajón

Codirector (a):

MSc. Diego Luis Durango Restrepo

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Química de los Productos Naturales y los Alimentos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Química
Medellín, Colombia
Año 2013

Este trabajo está dedicado al Dios todopoderoso, mi Creador, mi Papá, mi Mentor y mi Amigo. Quien ha impulsado mi vida hacia adelante con su amor y cuidado, y que me ha regalado invaluable promesas como esta:

*Si Jehová no edificare la casa,
En vano trabajan los que la edifican;
Si Jehová no guardare la ciudad,
En vano vela la guardia.
Por demás es que os levantéis de
madrugada, y vayáis tarde a reposar,
Y que comáis pan de dolores;
Pues que a su amado dará Dios el sueño.*

Salmo 127:1-2

Agradecimientos

Agradezco este logro principalmente a Dios y a mi familia, que me han apoyado incondicionalmente durante toda mi vida. En especial a mi Madre y amiga Isabel Páez Mercado que con su ejemplo y apoyo me ha impulsado siempre hacia adelante. A mi Padre, de quien he heredado muchas de las cosas que hoy soy. A mis abuelas Ana Mercado e Hilda Carreazo, quienes han levantado generaciones con su amor y ejemplo de vida. A mis primos, tíos y tías; en especial a mi tía Yudy Páez quien no se cansa de apoyar mis sueños.

Agradezco también a mi familia de Alfa y Omega Medellín, quienes han constituido una ayuda invaluable a nivel espiritual, y gracias a quienes aprendí a soportar la adversidad en esta ciudad, lejos de mis seres queridos. En especial a los líderes Elí Llanos, Heydi Polanía y Wálter Arias. También a todos aquellos compañeros y amigos a quienes no alcanzaría a nombrar y agradecer en estas pocas líneas.

A mis amigos de toda la vida, y compañeros en las buenas, las malas y las peores:
Luis Joseph Prent, Fernando José Parra, Leandro Gómez, Yeray Alexai Rodríguez y Fredys Sánchez.

A los amigos que me acogieron tan pronto llegué a la ciudad de Medellín y quienes no solo me brindaron una casa, sino también un hogar y una familia para compartir y aprender: Luis Alberto Oviedo, Hector Mauricio Espitia, Gustavo Rafael Hernández, Carlos García, Jesús David Viloría, Alejandra Soto y Clara Inés Henao.

A mis amigos de la maestría y del grupo de investigación que me apoyaron y me soportaron todo este tiempo:

Rodrigo Pineda Mejía, Lina Cristina Salazar, Víctor Manuel Galindo, Saul Enrique Bustamante, Jenifer Andrea Murillo, Natalia Eugenia Pulgarín, Lina Marcela Marín, Lina María Preciado, Manuel Alejandro Numpaque, Ánderson Mesa Correa, Janio, Rodrigo Velasco Bucheli, Andrés Rodríguez Vega, Enelia Cristina Peláez.

Y al resto de mis amigos:

Zulay Margarita Muriel, Zury Constaín, Natalia Betancur Granados.

A mis directores, asesores y amigos:

Carlos Mario García, Diego Luis Durango, Jesús Humberto Gil, Juan Camilo Marín.

A las demás personas que han hecho posible este logro:

Elizabeth Pabón, Daniel Alberto Barragán, Blanca Fabiola Espejo, Tatiana Lobo Echeverri, Nancy Beatriz Vanegas, Ana Silvia Arboleda Hurtado, Jeannie Paulina Hurtado.

Resumen

En el presente trabajo, los fenilpropanoides safrol y apiol (dillapiol) se obtuvieron de fuentes naturales, puntualmente desde las especies *Piper auritum* Kunth. (Pa) y *Piper holtonii* C.DC. (Ph); respectivamente. Además, se realizó una evaluación previa de la actividad antifúngica *in vitro* mediante la técnica del agar envenenado, contra el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*, tanto de estos metabolitos como de extractos de diferente polaridad provenientes de ambas especies. Los análisis de composición química de los extractos revelaron que la mayor inhibición está posiblemente relacionada con el contenido de safrol en *P. auritum* (56,88 % en el extracto hexánico, EH; y 64,54 % en el aceite esencial, AE) y apiol en *P. holtonii* (57,20 % en EH y 64,24 % en AE). Ambos compuestos se purificaron por métodos cromatográficos, y sus estructuras se confirmaron por resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y carbono 13; y con ayuda de los fragmentos obtenidos de la espectrometría de masas.

Adicionalmente, se analizó el metabolismo de safrol y apiol por parte del hongo *B. theobromae* incubado en el medio Czapeck Dox durante 216 h; como productos mayoritarios de la biotransformación se aislaron e identificaron los correspondientes dioles vecinales sobre la cadena lateral. Otros metabolitos minoritarios también se detectaron por cromatografía de gases.

Para observar el progreso del proceso metabólico se hizo un estudio en el curso del tiempo mediante CG-EM cada 12 h hasta las 120 h, y luego cada 48 h hasta las 316 h. De estos estudios se observó que para el safrol, donde la actividad antifúngica es moderada, la capacidad de metabolización es baja; mientras que para el apiol, que presentó una actividad relativamente alta, este microorganismo consigue después de 60 h iniciar el proceso de transformación; proceso que continuó durante el tiempo restante del ensayo. A partir de estos resultados se postula una posible ruta metabólica.

Por último, se prepararon algunos derivados del safrol y apiol (por nitración del anillo aromático y reducción del grupo nitro hasta amino) y se evaluaron contra el hongo fitopatógeno; esto con el fin de establecer el efecto de las variaciones estructurales sobre la actividad antifúngica *in vitro*.

Estos resultados brindan información importante acerca de la bioquímica de la interacción entre los hongos fitopatógenos y los fenilpropanoides. Información que

puede ser utilizada en el desarrollo racional de nuevas y mejoradas sustancias antifúngicas.

Palabras clave: *Piper*, *fenilpropanoide*, *fitopatógeno*

Abstract

In the present work, the phenylpropanoids safrole and apiol (dillapiol) was obtained from natural sources, punctually from *Piper auritum* Kunth. (Pa) and *Piper holtonii* C.DC. (Ph) species; respectively. Moreover, a previous *in vitro* antifungal activity was realized by the poisoned agar technique, against phytopathogenic fungi *Botryodiplodia theobromae*, both the metabolites as the different polarity extracts of both species. The chemical composition analysis of the extracts reveals that the major inhibition was likely related with safrole content in *P. auritum* (56,88 % in hexanic extract, HE; and 64,54 % in the essential oil, EO). Both compounds were purified by chromatographic means, and their structures were confirmed by proton and 13 carbon nuclear magnetic resonance (NMR); and using the fragments obtained from mass spectrometry.

Furthermore, the metabolism of safrole and apiol by the fungus *B. theobromae* cultured in Czapeck Dox media during 216 h was analyzed; as the major products from the biotransformation, the corresponding vicinal diols upon the lateral chain were analyzed and identified. Other minor metabolites were also detected by gas chromatography.

To observe the metabolic process progress, a time course analysis by GC-MS was done, each 12 h until 120 h, and then each 45 h to the 316 h. from these studies was observed that for safrole, where the antifungal activity is moderate, the metabolic capability is low. While for apiol, which showed a relatively high activity, this microorganism gets start the biotransformation process after 60 h; process that continues for the remainder of the assay. From these results a plausible metabolic pathway is postulated.

Finally, some derivatives for safrole and apiol were prepared (by nitration of the aromatic ring and reduction of the nitro group to amino) and were tested against the phytopathogenic fungus; this, with the aim of establishes the structural variation effect on the *in vitro* antifungal activity.

These results offer valuable information about the biochemistry of the interaction between phytopathogenic fungi and the phenylpropanoids.

Keywords: *Piper*, *phenylpropanoid*, *phytopathogenic*

Contenido

Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas.....	XIV
Lista de símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	1
Objetivos.....	1
Capítulo 1 Composición química de las especies <i>Piper auritum</i> y <i>Piper holtonii</i> y actividad antifúngica contra el hongo <i>Botryodiplodia theobromae</i>	3
1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1 Características del hongo <i>Botryodiplodia theobromae</i>	3
1.1.2 Fitoquímica y bioactividad del género <i>Piper</i>	7
1.2 Materiales y métodos.....	13
1.2.1 Materiales y equipos.....	13
1.2.2 Material vegetal	13
1.2.3 Obtención de los extractos.....	14
1.2.4 Obtención de los aceites esenciales (AE).....	14
1.2.5 Caracterización química de aceites y extractos.....	14
1.2.6 Aislamiento, purificación e identificación de los componentes mayoritarios	15
1.2.7 Microorganismos	15
1.2.8 Evaluaciones de actividad antifúngica <i>in vitro</i>	15
1.3 Resultados y discusión.....	16
1.3.1 Rendimiento de los procesos de extracción	16
1.3.2 Actividad de extractos y aceites contra el hongo <i>Botryodiplodia theobromae</i>	17
1.3.3 Composición química de los extractos hexánicos y aceites esenciales.....	22
1.3.4 Identificación de los componentes principales	27
1.3.5 Actividad antifúngica de safrol y dillapiol.....	30
Capítulo 2 Estudio del metabolismo de safrol y dillapiol por parte del hongo <i>B. theobromae</i>	33

2.1	Antecedentes.....	33
2.1.1	Metabolismo de compuestos bioactivos por hongos fitopatógenos.....	33
2.1.2	Metabolización de fenilpropanoides.....	36
2.1.3	Biotransformaciones logradas mediante <i>B. theobromae</i>	40
2.2	Materiales y métodos.....	42
2.2.1	Preparación del inóculo.....	42
2.2.2	Ensayo preparativo	42
2.2.3	Análisis en el curso del tiempo	42
2.2.4	Extracción de los productos metabólicos	42
2.2.5	Purificación e identificación de los productos de biotransformación.....	43
2.2.6	Análisis de la rotación óptica	43
2.3	Resultados	44
2.3.1	Productos de biotransformación del safrol y dillapiol.....	44
2.3.2	Análisis en el curso del tiempo	48
Capítulo 3 Síntesis de derivados del safrol y dillapiol, y su actividad antifúngica contra el hongo <i>B. theobromae</i>		
51		
3.1	Antecedentes.....	51
3.1.1	Desarrollo racional de fungicidas.....	51
3.1.2	Derivatización de fenilpropanoides	53
3.2	Materiales y métodos.....	55
3.2.1	Nitraciones	55
3.2.2	Aminaciones	55
3.2.3	Purificación y caracterización de los derivados sintéticos	56
3.2.4	Ensayos <i>in vitro</i>	56
3.3	Resultados	56
3.3.1	Identificación de los derivados	56
3.3.2	Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	58
4	Conclusiones generales y recomendaciones	61
4.1	Conclusiones	61
4.2	Recomendaciones	61
A.	Anexo.....	63
B.	Anexo.....	68
C.	Anexo.....	70
Bibliografía		72

Lista de figuras

Figura 1-1: Piper-amidas aisladas de las especies <i>Piper tuberculatum</i> , <i>P. hispidum</i> y <i>P. arboreum</i>	8
Figura 1-2: Ejemplos de los tipos representativos de compuestos encontrados en las <i>Piper</i> spp.	9
Figura 1-3: Modelo de nicho para la especie <i>Piper auritum</i> que representa las zonas de alta y baja probabilidad de ocurrencia de esta especie [32].	11
Figura 1-4: Modelo de nicho para la especie <i>Piper holtonii</i> que representa las zonas de alta y baja probabilidad de ocurrencia de esta especie [39].	12
Figura 1-5: Crecimiento micelial (barras) de <i>B. theobromae</i> y % de inhibición (líneas y símbolos) de extractos de diferente polaridad de <i>P. auritum</i> (arriba) y <i>P. holtonii</i> (abajo) a 400 mg/L.....	19
Figura 1-6: Crecimiento micelial (barras) de <i>B. theobromae</i> y % de inhibición (líneas y símbolos) de los extractos hexánicos de <i>P. auritum</i> (arriba) y <i>P. holtonii</i> (abajo) a diferentes concentraciones.	20
Figura 1-7: Crecimiento micelial (barras) de <i>B. theobromae</i> y % de inhibición (líneas y símbolos) del aceite esencial de <i>P. auritum</i> (arriba) y <i>P. holtonii</i> (abajo) a diferentes concentraciones.	21
Figura 1-8: Espectros de ¹ H-RMN (arriba) y ¹³ C-RMN (abajo); y sus respectivas asignaciones para el safrol aislado de <i>P. auritum</i>	28
Figura 1-9: Espectros de ¹ H-RMN (arriba) y ¹³ C-RMN (abajo); y sus respectivas asignaciones para el dillapiol aislado de <i>P. holtonii</i>	29
Figura 1-10: Crecimiento micelial (barras) de <i>B. theobromae</i> y % de inhibición (líneas y símbolos) de dillapiol a diferentes concentraciones.	31
Figura 1-11: Crecimiento micelial (barras) de <i>B. theobromae</i> y % de inhibición (líneas y símbolos) de safrol a diferentes concentraciones.	32
Figura 2-1: Transformación de la molécula de Leutona (i) mediante los hongos el hongo <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Aspergillus flavus</i> [62].	34
Figura 2-2: Biotransformación de las fitoalexinas wyerona, epóxido de wyerona y ácido wyerónico aisladas de la especie <i>Vicia faba</i> L., por parte de los hongos fitopatógenos <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Botrytis fabae</i> [65].	35
Figura 2-3: Reducción de la mezcla de isómeros del triadimefon (25) para dar los productos enantioselectivos del triadimenol (26) (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> y 1 <i>S</i> , 2 <i>S</i>) [67].	36
Figura 2-4: rutas de biotransformación del eugenol hasta su conversión en derivados de la vainillina [70].	37
Figura 2-5: Productos comunes de biotransformación del <i>t</i> -anetol (37) y el isosafrol (38) mediante bacterias como la <i>Arthrobacter</i> sp [81].	38
Figura 2-6: Rutas de bioconversión del isoeguenol (43) en vainillina (34), alcohol vanílico (35) y ácido vanílico (36) [83].	39
Figura 2-7: Transformación del valenceno (51) en nootkatona (52) por medio del hongo <i>B. theobromae</i> [87].	40
Figura 2-8: conversión de la lactona sesquiterpénica zaluzanin-D (53) en el producto reducido dihidrozaluzanin-C (54) al por medio de <i>B. theobromae</i> [88].	40
Figura 2-9: Reducción enantioselectiva de distintas cetonas aromáticas proquirales mediante <i>B. theobromae</i> , para la obtención de los alcoholes de configuración <i>S</i> , considerados en este caso los productos Prelog [89].	41
Figura 2-10: Posible ruta de biotransformación del safrol (3) en sus productos 2',3'-dihidroxi-dihidrosafrol (56), al que llegaría a través del óxido de safrol (55). También el 3'-hidroxidihidrosafrol (57) y/o 2'-hidroxidihidrosafrol (58). Entre corchetes productos intermedios no identificados.	44
Figura 2-11: Posible ruta metabólica para el dillapiol (3a) por parte del hongo <i>B. theobromae</i> . El cual pasa por un intermedio epoxidado (59) para generar el principal producto de biotransformación 2',3'-dihidroxi-dillapiol (60).	46
Figura 2-12: Espectro infrarrojo para 2',3'-dihidroxi-dihidrodillapiol.	47
Figura 2-13: Cinética de la formación del principal producto de biotransformación del dillapiol por el hongo <i>B. theobromae</i> en el medio Czapeck-Dox durante un periodo de 216 h.	48

Figura 3-1: Estructura de la pirrolnitrina (**61**) y sus derivados sintéticos: fenciclonil (**62**) y fludioxonil (**63**).....52

Figura 3-2: Estructura de la Estrobilurina A (**64**) y sus derivados mejorados sintéticamente: Kresoxim-metil (**65**) y Azoxystrobin (**66**).....52

Figura 3-3: Estructura de los fenilpropanoides más activos de su serie, correspondiente a los derivados clorados (**67**) y (**68**).54

Figura 3-4: Estructura del 2-metoxi-6-nitro-4-(prop-2-en-1-il)fenol (**69**), compuesto más activo de su serie contra hongos oportunistas fitopatógenicos en humanos y dermatofitos.54

Figura 3-5: estructuras de los derivados obtenidos para las reacciones de nitración y aminación, para safrol y dillapiol.57

Figura 3-6: Curvas de crecimiento micelial del hongo *B. theobromae* inhibido por safrol, dillapiol, los derivados sintéticos y 2',3'-dihidroxi-dihidro-dillapiol a una concentración de 50 µg/mL.....59

Lista de tablas

Tabla 1-1: Clasificación Taxonómica de la especie *Piper auritum* Kunth.11

Tabla 1-2: Clasificación taxonómica de la especie *Piper holtonii* C. DC. Imagen propia12

Tabla 1-3: Porcentajes de rendimiento de extracción con base en 500 g de material fresco de *Piper auritum* y *Piper holtonii*.16

Tabla 1-4: Composición química de los extractos hexánicos y aceites esenciales de las especies *Piper auritum* y *Piper holtonii*.23

Tabla 2-1: Desplazamientos químicos para el safrol y su principal producto de biotransformación por parte del hongo *B. theobromae*, el 2',3'-dihidroxisafrol.45

Tabla 2-2: Desplazamientos químicos para el dillapiol y su principal producto de biotransformación por parte del hongo *B. theobromae* el 2',3'-dihidroxi-dihidro-dillapiol.47

Tabla 3-1: Desplazamientos químicos para los derivados sintéticos de safrol: nitrosafrol y aminosafrol.....57

Tabla 3-2: Desplazamientos químicos para el derivado sintético de dillapiol: nitrodillapiol.58

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
AcOEt	Acetato de etilo
AE	Aceite esencial
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CE ₅₀	Concentración efectiva del 50 %
CG-EM	Cromatografía de Gases-Espectrómetro de Masas
CI ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 %
CMI	Concentración mínima inhibitoria
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
DMI	Inhibidores de la desmetilación del colesterol
EA	Extracto con acetato de etilo
ED	Extracto con diclorometano
EH	Extracto hexánico
EM	Extracto con metanol
EM-IE	Espectros de masas de ionización electrónica
EtOH	Etol
FDA	Administración de alimentos y drogas (Food and Drug Administration)
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
MBC	Metil benzimidazol carbamatos
MPC	Medio de papel cromatográfico
MWHD	Hidrodestilación asistida por microondas (Microwave Hydrodistillation)
NIST	Instituto nacional de estándares y tecnología (National Institute of Standards and Technology)
Pa	<i>Piper auritum</i>
PDA	Papa dextrosa agar
Ph	<i>Piper holtonii</i>
UV	Ultravioleta

Introducción

Colombia es un país esencialmente agrícola y esta actividad constituye la industria más generalizada del pueblo colombiano. Su importancia hace relación tanto a los productos de consumo interno como a los de exportación. Debido al relieve y a los diferentes climas que posee el territorio nacional, es rico en una infinidad de productos y en una gran variedad de los mismos. Recientemente uno de los productos agrícolas que ha cobrado gran importancia entre los pequeños agricultores es el aguacate (*Persea americana*). En Colombia este cultivo, ha sido un sector tradicional de la economía campesina de subsistencia para pequeños productores, alta dispersión geográfica y gran importancia socioeconómica desde el punto de vista de seguridad alimentaria y de generación de empleo. En el territorio colombiano, el cultivo de aguacate se realiza en más de 8000 hectáreas en zonas entre los 300 y 2500 msnm. En Antioquia, se cultiva principalmente en El Retiro, La Ceja, Guarne, San Vicente, entre otros municipios. Generalmente, el aguacate se cultiva en huertos jóvenes entre 0 y 8 años, con buenas producciones y con adecuada calidad de fruta, que en principio se ha destinado al mercado doméstico. Recientemente, sin embargo, Colombia ha iniciado la exportación de aguacate a Europa (Holanda) y las Antillas.

Desafortunadamente en Colombia, los cultivos de aguacate son afectados por microorganismos causantes de enfermedades, los cuales reducen considerablemente la productividad agrícola. Entre estos microorganismos, se destaca por su agresividad y las pérdidas económicas que ocasiona el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae* (sin. *Lasiodiplodia theobromae*). *B. theobromae* ocasiona la enfermedad denominada pudrición del pedúnculo, la cual causa pérdidas importantes en el campo y en la poscosecha, al deteriorar la calidad de la fruta. A pesar de ser una enfermedad de aparición reciente, esta adquiere cada vez mayor importancia en viveros, almácigos y en el campo. Además del aguacate, este hongo puede afectar en pre- y poscosecha a más de 280 especies de plantas, incluyendo frutas y plantaciones de árboles, lo que dificulta su control.

Tradicionalmente, el control de la enfermedad se ha realizado mediante la aplicación de pesticidas de síntesis, los cuales debido a su baja especificidad causan efectos adversos al medio ambiente y la salud humana. Adicionalmente, como resultado de la resistencia que ha desarrollado este microorganismo a los fungicidas empleados para su control, se ha hecho necesario la aplicación de dosis más altas y constantes en los cultivos, lo que ha terminado por agravar el problema ambiental y de seguridad

alimenticia, e incrementar los costos de producción. Por lo anterior, se requiere de sustancias nuevas y mejores para combatir este microorganismo, pero para su desarrollo se necesita de un diseño racional de sus estructuras y mecanismos de acción, lo que precisa de un íntimo conocimiento de la bioquímica del patógeno y su interacción con las sustancias empleadas para su control.

Recientemente, uno de los enfoques que más ha llamado la atención de los investigadores es aquel que emplea extractos y/o aceites esenciales de plantas, o sus componentes mayoritarios, para el control de microorganismos causantes de enfermedades. Estos materiales han demostrado una alta actividad antifúngica y se vislumbran actualmente como los nuevos pesticidas bioracionales, particularmente aquellos que son biodegradables y amigables con el ambiente (no tóxicos y específicos en su acción). Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios como mecanismos de defensa químicos contra microorganismos; éstos pueden ser empleados de manera exógena como agentes de control de enfermedades. No obstante existe un problema común en dicha aproximación, y es el hecho de que a pesar de que los productos naturales pueden presentar una actividad comparable o mejor que sus contrapartes sintéticas, pueden ser blanco de enzimas provenientes de los patógenos que pueden reconocerlos como sustratos; estas enzimas pueden cambiar, introducir o quitar funcionalidades químicas que terminan por disminuir el efecto deseado en la(s) molécula(s) inicial(es), inclinando la balanza a favor del patógeno, en la lucha por el control de la enfermedad. Por esto, es bastante útil conocer el tipo de interacción a nivel bioquímico que tienen las moléculas con potencial antifúngico cuando entran en contacto con los microorganismos objeto de estudio, para identificar así la capacidad que pueda tener el patógeno de detoxificarlas. Además, dichos estudios señalarían los blancos metabólicos que deben ser bloqueados de cara a mejorar las perspectivas de aplicación del agente antifúngico potencial.

No obstante la limitación asociada con la detoxificación, los productos naturales también pueden servir como plantillas estructurales interesantes para el desarrollo de nuevas sustancias con características mejoradas, por ejemplo, que presenten actividad antifúngica potenciada, mayor solubilidad, o que sean metabolizadas en menor proporción. En el presente trabajo se estudió previamente la composición química y actividad antifúngica contra el hongo *B. theobromae* de los extractos y los aceites esenciales de las especies *Piper auritum* Kunth y *Piper holtonii* C.DC, fuentes de safrol y apiol. A partir de los extractos bioactivos, se aislaron mediante técnicas cromatográficas ambos fenilpropenos. Posteriormente, para estos metabolitos se evaluó la transformación microbiana por parte del microorganismo. Y por último se prepararon derivados sintéticos de dichos metabolitos y se evaluó su actividad antifúngica contra el hongo *B. theobromae*.

Objetivos

Objetivo general

Realizar la evaluación del metabolismo y la actividad antifúngica de safrol y apiol contra el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*, y preparar algunos derivados sintéticos activos contra este microorganismo.

Objetivos específicos

1. Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas safrol y apiol a partir de fuentes vegetales, y confirmar sus estructuras por métodos espectroscópicos y espectrométricos.
2. Evaluar la toxicidad (expresada como inhibición del crecimiento radial) de los compuestos safrol y apiol contra el hongo *B. theobromae*.
3. Aislar, purificar e identificar algunos productos metabólicos resultantes de la incubación de *B. theobromae* con los compuestos safrol y apiol.
4. Analizar la transformación microbiana en el curso del tiempo (progreso) de safrol y apiol con el hongo *B. theobromae*.
5. Preparar algunos derivados sintéticos mediante reacciones de química orgánica convencionales, y determinar su actividad antifúngica contra *B. theobromae*.

Capítulo 1 Composición química de las especies *Piper auritum* y *Piper holtonii* y actividad antifúngica contra el hongo *Botryodiplodia theobromae*

1.1 Antecedentes

1.1.1 Características del hongo *Botryodiplodia theobromae*

El hongo *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (o *Lasiodiplodia theobromae*) es un parásito omnívoro y saprofito muy común a temperaturas relativamente altas, que se encuentra presente en la flora fungal de lugares tropicales [1].

Este hongo puede ser cultivado *in vitro* en medios sintéticos como el PDA (Papa Dextrosa Agar), para el cual presenta crecimiento micelial sólo en el rango de temperaturas entre 10 °C y 40 °C. En este medio, el rango de temperaturas óptimo para el crecimiento micelial y la esporulación es el comprendido entre 25 °C y 30 °C. En el PDA se presenta la formación de picnidios al sexto día y la pigmentación de la cepa es mayor (75 % negro y 25 % blanco) que en medios como el Medio de Papel Cromatográfico (MPC) (10 % negro y 90 % blanco). Por otra parte, la luz no es esencial en el crecimiento del microorganismo pero sí incrementa su esporulación [2].

B. theobromae es el causante de la pudrición de gran cantidad de frutos y tubérculos cuya enfermedad recibe diversos nombres tales como: Muerte Súbita, Muerte Basal o Secamiento de los cítricos, gomosis, enfermedad peduncular, cáncer negro y muerte negra entre otras.

Entre las especies que son afectadas por este hongo se encuentran los cítricos, cacao, cacahuete, algodón, plátano, banano [3], mango [4], maíz [5], cebolla, ajo, puerro, piña, durazno [6], coco, paprika, ñame, caucho, aguacate, berenjena, té, melón, alcachofa, soja, patata dulce, tabaco, arroz, granadilla gigante, caña de azúcar, zahína, vid, carambola, papaya [7], pera africana, zanahoria, guayaba común [8], entre otros.

▪ Síntomas de la enfermedad

Los síntomas que presentan los frutos afectados con *B. theobromae*, comienzan a presentarse en la unión del injerto, como una necrosis de color café que generalmente avanza en forma descendente y compromete el patrón e impide el paso de agua y nutrientes, por este motivo la copa muere posteriormente. Cuando el hongo no afecta la unión del injerto, causa necrosis de raíces, retraso en el desarrollo, amarillamiento, marchitez y muerte de arbolitos en condiciones de almácigo [9].

Otra característica que llama la atención de los frutos afectados con este hongo es un leve, pero característico, crecimiento micelial blanquecino que se desarrolla en la unión del pedúnculo con el fruto y que posteriormente desarrolla una pudrición interna y blanda de la pulpa, de color café claro u oscuro. Además, en los estados avanzados de la infección, el micelio blanquecino que rodea la inserción del fruto con el pedúnculo se torna de color negro y avanza al interior del fruto, deteriorándolo completamente.

Casi todos los síntomas de la pudrición del fruto por *B. theobromae* en poscosecha son muy parecidos a los que causa el hongo *Rhizopus stolonifer*; sin embargo, se diferencian porque en los ataques por *B. theobromae* hay crecimiento micelial blanquecino en la unión del pedúnculo con el fruto, mientras que en el caso de *R. stolonifer*, el crecimiento micelial es de color gris [9].

Además, este hongo se caracteriza por atacar directamente a las plantas, tanto en tallos como en ramas, produciendo la enfermedad conocida como gomosis, en la cual la planta afectada presenta brotes de una goma marrón-amarillenta en el tronco, y un pardeamiento de los tejidos vasculares. Esta enfermedad lleva a las plantas frutales a la disminución de su productividad e incluso a la muerte [4].

▪ Incidencia y pérdidas por la enfermedad

El hongo *B. theobromae* se caracteriza por atacar un amplio rango de cultivos, especialmente en la etapa de poscosecha, pero debido a que las enfermedades en esta etapa son causadas muchas veces por asociaciones complejas de patógenos, es difícil cuantificar el impacto económico de este hongo en particular. Sin embargo en un estudio con plantas de Yute en Pakistán, se lograron aislar e identificar los principales microorganismos causantes de la marchitez de esta especie. Dentro de ellos se encontró que *B. theobromae* causaba la muerte del 48 % de las plántulas de Yute, sólo superado por *Glomerella cingulata* con un 57 % [10].

En Costa Rica, la pudrición del pedúnculo causada por *Botryodiplodia theobromae* es también la segunda causa de pérdidas poscosecha en mango con valores de incidencia que oscilan entre 7,2 y 10,4 % [11].

En nuestro país, el secamiento descendente o necrosis del injerto causado por *B. theobromae* es una enfermedad muy frecuente en almácigos de aguacate en los departamentos de Antioquia, Caldas, Cundinamarca, Magdalena y Valle del Cauca.

Este organismo se encuentra frecuentemente en viveros, ya que pudre las raíces y provoca retraso en el desarrollo de los arbolitos. También se ha detectado en ataques poscosecha de frutos de aguacate en el departamento de Antioquia [9].

▪ Control químico de la enfermedad

Para el control de las enfermedades producidas por el hongo *B. theobromae* en plantaciones comerciales de frutas, las principales herramientas utilizadas son los fungicidas sintéticos. Por ejemplo, en las cadenas productivas de aguacate en Colombia se recomienda tratar la semilla con hipoclorito de calcio al 40 % (1,5 mL/L) durante 15 min, con posterior inmersión durante igual período de tiempo en un producto a base de Carboxin/Captan (Vitavax-300 de 2 a 6 g/L), a fin de prevenir posibles pudriciones o la manifestación del hongo en el semillero o almácigo. Además, y debido a que este patógeno es endófito, se recomienda realizar aspersiones tanto en condiciones de almácigo como poscosecha con fungicidas a base de oxiclورو de cobre (Oxiclor-35 WP a 2 g/L), hidróxido cúprico (Kocide-101 a 2 g/L), Benomil (Benlate-WP o Bezil-50 WP a 0,5 g/L), metil tiofanato (Topsin-M 50 SC a 1 mL/L), Carbendazim (Derosal 500 SC de 0,75 a 1,25 mL/L o Bavistin-500 SC a 0,5 mL/L), Tiabendazol (Mertect-500 SC a 1 mL/L) o Prochloraz (Mirage-45 EC a 0,5 mL/L o Sportak-45 EC a 0,5 mL/L o Octave-50 WP a 0,5 g/L) [9].

Otro de los cultivos que son ampliamente afectados por este patógeno son los de mango (*Mangifera indica* L.); para el cual, en países como Pakistan se ha optado por tratamientos como el de poner en cuarentena los frutos poscosecha con agua caliente; e incluso se ha ensayado un tratamiento combinado entre fungicidas comerciales y agua caliente, el cual ha dado muy buenos resultados. [12]

Además de la utilización de estos fungicidas de origen sintético en las producciones frutales, tanto pre- como poscosecha, también se han realizado ensayos *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de analizar la capacidad antifúngica de varios de ellos contra este patógeno en particular. Algunos de los componentes activos que han sido explorados son el Carbendazim, Metil Tiofanato y Alliete; pero solo los dos primeros resultan efectivos para el control del microorganismo *in vitro* a bajas concentraciones e *in vivo* mediante la técnica de rociado. Otros fungicidas como Copxykil, Cuprocaffaro y Thiovit son inefectivos para el control de este hongo, pues no generan disminución de su crecimiento *in vitro* ni decaimiento de la incidencia de la enfermedad *in vivo* [13].

Otros estudios se han realizados con el grupo de fungicidas conocidos como metil benzimidazol carbamatos (MBC), dentro de los cuales se encuentran el Benomil y Tiabendazol; y también con el grupo conocido como los inhibidores de la desmetilación del esteroles (DMI) (ó inhibidores de la biosíntesis de ergosterol), dentro de los que se encuentran el Imazalil, Prochloraz y Tebuconazol. Para todos estos fungicidas se analizó la actividad *in vitro* sobre una población de 120 cepas de *B. theobromae* aisladas de papayas brasileras, la cual se reportó mediante los valores

de concentración efectiva 50 (CE_{50}). Los resultados mostraron que el 8,4 % de las cepas analizadas con los MBC fueron no susceptibles; es decir, no presentaron disminución del crecimiento a concentraciones analizadas ($CE_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). Para el restante 91,6 %, los valores de CE_{50} fueron de 0,083 $\mu\text{g/mL}$ y 0,765 $\mu\text{g/mL}$ para el Benomil y Tiabendazol, respectivamente. Por otro lado, para los DMIs los valores de CE_{50} fueron de 0,63 $\mu\text{g/mL}$; 0,20 $\mu\text{g/mL}$ y 0,49 $\mu\text{g/mL}$ para imazalil, prochloraz y tebuconazole, respectivamente, en las cepas susceptibles. En las cepas menos susceptibles, los valores fueron significativamente mayores con CE_{50} de 1,74 $\mu\text{g/mL}$ para Imazalil, 0,60 $\mu\text{g/mL}$ para Prochloraz y 1,18 $\mu\text{g/mL}$ para el Tebuconazol. La aparición de estas cepas no susceptibles, principalmente contra los MBCs, es adjudicado a un fenómeno de resistencia cruzada debido a que en estos cultivos de papaya son empleados otros fungicidas del tipo MBC, diferentes a estos tres (por ejemplo el metil tiofanato), con el objetivo de controlar otros patógenos como *Asperisporium caricae* y *Oidium caricae* [7].

Sin embargo, debido a la necesidad de buscar alternativas un poco más amigables con el ambiente que los fungicidas sintéticos comerciales de uso tradicional, existen investigaciones en las que se explora el uso de extractos vegetales, aceites esenciales y metabolitos secundarios de plantas y frutas, para tratar de controlar el crecimiento micelial del hongo *B. theobromae*. Por ejemplo, hay estudios de la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial del fruto de *Illicium verum* y de su componente mayoritario *trans*-anetol (89,5 %), los cuales presentaron una Concentración Inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial (CI_{50}) de 110 $\mu\text{g/mL}$ para el aceite y 90 $\mu\text{g/mL}$ para el *trans*-anetol. Además, se analizó también la inhibición debida al contacto con los vapores de ambos, para los cuales se encontraron porcentajes de inhibición de 68,20 % para el aceite y 83,04 % para el *trans*-anetol a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, y CI_{50} de 340 $\mu\text{g/mL}$ y 270 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La cercanía de los valores de inhibición para el aceite y el *trans*-anetol, sugieren que éste es el principal componente activo en la mezcla; y la buena actividad antifúngica de los vapores del aceite, así como los de su componente mayoritario, indican que éstos podrían ser utilizados como fumigantes en ensayos de campo para el control del ataque poscosecha del hongo *B. theobromae* [14].

Reportes similares se han hecho con extractos crudos de tallos de las especies *Cinnamomum zeylanicum* y *Syzygium aromaticum*, ricas en metabolitos secundarios como el eugenol, cinamaldehído, ácido cinámico, entre otros. Para dichos extractos se determinaron valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) contra el hongo *B. theobromae* de 1,2 $\mu\text{g/mL}$ para la especie *C. zeylanicum* y 7,8 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aromaticum* [15]. Estudios similares fueron hechos con los aceites esenciales de 18 especies colectadas en Sudáfrica, dentro de las que se encuentran *C. zeylanicum* y *S. aromaticum*. Para estos aceites se encontraron valores muy bajos de CMI en el hongo *B. theobromae* aislado de aguacate, 1,0 $\mu\text{g/mL}$ y 2,0 $\mu\text{g/mL}$ para *C. zeylanicum*, *S. aromaticum*, respectivamente; y para *B. theobromae* aislado de mango los valores

fueron de 0,5 µg/mL y 3,0 µg/mL para *C. zeylanicum*, *S. aromaticum*, respectivamente [16].

Una característica en común que tienen las especies utilizadas con estos fines, es su riqueza en metabolitos secundarios de bajo peso molecular, y por lo general constituyentes volátiles en los aceites esenciales. Dentro de estos se encuentran los terpenos oxigenados (linalool, geraniol, entre otros) y algunos fenilpropanoides (timol, carvacrol, *cis* y *trans*-anetol, cinamaldehído, eugenol, isoeugenol, alcohol cinámico, entre otros). Para la mayoría de estas moléculas se ha reportado actividad antifúngica tanto para dermatofitos como para hongos fitopatógenos.

1.1.2 Fitoquímica y bioactividad del género *Piper*

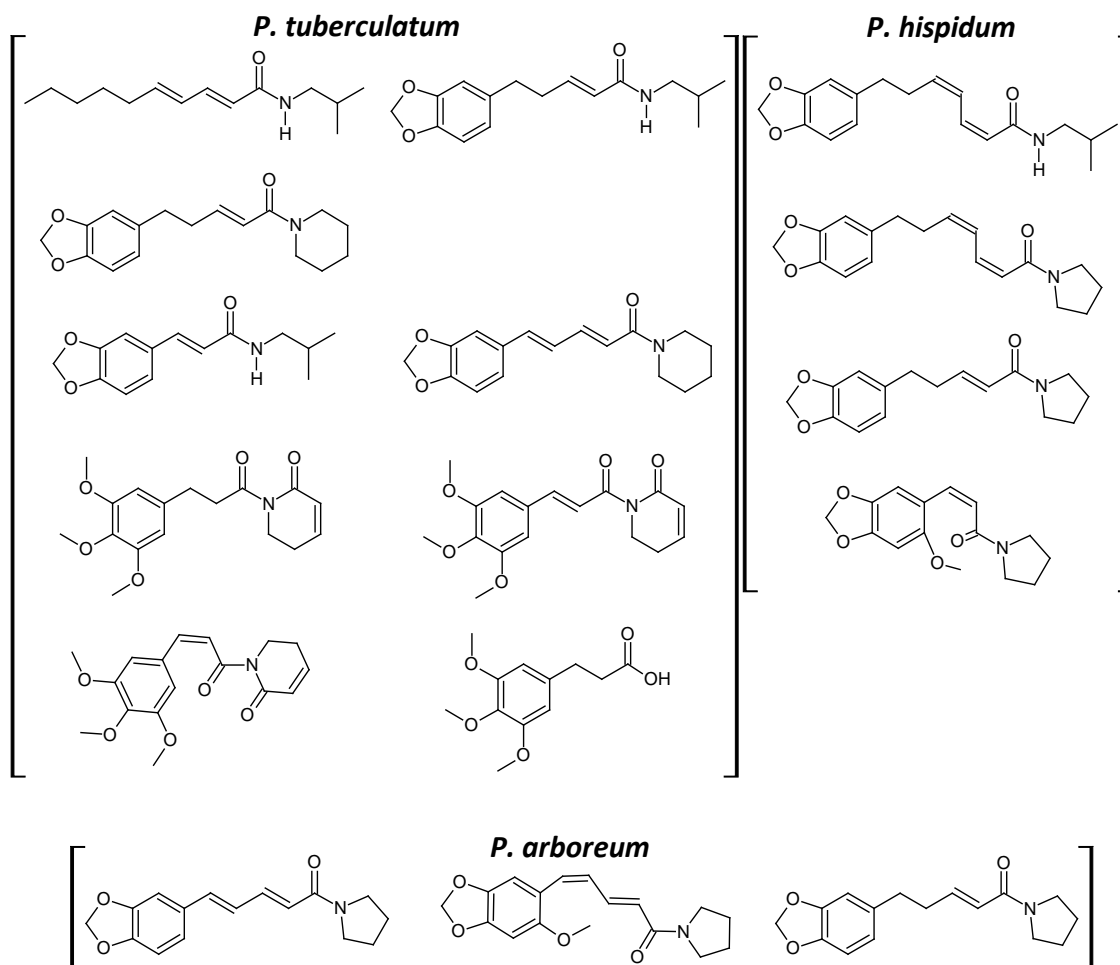
El género *Piper*, perteneciente a la familia de las Piperáceas, contiene cerca de 1000 especies distribuidas en los dos hemisferios (regiones tropicales y subtropicales), y cuyos extractos y aceites esenciales se han empleado tradicionalmente alrededor de todo el mundo con usos diversos, tales como: repelente de insectos, antiinflamatorio, antídoto contra el veneno de serpientes, en el tratamiento para la fiebre, el asma, bronquitis, dolor abdominal, afección de los hemorroides, entre otros.

Por lo general, estos usos tradicionales están directamente relacionados con la presencia de metabolitos secundarios (o conjuntos de éstos) que se consideran responsables de dicha bioactividad. Ejemplos de ello son las especies ricas en terpenos de bajo peso molecular o de fenilpropanoides, las cuales tienen actividades antifúngica y/o antimicrobiana características [17,18].

De todas las especies de *Piper* conocidas (ca. 1000), solo se ha investigado la fitoquímica de alrededor del 10 % de ellas. De estas 112 especies, se han aislado metabolitos secundarios en todas las partes de la planta, incluyendo hojas, tallos, raíces e inflorescencias. Dichos metabolitos suman alrededor de 667 compuestos diferentes que se distribuyen aproximadamente en: 190 alcaloides/amidas, 49 lignanos, 70 neolignanos, 97 terpenos, 39 fenilpropanoides, 15 esteroides, 18 kavapironas, 17 chalconas/dihidrochalconas, 16 flavonas, 6 flavanonas, 4 piperolidos (cinamilidón butenólidos) y 146 compuestos diversos que no encajan en los grupos mayores de metabolitos secundarios [19,20].

Los compuestos más representativos de este género de plantas son las *Piper*-amidas, las cuales no solo se reconocen por su toxicidad y efectos sinérgicos en la actividad insecticida, sino que también tienen un carácter antifúngico importante. Por ejemplo, se han realizados estudios en los que se ensaya la actividad antifúngica de amidas aisladas de *Piper hispidum*, *P. arboreum* y *P. tuberculatum*, contra *Cladosporium sphaerospermum* y *C. cladosporioides* (Figura 1-1), encontrándose valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,1 mg/L, menores que para el control positivo utilizado nistatina (CMI 0,5 mg/L) [21,22].

Figura 1-1: Piper-amidas aisladas de las especies *Piper tuberculatum*, *P. hispidum* y *P. arboreum*; en paréntesis se muestran los valores de CMI en mg/L. Imagen tomada de *Chemistry and evolution of the Piperaceae* [20].

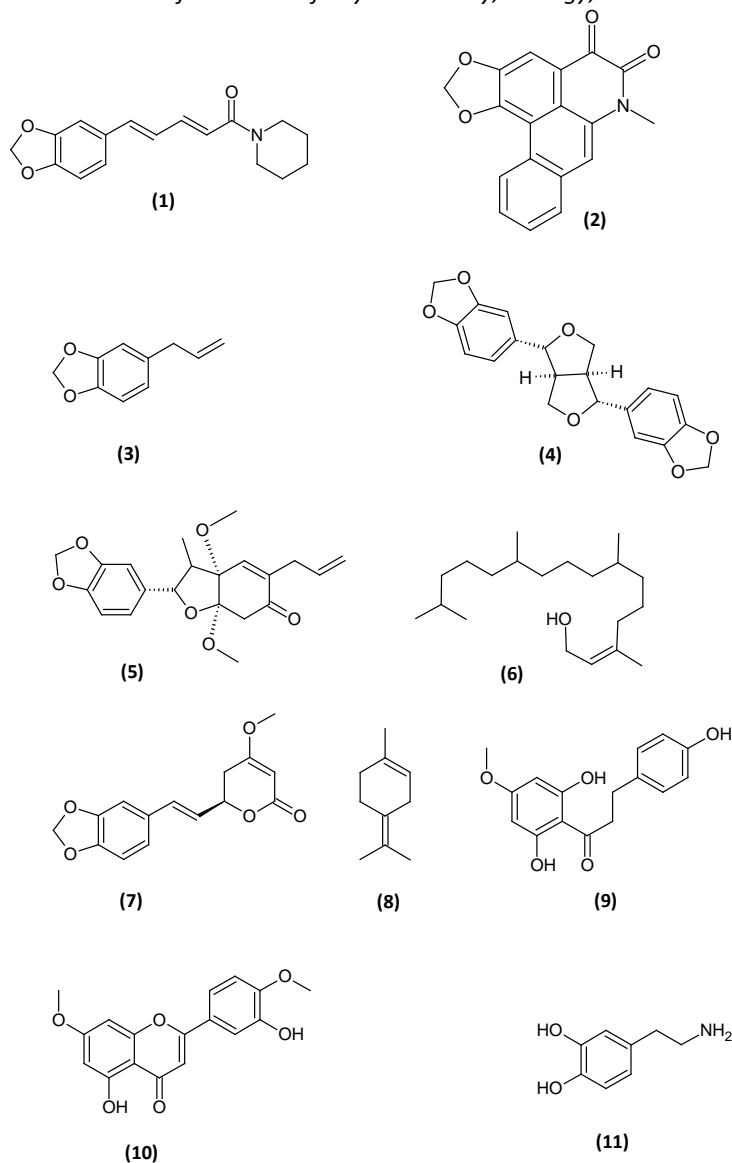


Dentro de las Piper-amidas más importantes se encuentra la piperina (**1**) (Figura 1-2), que constituye el principio activo picante de la pimienta negra (*Piper nigrum*), y para la cual se han publicado reportes en los que se resaltan sus cualidades insecticidas, molusquicidas y antifúngicas [23,24].

Otro tipo importante de compuestos que resaltan en este género de plantas son los fenilpropanoides¹, estructuras simples como lo son el safrol, eugenol, miristicina, dillapiol, entre otros que derivan compuestos que se encuentran también en otro tipo de plantas. Por ejemplo, el safrol (**3**), componente mayoritario del aceite esencial de varias Piperáceas, entre ellas *Piper hispidinervium* (83-93 %) [25], puede actuar sinérgicamente con otros compuestos presentes en la planta incrementando así su actividad biológica. Además, el piperonil butóxido, un conocido sinergista tanto en insecticidas comerciales [26], como en fungicidas [27], es un derivado del safrol.

¹ Llamados también propenilbencenos

Figura 1-2: Ejemplos de los tipos representativos de compuestos encontrados en las *Piper* spp.: *Amidas*: piperina **(1)** y cefaradiona A **(2)**; *Fenilpropanoide*: safrol **(3)**; *Lignano*: sesamina **(4)**; *Neolignano*: kadsurín **(5)**; *Terpenos*: *trans* fitol **(6)** y terpinoleno **(8)**; *Kavapirona*: metisticina **(7)**; *Dihidrochalcona*: asebogenina **(9)**; *Flavona*: 7,4'-dimetoxi-5,3'-dihidroxi-flavona **(10)**; *Otros*: dopamina **(11)**. Imagen tomada de: *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution* [24].



Otra familia importante de compuestos producidos por plantas del género *Piper* mediante la ruta biosintética de los fenilpropanoides son los lignanos y neolignanos. Por ejemplo, el lignano sesamina **(4)** es bien conocido por servir como sinergista o activador al combinarse con insecticidas a base de piretrina, potencializando su actividad y permitiendo disminuir la cantidad necesaria para producir una mortalidad del 100 % en moscas caseras [28]. También el neolignano kadsurín **(5)**, se caracteriza por inhibir la unión de las plaquetas a los sitios receptores en el plasma sanguíneo [29].

Una serie de compuestos muy exclusivos de este género de plantas como son las kavapironas o kavalactonas **(7)**, llamadas así por ser aisladas de la Kava², una planta nativa de islas del pacífico sur, donde históricamente se utiliza para conciliar el sueño y combatir la fatiga. Sin embargo, la FDA³ alerta que su consumo puede producir daños severos en el hígado, lo que genera un amarillamiento de la piel, entre otros síntomas [30].

Adicionalmente, hay otro resto de compuestos de baja polaridad presentes en buena parte de las plantas del género *Piper*, algunos de ellos provenientes de la ruta del ácido shikímico como el safrol, apiol, miristicina, eugenol, etc.; y otros provenientes de la ruta del ácido mevalónico como alcanfor, linalool y α -pineno (monoterpenos); guaicol (sesquiterpeno); y colesterol y sitosterol (esteroides) [24].

▪ *Piper auritum*

La especie *Piper auritum* es conocida con nombres tradicionales como Acullo cimarrón⁴, falsa Kava⁵, Anisillo⁶, Hierba santa⁴, Hoja santa⁴, Santilla de comer⁴, Hoja de anís⁴, Santa María de Anís⁷, entre otros. Es un arbusto de hasta 3 m de altura, cuyo tallo posee nudos ensanchados, separados entre 10-15 cm, lenticelados y de color morado; envés claro y nervadura principal color mostaza y prominente; flores en amentos colgantes algunos y otros erectos hasta con 30 cm de largo.

Esta especie se encuentra distribuida principalmente en zonas tropicales y subtropicales, como se puede observar en el modelo de nicho para esta especie (Figura 1-3). Este modelo se generó a partir de una base de datos que contiene los reportes de avistamientos de esta especie a lo largo de todo el mundo, y por medio de una serie de algoritmos⁸ que tienen en cuenta las condiciones tanto bio-geográficas como climáticas de los sitios donde se reporta la especie, para realizar estimaciones de las posibles zonas con mayor probabilidad de ocurrencia. En la Tabla 1-1 se muestra la clasificación taxonómica de la especie *Piper auritum*.

Dentro de los muchos usos tradicionales que se le han dado a esta planta, que van desde condimento en la cocina en algunas partes de México hasta la fuma de sus hojas machacadas al estilo del cannabis en Belice, resalta por ejemplo su uso por parte de comunidades indígenas de los jugos de hojas machacadas para prevenir la malaria y remover piojos y garrapatas [31], lo que indica sus cualidades como repelente de insectos.

² También conocida como kava-kava, nombres comunes de la *Piper methysticum*

³ Administración de Alimentos y Drogas de los EE.UU. (U.S. Food and Drug Administration)

⁴ Nombre tradicional en México

⁵ Nombre común en Hawaii

⁶ Nombre común en Caldas y Quindío, Colombia

⁷ Nombre común en la zona pacífica colombiana

⁸ Este modelamiento se lleva a cabo en el software de uso libre OpenModeller

Figura 1-3: Modelo de nicho para la especie *Piper auritum* que representa las zonas de alta y baja probabilidad de ocurrencia de esta especie [32].

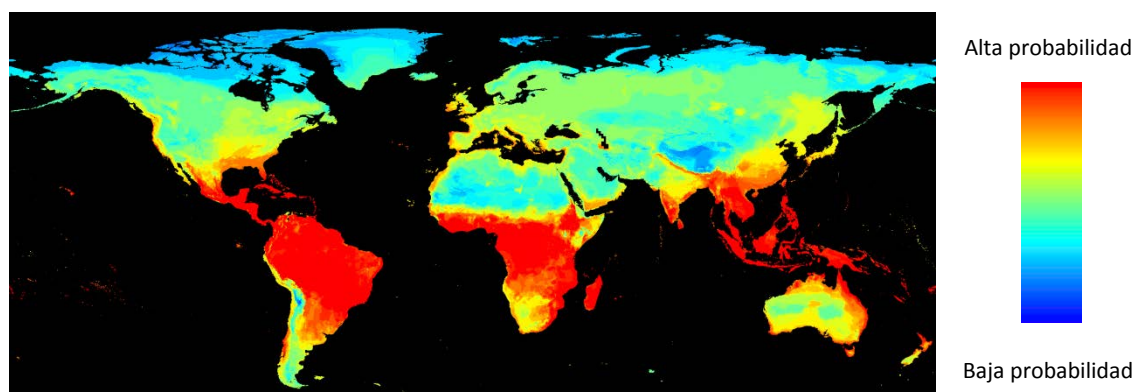


Tabla 1-1: Clasificación Taxonómica de la especie *Piper auritum* Kunth.


Nombre Científico	<i>Piper auritum</i>	
Reino	Plantae	
Filo	Magnoliophita	
Clase	Magnoliopsida	
Orden	Piperales	
Familia	Piperaceae	
Género	<i>Piper</i>	
Epíteto Específico	<i>auritum</i>	
Autor Epíteto Específico	Kunth	

Imagen del autor

La composición química de esta especie ha sido estudiada en varios países; principalmente, se ha investigado la constitución del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la planta (ca. 0,71 %) mediante destilación por arrastre de vapor, y del cual el safrol es el componente mayoritario, en proporciones que pueden variar entre 70 y 94 % [33-35].

▪ *Piper holtonii*

La *Piper holtonii*, conocida como raicillo⁹ o cordoncillo¹⁰, es una especie del género *Piper* un poco menos conocida (ver taxonomía en la Tabla 1-2), que se encuentra distribuida principalmente en zonas tropicales y ha sido reportada principalmente en Centroamérica y Colombia (Figura 1-4). A pesar de que la fitoquímica de esta planta ha sido poco estudiada, algunos reportes muestran que posee una isobutil amida del ácido 5-(3',4'-metilendioxfenil)-2*E*,4*E*- pentadienónico (una *Piper*-amida) [36].

⁹ Nombre común en el departamento de Antioquia, Colombia.

¹⁰ Nombre común en los departamentos de Antioquia y Santander, Colombia.

Desde el punto de vista de la actividad biológica, se ha reportado que el extracto etanólico de las partes aéreas de esta planta mostró actividad *in vitro* contra el parásito *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria [37]; e incluso, un análisis de las fracciones de diferentes polaridades muestra que el extracto de diclorometano posee actividad contra promastigotes de *Leishmania panamensis*, a pesar de ser también citotóxico y poco selectivo en ensayos con macrófagos murinos. Además, la actividad de esta especie también se reporta contra hongos como *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*, con valores de CMI de 500 µg/mL [38].

Figura 1-4: Modelo de nicho para la especie *Piper holtonii* que representa las zonas de alta y baja probabilidad de ocurrencia de esta especie [39].

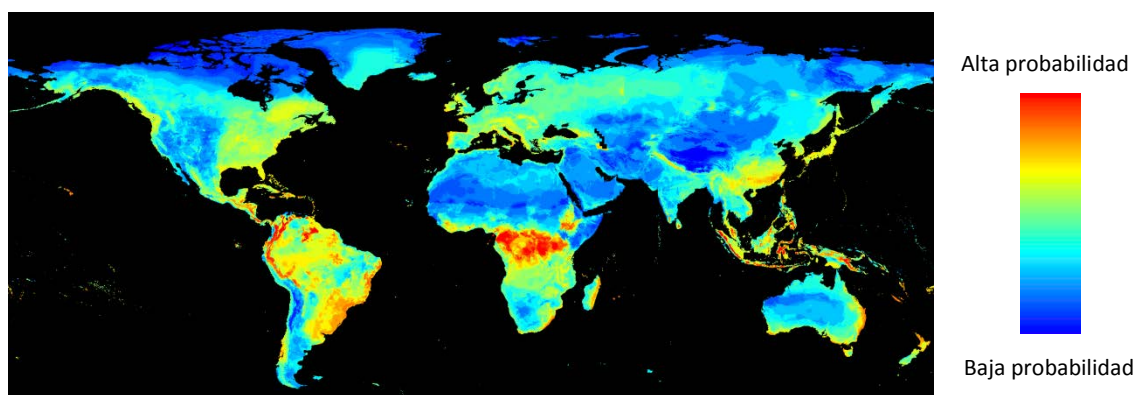



Tabla 1-2: Clasificación taxonómica de la especie *Piper holtonii* C. DC. Imagen propia

Nombre Científico	<i>Piper holtonii</i>		
Reino	Plantae		
Filo	Magnoliophita		
Clase	Magnoliopsida		
Orden	Piperales		
Familia	Piperaceae		
Género	<i>Piper</i>		
Epíteto Específico	<i>holtonii</i>		
Autor	Epíteto	C.DC.	
Específico			
Imagen del autor			

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Materiales y equipos

Para la purificación de los distintos compuestos se utilizaron columnas cromatográficas de vidrio con llave de teflón rellenas de sílica gel 60 (0,040-0,063 mm; Merck) ó Sephadex LH-20. El seguimiento de los compuestos se hizo mediante cromatografía de capa delgada (CCD) en placas de aluminio con fase estacionaria de sílica gel (Si 60 F₂₅₄, 0,25 mm, Merk), eluídas con mezclas de n-hexano:acetato de etilo (AcOEt) y visualizadas mediante radiación UV (254 nm y 365 nm) y/o por aspersion con ácido acético:ácido sulfúrico:agua (143:28:30) y posterior calentamiento. Los solventes empleados para la obtención de los extractos fueron de uso comercial, pero purificados mediante bidestilación.

Todos los procesos de inoculación del microorganismo se llevaron a cabo asépticamente dentro de una cabina de flujo laminar (o cabina de seguridad biológica CSB 180 A) clase II tipo A; utilizando para ello materiales esterilizados en un autoclave horizontal automático (marca Centricol AUA 80 L).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y carbono (¹³C-RMN) se tomaron en cloroformo deuterado (CDCl₃) (marca MERK) en un espectrómetro Bruker AMX 300 (300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C). Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en unidades de ppm tomando como referencia la señal del cloroformo a 7,26 ppm en los ¹H-RMN y a 77,0 ppm en los ¹³C-RMN; y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz (Hz).

La cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (CG-EM), se realizó en un equipo Hewlett-Packard 6890 (Agilent Technologies) equipado con un detector selectivo de masas del tipo cuadrupolo (HP 5973 MSD), y una columna capilar modelo Zebrón ZB 35 (longitud: 30 m, espesor de la película: 0,25 μ m, diámetro interno: 0,25 mm).

1.2.2 Material vegetal

El material vegetal utilizado (hojas, tallos e inflorescencias) de las especies *Piper holtonii* (Ph) y *Piper auritum* (Pa) se recolectó en el campus de la Universidad Nacional de Colombia en Medellín (6°15'N/75°34'O) en el mes de Octubre de 2010. Ambas especies fueron identificadas por el Dr. R. Callejas de la Universidad de Antioquia, Colombia. Un *voucher* de las especies (*P. holtonii*, código de barras COL000000706, número del catálogo 407594, número de colección 06355; *P. auritum*, código de barras COL000007171, número de catálogo 494711, número de colección 569) se depositó en el herbario "Gabriel Gutiérrez V."-Medel de la Universidad Nacional de Colombia (Medellín).

1.2.3 Obtención de los extractos

Se realizó una extracción de los metabolitos presentes en las partes aéreas de la planta por percolación con distintos solventes en orden creciente de polaridad: hexano (H), diclorometano (D), acetato de etilo (A) y metanol (M). Para esta extracción, 500 g del material vegetal se dejaron en contacto con 1,0 L de cada uno de los solventes, de manera sucesiva de acuerdo con su polaridad, durante 7 días y a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo estipulado para cada solvente, éste se separó del material y se concentró por rotaevaporación a presión reducida y a temperaturas no mayores a 43 °C. Cada extracto obtenido se almacenó en la oscuridad y a temperatura de 4 °C, en viales sellados y debidamente rotulados.

1.2.4 Obtención de los aceites esenciales (AE)

Para la obtención de los aceites esenciales se sometieron 500 g del material vegetal a hidrodestilación durante 3 h, condensándose distintos volúmenes de agua con cada aceite disperso en ella. Luego, se saturó la fase acuosa con cloruro de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 mL). La fase orgánica obtenida se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida a temperaturas no mayores a 40 °C. Por último, los aceites se almacenaron a 4 °C y al resguardo de la luz, para posterior análisis y purificación de los componentes mayoritarios.

1.2.5 Caracterización química de aceites y extractos

La determinación de la composición de aceites y extractos mediante cromatografía gaseosa con detector de masas (CG-EM) se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura del horno de 50 °C a 300 °C a razón de 5 °C/min manteniendo luego en una isoterma durante 10 min; temperatura del inyector 175 °C; temperatura del detector 250 °C; gas de arrastre, He con un flujo constante de 1.0 mL/min y velocidad promedio de 36 cm/s; volumen de inyección, 3 µL de la muestra (10 mg de cada aceite disuelto en 1.0 mL de CHCl₃) en modo splitless; el tiempo de corrida fue de 30 min. Los espectros de masas de ionización electrónica (EM-IE) se obtuvieron a 70 eV de energía electrónica, y las razones de masa/carga (m/z) monitoreadas de 30 a 400; las temperaturas de la fuente iónica y del analizador de cuadrupolo se fijaron en 250 °C y 150 °C, respectivamente. El voltaje del multiplicador de electrones se mantuvo en 1700 V. Los espectros de masa individuales fueron analizados para determinar la identidad de cada componente por comparación con fragmentogramas de bases de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de los EEUU. (NIST por sus siglas en inglés); y la composición relativa se determinó a partir del área relativa de cada pico respecto al área total de los picos integrados.

1.2.6 Aislamiento, purificación e identificación de los componentes mayoritarios

Para cada una de las especies vegetales se purificó e identificó el componente mayoritario presente en el respectivo aceite esencial. La purificación de ambos componentes se realizó mediante sucesivas cromatografías de columna en fase normal; los metabolitos se encontraron en las primeras fracciones, eluidas desde la columna cromatográfica empleando *n*-hexano como fase móvil. Una vez purificados los componentes mayoritarios, se identificaron mediante resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) y de carbono 13 ($^{13}\text{C-RMN}$), y con ayuda de los fragmentogramas obtenidos del análisis cromatográfico empleando el detector de espectrometría de masas.

1.2.7 Microorganismos

La cepa del patógeno utilizado se obtuvo de frutos comerciales de aguacate infectados, y adquiridos en las distribuidoras comerciales de la ciudad de Medellín. La identificación se realizó mediante características morfológicas, y empleando la prueba de Koch, en los laboratorios de Fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, confirmando que se trataba de la especie *Botryodiplodia theobromae*.

1.2.8 Evaluaciones de actividad antifúngica *in vitro*

Las medidas de actividad antifúngica de los extractos, aceites esenciales y componentes mayoritarios contra el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae* se llevaron a cabo en el medio de cultivo PDA (agar papa-dextrosa) mediante la metodología del agar envenenado [40], con algunas modificaciones. Las sustancias exógenas se incorporaron al agar disueltas al 2 % en etanol absoluto (concentración final de etanol en el medio < 2 mL por litro de medio) y se midió su bioactividad a diferentes concentraciones de muestra. Luego, se inoculó el microorganismo en la parte central de cada caja Petri mediante círculos de agar con micelio de 7 mm de diámetro (con la ayuda de un sacabocados del mismo diámetro), con una cepa del hongo cultivada con 48 h de anticipación. Por último, se midió el diámetro del hongo cada 12 h y durante un periodo de 96 h; los resultados se presentan en términos del crecimiento micelial en mm y como porcentajes de inhibición, mediante la comparación de los diámetros de crecimiento de los tratamientos y el control negativo (Ecuación 1-1), el cual contenía el hongo inoculado en el medio tratado solo con agua destilada (blanco absoluto). Adicionalmente se realizó otro control con el solvente utilizado (etanol al 2 %) para comprobar que éste no ocasionara inhibición sobre el hongo, arrojando falsos positivos (control solvente). Además se empleó

también Carbendazim a 50 mg/L el cual garantizó inhibición total del crecimiento micelial del microorganismo (control positivo).

Ecuación 1-1: % de Inhibición expresado en términos de DPBN (diámetro promedio del blanco negativo) y DPX (Diámetro promedio a la concentración X)

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{DPBN - DPX}{DPBN} \times 100 \%$$

Los ensayos se realizaron a concentraciones de 400 µg/mL para los extractos y aceites esenciales. Luego, para los materiales que presentaron mayor actividad (extractos hexánicos, aceites esenciales y/o componentes mayoritarios) se evaluaron a niveles entre 125 y 750 µg/mL y entre 250 y 1750 µg/mL para el safrol en especial.

1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Rendimiento de los procesos de extracción

Con el objetivo de determinar la actividad de la mayoría de los metabolitos presentes en ambas especies de *Piper*, se obtuvieron mediante percolación cuatro fracciones en orden creciente de polaridad de solvente. Adicionalmente, se obtuvieron los aceites esenciales mediante hidrodestilación de las partes aéreas de cada especie. En la Tabla 1-3 se representan los rendimientos de extracción con base en 500 g de material fresco de ambas especies.

Tabla 1-3: Porcentajes de rendimiento de extracción con base en 500 g de material fresco de *Piper auritum* y *Piper holtonii*.

Extracto/Aceite esencial	<i>Piper auritum</i>		<i>Piper holtonii</i>	
	Producto crudo g	Rendimiento ^a %	Producto crudo g	Rendimiento ^a %
<i>n</i> -Hexano	2,10	0,420	1,41	0,281
Diclorometano	2,29	0,457	1,87	0,374
Acetato de etilo	1,11	0,222	3,24	0,647
Metanol	1,25	0,250	9,46	1,89
Aceite esencial	1,140	0,228	0,500	0,100

^a(%) = (masa cruda/500 g) × 100

Para todos los solventes utilizados, la especie *Piper auritum* presentó los mayores porcentajes de extracción, lo que refleja que esta especie posee mayor cantidad de metabolitos secundarios por gramo de material que *Piper holtonii*.

El porcentaje en masa de aceite esencial obtenido en la especie *P. auritum* (0,228 %) difiere de resultados reportados por otros autores para esta misma especie colectada en Panamá [33]. En dicho trabajo, los autores reportan un porcentaje del 0,71 % para el aceite esencial obtenido por arrastre con vapor de agua. También se reportan porcentajes del 2,3 % para la extracción, mediante hidrodestilación asistida por radiación microondas (MWHD) en un aparato tipo *Clevenger*, de las hojas secas e inflorescencias de esta especie colectada en la costa norte colombiana [34]. Estas aparentes diferencias pueden deberse a condiciones edáficas diferentes en cada región, a diferencias en los periodos de recolección o a los disímiles métodos de extracción utilizados para la obtención del aceite [41,42].

1.3.2 Actividad de extractos y aceites contra el hongo *Botryodiplodia theobromae*

Los resultados de los análisis de actividad contra el hongo *Botryodiplodia theobromae* se reportan en términos de las curvas de crecimiento radial del hongo inhibido por las diferentes sustancias, en comparación con los controles (Figura 1-5).

Para ambas especies se observó que la fracción hidrofóbica (extracto hexánico) fue la más activa, con porcentajes de inhibición de 62,8 y 24,7 % para *P. holtonii* y *P. auritum* respectivamente; Por otra parte, los metabolitos secundarios de la fracción polar (extracto metanólico) no presentaron una inhibición significativa del patógeno a la concentración testada, puesto que el crecimiento fue similar al de los controles negativos (absoluto y solvente). Esto indica que los compuestos responsables de la actividad inhibitoria del crecimiento radial del hongo corresponden a los metabolitos secundarios de carácter poco polar, entre los que podrían encontrarse terpenos, esteroides, ácidos grasos, entre otros.

Además, los ensayos de actividad de las fracciones más activas mostraron una dependencia directa de la inhibición del crecimiento con la concentración del extracto (Figura 1-6). Sin embargo, se observó que el extracto que exhibió la mejor actividad corresponde a la fracción hexánica de la especie *P. holtonii* (EHPh), para la cual se determinó una concentración Inhibitoria del 50 % del crecimiento radial del hongo (CI_{50}) de 126 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 72 h; mientras que para el extracto hexánico de la *P. auritum* (EHPa) este valor fue de 541 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En las evaluaciones de actividad con los aceites esenciales de ambas especies (Figura 1-7), se encontró una inhibición mayor que la de los respectivos extractos hexánicos. El aceite esencial de *P. holtonii* (AEPH) a concentraciones de 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alcanzó una inhibición del 100 % durante todo el tiempo de evaluación; mientras que el aceite esencial de *P. auritum* (AEPa) presentó inhibiciones similares a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante las primeras 60 h de ensayo. La actividad encontrada para estos aceites fue relativamente alta para ambas especies, hecho que en muchos casos se atribuye al tipo de compuestos que generalmente hacen parte de estos aceites, dentro de los

que se encuentran terpenos de bajo peso molecular y algunos fenilpropanoides. Se sabe que dichos compuestos pueden actuar activamente contra hongos ya sea de forma individual o en conjunto, gracias a la sinergia existente entre algunos de ellos [16,43,44].

La actividad encontrada en todos los casos fue sólo fungistática; es decir, que el crecimiento del hongo era retraído solo durante cierto tiempo. Esto se pudo comprobar trasladando el disco de 8 mm de diámetro con el inóculo del hongo, al final de los ensayos donde hubo 100 % de inhibición, a cajas con PDA fresco; para lo cual se observó un crecimiento radial del hongo similar al de los controles negativos.

Figura 1-5: Crecimiento micelial (barras) de *B. theobromae* y % de inhibición (líneas y símbolos) de extractos de diferente polaridad de *P. auritum* (arriba) y *P. holtonii* (abajo) a 400 mg/L.. Columnas que comparten letras iguales no poseen diferencias significativas según el test LSD (Least Significant Difference) de Fisher (P<0,05).

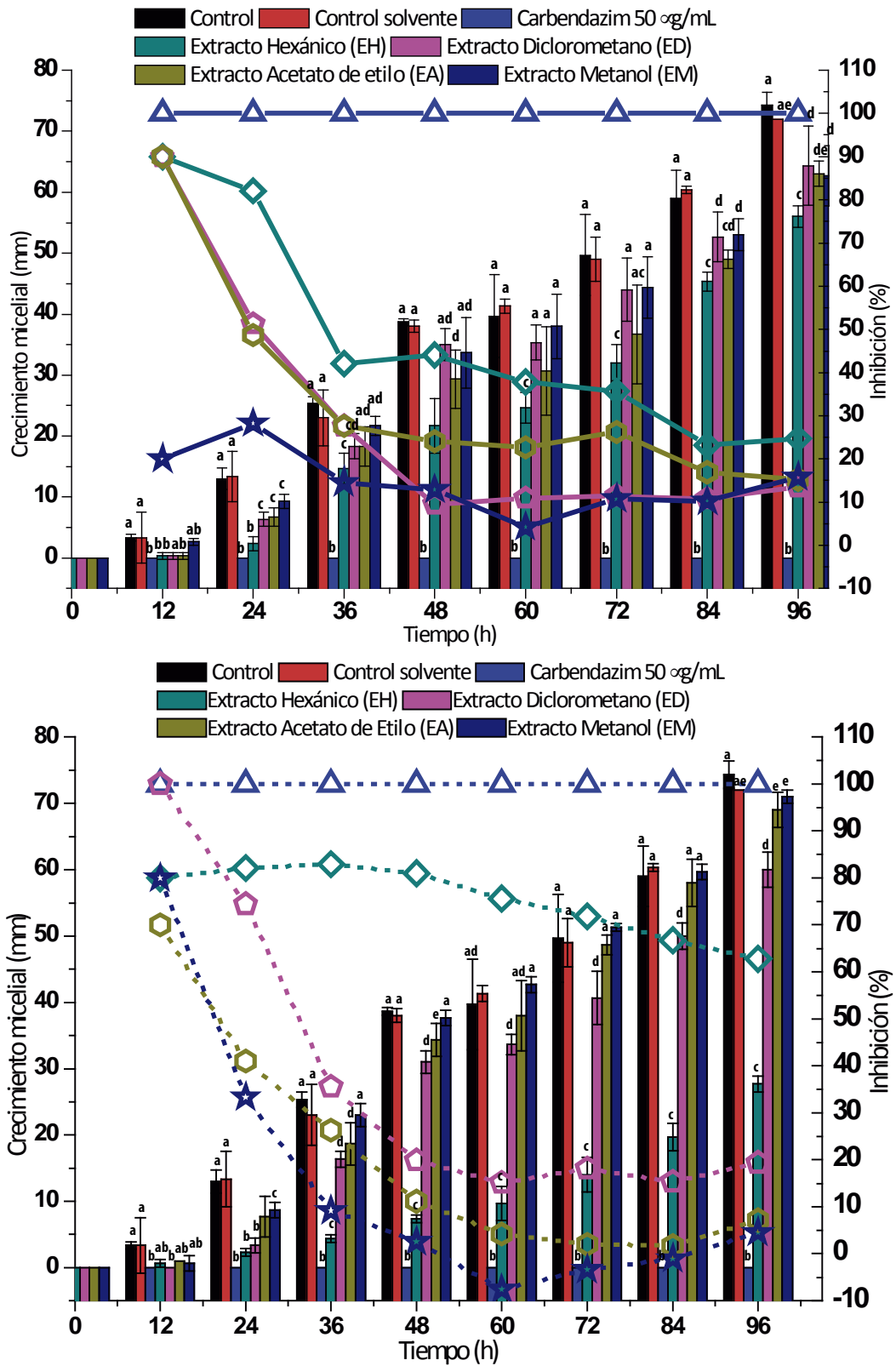


Figura 1-6: Crecimiento micelial (barras) de *B. theobromae* y % de inhibición (líneas y símbolos) de los extractos hexánicos de *P. auritum* (arriba) y *P. holtonii* (abajo) a diferentes concentraciones. Columnas que comparten letras iguales no poseen diferencias significativas según el test LSD (Least Significant Difference) de Fisher ($P < 0.05$).

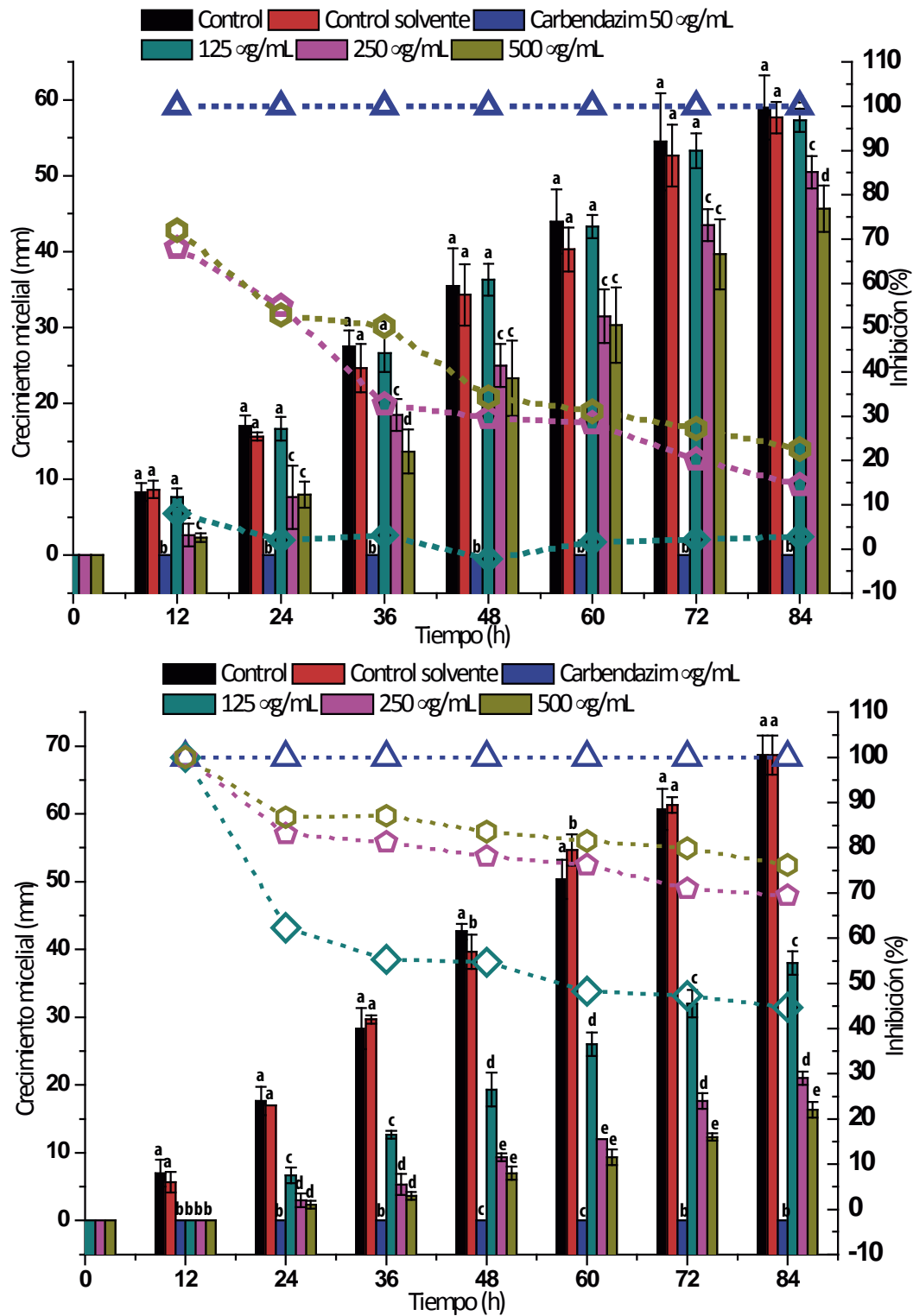
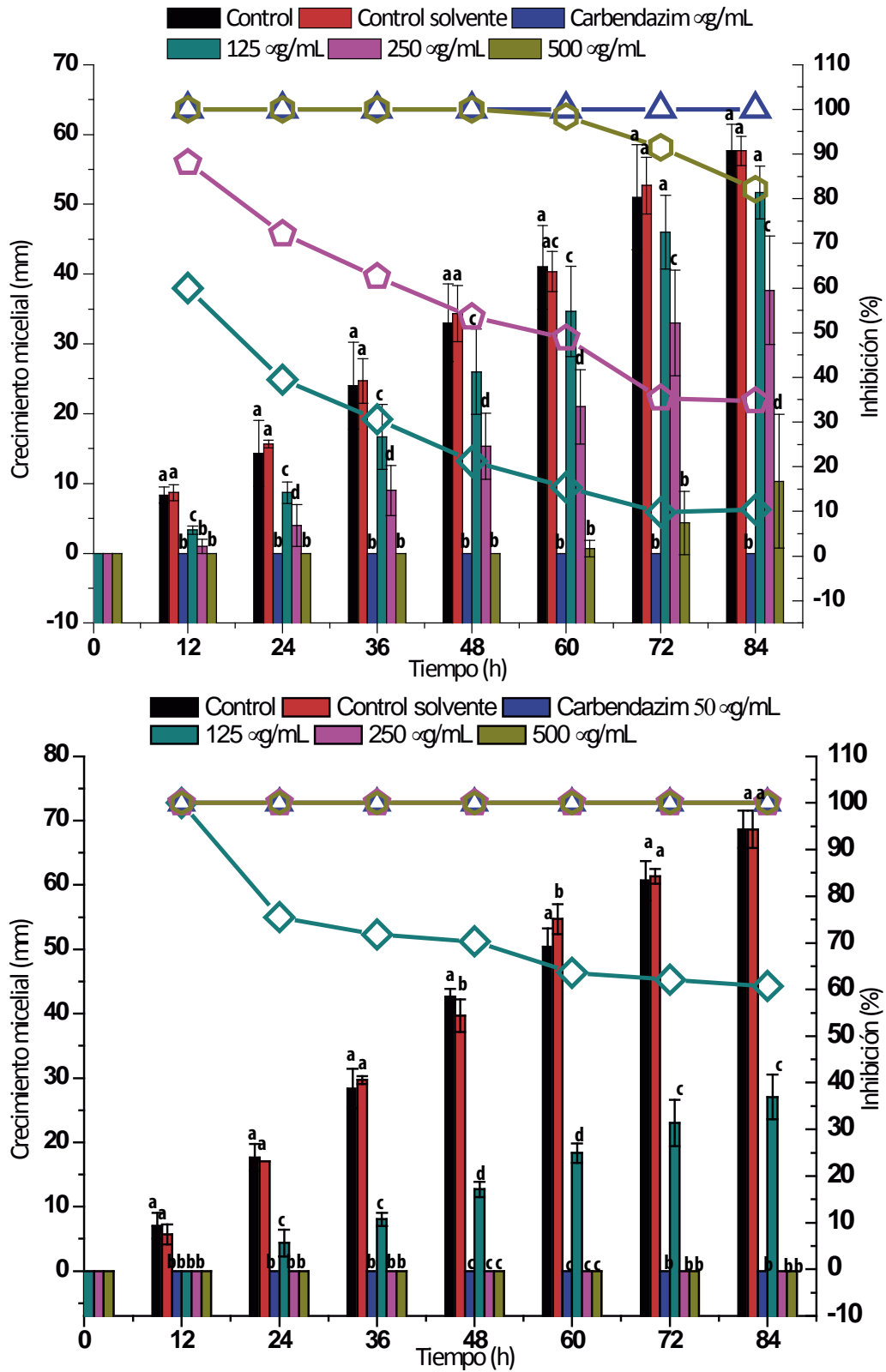


Figura 1-7: Crecimiento micelial (barras) de *B. theobromae* y % de inhibición (líneas y símbolos) del aceite esencial de *P. auritum* (arriba) y *P. holtonii* (abajo) a diferentes concentraciones. Columnas que comparten letras iguales no poseen diferencias significativas según el test LSD (Least Significant Difference) de Fisher ($P < 0.05$).



1.3.3 Composición química de los extractos hexánicos y aceites esenciales

El estudio de la composición química, en términos de los tiempos de retención y los porcentajes de abundancia relativa, de la fracción más activa y del aceite esencial para cada especie vegetal se muestra en la Tabla 1-4. Además, se presentan los principales fragmentos de masas obtenidos en los fragmentogramas de cada compuesto, con los cuales se llegó en la mayoría de casos, y con la ayuda de algunas bases de datos, a la identificación de los posibles componentes de las sustancias analizadas. Para este reporte solo se tuvieron en cuenta aquellos componentes que presentaban una abundancia relativa superior al 0,1 %. El análisis por CG-EM permitió la identificación de la mayoría de los componentes de los AEs/EHs (entre un 82 y 100 % de las señales integradas) los cuales correspondían a más de 50 compuestos, 26 de ellos presentes en *P. auritum* y 36 en *P. holtonii*. Cuando se agrupan de acuerdo a su funcionalidad, se observa que los fenilpropanoides son los constituyentes principales de los AEs y EHs (entre el 60 y 69 % de abundancia relativa), entre los que se destacan: el safrol (69,54 % en AE y 56,88 % en EH) para la *P. auritum*; y el apiol (64,24 % en AE y 57,20 % en EH) en la *P. holtonii*. Adicionalmente, están presentes eugenol, miristicina, asarona, isosafrol y elemicina, aunque en menores proporciones.

El porcentaje de safrol encontrado en el AE de *P. auritum* está acorde con lo reportado previamente para el aceite obtenido mediante destilación por arrastre con vapor, de plantas colectadas en Panamá (ca. 70 %) [33]; y difiere con el contenido encontrado en el aceite esencial obtenido de plantas cubanas mediante hidrodestilación en un aparato tipo *Clevenger* (74,29 %) [35]. Sin embargo, existen marcadas diferencias con otros reportes para los AEs obtenidos de plantas colectadas en la costa norte colombiana (entre 90 y 93 % en hojas e inflorescencias) [34,45], pero cuyo aceite fue obtenido mediante hidrodestilación asistida por radiación microondas¹¹.

Es bastante conocido que las relaciones porcentuales de los componentes de un AE pueden presentar ciertas variaciones, respondiendo a diferencias en las características ambientales y ecológicas [46], el estado de desarrollo de la planta [47], los métodos de extracción utilizados para la obtención del aceite [48], e incluso en las horas del día en que es colectada la planta [20].

¹¹ MWHD por sus siglas en inglés

Tabla 1-4: Composición química de los extractos hexánicos y aceites esenciales de las especies *Piper auritum* y *Piper holtonii*.

N°	Compuesto	Tr	Abundancias Relativas (%)				Principales fragmentos iónicos (m/z,% abundancia relativa)
			<i>P. auritum</i>		<i>P. holtonii</i>		
			AE	EH	AE	EH	
1	<i>p</i> -Cimeno	8,55	3,52	1,58	–	–	119 (100), 134 (25), 91 (16), 120 (10).
2	γ -Terpineno	9,10	0,97	5,11	–	–	93 (100), 91 (57), 77 (42), 136 (31).
3	Citral	9,38	–	0,83	–	–	69 (100), 41 (46), 84 (29), 94 (17).
4	Terpinoleno	9,96	1,42	1,46	–	–	93 (100), 121 (78), 91 (62), 136 (61).
5	Mirceno	10,11	–	1,46	–	–	41 (100), 93 (86), 69 (80), 39 (30).
6	Linalool	10,53	0,33	0,98	–	–	71 (100), 41 (64), 43 (64), 93 (59).
7	α -Terpineno	11,18	–	2,61	–	–	93 (100), 91 (37), 136 (36), 121 (30).
8	5,6-Dihidro-6-pentil-2H-piran-2-ona	11,49	–	–	–	0,78	97 (100), 68 (79), 41 (42), 39 (33).
9	Camfor	12,95	0,77	0,71	–	–	95 (100), 81 (69), 108 (43), 41 (39).
10	Eugenol	13,53	–	0,73	–	–	164 (100), 149 (29), 77 (21), 103 (19).
11	Ácido 2,4-decadienóico-metil éster	13,85	–	0,30	–	–	111 (100), 81 (85), 67 (56), 112 (43).
12	<i>p</i> -Cimen-8-ol	14,28	1,38	0,95	–	–	43 (100), 135 (80), 91 (21), 65 (11).
13	β -Bisaboleno	14,82	–	0,33	–	–	69 (100), 93 (69), 41 (69), 94 (27).

14	α -Amorfeno	14,95	–	0,37	–	–	105 (100), 161 (48), 94 (35), 93 (34).
15	Cubenol	15,61	–	1,14	–	–	119 (100), 41 (94), 43 (92), 161 (91).
16	α -Copaeno	17,15	–	–	1,68	–	161 (100), 119 (94), 105 (90), 93 (51).
17	β -Bourboneno	17,55	–	–	0,34	–	81 (100), 80 e(74), 123 (57), 161 (25).
18	Miristicina	17,66	–	2,01	0,94	0,28	192 (100), 91 (25), 165 (23), 65 (16).
19	Cariofileno oxide	17,77	–	–	–	2,17	93 (100), 69 (76), 41 (74), 133 (67).
20	Safrol	18,08	69,54	56,88	–	8,88	162 (100), 131 (38), 104 (37), 77 (30).
21	Isosafrol	18,37	–	–	–	0,39	162 (100), 104 (34), 131 (32).
22	Spatulenol	18,76	–	0,23	–	1,91	43 (100), 41 (69), 91 (42), 119 (42).
23	β -Cariofileno	18,90	3,71	2,65	4,18	3,32	93 (100), 133 (92), 91 (86), 41 (77).
24	3-Hidroxi- β -damascono	19,55	–	0,82	–	1,31	69 (100), 121 (50), 43 (42), 175 (39).
25	α -Humuleno	19,72	–	–	1,01	0,39	93 (100), 80 (35), 121 (27), 41 (23).
26	α -Ionona	19,89	–	–	–	0,17	121 (100), 93 (79), 136 (61), 43 (57).
27	3-Oxo- α -ionol	20,09	–	0,52	–	–	108 (100), 43 (27), 109 (26), 45 (20).
28	α -Cadineno	20,11	–	–	–	0,12	161 (100), 204 (52), 134 (46).
29	α -Cubebeno	20,52	1,04	0,79	–	–	161 (100), 105 (34), 91 (30), 120 (26).
30	β -Cubebeno	20,57	–	–	4,27	1,89	161 (100), 105 (34), 91 (30), 120 (26).
31	2-Tridecanona	20,80	–	–	0,68	–	58 (100), 43 (70), 59 (40), 71 (39).

32	α -Muuroleno	20,91	–	–	–	0,19	105 (100), 161 (66), 204 (39), 93 (35).
33	Dillapiol	20,98	–	0,59	64,24	57,20	222 (100), 207 (24), 149 (16).
34	τ -Cadineno	21,31	–	–	–	0,11	161 (100), 105 (35), 93 (29), 91 (28).
35	3-Oxo- β -ionol	21,42	–	0,73	–	2,19	108 (100), 43 (27), 109 (26), 45 (20).
36	δ -Cadineno	21,63	–	–	–	0,32	161 (100), 105 (26), 204 (26), 91 (21).
37	Calameneno	22,46	–	–	0,14	0,12	159 (100), 160 (14), 202 (11), 129 (7).
38	Ácido palmítico-metil éster	22,69	–	0,31	–	1,19	74 (100), 87 (70), 43 (42), 41 (33).
39	<i>t</i> -Nerolidol	22,85	–	–	0,67	0,25	69 (100), 41 (59), 93 (56), 43 (41).
40	Desconocido	23,10	–	–	0,24	–	159 (100), 177 (76), 91 (46), 220 (41).
41	Desconocido	23,60	–	–	0,37	–	109 (100), 159 (90), 91 (79), 79 (60).
42	Ácido Palmítico	24,02	–	5,95	–	8,36	43 (100), 73 (97), 60 (90), 41 (77).
43	Elemicina	25,35	–	–	3,24	–	208 (100), 193 (43), 209 (14), 77 (9).
44	Asarona	25,75	–	–	0,19	–	208 (100), 193 (44), 165 (23).
45	α -Cadinol	26,42	–	–	0,32	–	43 (100), 95 (63), 121 (47), 41 (44).
46	Fitol	26,48	–	2,31	–	3,07	71 (100), 43 (38), 57 (33), 41 (26).
47	Pentadecanal	26,61	–	–	0,64	0,64	82 (100), 57 (86), 41 (76), 55 (72).
48	Desconocido	27,15	–	–	0,98	–	122 (100), 148 (37), 133 (28).
49	Desconocido	27,55	–	–	0,63	–	151 (100), 96 (43), 81 (40), 152 (33).

50	Ácido oléico	31,45	–	–	0,60	–	41 (100), 55 (82), 43 (60), 29 (50).
51	Ácido linoleico metil éster	31,83	–	–	0,19	1,03	67 (100), 81 (82), 55 (64), 41 (61).
52	Ácido esteárico	33,64	–	–	0,25	1,35	43 (100), 41 (87), 60 (81), 73 (81).
53	Ácido linoleico	34,41	–	–	0,29	1,60	67 (100), 81 (85), 95 (58), 82 (55).
54	Ácido linolénico	35,01	–	–	0,23	0,68	41 (100), 79 (78), 67 (73), 55 (62).
	Rotación específica $[\alpha]_D^{25}$		-1,11	+2,04	-13,23	-1,94	
	Fenilpropanoides		69,54	60,21	68,61	66,75	
	Monoterpenos		8,39	15,69	0,00	0,00	
	Cíclicos		8,06	12,42	0,00	0,00	
	Acíclicos		0,33	3,27	0,00	0,00	
	Sesquiterpenos		4,75	5,51	12,47	10,79	
	Acíclicos		0,00	0,00	0,67	0,25	
	Monocíclicos		0,00	0,33	1,01	0,39	
	Bicíclicos		3,71	4,16	4,50	6,35	
	Tricíclicos		1,04	1,02	6,29	3,80	
	Otros		0,00	10,94	3,02	22,37	
	Total de compuestos identificados (%)		82,68	92,35	84,10	99,91	
	Compuestos desconocidos		0,00	0,00	2,22	0,00	

1.3.4 Identificación de los componentes principales

Luego de analizar los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del componente mayoritario de *P. auritum* se identificaron las señales de una cadena alílica, un anillo aromático y un sistema metilendioxi; características del fenilpropanoide safrol. Además, en el análisis cromatográfico del aceite esencial y la fracción hexánica se alcanzaron a detectar los fragmentos de masa característicos de este compuesto, cuyo ión molecular tiene una relación masa/carga de 162 (ver Anexo). Estos resultados también se reportan por diversos autores que señalan al safrol como el metabolito secundario de mayor abundancia en la especie *P. auritum* [33-35]. En la Figuras 1-8 y 1-9 se presentan los desplazamientos químicos de protón y carbono 13 para el safrol aislado de *P. auritum*. De forma similar, para el dillapiol obtenido de *Piper holtonii* también se observaron esta serie de picos en ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, con la diferencia que sólo se observó una señal para hidrógenos sobre el anillo aromático, y se observaron dos señales adicionales correspondientes a los carbonos de los grupos metoxilos.

Por comparación con los espectros de hidrógeno y carbono 13 de los compuestos apiol (componente principal del aceite esencial de perejil) y su isómero dillapiol (componente principal del aceite esencial de la especie *Piper aduncum*), se observó que el metabolito secundario presente en *P. holtonii* es el dillapiol.

De forma similar, en los cromatogramas de la fracción hexánica y el aceite esencial se obtuvo el patrón de fragmentación en masas característico del dillapiol (ver Anexo), con ion molecular de 222 m/z.

Figura 1-8: Espectros de ^1H -RMN (arriba) y ^{13}C -RMN (abajo); y sus respectivas asignaciones para el safrol aislado de *P. auritum*.

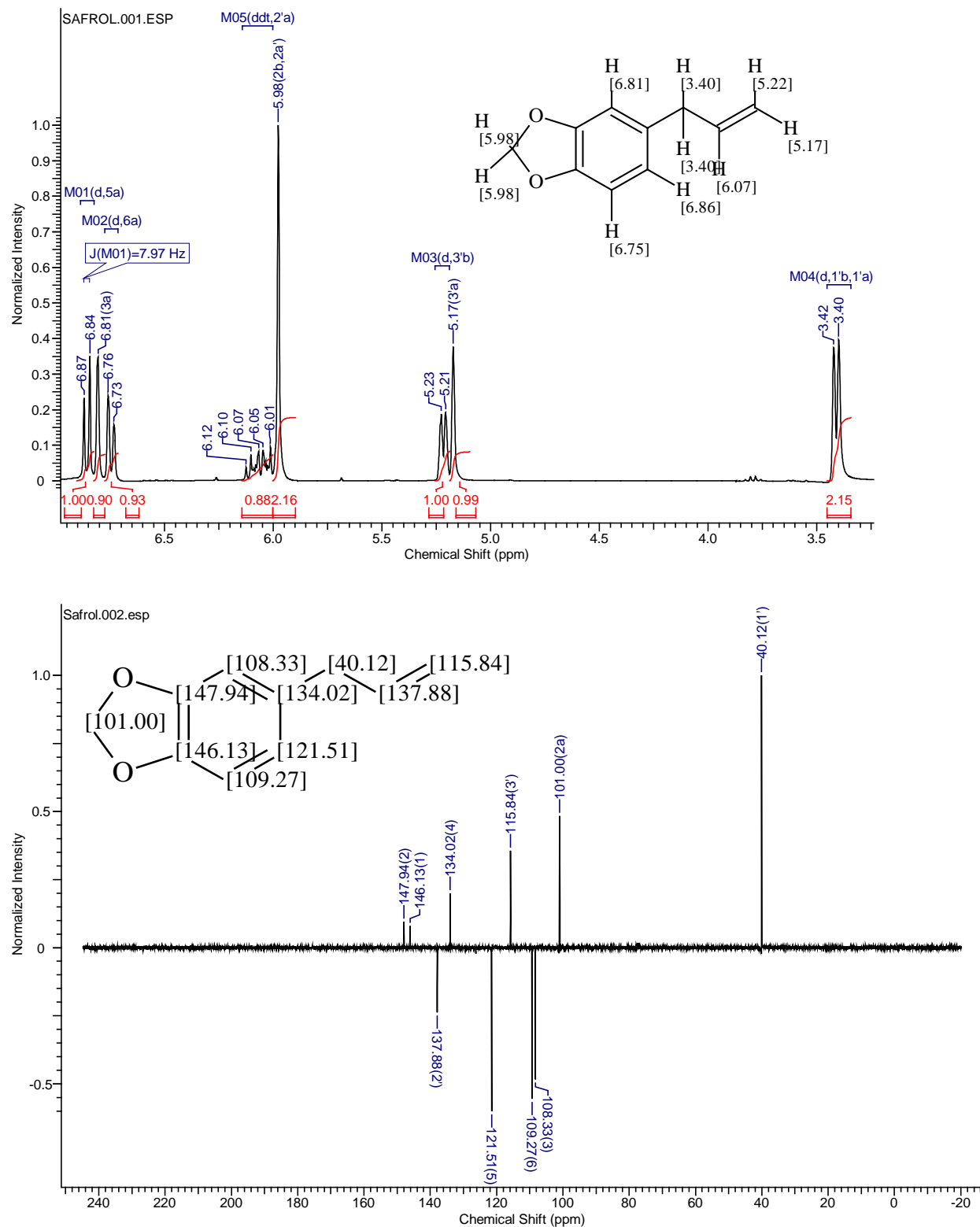
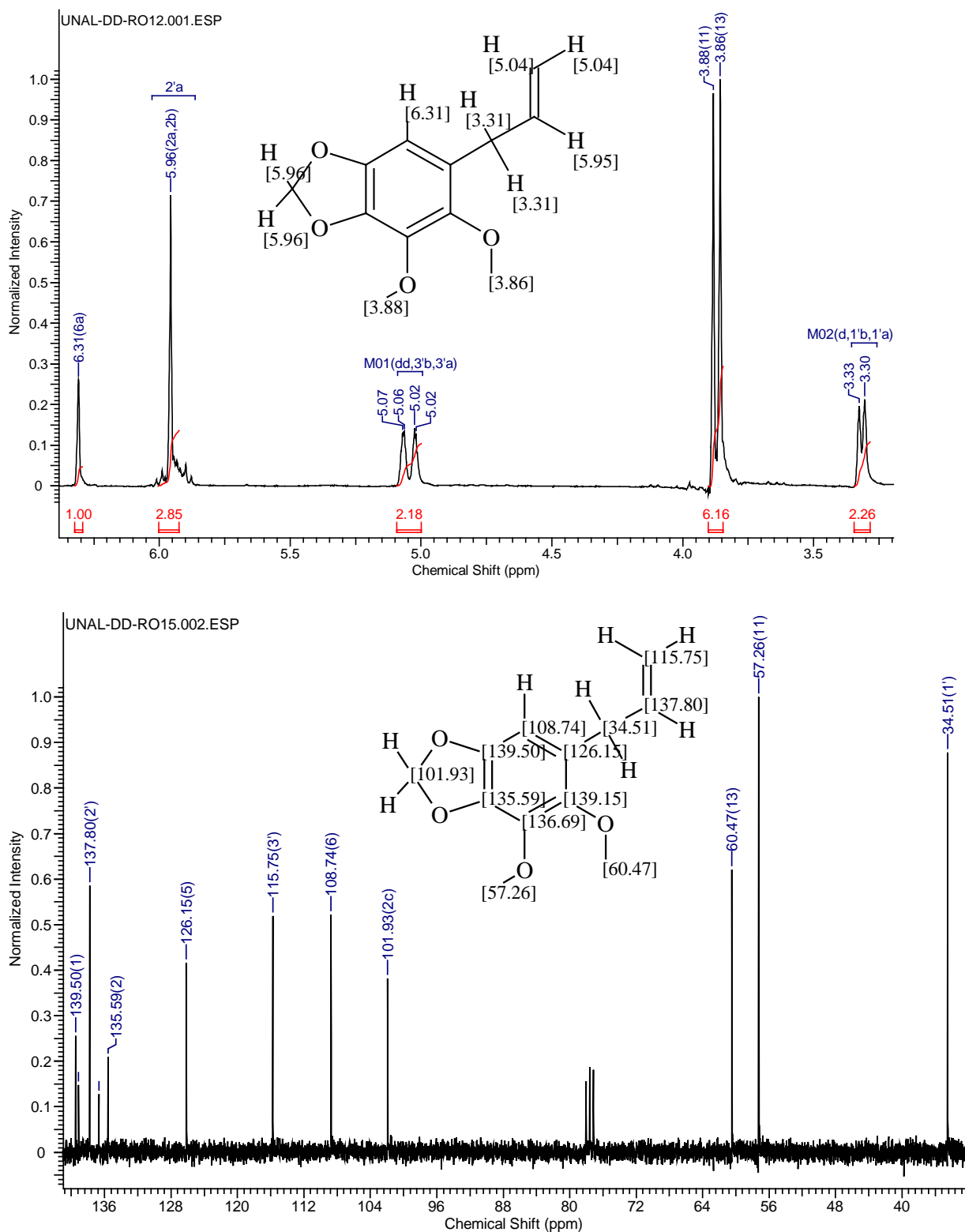


Figura 1-9: Espectros de ^1H -RMN (arriba) y ^{13}C -RMN (abajo); y sus respectivas asignaciones para el dillapiol aislado de *P. holtonii*.

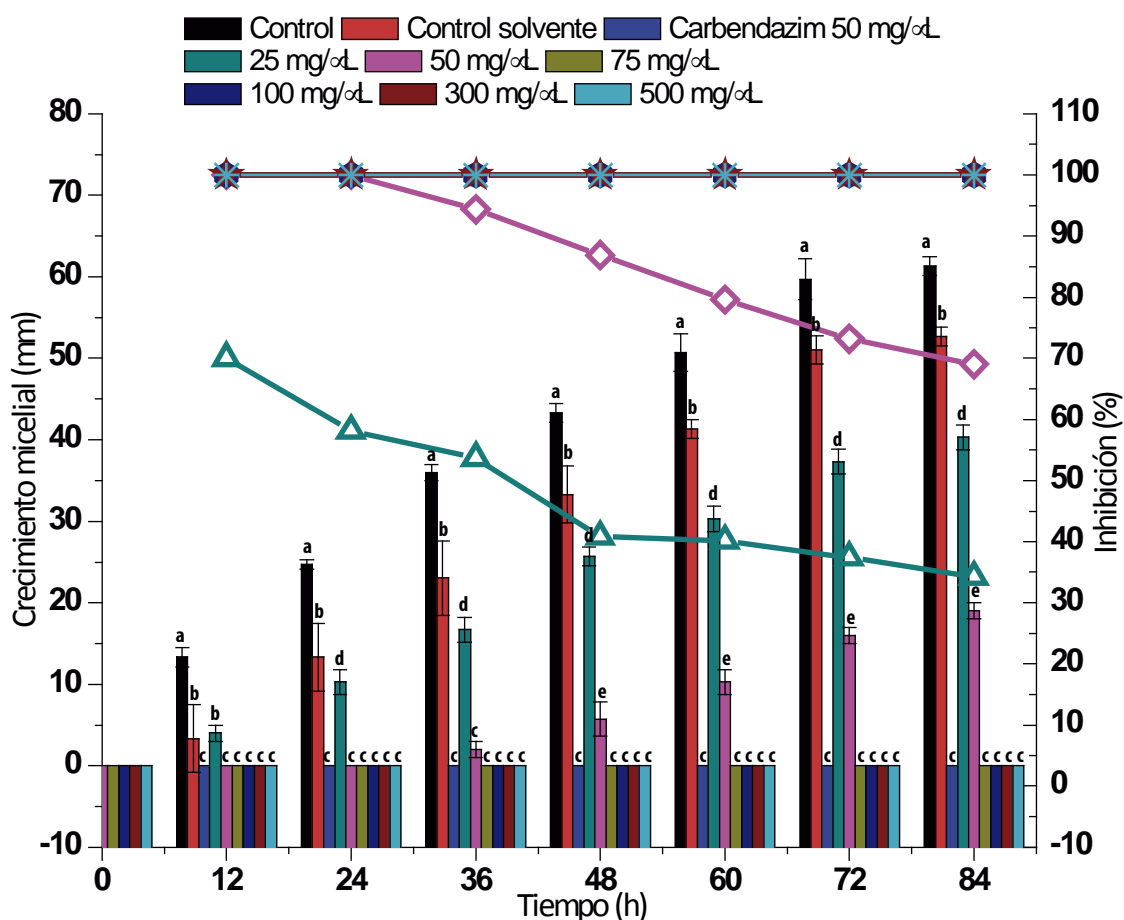
1.3.5 Actividad antifúngica de safrol y dillapiol

Los resultados de los ensayos de actividad antifúngica *in vitro* de los fenilpropanoides dillapiol y safrol se reportan en términos de crecimiento micelial en las Figuras 1-10 y 1-11. Se observó una actividad relativamente alta del dillapiol, el cual generó una inhibición total del crecimiento radial, durante el tiempo del ensayo, a concentraciones iguales o mayores a 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 1-10); este valor es inferior en comparación con la concentración (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del AEPH (del cual dillapiol es componente mayoritario), para la cual se comienza a observar la inhibición total del crecimiento del hongo. Esto sugiere que este fenilpropanoide puede ser el principal responsable de la actividad fungistática encontrada tanto en el EPH como en el AEPH; aunque no se descartan los aportes que puedan tener los demás componentes a la actividad del aceite esencial.

Algunos estudios previos realizados con dillapiol destacan su actividad biológica, no solo como potencial insecticida, sino también por sus propiedades sinérgicas [49,50]. También existen reportes de actividad antifúngica en los que el dillapiol se ha ensayado de forma indirecta; es decir, mediante el análisis de aceites esenciales que lo contienen en alta proporción [51,52]. Sin embargo, uno de estos ensayos muestra que las basidiosporas del hongo *Clinipellis perniciososa* fueron completamente inhibidas por dillapiol a concentraciones por encima de 0,6 ppm [53]; mientras que en otro estudio se determinó que por encima del apiol y la miristisina, el dillapiol es capaz de inhibir específicamente la producción de la aflatoxina G1 en el *Aspergillus parasiticus*, a pesar de no inhibir significativamente su crecimiento ni la producción de la aflatoxina B₁ [54].

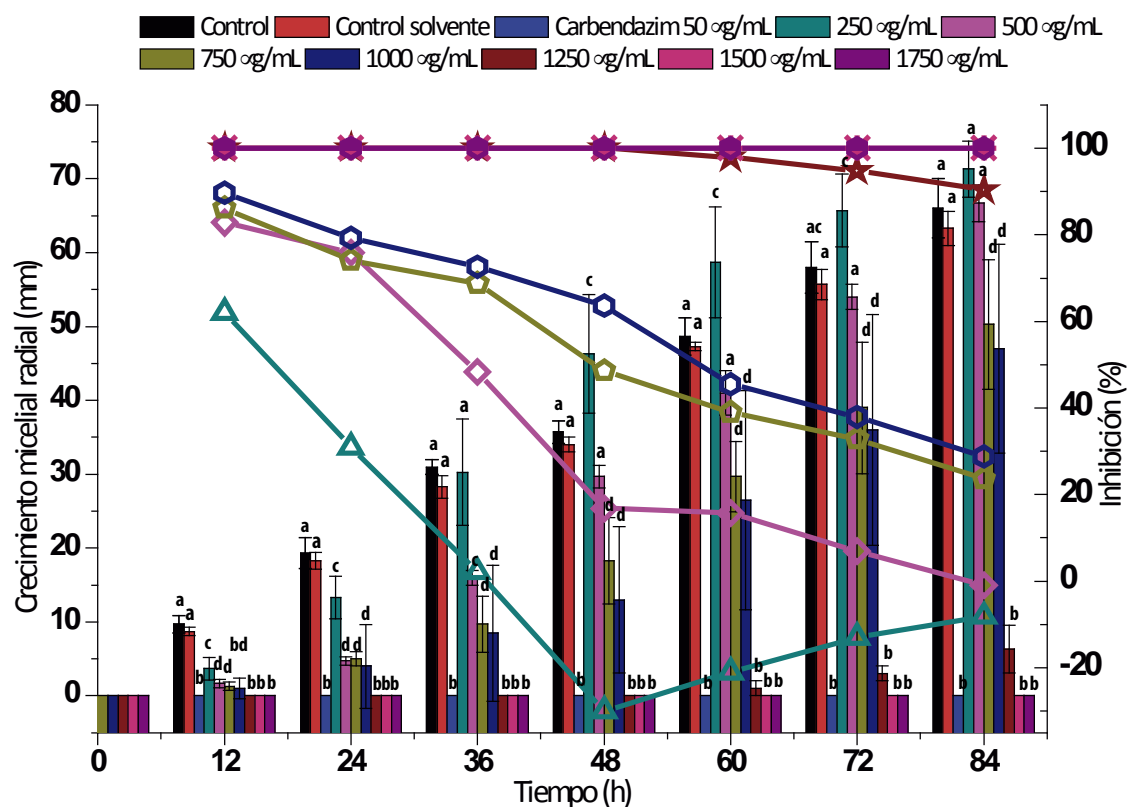
Por otra parte, del ensayo de actividad con el safrol se observó una actividad antifúngica menor que para el dillapiol (Figura 1-11), debido a que la concentración que inhibe el crecimiento radial al 50 % (CI₅₀), a las 72 h, fue de 891 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al comparar este valor con la CI₅₀ del AEPa (254 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a las mismas 72 h, se observa una disminución de la actividad fungistática, lo que sugiere que los componentes minoritarios juegan un papel crucial en la actividad de todo el AEPa. Esto podría explicarse por las propiedades sinérgicas que se han reportado para algunos de los componentes de este aceite como son el *p*-cimeno, γ -terpineno, terpinoleno, α -terpineno, y camfor [55,56]; e incluso el mismo safrol [57].

Figura 1-10: Crecimiento micelial (barras) de *B. theobromae* y % de inhibición (líneas y símbolos) de dillapiol a diferentes concentraciones. Columnas que comparten letras iguales no poseen diferencias significativas según el test LSD (Least Significant Difference) de Fisher ($P < 0.05$).



En general, la actividad encontrada para safrol y dillapiol, presentes en alta proporción en los aceites esenciales de *P. auritum* y *P. holtonii* respectivamente, parece tener estrecha relación con el tipo de estructura C3-C6 correspondiente al grupo de los fenilpropanoides. Otros autores han realizado ensayos *in vitro* con aceites esenciales con alta proporción de elemicina [47], *trans*-anetol [14], eugenol [16], safrol [58,59], y dillapiol [52,59]; encontrando en muchos casos buena actividad contra hongos fitopatógenos como el *B. theobromae*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, entre otros.

Figura 1-11: Crecimiento micelial (barras) de *B. theobromae* y % de inhibición (líneas y símbolos) de safrol a diferentes concentraciones. Columnas que comparten letras iguales no poseen diferencias significativas según el test LSD (Least Significant Difference) de Fisher ($P < 0.05$).



En este caso particular, los resultados encontrados son consistentes con un reporte en el que se evaluó la actividad contra hongos fitopatógenos y dermatofitos de los aceites esenciales de otras dos especies de plantas pertenecientes a la familia de las Piperáceas: *Piper aduncum* y *Piper obliquum*, pero colectadas al este de Ecuador. Interesantemente, los componentes mayoritarios de estos dos aceites son el dillapiol (45,92 % en la *P. aduncum*) y el safrol (45,86 % en la *P. obliquum*), y la actividad contra los hongos fitopatógenos ensayados fue siempre superior para *P. aduncum* que para *P. obliquum*. Según este reporte, los autores obtuvieron para el aceite esencial de *P. aduncum* porcentajes de inhibición del crecimiento radial del hongo *Botrytis cinerea* de 15,83; 23,75; y 70,51 % a concentraciones de 50, 100 y 500 µg/mL, respectivamente; mientras que para el aceite de *P. obliquum* los porcentajes de inhibición obtenidos a las mismas concentraciones, y contra este mismo hongo fueron de 2,22; 8,41 y 19,92 % respectivamente [59].

Capítulo 2 Estudio del metabolismo de safrol y dillapiol por parte del hongo *B. theobromae*

2.1 Antecedentes

2.1.1 Metabolismo de compuestos bioactivos por hongos fitopatógenos

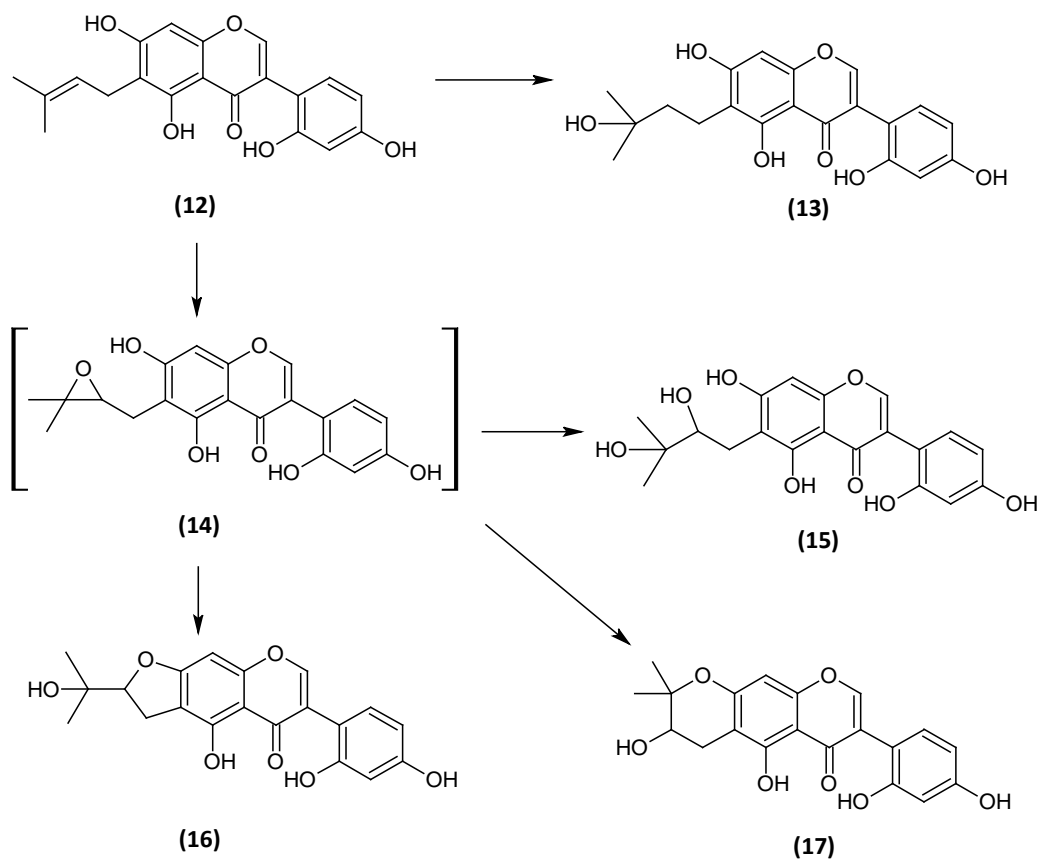
Como ya es conocido, existe una serie de compuestos que cumplen un importante rol en los procesos de defensa de las plantas contra organismos patógenos, que podrían ser sintetizados *de novo* (fitoalexinas), o ser componentes fijos del grupo de metabolitos secundarios de la planta (fitoanticipinas) [60]. Sin embargo, algunos patógenos han desarrollado con el tiempo la capacidad de detoxificar este tipo de moléculas mediante transformaciones enzimáticas, generando cambios estratégicos en ciertas funcionalidades químicas que, a la postre, terminan disminuyendo la actividad y permitiendo la proliferación de la infección.

Por ejemplo, algunas isoflavonas como la leutona (**12**) (Figura 2-1), aislada de frutos inmaduros de *Lupinus luteus*, y que se caracterizan por poseer una fuerte actividad antifúngica y antimicrobiana [61], pueden ser biotransformadas por hongos como *Botrytis cinerea* o *Aspergillus flavus*, generando productos con menor actividad antifúngica en comparación con la molécula inicial. Los productos mayoritarios encontrados para la biotransformación con ambos hongos corresponden a mono (**13**) y dihidroxilaciones (**15**) en la cadena lateral insaturada, que se cree que se generan por un intermediario epoxidado (**14**), pues también se obtienen los éteres cíclicos de 5 (**16**) y 6 miembros (**17**) [62]. Es bien conocido que varios hongos tienen la capacidad de detoxificar isoflavonoides, y que dicha capacidad está ligada con su patogenicidad, ya que por ejemplo la luteona (**12**), cumple la función de agente antifúngico preinfeccional en las hojas de *L. luteus* [62].

De la misma forma, se han estudiado muchos casos en los que algunas moléculas identificadas como fitoalexinas pueden ser transformadas por microorganismos patógenos, mediante enzimas del Citocromo P450. Un ejemplo notable es el del

hongo *Nectria haematococca*, que a pesar de ser sensible a la acción de la Pisatina (una reconocida fitoalexina producida en la arveja), es capaz de detoxificarla a través de la demetilación realizada con la enzima pisatin demetilasa [63]. En estos estudios se encontró que la patogenicidad de este hongo está relacionada con la capacidad de llevar a cabo dicha desmetilación por medio de esta enzima, ya que al suprimir el gen que la codifica, la actividad inhibidora de la fitoalexina se manifiesta, y los efectos del patógeno disminuyen sustancialmente, aunque no son del todo suprimidos [64].

Figura 2-1: Transformación de la molécula de Leutona (i) mediante los hongos el hongo *Botrytis cinerea* y *Aspergillus flavus* [62].



Otro caso interesante fue observado en la planta *Vicia faba* L., en la cual, el ataque de los hongos *Botrytis cinerea* y *Botrytis fabae* inducen la formación de las fitoalexinas wyerona (20), epóxido de wyerona (22) y ácido wyerónico (18) (Figura 2-2) [65,66]. En esta serie de investigaciones se realizaron los siguientes descubrimientos:

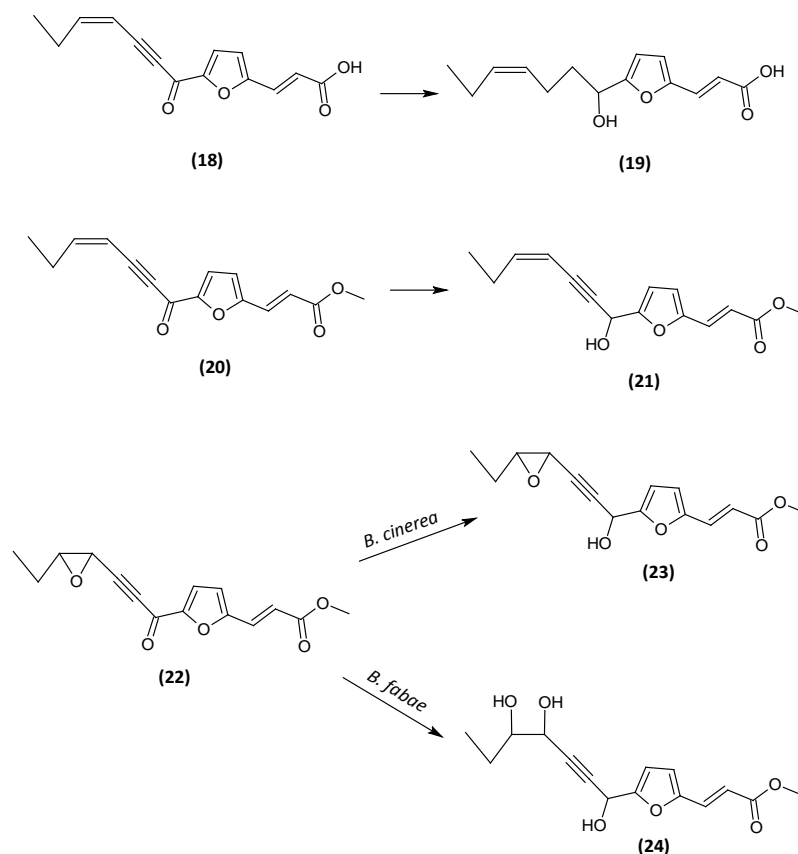
1. El ácido wyerónico es metabolizado por *B. fabae* mucho más rápido que por *B. cinerea*.
2. Luego del metabolismo del ácido wyerónico por parte de *B. fabae* se obtiene un producto menos fungitóxico, el ácido wyerónico reducido (19).

3. La formación del ácido wyerónico reducido en las semillas infectadas aumenta durante los primeros tres días, y no se detectó en los tejidos sanos de la planta.
4. Las enzimas extracelulares no son capaces de degradar **(18)**, lo que indica que el metabolismo de esta fitoalexina ocurre dentro de las hifas del hongo.

Todos estos hallazgos llevan a deducir que, luego de que ambos microorganismos inducen la producción de **(18)**, la diferencia en la capacidad de cada hongo de proliferar en los tejidos, está ligada a la diferente sensibilidad que cada uno tiene a esta fitoalexina. Y que dicha sensibilidad puede o no estar ligada a la capacidad de metabolizar este ácido.

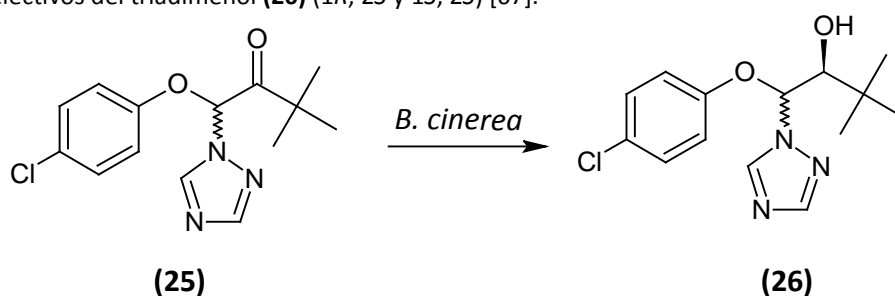
De forma similar, los mismos autores reportaron que la wyerona **(20)**, es bioconvertida en wyerol **(21)** por ambos microorganismos [65], y que el epóxido de wyerona **(22)** es transformado en epóxido de wyerol **(23)** por el *B. cinerea* y en dihidrodihidroxiwyerol **(24)** por el *B. fabae* [66]. De igual forma, en todos los casos los productos de biotransformación presentaron menor actividad que el sustrato inicial; y para las tres fitoalexinas examinadas, se observó una mayor sensibilidad por parte del hongo *B. cinerea* comparado con el *B. fabae*.

Figura 2-2: Biotransformación de las fitoalexinas wyerona, epóxido de wyerona y ácido wyerónico aisladas de la especie *Vicia faba* L., por parte de los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Botrytis fabae* [65].



Pero, si bien es cierto que los hongos fitopatógenos han desarrollado un grupo de enzimas que ayudan a contrarrestar casi que específicamente, el grupo de moléculas que cumplen un papel defensivo en la planta hospedera, dichas enzimas no se limitan solo a esos sustratos específicos, ya que se ha observado que algunas pueden realizar cambios sobre otro tipo de moléculas bioactivas, sean o no provenientes de fuentes naturales. Por ejemplo, existen reportes de biotransformaciones de moléculas que hacen parte de principios activos de fungicidas comerciales como el triadimefon (**25**), que a pesar de no ser de origen natural puede ser reducido enantioselectivamente por *Botrytis cinerea* a un alcohol menos activo (**26**) (Figura 2-3) [67,68]. Todo esto juega un papel importante en el proceso de resistencia que han generando con el pasar del tiempo, algunas especies de hongos contra las sustancias que se han utilizado comúnmente para su control.

Figura 2-3: Reducción de la mezcla de isómeros del triadimefon (**25**) para dar los productos enantioselectivos del triadimenol (**26**) (1*R*, 2*S* y 1*S*, 2*S*) [67].



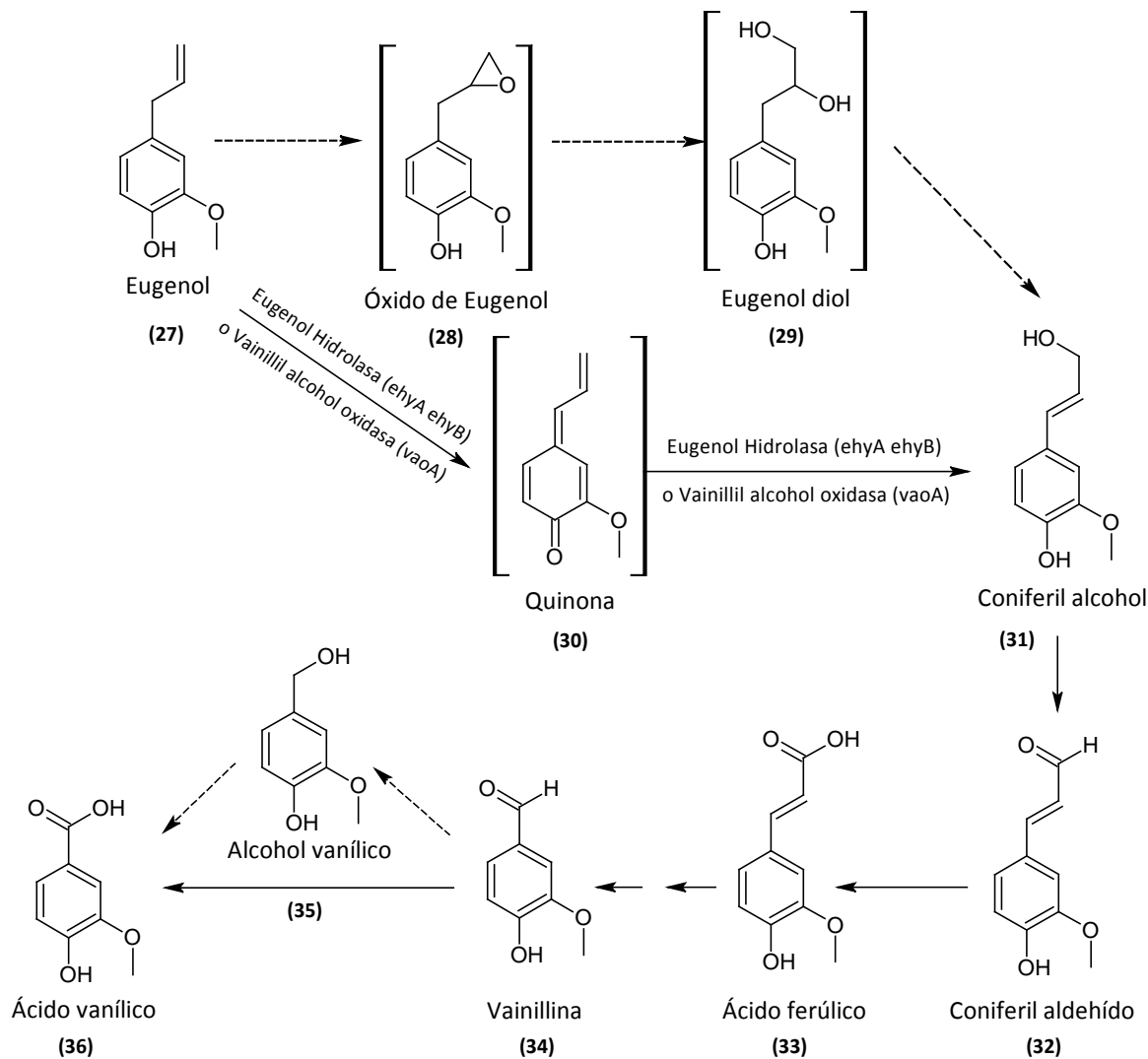
2.1.2 Metabolización de fenilpropanoides

El interés en el estudio de las transformaciones de algunos fenilpropanoides ha sido enfocado principalmente al área de la producción de aromas y sabores, por lo general, con bacterias. Esto se debe a que varios fenilpropanoides se constituyen como precursores de estos compuestos de alto interés comercial. Un ejemplo muy conocido es la producción de vainillina (Figura 2-4) (**34**) y ácido vanílico (**36**) a través de la bioconversión de precursores como el ácido ferúlico (**33**), eugenol (**27**) e isoeugenol; en procesos que implican la descomposición de parte de la cadena lateral, llevándola de tres a un solo átomo carbono [69-71].

Por ejemplo para el eugenol, donde la insaturación de la cadena lateral se encuentra en el extremo, se propone la epoxidación de la olefina y posterior apertura para generar el diol vecinal; el cual sigue luego una serie de reacciones que implican deshidratación produciendo el alcohol coniferílico (**31**), y oxidaciones para formar el coniferil aldehído (**32**) y posteriormente el ácido ferúlico (**33**). Luego, (**33**) sigue el proceso de descomposición ya conocido que termina en la obtención de vainillina (**34**), alcohol vanílico (**35**) y ácido vanílico (**36**) (Figura 2-4) [70,71].

Sin embargo, este tipo de biotransformaciones no se limita sólo a bacterias, ya que se ha encontrado que también algunos hongos como el *Aspergillus niger*, *Sporotrichum thermophile* o el *Schizophyllum commune* pueden transformar el ácido ferúlico en 4-vinilguayacol y ácido vanílico [72-74].

Figura 2-4: rutas de biotransformación del eugenol hasta su conversión en derivados de la vainillina [70].



La capacidad de los hongos de realizar transformaciones sobre los fenilpropanoides no se limita solo a una ruta, ya que para diversas especies se observan también diferencias en cuanto a los productos obtenidos para un mismo sustrato. Por ejemplo la especie *Paecilomyces variotii* convierte el ácido *p*-coumárico en ácido protocatecúico [75] y el ácido sinápico en siríngico [76], ambos pasando por el aldehído como intermedio; mientras que el *Pycnoporus cinnabarinus* transforma el ácido *p*-coumárico en ácido caféico mediante la inclusión de un grupo hidroxilo en el anillo aromático [77]; o el *Schizophyllum commune*, que genera tanto la oxidación y

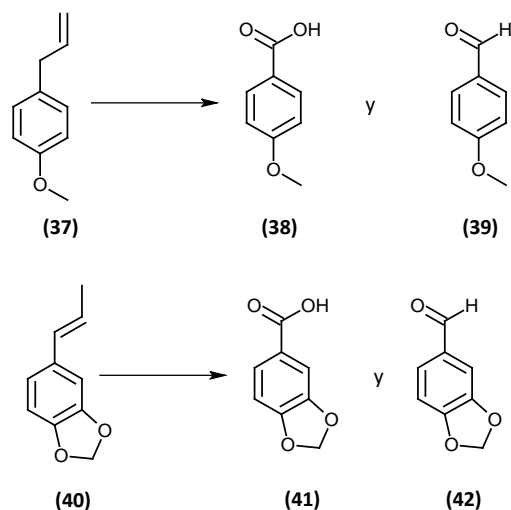
posterior descomposición para formar el ácido *p*-hidroxibenzoico, como la reducción produciendo el 3-(*p*-hidroxifenil)-1-propanol [74].

Por otro lado, el metabolismo de fenilpropanoides del tipo dioxol, como el safrol (**3**), ha sido muy estudiado en mamíferos debido a sus características hepatotóxicas. En estos estudios se ha encontrado que pueden ser transformados mediante enzimas no específicas del Citocromo P450, que son capaces de romper el éter dioxol para convertir esta molécula en hidroxichavicol [78]. Otras transformaciones de este tipo en mamíferos implican la introducción del grupo hidroxilo en la cadena lateral, específicamente en la posición 1', lo que genera una especie reportada como carcinógena, el 1'-hidroxisafrol [79].

Otros estudios realizados con bacterias muestran que estructuras similares al safrol como el *t*-anetol, eugenol, isoeugenol e isosafrol pueden seguir los mismos procesos de degradación de la cadena lateral, hasta llegar en la mayoría de los casos, a los ácidos benzoicos sustituidos correspondientes (Figura 2-5). Para esta degradación se proponen varias rutas, que dependen en algunos casos de la posición del doble enlace de la cadena lateral (terminal o intermedio).

De forma similar, los compuestos encontrados tras la metabolización del *t*-anetol (**37**) por parte de bacterias como la *Arthrobacter* sp., son el ácido *p*-anísico (**38**) y el *p*-anisaldehído (**39**); y para la metabolización del isosafrol (**40**) el ácido piperonílico (**41**) y piperonal (**42**) (Figura 2-5) [80-82].

Figura 2-5: Productos comunes de biotransformación del *t*-anetol (**37**) y el isosafrol (**38**) mediante bacterias como la *Arthrobacter* sp [81].

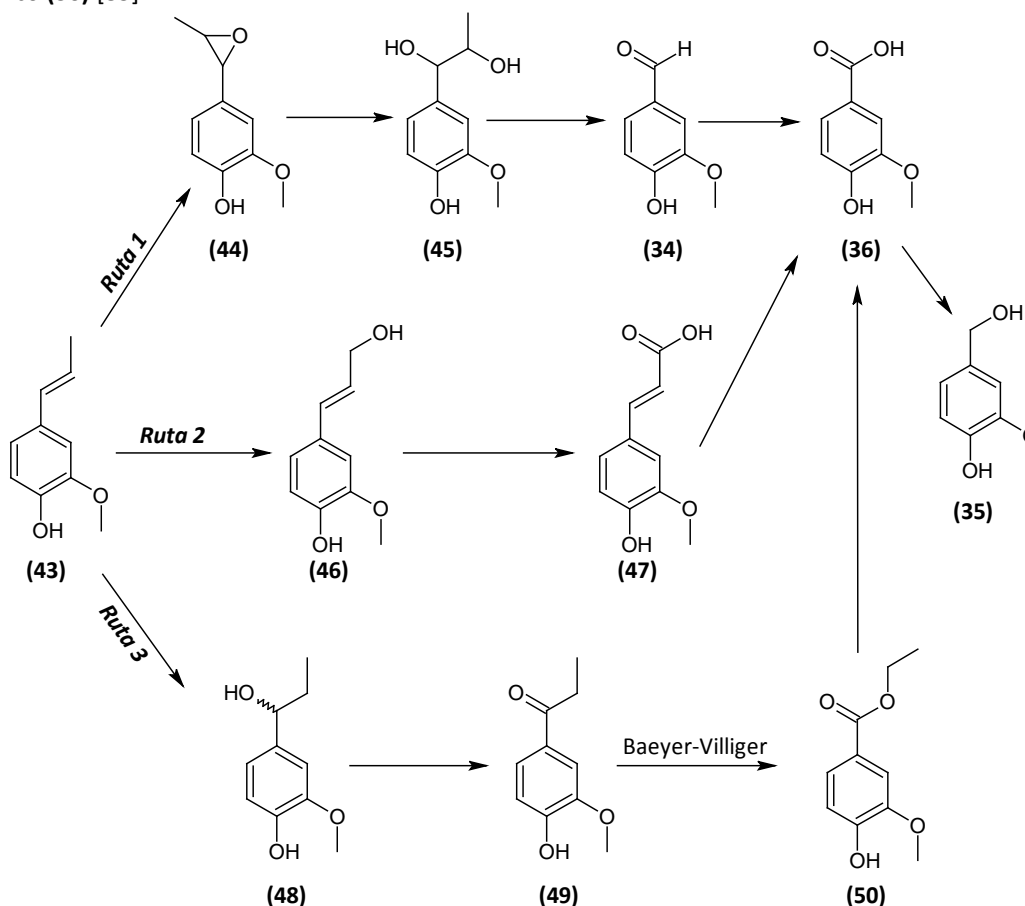


Para el isoeugenol (**43**), donde la insaturación es intermedia, se proponen en la literatura fundamentalmente tres rutas de bioconversión (Figura 2-6). La primera de ellas, de forma similar a la del eugenol, consta en la formación del diol vecinal (**45**) a partir del epóxido (**44**), pero con la diferencia de que no sufre una deshidratación, sino la ruptura del diol para generar vainillina (**34**) y acetaldehído. En la segunda, está implicada la oxidación del carbono extremo de la cadena, lo que genera el alcohol

ferúlico (**46**), y posteriormente el ácido ferúlico (**47**); que como ya se ha mencionado, sigue una ruta de descomposición hasta (**34**) y sus derivados. Y en la tercera, ocurre una reducción del doble enlace y la inclusión de un grupo hidroxilo en la posición 1', generando un alcohol secundario (**48**) que posteriormente es oxidado hasta la cetona (**49**). Luego, esta cetona es llevada hasta el éster etílico (**50**) mediante la reacción conocida como de Baeyer-Villiger, la cual se conoce que puede ser llevada a cabo tanto por bacterias como por hongos; y por último, el éster formado es hidrolizado para obtener el ácido vanílico (**36**) [83].

Estas rutas han sido reportadas no solo para muchas bacterias, sino también para algunos hongos como el *Aspergillus niger* [84,85], y en muchos de los mecanismos propuestos se han logrado corroborar los intermediarios formados mediante marcaje isotópico, e incluso en varios de ellos, se han identificado las enzimas implicadas en los procesos de transformación.

Figura 2-6: Rutas de bioconversión del isoeguenol (**43**) en vainillina (**34**), alcohol vanílico (**35**) y ácido vanílico (**36**) [83].

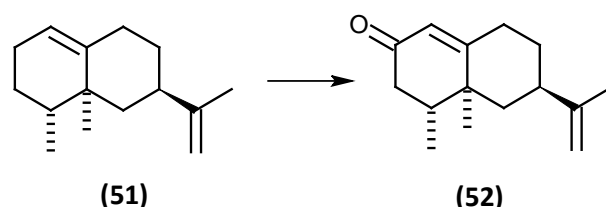


Todos estos productos de biotransformación, principalmente los aldehídos, poseen olores agradables que los hacen apetecibles en la industria de aromas y sabores, que como bien sabemos, es una de las que mueve mayor cantidad de dinero en el mundo, y es gracias a esto que se han dedicado tantos esfuerzos y recursos a realizar investigaciones en este campo.

2.1.3 Biotransformaciones logradas mediante *B. theobromae*

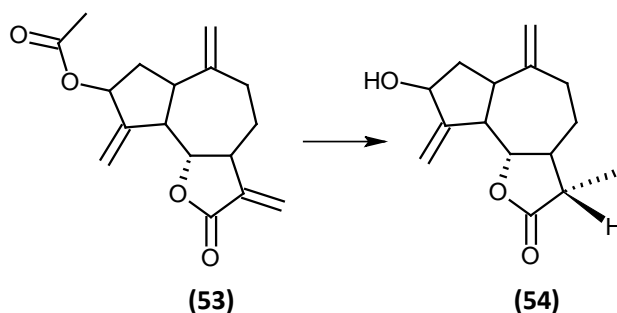
Si bien no se reportan estudios sobre los cambios metabólicos que el hongo *B. theobromae* podría realizar sobre moléculas como el safrol y dillapiol, sí se han realizado estudios con otro tipo de moléculas con funcionalidades químicas parecidas, que pueden brindar una perspectiva de los cambios que este microorganismo podría generar sobre este par de moléculas al ser expuesto a ellas bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, se ha observado que esta especie es capaz de introducir grupos hidroxilo en carbonos alifáticos como los de los esteroides, donde se encontró una preferencia por la hidroxilación en el carbono 7 α [86]. Además, en moléculas como el valenceno (**51**) se ha encontrado que no solo es capaz de realizar una hidroxilación, sino también de llevarla a la forma oxidada ceto; convirtiendo a este sesquiterpeno en la nootkatona (**52**), el componente aromático principal del pomelo (Figura 2-7) [87].

Figura 2-7: Transformación del valenceno (**51**) en nootkatona (**52**) por medio del hongo *B. theobromae* [87].



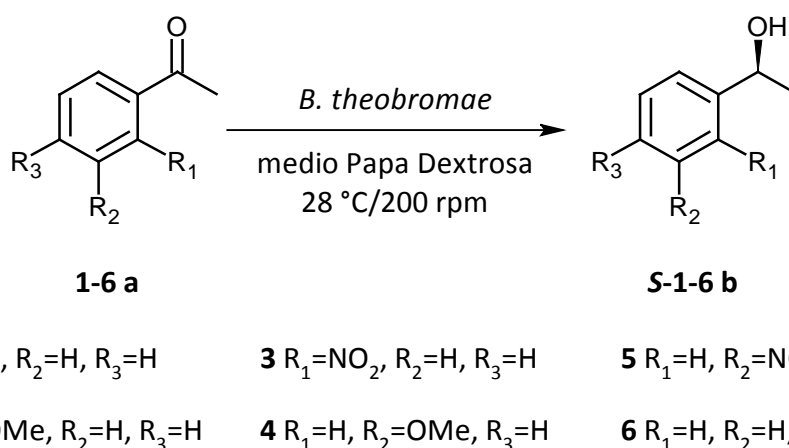
Sin embargo, las capacidades de este hongo en particular no se limitan solo a procesos oxidativos, ya que también se conocen procesos de biotransformación en los cuales están implicadas reacciones de reducción. Por ejemplo, en la lactona sesquiterpénica zaluzanin-D (**53**), el hongo *B. theobromae* fue capaz de realizar tanto la hidrogenación del doble enlace adyacente al carboxilo de la lactona, como la desacetilación; para una conversión del 94% (Figura 2-8). Estos procesos podrían estar relacionados con una estrategia defensiva por parte de estos microorganismos, ya que a este tipo de compuestos se les conoce su actividad antifúngica, citotóxica, antialimentaria, entre otras [88].

Figura 2-8: conversión de la lactona sesquiterpénica zaluzanin-D (**53**) en el producto reducido dihidrozaluzanin-C (**54**) al por medio de *B. theobromae* [88].



Estos procesos en los cuales están implicadas reacciones de reducción, han llamado especialmente la atención debido a la estereoespecificidad de los productos obtenidos, ya que estos pueden representar una alternativa útil en la síntesis de moléculas bioactivas que presentan centros quirales. Por ejemplo, al incubar este hongo con diferentes cetonas aromáticas proquirales se encontraron en todos los casos, excesos enantioméricos entre el 35 y 98 % en los alcoholes producidos. En este estudio, se descubrió que los alcoholes producidos eran en su mayoría de configuración *S*, como se reporta para otros microorganismos (Figura 2-9); pero que además, estos obedecían los llamados productos "Prelog" [89,90].

Figura 2-9: Reducción enantioselectiva de distintas cetonas aromáticas proquirales mediante *B. theobromae*, para la obtención de los alcoholes de configuración *S*, considerados en este caso los productos Prelog [89].



La biotransformación de fenilpropanoides por medio de hongos fitopatogénicos como *B. theobromae*, *Aspergillus sp* o las variedades de *Colletotrichum*, ha sido objeto de estudio de nuestro grupo desde años atrás. En estudios previos se observó que el cinamaldehído, que se postula como una buena alternativa para el control pos-cosecha de hongos fitopatógenos [91], puede ser convertido progresivamente en compuestos menos activos como alcohol cinámico, 3-fenil-1-propanol, y otros productos minoritarios, por el hongo filamentoso *Aspergillus sp* [92].

Por otra parte, los fenoles de origen natural timol y carvacrol, bien reconocidos por su alta actividad contra un gran rango de hongos y bacterias, pudieron ser biotransformados casi en un 50 % por los hongos fitopatógenos *B. theobromae* y *C. acutatum*¹². Los productos encontrados de dichas transformaciones correspondían a hidroxilaciones tanto aromáticas como alifáticas [93].

¹² En medio líquido y bajo ciertas condiciones

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Preparación del inóculo

El inóculo del hongo se realizó partir de cepas cultivadas con 20 días de anticipación en medio PDA. El micelio fue traspasado de las cajas Petri mediante pequeños cortes del agar ($\sim 1 \text{ cm}^2$), a erlenmeyer de 1 L con 500 mL del medio Czapeck-Dox (Glucosa 5 %, extracto de levadura 0,1 %, K_2HPO_4 0,5 %, NaNO_3 0,2 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 %). Luego, los inóculos se conservaron por un periodo de siete días bajo agitación constante (120 revoluciones por minuto, rpm), en un shaker orbital a temperatura ambiente ($\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$) y porcentajes de humedad relativa entre un 45 % y 60 %.

2.2.2 Ensayo preparativo

Luego de cultivar el micelio durante siete días en Czapeck, se traspasó mediante filtrado a un medio fresco que contenía la sustancia a evaluar, disuelta en etanol absoluto (en cantidad no superior a 2 mL EtOH/L de medio), a la concentración seleccionada según los ensayos de bioactividad. Cada experimento se realizó bajo agitación orbital por un periodo de 15 días, bajo las mismas condiciones ambientales del inóculo.

2.2.3 Análisis en el curso del tiempo

Para analizar la dinámica del metabolismo de ambas sustancias, se dispusieron 15 erlenmeyers con 125 mL de medio, el inóculo del hongo y la sustancia a evaluar a la concentración seleccionadas según los ensayos *in vitro*.

Con el objetivo de analizar la cinética de los productos de biotransformación, cada 12 h (0 hasta 120 h), y luego cada 48 h (120 hasta 216 h), se retiró una muestra y se sometió al proceso de extracción, concentración y posterior análisis cromatográfico.

2.2.4 Extracción de los productos metabólicos

Finalizado el tiempo estipulado para cada ensayo (tanto preparativo como en el curso del tiempo), se retiró el micelio del medio mediante filtración, se saturó el filtrado con cantidad suficiente de cloruro de sodio, y se realizó triple extracción con volúmenes iguales de acetato de etilo. Posteriormente, la fase acuosa de la etapa anterior se llevó a pH ~ 2 con HCl con el fin mantener los posibles productos de carácter prótico en su forma no ionizada, favoreciendo así su desplazamiento hacia la fase orgánica. Ambos extractos fueron concentrados hasta sequedad mediante evaporación a

presión reducida y posteriormente analizados en busca de productos de biotransformación de cada sustancia exógena agregada.

2.2.5 Purificación e identificación de los productos de biotransformación

El aislamiento y purificación de los posibles productos de biotransformación se llevó a cabo mediante cromatografía en capa delgada (CCD) (Si 60 F₂₅₄, 0,25 mm, Merk); como sistema de elusión se emplearon mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo y para la detección radiación UV (254 nm y 365 nm) y aspersión con CH₃COOH:H₂SO₄:CH₃CH₂OH (143:28:30); también se utilizó la cromatografía en columna (CC) en fase normal con sílica gel 60 (0,040-0,063 mm; Merck) y Sephadex LH-20. Los productos purificados fueron llevados a sequedad y almacenados en viales sellados en oscuridad y a una temperatura de 4 °C para su posterior identificación.

La identidad de cada compuesto se llevó a cabo mediante ¹H-RMN y ¹³C-RMN; y con ayuda de sus patrones de fragmentación en espectrometría de masas (EM).

La identidad de cada compuesto se llevó a cabo mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹HRMN) y de carbono 13 (¹³CRMN); y con ayuda de sus patrones de fragmentación en Espectrometría de Masas (EM).

2.2.6 Análisis de la rotación óptica

Con el objetivo de comprobar la actividad óptica debida a excesos enantioméricos de los productos de biotransformación, se midió la rotación específica a 25 °C de cada uno de los compuestos aislados en un equipo Jasco P 2000. Se empleó una celda de vidrio de 1 dm de longitud y la línea D del sodio 589 nm ($[\alpha]_D^{25}$). Para ello se usaron muestras de los productos de biotransformación disueltas en cloroformo a concentraciones entre $1,1 \times 10^{-2}$ g/mL y $1,75 \times 10^{-3}$ g/mL; y se realizaron las medidas por triplicado.

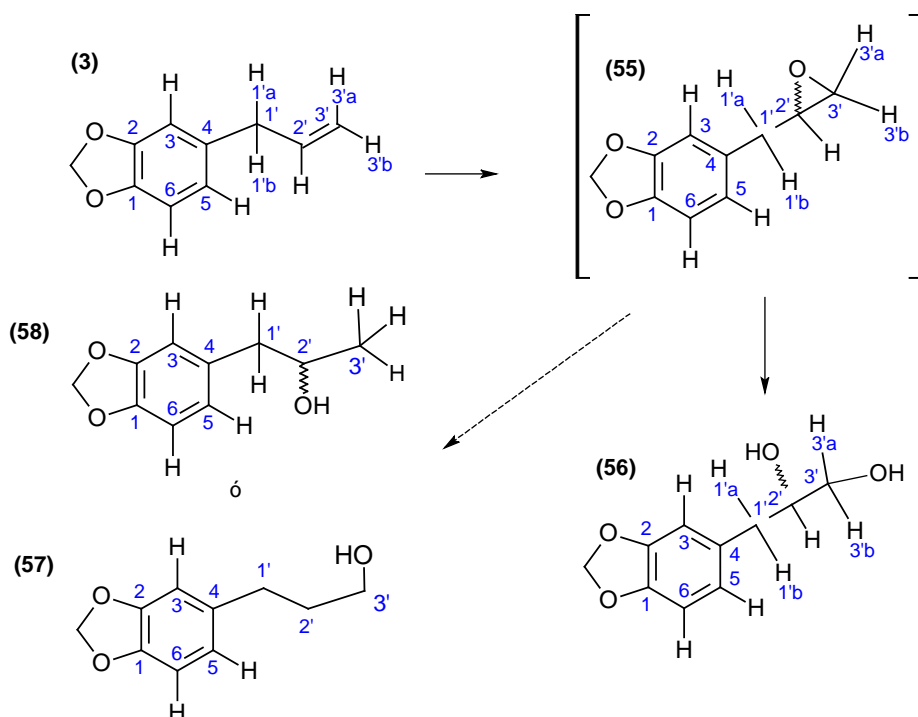
2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Productos de biotransformación del safrol y dillapiol

Para llevar a cabo el análisis del metabolismo de ambos sustratos por parte del hongo, fue necesario determinar primero una concentración adecuada. A esta concentración el sustrato no debía inhibir por completo el crecimiento del hongo, pero sin embargo debía ser lo suficiente como para estresar el microorganismo. La concentración de cada sustrato fue seleccionada con base en los ensayos de inhibición de crecimientos radial del hongo objeto de estudio cuando se emplearon diferentes concentraciones de safrol y dillapiol (véase cap. 1 sección 1.3.5). Para la biotransformación se tomaron valores en los cuales se obtuvo una inhibición cerca al 50 %. Concentraciones que fueron de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para el safrol y 50 $\mu\text{g/mL}$ para el dillapiol.

Luego de realizar las respectivas extracciones, separaciones y concentraciones de la fase orgánica del ensayo preparativo, se logró identificar mediante CCD un compuesto mayoritario que no estaba presente en el blanco negativo. Éste se purificó mediante cromatografía en columna, obteniéndose un compuesto sólido de cristales blancos. Luego de purificar y analizar espectroscópica y espectrométricamente este compuesto se observó que se trataba del 2',3'-dihidroxi-dihidosafrol (**56**) (Figura 2-10).

Figura 2-10: Posible ruta de biotransformación del safrol (**3**) en sus productos 2',3'-dihidroxi-dihidosafrol (**56**), al que llegaría a través del óxido de safrol (**55**). También el 3'-hidroxi-dihidosafrol (**57**) y/o 2'-hidroxi-dihidosafrol (**58**). Entre corchetes productos intermedios no identificados.



En la Tabla 2-1 se resumen los desplazamientos químicos de ^1H -RMN observados para el safrol y el producto principal de la biotransformación (**56**). Se observó que (**56**) posee las señales características del safrol, tanto en la parte aromática como en el sistema metilendioxi; pero con diferencias en la cadena lateral, donde desaparecen las señales de los hidrógenos olefínicos y aparecen nuevos multipletes a campo alto debido al hidrógeno sobre el carbono quiral de la posición 2'. Este compuesto produjo una rotación de la luz polarizada con valor de $[\alpha]_D^{25} = (+8,5943 \pm 1,1 \times 10^{-3})^\circ$ (dextrógiro), lo que indica cierta selectividad por parte de las enzimas del hongo, en el proceso de inclusión del grupo funcional en el compuesto, generando una mayor proporción de uno de los estereoisómeros.

Tabla 2-1: Desplazamientos químicos para el safrol y su principal producto de biotransformación por parte del hongo *B. theobromae*, el 2',3'-dihidroxisafrol. Datos obtenidos a 300 y 75 MHz respectivamente, en CDCl_3 ; δ en ppm; J en Hz.

Posición	safrol		2',3'-dihidroxisafrol	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^{13}C	δ ^1H
1	-	146,13	-	-
2	-	147,94	-	-
3	6,81 (s; 1H)	108,33	-	6,77 (s; 1H)
4	-	134,02	-	-
5	6,86 (d; $J = 8,0$; 1H)	121,51	6,72 (d; $J = 7,0$; 1H)	
6	6,74 (d; $J = 8,0$; 1H)	109,27	6,75 (d; $J = 7,0$; 1H)	
1'	3,41 (d; $J = 6,9$; 2H)	40,12	-	3,49-3,59 (m; 2H)
2'	6,06 (ddt; $J = 16,2$; 10,7; 6,6; 1H)	137,88	-	3,85-3,97 (m; 1H)
3'a	5,22 (d; $J = 6,0$; 1H)	115,84	-	3,65-3,77 (m; 2H)
3'b	5,17 (m; 1H)	-	-	-
-O-CH ₂ -O-	5,98 (s; 1H)	101,00	-	5,94 (s; 2H)

Adicionalmente, mediante el análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas de los extractos del seguimiento en el curso del tiempo, se detectó un compuesto con relación masa/carga (m/z) igual a 180 para su ion molecular (ver Anexo), y cuyo fragmentograma sugiere uno de dos posibles productos de biotransformación (Figura 2-10): el 3'-hidroxidihidosafrol (**57**) o el 2'-hidroxidihidosafrol (**58**), que podrían haber sido formados luego de la apertura del epóxido que se plantea como intermedio de la biotransformación de este tipo de sustancias [70,85]. Para ambos, el pico base consiste de la porción del anillo aromático sumado al primer carbono de la cadena, formando un tipo de ion tropilio con relación masa/carga igual a 135.

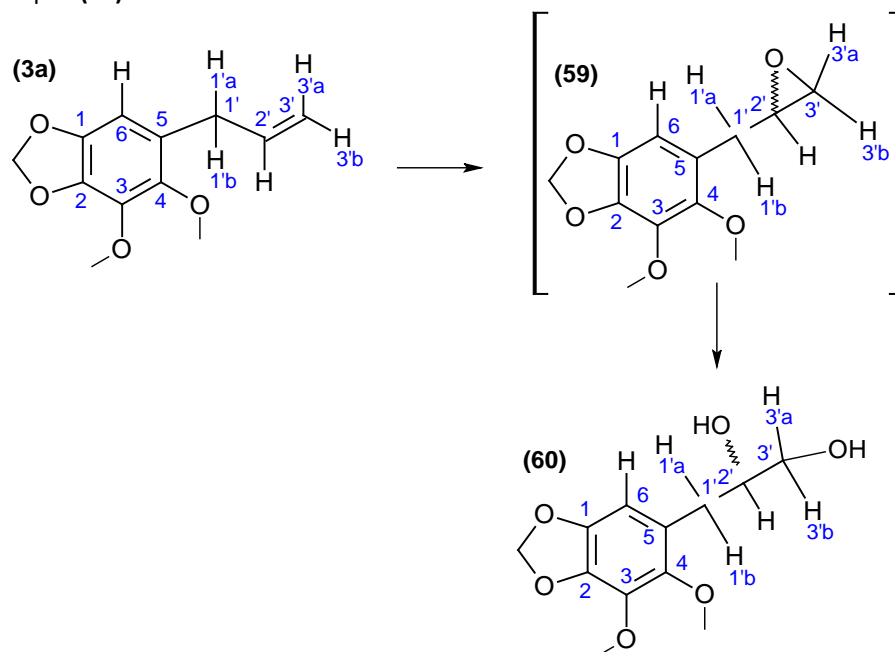
Los productos de biotransformación del safrol, a pesar de hallarse en muy baja proporción respecto al sustrato inicial, son consecuentes con las rutas de transformaciones generadas por hongos sobre los fenilpropanoides [83]. Por último, lo esperado según resultados con otras especies de hongos [80,81], es que con un

poco más de tiempo la ruta llegará a su final produciendo el piperonal, piperonol y/o ácido piperonílico. Pero estos compuestos no fueron identificados en nuestros análisis.

Por otro lado, cuando se empleó dillapiol como sustrato para la biotransformación, y posterior purificación del extracto, se obtuvo un sólido blanco cristalino correspondiente al compuesto análogo 2',3'-dihydrodihydrodillapiol (**60**). En la Tabla 2-2 se presentan las señales y desplazamientos de ^1H -RMN para (**60**), las cuales son similares a las encontradas para 2',3'-dihydrodihydrosafrol, exceptuando los hidrógenos sobre el anillo aromático. Estos desplazamientos coinciden con los reportados para el 2',3'-dihydrodihydrodillapiol preparado semisintéticamente [49]. Para la formación de este producto se plantea una ruta metabólica (Figura 2-11) similar a la de safrol, en la cual el sustrato pasaría por un intermedio tipo epóxido que posteriormente sería hidratado para formar el diol encontrado.

De forma similar, este producto también presenta actividad óptica, produciendo un $[\alpha]_D^{25} = (-7,1310 \pm 0,4 \times 10^{-3})^\circ$ (levógiro) que demuestra nuevamente la selectividad del producto de la transformación enzimática, esta vez con el dillapiol.

Figura 2-11: Posible ruta metabólica para el dillapiol (**3a**) por parte del hongo *B. theobromae*. El cual pasa por un intermedio epoxidado (**59**) para generar el principal producto de biotransformación 2',3'-dihydrodihydrodillapiol (**60**).

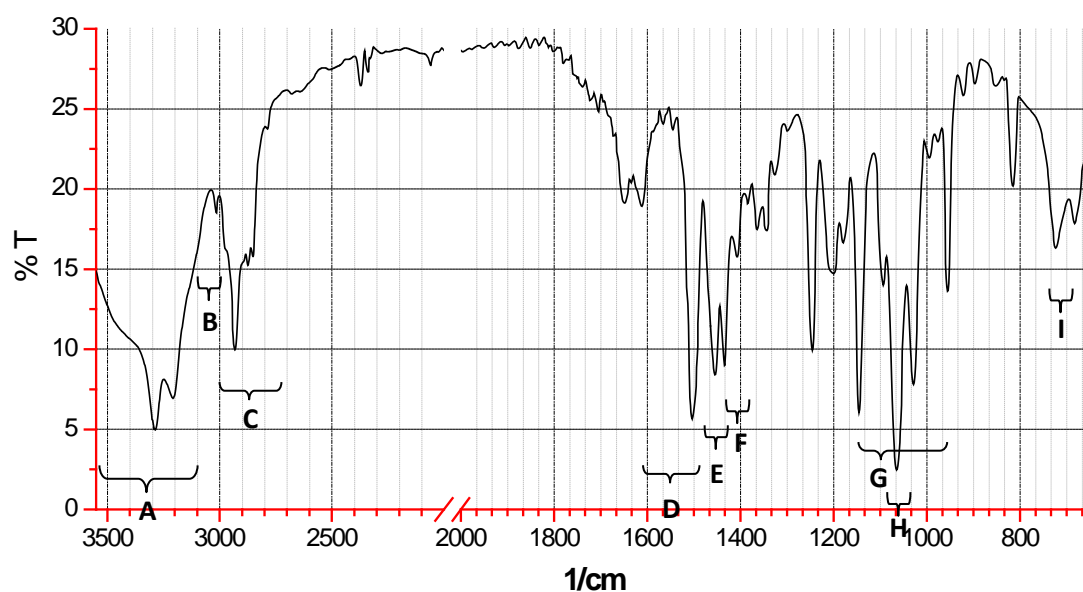


La confirmación de la identidad de los sustituyentes introducidos en la cadena lateral por parte del hongo se logró mediante el análisis por espectroscopía infrarroja del sólido obtenido (Figura 2-12).

Tabla 2-2: Desplazamientos químicos para el dillapiol y su principal producto de biotransformación por parte del hongo *B. theobromae* el 2',3'-dihidroxi-dihidro-dillapiol. Datos obtenidos a 300 y 75 MHz respectivamente, en CDCl₃; δ en ppm; J en Hz.

Posición	dillapiol		2',3'-dihidroxi-dihidro-dillapiol	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1	-	139,50	-	
2	-	135,55	-	
3	-	136,69	-	
4	-	139,12	-	
5	-	126,20	-	
6	6,31 (s; 1H)	108,66	6,33 (s; 1H)	109,81
1'a	3,27-3,35 (m; $J = 6,3; 2H$)	34,49	2,76-2,81 (dd; $J = 13,6; 5,7; 1H$)	34,71
1'b			2,70-2,75 (dd; $J = 13,6; 7,3; 1H$)	
2'	5,87-6,00 (m; 1H)	137,76	3,82-3,89 (m; 1H)	73,02
3'a	4,99-5,09 (m; $J = 13,6; 1,8; 2H$)	115,78	3,60-3,64 (dd; $J = 11,4; 3,5; 1H$)	66,21
3'b			3,47-3,51 (dd; $J = 11,4; 6,0; 1H$)	
-O-CH ₂ -O-	5,96 (s; 2H)	101,92	5,97 (s; 2H)	102,09
(3)-O-CH ₃	3,86 (s; 3H)	57,29	3,86 (s; 3H)	57,37
(4)-O-CH ₃	3,88 (s; 3H)	60,56	3,92 (s; 3H)	60,58

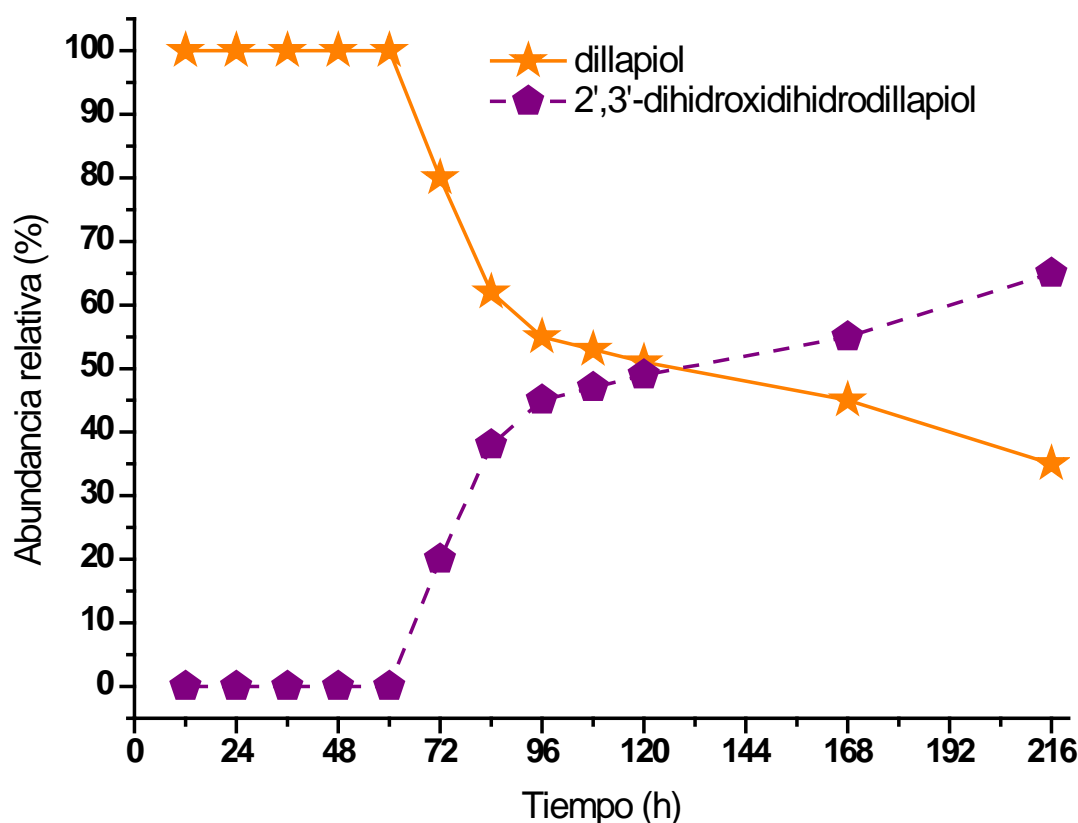
Figura 2-12: Espectro infrarrojo para 2',3'-dihidroxi-dihidro-dillapiol. **A:** estiramiento de enlaces O-H, desplazados a números de onda menores por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, 3289 cm⁻¹, 3206 cm⁻¹; **B:** estiramiento C-H para hidrógenos sobre carbonos aromáticos, 3015 cm⁻¹; **C:** estiramientos C-H sobre carbonos alifáticos, principalmente metilénicos (-CH₂), 2999–2763 cm⁻¹; **D:** estiramientos C=C del anillo 1611, 1503 cm⁻¹; **E:** movimiento de tijera de grupos metilénicos 1455; **F:** flexiones en el plano de O-H 1435 cm⁻¹; **G:** estiramientos C-O, 1146, 1028 cm⁻¹; **H:** flexión C-H en el plano, 1065 cm⁻¹; **I:** movimiento "rock" de los metilenos, 724 cm⁻¹.



2.3.2 Análisis en el curso del tiempo

Luego de analizar los cromatogramas obtenidos para los extractos de los procesos de biotransformación de ambas sustancias, para el dillapiol se pudo realizar una curva de abundancia relativa del producto obtenido (%), respecto al sustrato inicial (Figura 2-13). Se observó que el dillapiol no sufre cambios estructurales apreciables sino a partir de las 60 h de incubación, tiempo en el que se comienza a general el producto metabólico principal (**60**). Dicha transformación muestra una tendencia exponencial que se mantiene hasta el último día del ensayo, lo que sugiere que ésta continuaría hasta consumir por completo el sustrato. También se observó el carácter fungistático del dillapiol en el medio líquido utilizado (Czaeck-Dox), por un periodo de por lo menos 60 h. No obstante, después de este periodo el hongo se desarrolla y exhibiendo capacidad para transformar el sustrato en un compuesto de carácter más polar (diol).

Figura 2-13: Cinética de la formación del principal producto de biotransformación del dillapiol por el hongo *B. theobromae* en el medio Czaeck-Dox durante un periodo de 216 h.



Sin embargo, para el safrol no pudo hacerse seguimiento de los productos de biotransformación debido a que las cantidades de estos en el medio no fueron apreciables; En su lugar, el sustrato se mantuvo sin transformar durante el tiempo del ensayo.

La poca transformación por parte del hongo *B. theobromae* del safrol, puede estar relacionada con la relativamente baja actividad antifúngica *in vitro* (véase cap. 1 sección 1.3.5). Ya que al realizar la comparación con el dillapiol, donde sí se observó buena actividad fungistática (véase cap. 1 sección 1.3.5), y transformación progresiva del sustrato; se podría intuir que el estrés generado sobre el microorganismo puede incrementar o activar su capacidad enzimática, en pro de la disminución de la concentración de la sustancia exógena que genera condiciones en el medio no propicias para el desarrollo.

Capítulo 3 Síntesis de derivados del safrol y dillapiol, y su actividad antifúngica contra el hongo *B. theobromae*

3.1 Antecedentes

3.1.1 Desarrollo racional de fungicidas

El uso de sustancias químicas para el control de plagas que afectan plantas frutales y de consumo se conoce desde 1850, donde los franceses controlaban el mildiú¹³ de los viñedos mediante la “Mezcla Bordeaux”, consistente en sulfato de cobre (II) (CuSO₄) e hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) [94]. Desde entonces, se han descubierto y desarrollado nuevas sustancias activas contra hongos, a tal punto que a la fecha se reportan para la Unión Europea un total de 283, entre aprobadas y no aprobadas¹⁴.

Sin embargo, y pese a esta cantidad, no cesan los esfuerzos por encontrar nuevas y mejoradas sustancias antifúngicas, ya que muchas de las utilizadas actualmente suelen ser tóxicas para otros organismos incluyendo al hombre. Muchos de estos problemas de toxicidad radican en que sus principios activos corresponden a moléculas cuyos núcleos son de origen “no natural”, por lo que la degradación mediante procesos enzimáticos, en organismos vivos, suele a ser muy lenta. Otras sustancias han perdido poder antifúngico debido a los procesos de resistencia que han generando los patógenos con el pasar del tiempo; mientras que otras, no tienen la suficiente estabilidad para su uso en campo.

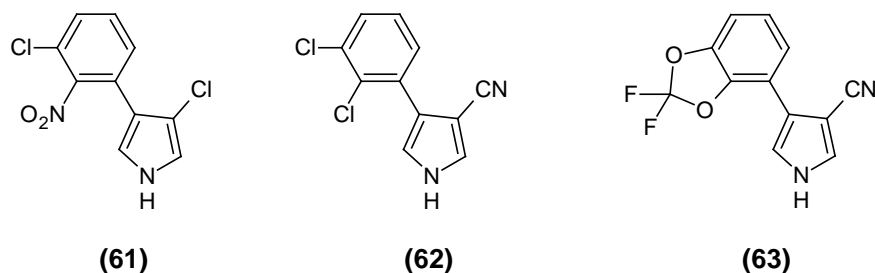
Muchos productos naturales que poseen actividad antifúngica corresponden a estructuras simples, que son apropiadas como puntos de partida para su mejoramiento mediante síntesis química [94]. Un ejemplo de ello es la pirrolnitrina (**61**) (Figura 3-1), un metabolito secundario de *Pseudomonas pyrocinia* [95] a partir del cual se sintetizaron dos agentes, que utilizados como recubrimiento de semillas,

¹³ Enfermedad producida por el moho *Plasmopara viticola*, un protista fungoide oomiceto

¹⁴ http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection

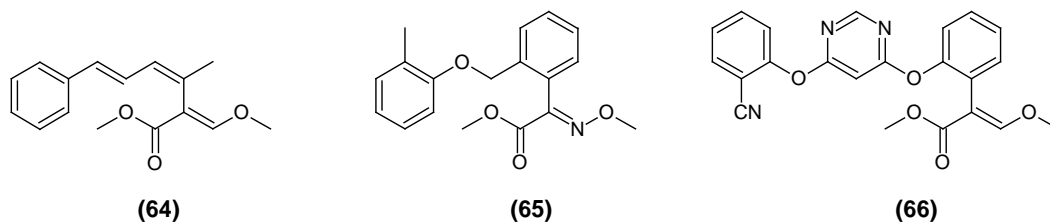
sirven para controlar numerosos patógenos de origen fúngico. Estos agentes son el fenpiclonil **(62)** y el fludioxonil **(63)**; este último con una fotoestabilidad mejorada sobre los dos anteriores, y se ha empleado como fungicida foliar contra hongos como *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp. y *Sclerotinia* spp [96].

Figura 3-1: Estructura de la pirrolnitrina **(61)** y sus derivados sintéticos: fenpiclonil **(62)** y fludioxonil **(63)**.



Otro ejemplo de sustancias de origen natural con actividad antifúngica es la Estrobilurina A **(64)** (Figura 3-2), aislada del hongo basidiomiceto *Strobilurus tenacellus* [97], y que es capaz de inhibir la respiración mitocondrial. Este compuesto tiene actividad antifúngica *in vitro* contra una serie de hongos fitopatógenos, pero su actividad *in vivo* es mucho menor debido a su inestabilidad fotoquímica. Este hecho impulsó el desarrollo de programas sintéticos por parte de las compañías ICI¹⁵ y BASF¹⁶, con el objetivo de mejorar la estabilidad a la luz, disminuir la toxicidad aguda en mamíferos y mejorar las propiedades de movimiento dentro de la planta. De estos programas se obtuvieron las primeras estrobilurinas sintéticas, utilizadas como fungicidas comerciales de amplio espectro, que inhiben la germinación de las esporas de hongos de los principales grupos taxonómicos. Estos se conocen con los nombres de Kresoxim-metil **(65)** (fabricada por la multinacional BASF) y Azoxystrobin **(66)** (fabricada por ICI).

Figura 3-2: Estructura de la Estrobilurina A **(64)** y sus derivados mejorados sintéticamente: Kresoxim-metil **(65)** y Azoxystrobin **(66)**.



¹⁵ Compañía inglesa de nombre: Imperial Chemical Industries

¹⁶ Sigla alemana: *Badische Anilin und Soda-Fabrik*

Al igual que en estos ejemplos, otras moléculas también han sido blanco de modificaciones de tipo estructural en pro de su desarrollo como agentes antifúngicos, pero todas ellas a la final siguen el mismo principio:

1. Primero partir de una molécula de origen natural que posea actividad antifúngica. Preferiblemente que correspondan a núcleos sencillos desde el punto de vista sintético.
2. Determinar la parte de la estructura que se relaciona estrechamente con el modo de acción del compuesto, y que, por lo tanto, es responsable de la actividad biológica. Por lo general es aquella parte de la estructura que al ser modificada, ocasiona una drástica disminución de la actividad biológica.
3. Realizar cambios sistemáticos sobre las partes de la molécula diferentes a la porción activa.
4. Evaluar nuevamente su actividad biológica, tanto en hongos (antifúngica) como en mamíferos u otras especies (toxicidad).

3.1.2 Derivatización de fenilpropanoides

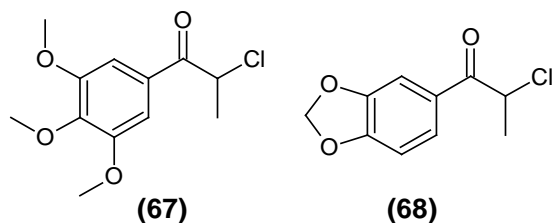
Los compuestos denominados fenilpropanoides han sido reportados muchas veces por poseer actividad contra hongos, ya sean dermatofitos o fitopatogénicos [98,99]. Sin embargo, estos también han sido objeto de modificaciones de tipo estructural en busca de mejoras en esta actividad. De este tipo de análisis se han podido encontrar relaciones de tipo estructura-actividad, que permiten identificar las partes que juegan un papel fundamental en la actividad de la molécula; lo que brinda herramientas útiles a la hora de hacer el diseño racional de un antifúngico [99,100].

Por ejemplo, en un ensayo se probó la actividad contra dermatofitos de una serie de fenilpropanoides entre los que se encontraban el safrol, eugenol, isoeugenol, metileugenol, metoxieugenol feniletilacetona, entre otros derivados halogenados. Se encontró, para la mayoría de los compuestos, valores de CMI de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o incluso menores, siendo más activos aquellos que en la cadena lateral poseían un grupo carbonilo adyacente al anillo y un halógeno adyacente al carbonilo (Figura 3-3) [99]. De las comparaciones realizadas se concluyó lo siguiente:

1. Que los átomos de cloro realizan un mayor aporte a la actividad antifúngica que los átomos de bromo, cuando actúan como sustituyentes sobre la cadena lateral.
2. Que la presencia del halógeno en estas estructuras quizás no es la directamente responsable de la actividad, pero sí contribuye con la misma.

3. Que el efecto principal del átomo halógeno sobre la actividad era de carácter electrónico y no estérico.

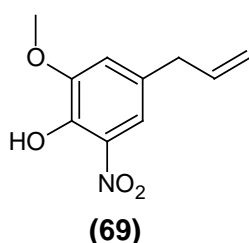
Figura 3-3: Estructura de los fenilpropanoides más activos de su serie, correspondiente a los derivados clorados **(67)** y **(68)**.



Otros estudios se han realizado con eugenol, safrol y sus derivados correspondientes a nitraciones sobre el anillo, isomerización del doble enlace de la cadena alílica, acetilaciones de grupos hidroxilo, reducciones e hidroxilaciones sobre la cadena, entre otros. Esta serie de compuestos se ensayaron sobre hongos oportunistas fitopatogénicos en humanos como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, y dermatofitos; encontrando que el 2-metoxi-6-nitro-4-(prop-2-en-1-il)fenol **(69)** fue el compuesto más activo (Figura 3-4). De estos estudios de relación estructura-actividad se pudo determinar lo siguiente:

1. Que no había relación directa entre la lipofilicidad o hidrofobicidad de los derivados y la actividad observada,
2. Que la hidrogenación o isomerización del doble enlace de la cadena alílica (originalmente entre las posiciones 2'-3') ocasiona una pérdida sustancial de dicha actividad.
3. Que la inclusión de un grupo nitro sobre el anillo solo tiene un aporte relevante cuando se trata de un compuesto fenólico. Y la actividad es diferenciada según la posición de la nitración.

Figura 3-4: Estructura del 2-metoxi-6-nitro-4-(prop-2-en-1-il)fenol **(69)**, compuesto más activo de su serie contra hongos oportunistas fitopatogénicos en humanos y dermatofitos.



De forma adicional se examinó el modo de acción de este derivado más activo, encontrando que no se trataba de interferencias en el proceso biosintético de la pared celular de los hongos, ya que la actividad no se invierte en presencia de un soporte osmótico como el sorbitol. Tampoco se trataba de un acomplejamiento del ergosterol de la membrana con el compuesto, pues al agregar ergosterol de una

fuerza externa, no se observó un incremento significativo en la CMI. Sin embargo, los ensayos de rompimiento de la membrana celular arrojaron resultados positivos, mostrando una relación directa entre la concentración del compuesto y este rompimiento [100].

En general, de estos estudios que implican la preparación de derivados sintéticos de compuestos bioactivos, se puede extraer información importante respecto a la relación entre la estructura del compuesto y la actividad biológica en cuestión. Información que puede ser de mucha utilidad a la hora de intentar optimizar la actividad encontrada para un determinado compuesto de origen natural.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Nitraciones

Para realizar las nitraciones del safrol y dillapiol, se llevaron a enfriamiento (-5 °C) soluciones de cada compuesto (1,0 g) disueltos en ácido acético (2 mL); seguidamente, se agregó lentamente (gota a gota), y en agitación, la mezcla nitrante (ácido sulfúrico/ácido nítrico en relación 10:1). Las reacciones se dejaron a (-5 °C y bajo agitación entre 4 y 6 h, realizándose un seguimiento del progreso mediante cromatografía de capa delgada (CCD). Al finalizar este tiempo, se agregaron 5 mL de agua, se neutralizó con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) sólido hasta saturación, y se extrajeron los compuestos con cloroformo (3x25 mL). Por último, se descartaron las fases acuosas y se secaron las fases orgánicas con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4); se evaporó el solvente mediante destilación a presión reducida y se guardaron los compuestos obtenidos para sus posteriores purificaciones.

3.2.2 Aminaciones

Para las aminaciones se emplearon como compuestos de partida los derivados purificados obtenidos en las respectivas nitraciones, los cuales se redujeron selectivamente disolviendo 500 mg de cada compuesto en 1 mL de HCl (conc.) y agregando pequeñas cantidades de Sn sólido. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 6 h y se realizó seguimiento mediante CCD. Luego de este tiempo, se agregaron 5 mL de agua, se neutralizó con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) sólido hasta saturación, y se extrajeron los compuestos con cloroformo (3x25 mL). Finalmente, se descartaron las fases acuosas y se secaron las fases orgánicas con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4); se evaporó el solvente orgánico mediante

destilación a presión reducida y se guardaron los compuestos obtenidos para sus posteriores purificaciones.

3.2.3 Purificación y caracterización de los derivados sintéticos

El seguimiento de los derivados sintetizados se llevó a cabo mediante Cromatografía en Capa Delgada (CCD) (Si 60 F₂₅₄, 0,25 mm, Merk), eluidas con mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo y visualizadas mediante radiación UV (254 nm y 365 nm) y por aspersion con CH₃COOH:H₂SO₄:CH₃CH₂OH (143:28:30); Para el aislamiento y purificación se utilizó la cromatografía en columna (CC) en fase normal con sílica gel 60 (0,040-0,063 mm; Merck) y Sephadex LH-20. Los productos purificados fueron llevados a sequedad y almacenados para su posterior identificación. La identidad de cada compuesto se llevó a cabo mediante ¹H-RMN y ¹³C-RMN.

3.2.4 Ensayos *in vitro*

Los ensayos de actividad antifúngica *in vitro* se realizaron con la metodología anteriormente descrita (véase cap. 1 sección 1.2.8), utilizando PDA como medio [40]. Las sustancias analizadas se incorporaron al medio sólido usando etanol absoluto como vehículo, y mejorando la solubilidad, en algunos casos, con Tween 80 para aquellos compuestos poco solubles en etanol. En este ensayo se incluyeron, además de los blancos positivo y negativo, los compuestos de partida (safrol y dillapiol) y el producto principal de la biotransformación del dillapiol; Con fines comparativos, todos los compuestos se evaluaron a una única concentración de 50 µg/mL.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Identificación de los derivados

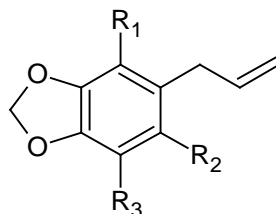
En las Tablas 3-1 y 3-2 se resumen los desplazamientos químicos encontrados mediante espectroscopía de ¹H-RMN y ¹³C-RMN para los derivados sintéticos.

Mediante estos desplazamientos se pudo comprobar que los productos obtenidos correspondían a los derivados nitrados y aminados en la posición 4 del anillo aromático del safrol, y en la posición 6 del dillapiol (Figura 3-5). Las características físicas de los derivados eran similares para safrol y dillapiol, siendo los compuestos nitrados líquidos a temperatura ambiente y con color amarillo pálido; mientras que las aminas de ambos se obtuvieron como sólidos de color marrón.

Los desplazamientos en ¹³C-RMN para los productos obtenidos coinciden con los reportados por otros autores [100,101]. Además, para los derivados del dillapiol se

observó la desaparición de la señal del hidrógeno sobre el anillo aromático, lo que confirma la sustitución con el respectivo grupo funcional.

Figura 3-5: estructuras de los derivados obtenidos para las reacciones de nitración y aminación, para safrol y dillapiol.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
safrol	H	H	H
nitrosafrol	H	NO ₂	H
aminosafrol	H	NH ₂	H
dillapiol	H	OCH ₃	OCH ₃
nitrodillapiol	NO ₂	OCH ₃	OCH ₃
aminodillapiol	NH ₂	OCH ₃	OCH ₃

Tabla 3-1: Desplazamientos químicos para los derivados sintéticos de safrol: nitrosafrol y aminosafrol. Datos obtenidos a 300 y 75 MHz respectivamente, en CDCl₃; δ en ppm; J en Hz.

Posición	nitrosafrol		aminosafrol	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1	-	151,73	-	
2	-	146,49	-	
3	7,51 (s; 1H)	110,43	6,57 (s; 1H)	97,92
4	-	142,78	-	
5	-	132,24	-	
6	6,78 (s; 1H)	105,66	6,29 (s; 1H)	109,62
1'a	3,66-3,69 (d; J = 6,6; 2H)	37,62	3,21-3,23 (d; J = 6,0; 1H)	
1'b			35,82	
2'	5,92-6,06 (ddt; J = 16,8; 10,2; 6,6; 1H)	135,23	5,85-5,96 (ddt; J = 16,8; 10,2; 6,3; 1H)	
3'a	4,99-5,09 (dd; J = 13,6; 1,8; 2H)	117,03	5,09-5,13 (dd; J = 6,0; 1,8; 1H)	
3'b			5,05-5,06 (d; J = 1,5; 1H)	
-O-CH ₂ -O-	6,12 (s; 2H)	102,81	5,85 (s; 2H)	

Tabla 3-2: Desplazamientos químicos para el derivado sintético de dillapiol: nitrodillapiol. Datos obtenidos a 300 y 75 MHz respectivamente, en CDCl₃; δ en ppm; *J* en Hz.

Posición	nitrodillapiol	
	δ ¹ H	δ ¹³ C
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
1'	3,26-3,28 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 6,1; 2H)	30,23
2'	5,77-5,91 (<i>ddt</i> ; <i>J</i> = 15,7; 9,6; 6,6; 1H)	135,24
3'	5,01-5,05 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 12,37; 1,1; 2H)	116,70
-O-CH ₂ -O-	6,03 (<i>s</i> ; 2H)	102,78
(3)-O-CH ₃	3,93 (<i>s</i> ; 3H)	60,78
(4)-O-CH ₃	3,98 (<i>s</i> ; 3H)	61,45

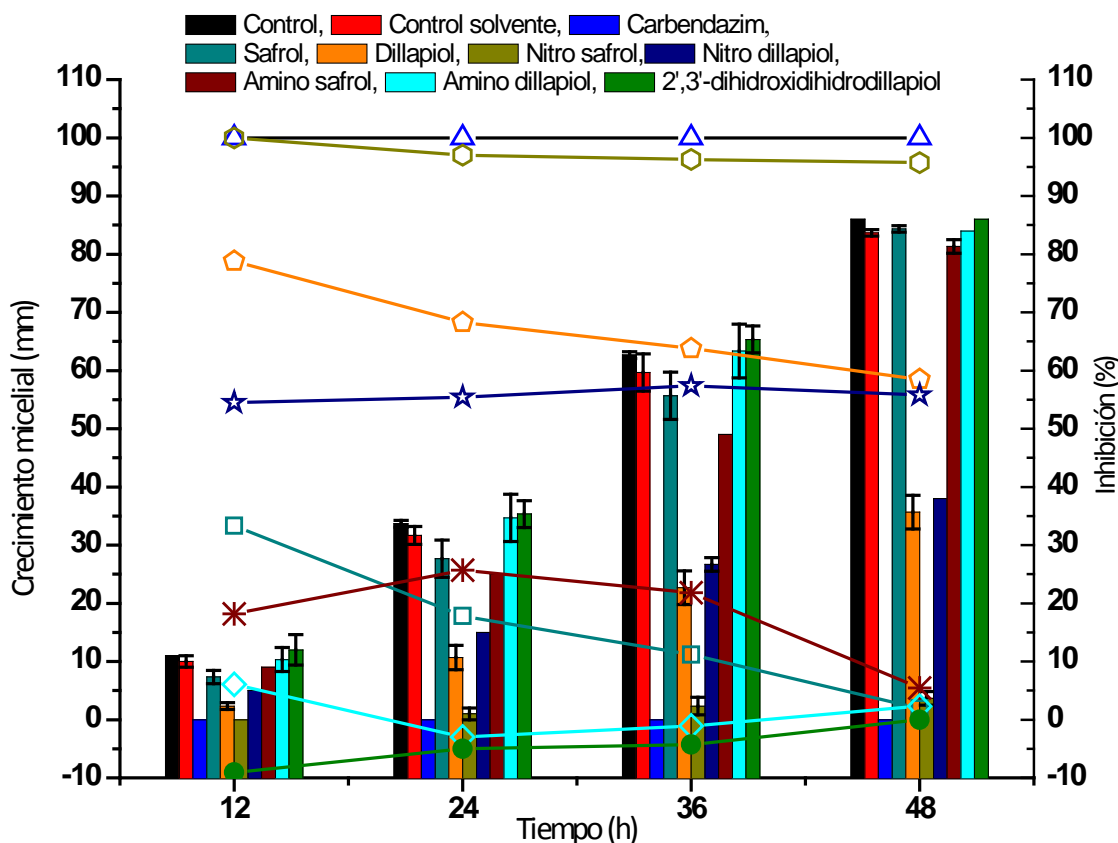
3.3.2 Actividad antifúngica *in vitro*

Los resultados de la actividad de los diferentes compuestos y derivados se presentan en la Figura 3-6 en términos de crecimiento micelial. Del análisis de estas curvas de crecimiento se realizaron las siguientes observaciones:

1. El grupo amino como sustituyente en anillo del dillapiol, ocasiona una disminución en la actividad, representada por un crecimiento del microorganismo casi a la par que los blancos negativos.
2. El grupo amino como sustituyente en el anillo aromático del safrol ocasiona un aumento de la actividad muy leve, que se observa solo entre las 24 y 36 h del ensayo.
3. El grupo nitro introducido en el anillo aromático del dillapiol genera una disminución muy leve de la actividad observada para este compuesto a esta concentración.
4. La nitración del anillo de safrol ocasiona un aumento considerable de la actividad a la concentración ensayada. La inhibición ocasionada por este

derivado se mantuvo casi estable durante el periodo ensayado, y a las 48 h fue de 95,7 % en comparación con el 1,9 % originado por safrol a esta misma concentración.

Figura 3-6: Curvas de crecimiento micelial del hongo *B. theobromae* inhibido por safrol, dillapiol, los derivados sintéticos y 2',3'-dihidroxi-dihidro-dillapiol a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$.



De forma general se observó que la inclusión de un sustituyente electron-dador como el grupo amino no genera un aporte apreciable a la actividad antifúngica de este tipo de núcleos. No obstante, en compuestos como el dillapiol puede llegar a inactivar la molécula de tal forma que desaparece la actividad que ya se observaba para el compuesto sin derivatizar.

También se observó que la sustitución del anillo aromático con un grupo electron-atrayente como el nitro, puede o no aumentar significativamente la actividad. Por ejemplo, en el dillapiol, donde se encuentra sobre el anillo otros sustituyentes electron-dadores como los metoxilo, el aporte del grupo nitro no es al parecer apreciable (por lo menos no en este ensayo preliminar, y a esta concentración testeada). Sin embargo, en anillos con menos sustituyentes electron-dadores como el safrol, se incrementó considerablemente la actividad antifúngica (ca. 50,4 veces mayor).

Estas observaciones son coherentes con lo observado por Carrasco, Raimondi *et al.* [100], quienes prepararon distintos derivados para safrol y eugenol, y encontraron que el más activo contra dermatofitos era el **(69)** (Figura 3-4).

Adicionalmente se analizó el compuesto obtenido tras la biotransformación del dillapiol, con el cual se observa que la desaparición del doble enlace de la cadena lateral está ligada con la pérdida de la actividad antifúngica. Esto también fue reportado por Carrasco, Raimondi *et al.* [100], quienes observaron que la actividad no solo decrecía con la reducción de este doble enlace, sino también con la isomerización; lo que indica que esta cadena de tres carbonos juega un importante papel en la actividad de estos compuestos, no solo por su insaturación, sino también por su posición en la cadena.

Adicionalmente, estos mismos autores observaron que la actividad de estas moléculas no tiene una directa relación con la lipofilicidad o hidrofobicidad que poseen. Sino con un proceso de ruptura de la membrana y posterior liberación de los componentes celulares. Este hecho, refuerza la idea de que la inclusión de los grupos hidroxilo y la reducción de la cadena alílica del dillapiol, no está originalmente motivada a aumentar la polaridad de este compuesto, sino a desaparecer la insaturación que tiene gran influencia en la actividad de este fenilpropanoide.

Por último, la baja actividad de este compuesto también explica el hecho de que la biotransformación no siguiera su curso para la formación de otros productos, como se ha visto para otro tipo de microorganismos. Pues al parecer, este hongo sólo realiza estas transformaciones sobre sustancias que le generen algún tipo de estrés. Para el safrol, donde la actividad fue baja, no se encontró una cantidad considerable de productos de biotransformación.

4 Conclusiones generales y recomendaciones

4.1 Conclusiones

1. Los metabolitos secundarios de las especies *Piper auritum* y *Piper holtonii* que presentan mayor actividad antifúngica hacen parte de las fracciones menos polares, hexánica y aceite esencial.
2. Los compuestos safrol y dillapiol pueden ser plantillas interesantes para el desarrollo de nuevos fungicidas; y la presencia del doble enlace en la cadena lateral es una determinante para la actividad para estas moléculas.
3. El metabolismo de los fenilpropanoides safrol y dillapiol por parte del hongo *B. theobromae* consiste en la oxidación de la cadena alílica lateral, para producir los respectivos compuestos dihidroxilados.
4. De los derivados preparados, el nitrosafrol se constituye como la alternativa más interesante para el desarrollo posterior de un posible antifúngico, debido a su elevada actividad *in vitro* (una inhibición superior al 95 % del crecimiento radial).

4.2 Recomendaciones

Con base en los inconvenientes presentados en la ejecución de este trabajo, y en los resultados encontrados en las diferentes etapas experimentales, se sugieren las siguientes recomendaciones para posteriores trabajos:

1. Conseguir una fuente alterna de los metabolitos secundarios objetos de estudio, para facilitar tanto el análisis de los procesos metabólicos como la preparación de los distintos derivados.
2. Preparar una serie mayor de derivados semisintéticos, que incluya diferentes funcionalidades químicas tanto en la cadena alílica como en el anillo

aromático, para tratar de realizar un análisis más profundo de la relación estructura-actividad de este tipo de compuestos con este hongo en particular.

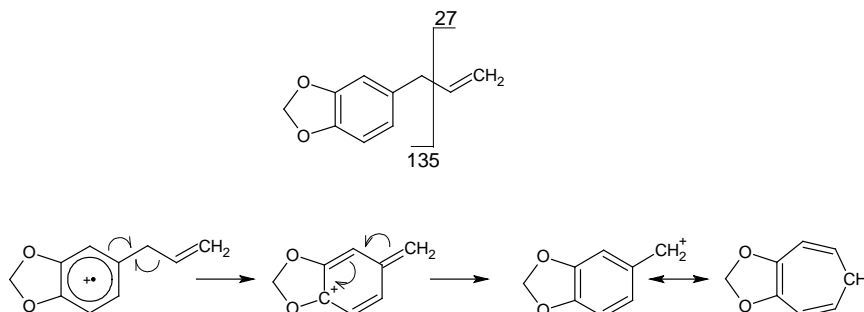
3. Continuar estos trabajos con otro tipo de ensayos de los que se pueda generar un diagnóstico de la factibilidad de utilizar este tipo de compuestos en campo. Tales como ensayos *in vivo*, de citotoxicidad, fitotoxicidad, entre otros.

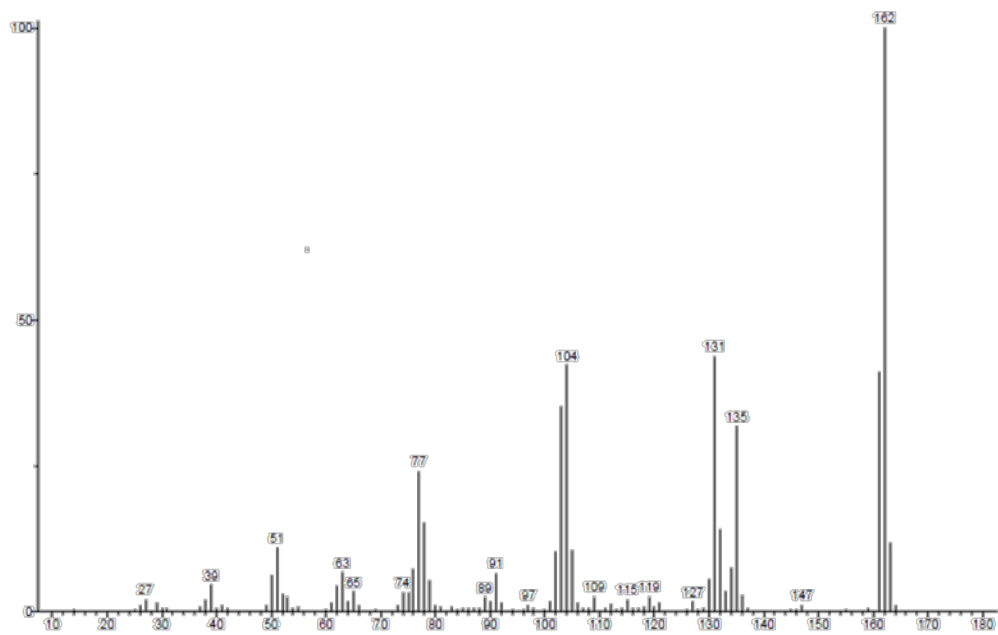
A. Anexo

Fragmentogramas del safrol, dillapiol y algunos de sus productos de biotransformación

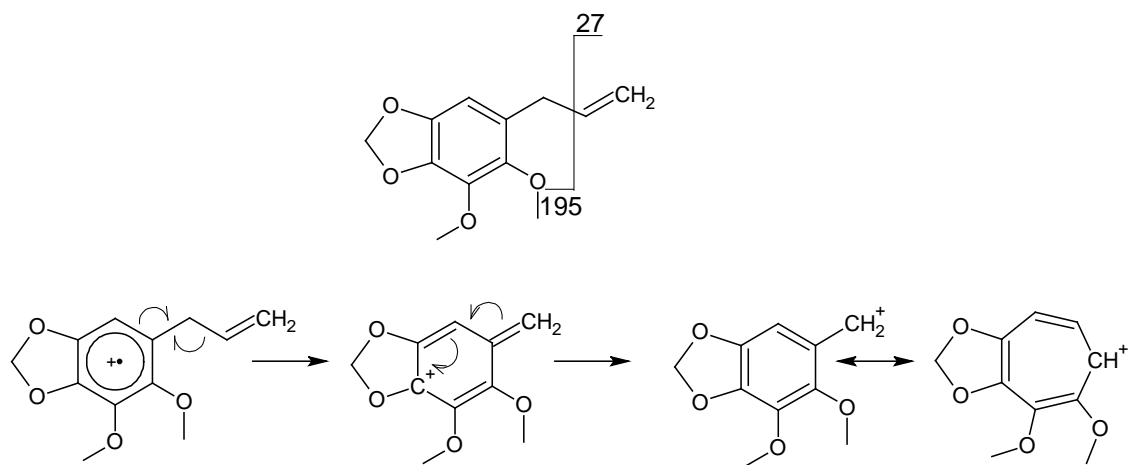
Aquí se presentan los fragmentogramas de los distintos compuestos, con las respectivas desconexiones propuestas para la formación de los picos más abundantes a partir del pico base. En el eje de las abscisas se presenta la relación masa/carga (m/z) y en el de las ordenadas la abundancia relativa (%) de cada pico.

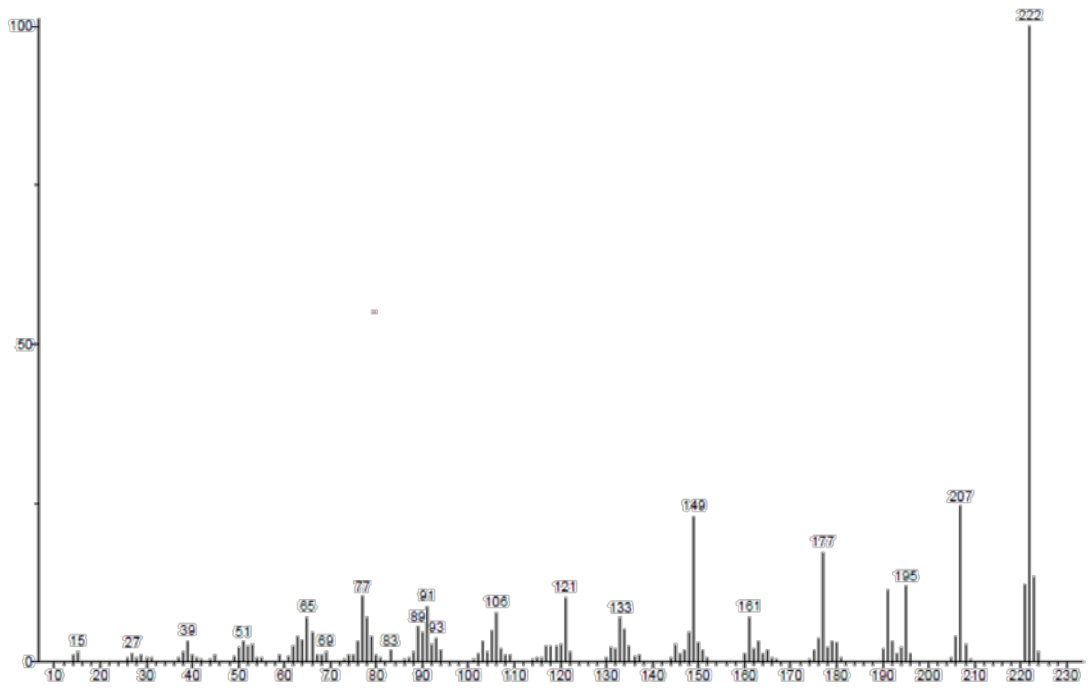
Safrol



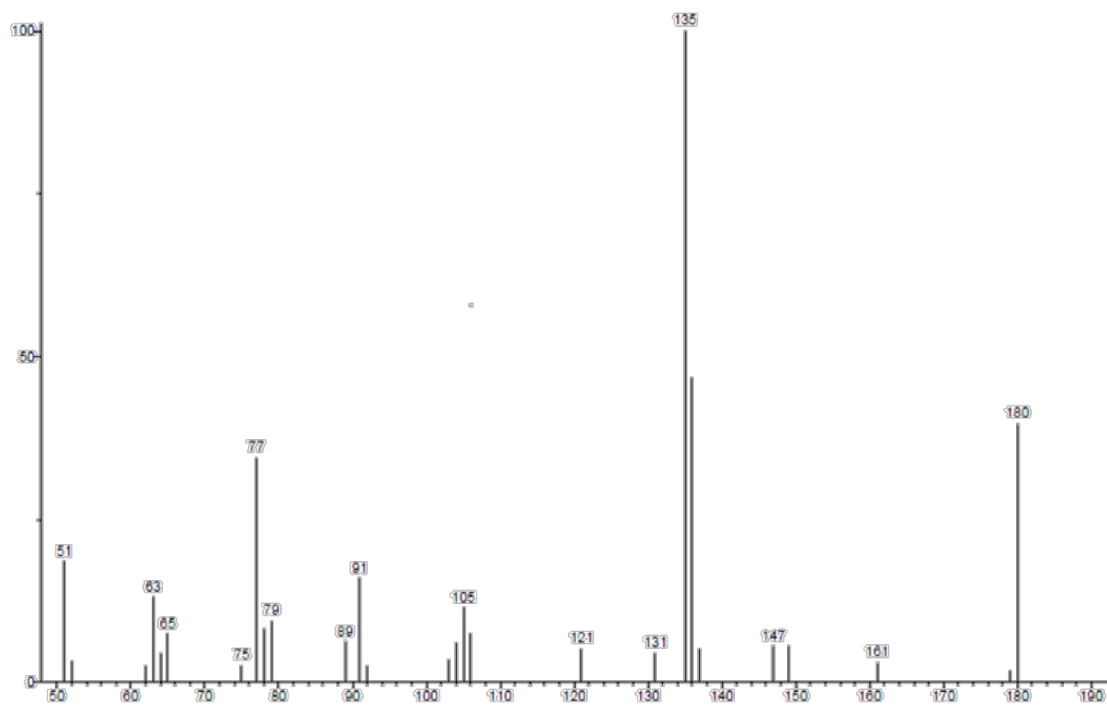
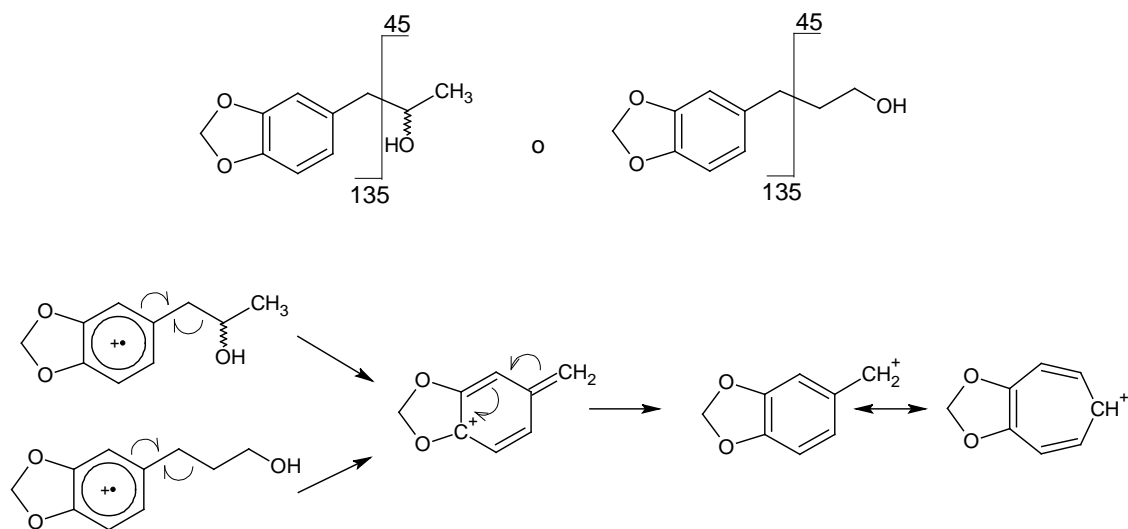


Dillapiol





Compuesto minoritario encontrado para la biotransformación de safrol



B. Anexo

Predicciones de los desplazamientos en ^{13}C -RMN de carbonos del anillo aromático de algunos compuestos estudiados

$$\delta_k = \delta_{k(RH)} + \sum Z_{ik} (+ \sum S_i)$$

δ_k = desplazamiento en ^{13}C de un carbono en la posición k con respecto a un sustituyente X.

$\delta_{k(RH)}$ = desplazamiento en ^{13}C de un correspondiente carbono k en un hidrocarburo patrón.

Z_{ik} = incremento en el desplazamiento en ^{13}C por un sustituyente X en la posición i del considerado carbono k .

S_i = corrección(es) estérica(s) en *cis*- y *trans*-ciclohexanos y alquenos.

Predicciones para el dillapiol

$$\delta_{C1} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 138,8 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C2} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 2,7_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 129,4 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C3} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 132,2 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C4} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3} - 2,0_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 136,7 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C5} = (128,5 + 14,1_{-CH_2CH_2CH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3}) \text{ ppm} = 122,4 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C6} = (128,5 - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3} - 2,0_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 106,3 \text{ ppm}$$

Predicciones para el nitrodillapiol

$$\begin{aligned} \delta_{C1} &= (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} - 4,3_{-NO_2} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} \\ &= 134,5 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \delta_{C2} &= (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 1,3_{-NO_2} - 2,7_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} \\ &= 130,7 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \delta_{C3} &= (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3} + 6,0_{-NO_2}) \text{ ppm} \\ &= 132,8 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\delta_{C4} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3} + 1,3_{-NO_2} - 2,0_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} \\ = 138,0 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C5} = (128,5 + 14,1_{-CH_2CH_2CH_3} - 4,3_{-NO_2} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3}) \text{ ppm} \\ = 118,1 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C6} = (128,5 + 20,6_{-NO_2} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3} - 2,0_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} \\ = 126,9 \text{ ppm}$$

Predicciones para el safrol

$$\delta_{C1} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} - 2,7_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 142,8 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C2} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 145,6 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C3} = (128,5 - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 2,0_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 113,1 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C4} = (128,5 + 14,1_{-CH_2CH_2CH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3}) \text{ ppm} = 136,1 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C5} = (128,5 - 2,0_{-CH_2CH_2CH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,8_{-OCH_3}) \text{ ppm} = 119,7 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C6} = (128,5 - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 115,2 \text{ ppm}$$

Predicciones para el nitrosafrol

$$\delta_{C1} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3} + 6,0_{-NO_2}) \text{ ppm} = 151,6 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C2} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 1,3_{-NO_2} - 2,7_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 144,1 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C3} = (128,5 - 4,3_{-NO_2} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 110,9 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C4} = (128,5 + 20,6_{-NO_2} + 2,0_{-CH_2CH_2CH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,7_{-OCH_3}) \text{ ppm} = 144,4 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C5} = (128,5 + 14,1_{-CH_2CH_2CH_3} - 4,3_{-NO_2} + 1,0_{-OCH_3} - 7,7_{-OCH_3}) \text{ ppm} = 131,6 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C6} = (128,5 - 2,0_{-CH_2CH_2CH_3} + 1,3_{-NO_2} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3}) \text{ ppm} = 114,4 \text{ ppm}$$

Predicciones para el aminosafrol

$$\delta_{C1} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3} - 9,6_{-NH_2}) \text{ ppm} = 136,0 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C2} = (128,5 + 31,4_{-OCH_3} - 14,4_{-OCH_3} + 0,6_{-NH_2} - 2,7_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 143,4 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C3} = (128,5 - 14,1_{-NH_2} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3} + 0,1_{-CH_2CH_2CH_3}) \text{ ppm} = 101,1 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C4} = (128,5 + 20,2_{-NH_2} + 2,0_{-CH_2CH_2CH_3} + 1,0_{-OCH_3} - 7,7_{-OCH_3}) \text{ ppm} = 144,0 \text{ ppm}$$

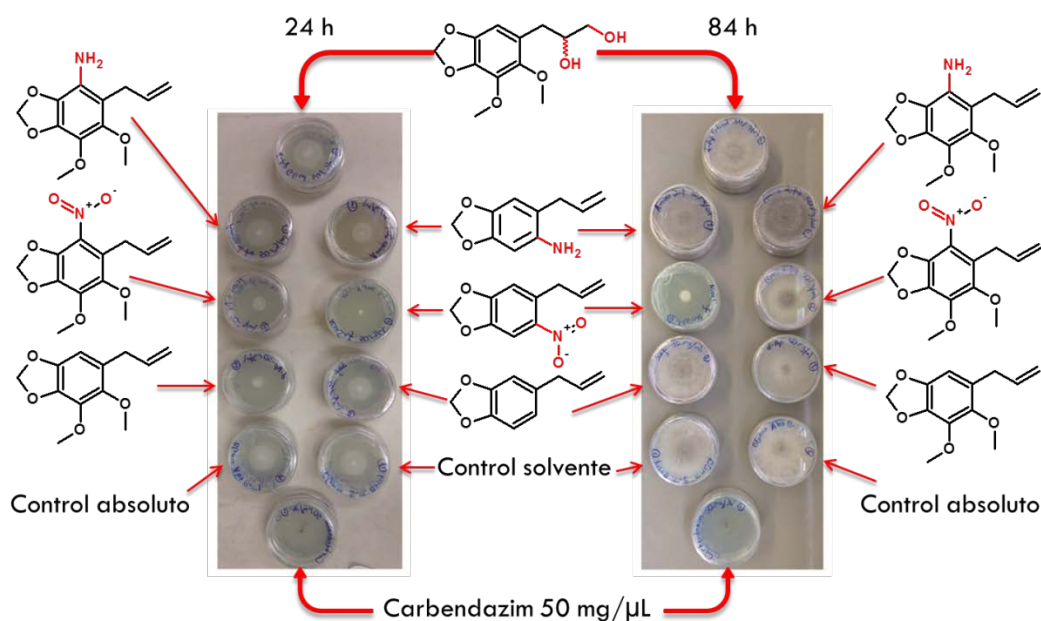
$$\delta_{C5} = (128,5 + 14,1_{-CH_2CH_2CH_3} - 14,1_{-NH_2} + 1,0_{-OCH_3} - 7,7_{-OCH_3}) \text{ ppm} = 121,8 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C6} = (128,5 - 2,0_{-CH_2CH_2CH_3} + 0,6_{-NH_2} - 14,4_{-OCH_3} + 1,0_{-OCH_3}) \text{ ppm} = 113,7 \text{ ppm}$$

C. Anexo

Imágenes de los ensayos de actividad con los derivados sintéticos

En las imágenes se puede observar el crecimiento radial del hongo expuesto a las distintas sustancias y creciendo libremente (blanco absoluto). Aquí se observa la marcada inhibición del crecimiento micelial del hongo por el blanco positivo (carbendazim) y por nitrosafrol, tanto a las 24 h (izquierda) como al finalizar el ensayo (derecha).



Bibliografía

- (1) Holliday, P.; Dover Publications: New York, 1995, p 137.
- (2) Alam, M. S.; Begum, M.-F.; Sarkar, M. A.; Islam, M. R.; Alam, M. S. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **2001**, *4*, 1224.
- (3) Mortuza, M. G.; Ilag, L. L. *Biological Control* **1999**, *15*, 235.
- (4) Khanzada, M. A.; Lodhi, A. M.; Shahzad, S. *Pak. J. Bot.* **2004**, *36*, 181.
- (5) Somda, I.; Sanou, J.; Sanon, P. *Plant Pathology Journal* **2008**, *7*, 98.
- (6) Li, H.-Y.; Cao, R.-B.; Mu, Y.-T. *Crop Protection* **1995**, *14*, 187.
- (7) da Silva Pereira, A.; Martins, R.; Michereff, S.; da Silva, M.; Câmara, M. *European Journal of Plant Pathology* **2012**, *132*, 489.
- (8) Hashem, M.; Alamri, S. *Postharvest Biology and Technology* **2009**, *53*, 123.
- (9) Molano, P. J. T. In *Encuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate Medellín*, 2007, p 51.
- (10) Wadud, M. A.; Ahmed, Q. A. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* **1962**, *18*, 107.
- (11) Arauz, L. F.; Wang, A.; Duran, J. A.; Monterrey, M. *Agronomía Costarricense* **1994**, *18*, 47.
- (12) Jabbar, A.; Malik, A. U.; Islam-ud-Din; Anwar, R.; Ayub, M.; Rajwana, I. A.; M. Amin, A. S. K.; Saeed, M. *Pak. J. Bot.* **2011**, *43*, 65.
- (13) Khanzada, M. A.; Lodhi, A. M.; Shahzad, S. *Pak. J. Bot.* **2005**, *37*, 1023.
- (14) Huang, Y.; Zhao, J.; Zhou, L.; Wang, J.; Gong, Y.; Chen, X.; Guo, Z.; Wang, Q.; Jiang, W. *Molecules* **2010**, *15*, 7558.
- (15) Khewkhom, N.; Shangchote, S. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* **2009**, *2*, S125.
- (16) Combrinck, S.; Regnier, T.; Kamatou, G. P. P. *Industrial Crops and Products* **2011**, *33*, 344.
- (17) Evans, P. H.; Bowers, W. S.; Funk, E. J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1984**, *32*, 1254.
- (18) Nair, M. G.; Burke, B. A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1990**, *38*, 1093.
- (19) Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 591.
- (20) Kato, M. J.; Furlan, M. *Pure & Appl. Chem* **2007**, *79*, 529.
- (21) Navickiene, H. M. D.; Alécio, A. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. d. S.; Young, M. C. M.; Cavalheiro, A. J.; Furlan, M. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 621.
- (22) Vasques da Silva, R.; Deboni Navickiene, H. M.; Kato, M. J.; Bolzani, V. d. S.; Méda, C. I.; Young, M. C. M.; Furlan, M. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 521.

- (23) Su, H. C. F.; Horvat, R. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1981**, *29*, 115.
- (24) Dyer, L. A.; Palmer, A. *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*; Kluwer Academic / Plenum Publishers: New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2004.
- (25) Rocha, S. F. R.; Ming, L. C. In *Perspectives on new crops and new uses*; Janick, J., Ed.; ASHS Press: Alexandria, VA., 1999.
- (26) Jones, D. G. *Piperonyl Butoxide: The Insecticide Synergist*; Elsevier, 1998.
- (27) Hagemester, H.; Milling, R. J.; Aventis CropScience UK Limited Hauxton: 1998.
- (28) Haller, H. L.; McGovran, E. R.; Goodhue, L. D.; Sullivan, W. N. *The Journal of Organic Chemistry* **1942**, *07*, 183.
- (29) Shen, T. Y.; Hwang, S. B.; Chang, M. N.; Doebber, T. W.; Lam, M. H.; Wu, M. S.; Wang, X.; Han, G. Q.; Li, R. Z. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82*, 672.
- (30) NCCAM. Kava. [Online Early Access]. Published Online: 2006. (accessed 2012).
- (31) Schultes, R. E. *Rhodora* **1975**, *77*, 165.
- (32) Museum, B. P. B.; Oberoesterreich, B. L.; Texas, B. R. I. o.; biodiversidad, C. n. p. e. c. y. u. d. I.; Museum, F.; GBIF-Spain; Naturales, I. d. C.; Humboldt, I. d. I. d. R. B. A. v.; Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), C. R.; Development, I.-I. o. R. f.; Garden, M. B.; Rica, M. N. d. C.; Netherlands Centre for Biodiversity Naturalis, s. N. H. o. t. N.; Studies, O. f. T.; SysTax; Garden, T. N. Y. B.; UNIBIO, I.; Herbarium, U. o. A.; Connecticut, U. o.; University of Vienna, I. f. B.-H. W.; PLANTS, U.; Sightings, W. Ingreso a través de *GBIF Data Portal*, data.gbif.org, 19/12/2012.
- (33) Gupta, M. P.; Arias, T. D.; Williams, N. H.; Bos, R.; Tattje, D. H. E. *Journal of Natural Products* **1985**, *48*, 330.
- (34) García-Rios, A.; Leyva, M. A.; M., J. R. M.; Stashenko, E. E. *Scientia et Technica* **2007**, *XIII*, 439.
- (35) Sánchez, Y.; Pino, O.; Correa, T. M.; Naranjo, E.; Iglesia, A. *Revista de Protección Vegetal* **2009**, *24*, 39.
- (36) Correa, E. A.; Högestätt, E. D.; Sterner, O.; Echeverri, F.; Zygmunt, P. M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 3299.
- (37) Garavito, G.; Rincón, J.; Arteaga, L.; Hata, Y.; Bourdy, G.; Gimenez, A.; Pinzón, R.; Deharo, E. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, *107*, 460.
- (38) Svetaz, L.; Zuljan, F.; Derita, M.; Petenatti, E.; Tamayo, G.; Cáceres, A.; Cechinel Filho, V.; Giménez, A.; Pinzón, R.; Zacchino, S. A.; Gupta, M. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, *127*, 137.
- (39) Museum, B. P. B.; Museum, F.; GBIF-Spain; Herbaria, H. U.; Naturales, I. d. C.; Humboldt, I. d. I. d. R. B. A. v.; Garden, M. B.; naturelle, M.-M. n. d. H.; National Museum of Natural History, S. I.; Royal Botanic Gardens, K.; Garden, T. N. Y. B. Ingreso a través de *GBIF Data Portal*, data.gbif.org, 19/12/2012.
- (40) Daoubi, M.; Deligeorgopoulou, A.; Macías-Sánchez, A. J.; Hernández-Galán, R.; Hitchcock, P. B.; Hanson, J. R.; Collado, I. G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 6035.
- (41) Juliano, C.; Mattana, A.; Usai, M. *Journal of Essential Oil Research* **2000**, *12*, 516.

- (42) Faleiro, M. L.; Miguel, M. G.; Ladeiro, F.; Venâncio, F.; Tavares, R.; Brito, J. C.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G. *Letters in Applied Microbiology* **2003**, *36*, 35.
- (43) Amiri, A.; Dugas, R.; Pichot, A. L.; Bompeix, G. *International Journal of Food Microbiology* **2008**, *126*, 13.
- (44) Gill, A. O.; Delaquis, P.; Russo, P.; Holley, R. A. *International Journal of Food Microbiology* **2002**, *73*, 83.
- (45) Castañeda, M. L.; Muñoz, A.; Martínez, J. R.; Stashenko, E. *Scientia Et Technica* **2007**, *XIII*, 165.
- (46) Pérez-Sánchez, R.; Gálvez, C.; Ubera, J. L. *Journal of Essential Oil Research* **2012**, *24*, 71.
- (47) Tavares, A. C.; Gonçalves, M. J.; Cavaleiro, C.; Cruz, M. T.; Lopes, M. C.; Canhoto, J.; Salgueiro, L. R. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, *119*, 129.
- (48) Chatzopoulou, P. S.; Katsiotis, S. T. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **1995**, *70*, 247.
- (49) Silva P., A. C.; Lagos N., K.; Maia C., F. C.; Souza d. S., L. V.; Tadei, W. P.; Pohlit, A. M. *Journal of Mosquito Research* **2012**, *2*, 1.
- (50) Belzile, A.-S., Canada, University of Ottawa, 1998.
- (51) Maxia, A.; Falconieri, D.; Piras, A.; Porcedda, S.; Marongiu, B.; Frau, M.; Gonçalves, M.; Cabral, C.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. *Mycopathologia* **2012**, *174*, 61.
- (52) Singh, G.; Marimuthu, P.; de Heluani, C. S.; Catalan, C. A. N. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *54*, 174.
- (53) de Almeida, R. R. P.; Souto, R. N. P.; Bastos, C. N.; da Silva, M. H. L.; Maia, J. G. S. *Chemistry & Biodiversity* **2009**, *6*, 1427.
- (54) Razzaghi-Abyaneh, M.; Yoshinari, T.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Rezaee, M.-B.; Nagasawa, H.; Sakuda, S. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2007**, *71*, 2329.
- (55) Rasooli, I. *Food* **2007**, *1*, 111.
- (56) Rattanachaiakunsopon, P.; Phumkhachorn, P. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2010**, *74*, 520.
- (57) Himejima, M.; Kubo, I. *Journal of Natural Products* **1992**, *55*, 620.
- (58) Bittner, M.; Aguilera, M. A.; Hernández, V.; Arbert, C.; Becerra, J.; Casanueva, M. E. *Chilean journal of agricultural research* **2009**, *69*, 30.
- (59) Guerrini, A.; Sacchetti, G.; Rossi, D.; Paganetto, G.; Muzzoli, M.; Andreotti, E.; Tognolini, M.; Maldonado, M. E.; Bruni, R. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2009**, *27* 39.
- (60) Van Etten, H. D.; Mansfield, J. W.; Bailey, J. A.; Farmer, E. E. *Plant Cell* **1994**, *6*, 1191.
- (61) Fukui, H.; Egawa, H.; Koshimizu, K.; Mitsui, T. *Agricultural and Biological Chemistry* **1973**, *37*, 417.
- (62) Tahara, S.; Nakahara, S.; Mizutani, J.; Ingham, J. L. *Agricultural and Biological Chemistry* **1984**, *48*, 1471.
- (63) Matthews, D. E.; Van Etten, H. D. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1983**, *224*, 494.
- (64) Wasmann, C. C.; Etten, H. D. V. *MPMI* **1996**, *9*, 793.
- (65) Hargreaves, J. A.; Mansfield, J. W.; Coxon, D. T. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 651.
- (66) Hargreaves, J. A.; Mansfield, J. W.; Coxon, D. T.; Price, K. R. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1119.

- (67) Clark, T.; Clifford, D. R.; Deas, A. H. B.; Gendle, P.; Watkins, D. A. M. *Pesticide Science* **1978**, *9*, 497.
- (68) Gasztonyi, M. *Pesticide Science* **1981**, *12*, 433.
- (69) Hua, D.; Ma, C.; Lin, S.; Song, L.; Deng, Z.; Maomy, Z.; Zhang, Z.; Yu, B.; Xu, P. *Journal of Biotechnology* **2007**, *130*, 463.
- (70) Priefert, H.; Rabenhorst, J.; Steinbüchel, A. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, *56*, 296.
- (71) Xu, P.; Hua, D.; Ma, C. *Trends Biotechnol* **2007**, *25*, 571.
- (72) Baqueiro-Pena, I.; Rodriguez-Serrano, G.; Gonzalez-Zamora, E.; Augur, C.; Loera, O.; Saucedo-Castaneda, G. *Bioresource technology* **2010**, *101*, 4721.
- (73) Topakas, E.; Kalogeris, E.; Kekos, D.; Macris, B. J.; Christakopoulos, P. *LWT - Food Science and Technology* **2003**, *36*, 561.
- (74) Nimura, Y.; Tsujiyama, S.-i.; Ueno, M. *The Journal of General and Applied Microbiology* **2010**, *56*, 381.
- (75) Sachan, A.; Ghosh, S.; Mitra, A. *Letters in Applied Microbiology* **2006**, *42*, 35.
- (76) Mukherjee, G.; Sachan, A.; Ghosh, S.; Mitra, A. *The Journal of General and Applied Microbiology* **2006**, *52*, 131.
- (77) Estrada Alvarado, I.; Navarro, D.; Record, E.; Asther, M.; Asther, M.; Lesage-Meessen, L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2003**, *19*, 157.
- (78) Klungøyr, J.; Scheline, R. R. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **1983**, *52*, 211.
- (79) Borchert, P.; Miller, J. A.; Miller, E. C.; Shires, T. K. *Cancer Res* **1973**, *33*, 590.
- (80) Shimoni, E.; Baasov, T.; Ravid, U.; Shoham, Y. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 11866.
- (81) Shimoni, E.; Baasov, T.; Ravid, U.; Shoham, Y. *J Biotechnol* **2003**, *105*, 61.
- (82) Santos, A. S.; Pereira, N. P.; da, S., II; Sarquis, M. I.; Antunes, O. A. *Appl Biochem Biotechnol* **2003**, *105-108*, 649.
- (83) Seshadri, R.; Lamm, A. S.; Khare, A.; Rosazza, J. P. N. *Enzyme and Microbial Technology* **2008**, *43*, 486.
- (84) Abraham, W. R.; Arfmann, H. A.; Kieslich, K.; Stumpf, B.; Washausen, P. In *Bioflavour 87: Analysis, Biochemistry, Biotechnology : Proceedings of the International Conference Wurzburg*; Schreier, P., Ed.; Walter De Gruyter Inc: Berlin, 1988, p 399.
- (85) Zhang, Y.; Xu, P.; Han, S.; Yan, H.; Ma, C. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *73*, 771.
- (86) Despreaux, C. W.; Rittweger, K. R.; Palleroni, N. J. *Applied and environmental microbiology* **1986**, *51*, 946.
- (87) Furusawa, M.; Hashimoto, T.; Noma, Y.; Asakawa, Y. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2005**, *53*, 1513.
- (88) Kumari, G. N. K.; Masilamani, S.; Ganesh, M. R.; Aravind, S. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 1101.
- (89) Barros-Filho, B. A.; Nunes, F. M.; de Oliveira, M. d. C. F.; Lemos, T. L. G.; de Mattos, M. C.; de Gonzalo, G.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *65*, 37.
- (90) Prelog, V. *Pure & Appl. Chem* **1964**, *9*, 119.
- (91) Sivakumar, D.; Wilson Wijeratnam, R. S.; Wijesundera, R. L. C.; Abeyesekere, M. *Crop Protection* **2002**, *21*, 847.

- (92) Velasco B., R.; Aristizabal, D.; García P., C.; Gil G., J.; Durango R, D. *Vitae* **2010**, *17*, 281.
- (93) Numpaque, M. A.; Oviedo, L. A.; Gil, J. H.; García, C. M.; Durango, D. L. *Tropical Plant Pathology* **2011**, *36*, 3.
- (94) Knight, S. C.; Anthony, V. M.; Brady, A. M.; Greenland, A. J.; Heaney, S. P.; Murray, D. C.; Powell, K. A.; Schulz, M. A.; Spinks, C. A.; Worthington, P. A.; Youle; D. *Annual Review of Phytopathology* **1997**, *35*, 349.
- (95) Arima, K.; Imanaka, H.; Kousaka, M.; Fukuta, A.; Tamura, G. *Agricultural and Biological Chemistry* **1964**, *28*, 575.
- (96) Zhang, J. *Postharvest Biology and Technology* **2007**, *46*, 262.
- (97) Anke, T.; Oberwinkler, F.; Steglich, W.; Schramm, G. *The Journal of antibiotics* **1977**, *30*, 806.
- (98) Lanfranchi, D.-A.; Laouer, H.; El Kolli, M.; Prado, S.; Maulay-Bailly, C.; Baldovini, N. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 2174.
- (99) Zacchino, S. A.; López, S. N.; Pezzenati, G. D.; Furlán, R. L.; Santecchia, C. B.; Munóz, L.; Giannini, F. A.; Rodríguez, A. M. *Journal of Natural Products* **1999**, *62*, 1355.
- (100) Carrasco, H.; Raimondi, M.; Svetaz, L.; Liberto, M. D.; Rodriguez, M. V.; Espinoza, L.; Madrid, A.; Zacchino, S. *Molecules* **2012**, *17*, 1002.
- (101) Leite, A. C. L.; Peixoto da Silva, K.; de Souza, I. A.; Magali de Araújo, J.; Brondani, D. J. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *39*, 1059.

Glosario de términos

Citotoxicidad: (Del griego kytos, célula y toxicidad). Sinónimo: citonocividad. Poder destructor con respecto a las células.

Endófito: “dentro de la planta”. Término que se ha usado para referirse a distintos organismos que viven dentro de una planta sin importar la relación que guarden con ella.

Envés: Cara inferior de la hoja, opuesta al haz.

Hidrodestilación: se define como el proceso para obtener el aceite esencial de una planta aromática, mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica.

Lenticela: Protuberancia visible a simple vista, de forma lenticular que aparece en la superficie de los tallos leñosos y que reemplaza a los estomas de la desaparecida epidermis.

Macrófago: Célula del tejido conectivo capaz de fagocitar partículas mayores.

Metabolización: Transformación química de un xenobiótico por el organismo. Los sistemas enzimáticos que dan lugar a esta biotransformación no poseen la especificidad de sustrato propia de los procesos enzimáticos del metabolismo orgánico, y son generalmente sistemas de transporte de electrones mediados por citocromos. La mayor parte de las reacciones de metabolización de fármacos ocurren en el hígado.

Micelio: Talo de los hongos, formado comúnmente de filamentos muy ramificados y que constituye el aparato de nutrición de estas plantas.

Saprophyto: Se dice de las plantas y los microorganismos que se alimentan de materias orgánicas en descomposición.

Xenobiótico: Compuesto externo a un organismo vivo que interacciona con él, generalmente a través de alteraciones metabólicas.