

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Preparación y actividad antifúngica de derivados del 3,9- dimetoxipterocarpano (Homopterocarpana)**

**Janio Martínez Quiñonez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Escuela de Química  
Medellín, Colombia  
2018



# **Preparación y actividad antifúngica de derivados del 3,9- dimetoxipterocarpano (Homopterocarpana)**

**Janio Martínez Quiñonez**

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Química**

Director (a):

Ph.D., 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

2018



*Dedicatoria*

*A Dios*



## **Agradecimientos**

A mi apreciado tío Henry Quiñonez Velandia que gracias a su vocación y gran espíritu observador se inició este trabajo. A mi tía Ledys Martínez Anaya, mi abuela Carmen Rosa Anaya Plaza, mi esposa Liliana María Cardona Bermúdez, ellas me fortalecen y han sido mí pilar dentro de situaciones muchas veces adversas, sobra decir que ellas son la razón de mí ser.

A Diego Luis Durango Restrepo, Jesús Gil Gonzales, Carlos Mario García Pajón, Tatiana Lobo Echeverry profesores de la Sede, por el valioso interés, aportes, recomendaciones y experiencia brindada; constituyeron base y apoyo para la dirección y finalización del proyecto. Al profesor Winston Quiñones Fletcher del grupo de Química Orgánica de Productos Naturales de la Universidad de Antioquia por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes del Grupo de Investigación Química de los Productos Naturales y los Alimentos de la Sede y demás compañeros de la Sede, por apoyarme en el desarrollo de la investigación y en mi formación profesional y personal: Cesar Darío Ramírez Pelayo, Andrés Felipe Gómez Bedoya, Luisa María Castaño Pulgarin, Diana Niño Avellaneda, Jaime León Álzate Arias, David Santiago Grisales Castañeda, José Eduardo Cuellar Cuellar, Luis Fernando Cardona y mi gran amigo Diego Segundo Deossa Vásquez.

A la Universidad Nacional de Colombia, por brindar la oportunidad de formación científica y profesional, aunado a la consolidación de excelencia en su educación.



## Resumen

En el presente trabajo se prepararon derivados del 3,9-dimetoxipterocarpano (**I**, homopterocarpana) y se les evaluó la actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*. Inicialmente se establecieron las mejores condiciones para la extracción y purificación de (**I**) a partir de residuos industriales de *P. gracile* Benth. Posteriormente se obtuvieron derivados por reacciones de nitración, aminación y oxidación; estos derivados se purificaron con técnicas cromatográficas (cromatografía de columna con sílica gel y/o Sephadex LH-20, y cromatografía de capa fina preparativa) y se identificaron por métodos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear mono- ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN) y bidimensional (COSY, HMQC y HMBC), IR y UV. Los derivados obtenidos correspondieron al 3,9-dimetoxi-8-nitropterocarpano (**II**), 3,9-dimetoxi-2,8-dinitropterocarpano (**III**), 3,9-dimetoxi-2,8,10-trinitropterocarpano (**IV**), 2,8-diamino-3,9-dimetoxipterocarpano (**V**), 3,9-dimetoxicoumestano (**VI**), 9-metoxi-3-hidroxipterocarpano (**VII**), 2'-hidroxi-4-(2-hidroxietilsulfanil)-7,4'-dimetoxiisoflavano (**VIII**) y 4-(2-hidroxietilsulfanil)-7,2',4'-trimetoxiisoflavano (**IX**). La actividad antifúngica *in vitro* de los derivados se determinó por inhibición del crecimiento micelial en medio sólido contra *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*, e inhibición de la germinación de esporas contra *C. gloeosporioides*, a concentraciones entre 35 y 700  $\mu\text{M}$ . Los derivados (**VII**) y (**VIII**), a la mayor concentración evaluada, mostraron una inhibición del crecimiento radial cercana al 100%, superando la encontrada para el compuesto de partida (**I**), que fue del 46%. También se realizaron pruebas de inhibición del crecimiento para el derivado (**VIII**) sobre frutos de papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiana) y mango (*Mangifera indica* L. cv. Hilacha) infectados con *C. gloeosporioides*, a condiciones de laboratorio. El derivado (**VIII**) mostró una inhibición del crecimiento en frutos superior al encontrado para el compuesto (**I**) y para el timol (un reconocido antifúngico natural), a las mismas condiciones. En general, los derivados con mayor actividad antifúngica correspondieron a aquellos con presencia de grupos hidroxilos en su estructura. Algunos de los compuestos obtenidos

podrían ser considerados promisorios para la búsqueda de nuevos agentes de control de hongos fitopatógenos.

**PALABRAS CLAVES:** Antracnosis, *Colletotrichum* sp., pterocarpanos, inhibición.

## Abstract

In the present work, derivatives of 3,9-dimethoxypterocarpan (homopterocarpine, **I**) were prepared and their antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. lindemuthianum* was evaluated. Initially, the best conditions were established for the extraction and purification of (**I**) from industrial residues of *P. gracile* Benth. Subsequently, derivatives were obtained by nitration, amination and oxidation reactions; these derivatives were purified by chromatographic techniques (column chromatography using silica gel and/or Sephadex LH-20, and preparative thin layer chromatography) and identified by spectroscopic methods such as mono- ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) and two-dimensional nuclear magnetic resonance (COSY, HMQC and HMBC), IR and UV. The obtained derivatives corresponds to 3,9-dimethoxy-8-nitropterocarpan (**II**), 3,9-dimethoxy-2,8-dinitropterocarpan (**III**), 3,9-dimethoxy-2,8,10-trinitropterocarpan (**IV**), 2,8-diamino-3,9-dimethoxypterocarpan (**V**), 3,9-dimethoxycoumestan (**VI**), 9-methoxy-3-hydroxypterocarpan (**VII**), 2'-hydroxy-4-(2-hydroxyethylsulfanyl)-7,4'-dimetoxiisoflavane (**VIII**) and 4-(2-hydroxyethylsulfanyl)-7,2',4'-trimethoxyisoflavin (**IX**). The *in vitro* antifungal activity of the derivatives was determined by inhibition of mycelial growth in solid medium against *C. gloeosporioides* and *C. lindemuthianum*, and inhibition of spore germination against *C. gloeosporioides*, between 35 and 700  $\mu\text{M}$ . Derivatives (**VII**) and (**VIII**), at the highest concentration, showed a radial growth inhibition of 100%, exceeding that found for the starting compound (**I**), which was 46%. Growth inhibition tests were also performed for the derivative (**VIII**) on papaya fruits (*Carica papaya* L., cv. Hawaiian) and mango (*Mangifera indica* L. cv. Hilacha), infected with *C. gloeosporioides*, at laboratory conditions. The derivative (**VIII**) showed a growth inhibition in fruits higher than that found for the compound (**I**) and for the thymol (a recognized natural antifungal), under the same conditions. In general, the derivatives with greater antifungal activity correspond to those with presence of hydroxyl groups in their structure. Some of these compounds may be promising for the search for new control agents of phytopathogenic fungi.

**KEYWORDS:** Anthracnosis, *Colletotrichum* sp., pterocarpanos, inhibición.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Estado del arte</b> .....	<b>7</b>
1.1 Pterocarpanos: Aspectos generales .....	7
1.2 Actividad antifúngica .....	10
1.3 Relación estructura-actividad antifúngica.....	12
1.4 Homopterocarpina (3,9-dimetoxipterocarpano).....	13
1.5 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>C. lindemuthianum</i> .....	15
1.6 Estrategias de control. ....	16
1.7 Derivatización en la búsqueda de nuevos antifúngicos.....	18
<b>2. Metodología</b> .....	<b>22</b>
2.1 Materiales y equipos.....	22
2.1.1 Cepas de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. lindemuthianum</i> .....	22
2.1.2 Reactivos.....	22
2.1.3 Instrumentación.....	23
2.2 Obtención e identificación del 3,9-dimetoxipterocarpano (I).....	24
2.2.1 Obtención a escala analítica: .....	24
2.2.2 Obtención a escala preparativa: .....	25
2.3 Preparación de derivados y purificación .....	27
2.4 Evaluación de la actividad antifúngica. ....	31
2.4.1 Inhibición del crecimiento radial. ....	31
2.4.2 Inhibición de la germinación.....	32
2.4.3 Crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de <i>C. papaya</i> y <i>Mangifera indica</i> . 34	34
<b>3. Resultados y discusión</b> .....	<b>35</b>
3.1 Obtención a escala analítica, identificación y cuantificación de (I). ....	35
3.2 Obtención a escala preparativa. ....	37
3.3 Preparación de derivados y purificación. ....	42

3.3.1	Compuesto (II): 3,9-dimetoxi-8-nitropterocarpano.....	43
3.3.2	Compuesto (III): 3,9-dimetoxi-2,8,-dinitropterocarpano. ....	43
3.3.3	Compuesto (IV): 3,9-dimetoxi-2,8,10-trinitropterocarpano.....	44
3.3.4	Compuesto (V): 4,10-diamino-3,9-dimetoxipterocarpano. ....	45
3.3.5	Compuesto (VI): 3,9-dimetoxicoumestano. ....	46
3.3.6	Compuesto (VII): 9-metoxi-3-hidroxipterocarpano.....	46
3.3.7	Compuesto (VIII): 6'-hidroxi-4-(2-hidroxietilsulfanil)-7,4'- dimetoxiisoflavano. ....	47
3.3.8	Compuesto (IX): 4-(2''-hidroxietilsulfanil)-7,4',2'-trimetoxiisoflavano. .	48
3.4	Actividad antifúngica de los derivados obtenidos.....	49
3.4.1	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA <i>C. lindemuthianum</i> . ....	49
3.4.2	Actividad antifúngica contra <i>C. gloeosporioides</i> . ....	57
3.4.3	Inhibición de la germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> con los derivados. ....	65
3.4.4	Efecto del compuesto (VIII) contra <i>C. gloeosporioides</i> en <i>Carica papaya</i> L. (cv. Hawaiana) y <i>Mangifera indica</i> L. (cv. Hilacha). ....	67
3.5	Análisis cualitativo de la relación entre la actividad y estructura. ....	70
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>75</b>
4.1	Conclusiones.....	75
4.2	Recomendaciones.....	76
<b>A.</b>	<b>Anexo: Cromatogramas de análisis por HPLC .....</b>	<b>79</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Espectros RMN, IR y UV de derivados. ....</b>	<b>81</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>99</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1-1:</b>	Tipos de flavonoides.....	7
<b>Figura 1-2:</b>	Grupos de los isoflavonoides.....	8
<b>Figura 1-3:</b>	Estructura del pterocarpano y sus cuatro posibles isómeros .....	9
<b>Figura 1-4:</b>	Conformaciones posibles en los pterocarpanos (Jiménez et al., 2007)..	10
<b>Figura 1-5:</b>	Pterocarpanos reportados como fitoalexinas (Jiménez et al., 2007) .....	11
<b>Figura 1-6:</b>	Estructura del 3,9-dimetoxipterocarpano .....	13
<b>Figura 1-7:</b>	Inhibición del crecimiento micelial de <i>C. acutatum</i> con el 3,9-dimetoxipterocarpano (Martínez et al., 2016). .....	14
<b>Figura 1-8:</b>	Síntomas de la antracnosis en papaya ( <i>C. papaya</i> ) (DANE, 2016) (A) y tomate de árbol ( <i>S. betaceum</i> ) (DANE, 2014) (B). .....	16
<b>Figura 1-9:</b>	Estructuras de algunos fungicidas empleados comúnmente.....	17
<b>Figura 1-10:</b>	Derivado de Safrol obtenido por nitración .....	19
<b>Figura 1-11:</b>	Derivado de esclareol con mayor actividad.....	20
<b>Figura 1-12:</b>	Derivado más activo proveniente del ácido abiótico.....	20
<b>Figura 1-13:</b>	Derivado más activo proveniente del 2,4-dihidroxi-5-metilacetofenona..	21
<b>Figura 1-14:</b>	Izquierda-derecha: camalexina, 1-metilcamalexina, 5-fluorocamalexina, 5-metilcamalexina.....	21
<b>Figura 2-1:</b>	Germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> en PDA 3% y $2 \times 10^5$ esporas/mL a diferentes concentraciones de DMSO. Experimento realizado en tubos de microcentrifuga marca Eppendorf de 2 ml de capacidad. ....	33
<b>Figura 3-1:</b>	Cromatograma del extracto de n-hexano.....	35
<b>Figura 3-2:</b>	Estructura de 3,9-dimetoxipterocarpano (I).....	36
<b>Figura 3-3:</b>	Cromatograma del 3,9-dimetoxipterocarpano (I).....	37
<b>Figura 3-4:</b>	Superficie de respuesta y contorno estimado con $X_2 = 50\%$ para $X_1$ y $X_3$ . .	39
<b>Figura 3-5:</b>	Superficie de respuesta y contorno estimado con $X_3 = 97.5$ min para $X_2$ y $X_1$ . .....	40
<b>Figura 3-6:</b>	Experimento de extracción L-L antes (A) y después (B) de ser sometida a ultrasonido. Perfil en TLC de extracto obtenido en las condiciones óptimas de extracción (C) y de (I) purificado posteriormente por cromatografía de columna (D) .....	41
<b>Figura 3-7:</b>	Esquema general de derivados obtenidos .....	42
<b>Figura 3-8:</b>	Estructura de 3,9-dimetoxi-8-nitropterocarpano (II). .....	43
<b>Figura 3-9:</b>	Estructura de 3,9-dimetoxi-2,8-dinitropterocarpano (III) .....	44
<b>Figura 3-10:</b>	Estructura de 3,9-dimetoxi-4,8,10-trinitropterocarpano (IV).....	45
<b>Figura 3-11:</b>	Estructura de 4,10-diamino-3,9-dimetoxipterocarpano (V) .....	45
<b>Figura 3-12:</b>	Estructura de 3,9-dimetoxicumestano (VI) .....	46

<b>Figura 3-13:</b>	Estructura de 9-metoxi-3-hidroxipterocarpano (VII) .....	47
<b>Figura 3-14:</b>	Estructura de 2'-hidroxi-4-(2''-hidroxietilsulfanil)-7,4'-dimetoxiisoflavano (VIII) .....	48
<b>Figura 3-15:</b>	Estructura de 4-(2''-hidroxietilsulfanil)-7,4', 2'-trimetoxiisoflavano (IX)...	49
<b>Figura 3-16:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del DMSO contra <i>C. lindemuthianum</i> .....	50
<b>Figura 3-17:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) de 3,9-dimetoxipterocarpano (I) contra <i>C. lindemuthianum</i> .....	50
<b>Figura 3-18:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) de Timol contra <i>C. lindemuthianum</i> .....	52
<b>Figura 3-19:</b>	Crecimiento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> en presencia de los compuestos (II) (A); (III) (B); (IV) (C) y (V) (D) .....	52
<b>Figura 3-20:</b>	Crecimiento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> en presencia del compuesto (VI) .....	54
<b>Figura 3-21:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) de <i>C. lindemuthianum</i> en presencia del compuesto (VII).....	55
<b>Figura 3-22:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (VIII) contra <i>C. lindemuthianum</i> .....	56
<b>Figura 3-23:</b>	Crecimiento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> en presencia del compuesto (IX) .....	57
<b>Figura 3-24:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) de DMSO contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	58
<b>Figura 3-25:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (I) contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	59
<b>Figura 3-26:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del timol contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	60
<b>Figura 3-27:</b>	Crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> en presencia (II) (A); (III) (B); (IV) (C) y (V) D .....	61
<b>Figura 3-28:</b>	Crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> en presencia del compuesto (VI) .....	62
<b>Figura 3-29:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (VII) contra <i>C. gloeosporioides</i> . .....	63
<b>Figura 3-30:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (VIII) contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	63
<b>Figura 3-31:</b>	Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (IX) contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	64
<b>Figura 3-32:</b>	Inhibición de la germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> (%IG) de los derivados (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX) evaluados a 704 $\mu$ M.....	65
<b>Figura 3-33:</b>	Fotografía de las esporas de <i>C. gloeosporioides</i> . A: espora sin germinar; B: espora germinada; C y D: esporas parcialmente germinadas con afectación del tubo germinativo. ....	66

<b>Figura 3-34:</b> Crecimiento de la lesión causada por <i>C. gloeosporioides</i> en <i>C. papaya</i> L. cv. Hawaiana evaluada al día 7. <b>A</b> (blanco Absoluto); <b>B</b> (blanco solvente); <b>C</b> (carbendazim); <b>D</b> (timol); <b>E (I)</b> ; <b>F (VIII)</b> .....	67
<b>Figura 3-35:</b> Diámetro de la lesión en <i>C. papaya</i> causada por <i>C. gloeosporioides</i> evaluado a los siete días de incubación .....	68
<b>Figura 3-36:</b> Profundidad de la lesión en <i>C. papaya</i> causada por <i>C. gloeosporioides</i> evaluado en siete días. <b>A</b> (blanco Absoluto); <b>B</b> (blanco solvente); <b>C</b> (carbendazim); <b>D</b> (timol); <b>E (I)</b> ; <b>F (VIII)</b> .....	69
<b>Figura 3-37:</b> Profundidad de la lesión causada por <i>C. gloeosporioides</i> evaluada en siete días .....	69
<b>Figura 3-38:</b> Efecto en el crecimiento de lesión en <i>Mangifera indica</i> causada por <i>C. gloeosporioides</i> evaluado en 15 días. <b>A</b> (blanco Absoluto); <b>B</b> (blanco solvente); <b>C</b> (timol); <b>D</b> (carbendazim); <b>E (I)</b> ; <b>F (VIII)</b> . .....	70
<b>Figura 3-39:</b> Inhibición de crecimiento micelial de derivados a 704 $\mu$ M contra <i>C. lindemuthianum</i> ( <b>A</b> ) y <i>C. gloeosporioides</i> ( <b>B</b> ). .....	72
<b>Figura 3-40:</b> Inhibición de crecimiento micelial de derivados a 704 $\mu$ M contra <i>C. lindemuthianum</i> ( <b>A</b> ) a 240 horas y <i>C. gloeosporioides</i> a 120 horas ( <b>B</b> ). .....	73

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1:</b> Rango de variables independiente del diseño BB .....	25
<b>Tabla 2-2:</b> Condiciones de experimentos para el diseño Box-Behnken.....	26
<b>Tabla 3-1:</b> Resultados del rendimiento obtenidos en los experimentos.....	38
<b>Tabla 3-2:</b> Análisis de variancia para el rendimiento de la extracción de (I), Y.....	38
<b>Tabla 3-3:</b> Análisis de variancia para el rendimiento de la extracción de (I), Y.....	40
<b>Tabla 3-4:</b> Variación de del porcentaje de inhibición de crecimiento a 120 y 240 horas para <i>C. lindemuthianum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> de derivados comparados con (I).....	73

## Lista de Símbolos y abreviaturas

<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>IR</b>	Espectroscopia Infrarroja
<b>UV</b>	Espectroscopia Ultravioleta/Visible
<b>EM</b>	Espectrometría de Masas
<b><sup>13</sup>C RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
<b>COSY</b>	Correlación Espectroscópica (Correlation Spectroscopy)
<b>Dept</b>	Mejora sin Distorsión por la Transferencia de Polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
<b>δ</b>	Desplazamiento Químico en ppm en Resonancia Magnética Nuclear
<b>HMQC</b>	Coherencia Cuántica Múltiple Heteronuclear (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)
<b>Hz</b>	Hertz
<b><i>J</i></b>	Constante de Acoplamiento en Resonancia Magnética Nuclear
<b>jmod</b>	Experimento J-Modulación (J-Modulation Experiment)
<b>Uma</b>	Unidad de Masa Atómica
<b><i>v</i><sub>max</sub></b>	Frecuencia Máxima
<b>M+</b>	Ión Molecular en Espectrometría de Masas
<b>m/e</b>	Relación Masa a Carga en Espectrometría de Masas
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CC</b>	Cromatografía de Columna
<b>CCF</b>	Cromatografía de Capa Fina
<b>GRAS</b>	Generalmente Reconocido Como Seguro (Generally Recognized As Safe)
<b>h</b>	Hora
<b>min</b>	Minutos

<b>μL</b>	Microlitros
<b>L</b>	Litros
<b>m</b>	Metros
<b>M</b>	Concentración Molar
<b>ppm</b>	Partes Por Millón
<b>EtoAc</b>	Acetato de Etilo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>PDA</b>	Papa Dextrosa Agar (Potato Dextrose Agar)

# Introducción

El control de enfermedades con pesticidas químicos ha sido tradicionalmente el método más empleado en la agricultura mundial. Estos pesticidas, desarrollados por síntesis empírica, tamizaje (screening) aleatorio y optimización estructural, han posibilitado una mayor producción de alimentos y el crecimiento de la industria agrícola mundial (Ortiz et al., 2013). Sin embargo, la baja selectividad, alta toxicidad, y escasa biodegradabilidad de estas sustancias ha generado efectos adversos al medio ambiente (Bernabó et al., 2016; Mimbs et al., 2016) y a la salud humana (Weichenthal et al., 2012; Xavier et al., 2005). Adicionalmente, la resistencia creciente desarrollada por las plagas (Hollomon 2012) a los pesticidas usados para su control, hace necesario la aplicación de éstos en mayor cantidad y frecuencia, lo que ha traído consigo mayores costos de producción y la presencia de residuos tóxicos en los alimentos lo que consecuentemente ha limitado el acceso a los mercados internacionales (Hollomon 2012; Blankson et al., 2016; Nakano et al., 2016).

Esta situación ha dirigido la investigación mundial hacia la búsqueda de nuevas tecnologías para el control de plagas (Petroski & Stanley, 2009). Los productos de origen natural, en especial de plantas, se presentan como una buena e importante alternativa para los pesticidas de baja selectividad que se usan actualmente. Parte de la relevancia de los productos naturales se origina en el hecho de que poseen gran actividad biológica contra los organismos patogénicos, lo que es el resultado de procesos de perfeccionamiento evolutivo relacionados con los mecanismos de defensa de las plantas en la interacción planta-patógeno (Dayan et al., 2000; Hollomon 2012). Adicionalmente, los productos naturales pueden ser menos agresivos con el medio ambiente y de menor toxicidad a la salud humana.

Dado que muchos de los productos naturales se han producido como sustancias de defensa en la interacción planta-patógeno, es de esperar que sean compuestos afines con la bioquímica y biología celular de la plaga, logrando afectar principalmente el citoesqueleto, la pared celular, la traducción de señales celulares o interferir la producción de proteínas (Hollomon 2012; Mallet 1989; Carrière & Roff 1995), lo que les aporta alta

selectividad (Dayan et al., 2009). Un beneficio adicional de los productos naturales es su corta vida en el medio ambiente, ya que poseen estructuras relacionadas con la naturaleza y contienen pocos sustituyentes halogenados (Dayan et al., 2000), brindándoles mayor biodegradabilidad que sus contrapartes sintéticas. Finalmente, los productos naturales poseen una gran diversidad y complejidad estructural en comparación con los pesticidas comerciales, lo que se refleja en la gran cantidad de centros quirales, carbonos con hibridación  $sp^3$ , anillos y sistemas ricos en nitrógeno y oxígeno, lo que lleva a que se desarrollen bajos niveles de resistencia a estas sustancias por parte del patógeno. De otro lado, esta diversidad química puede brindar estructuras útiles en el desarrollo de nuevos agentes de control de plagas, más eficientes y amigables con el medio ambiente (Harvey 2007; Costantino & Barlocco 2006).

Existe una amplia variedad de productos de origen natural registrados para el control de malezas, insectos y hongos (Gwinn 2018). Actualmente se utilizan aceites esenciales provenientes de clavos de olor (*Eugenia caryophyllus* Spreng) con eugenol como compuesto bioactivo, menta (*Mentha piperita* L.) con mentol como compuesto bioactivo, limoncillo (*Cymbopogon citratus* Stapf.) con el citral como agente activo, productos derivados de neem (*Azadirachta indica* Juss), spinocinas A y D provenientes de *Saccharopolyspora spiosa*, piretrinas y piretratos de *Tenacetum cinerariaefolium*, rotenonas provenientes de plantas del genero *Derris* y *Lonchocarpus* (Leguminosae), neonicotinoides y piretroides, extractos de *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Capsicum frutescens*, *Allium sativum*, entre otros. Estos extractos y aceites esenciales poseen una amplia diversidad de compuestos con actividad biológica importante contra hongos e insectos (Gwinn 2018; Cantrell 2012), lo que ha generado un sector creciente en la industria con grandes oportunidades económicas (Gwinn 2018; Cantrell 2012).

Por otra parte, el uso de productos naturales como plantillas estructurales para generar compuestos modificados químicamente y con mayor actividad que el compuesto de partida, es recientemente importante en la investigación y desarrollo de nuevos agentes de control de plagas (Wu et al., 2015; Petroski and Stanley, 2009). Esta metodología aprovecha la actividad biológica innata de los productos naturales, la potencializa y genera agentes de control que pueden ser más amigables con el medio ambiente. De esta manera se han obtenido potentes pesticidas y estructuras con propiedades análogas a la de los pesticidas comerciales, como los piretroides y nicotinoides (Gwinn 2018; Cantrell 2012; Silvério et al., 2009).

Entre la amplia variedad de compuestos naturales bioactivos, que pueden servir como plantillas estructurales para desarrollar nuevos agentes de control, se encuentran los pterocarpanos (6a, 11a-dihydro-6H-benzofuro [3,2-c] cromeno). Éstos, pertenecen al grupo de los isoflavonoides y estructuralmente están conformados por un sistema tetracíclico de anillos benzofurano-benzopirano fusionados (Boland, 1998). Los pterocarpanos han sido reconocidos por sus importantes actividades biológicas y farmacológicas, dentro de las que se destaca su comportamiento como fitoalexinas: sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular que son producidas por las plantas como sistema de defensa químico (Goel et al., 2012), el cual se activa ante la presencia de amenazas o influencias externas como el ataque de bacterias, hongos, metales pesados o radiación UV (Guest, 2017). Esta clase de sustancias al relacionarse con la resistencia de las plantas a enfermedades, son consideradas buenos prospectos para el desarrollo de nuevos agentes de control de plagas (Guest, 2017; Selvan et al., 2017).

Investigaciones iniciales propusieron que la actividad antifúngica de los pterocarpanos dependía de la configuración estructural y la presencia de sustituyentes oxigenados en las posiciones C3 y C9 (Perrin & Cruickshank 1969). Posteriormente se investigó, conjuntamente con los pterocarpanos, 6a,11a-dihidropterocarpanos, isoflavanos, cumestanos y una isoflavona, y los resultados mostraron inconsistencias en la dependencia de la actividad con la conformación tridimensional (Van Etten, 1976). Esta investigación propuso que la actividad antifúngica de los pterocarpanos se relaciona con la presencia de sustituyentes claves y de una propiedad fisicoquímica, la lipofilidad, la cual permite penetrar más fácilmente las membranas celulares (Arnoldi & Merlini, 1990). Aunque estas investigaciones no establecieron relaciones concluyentes entre la actividad y la estructura, si evidenciaron la posibilidad de variar fuertemente la actividad antifúngica con modificaciones químicas en el pterocarpano y moléculas relacionadas.

En el presente estudio se preparó una serie de derivados del pterocarpano de origen natural 3,9-dimetoxipterocarpano (homopterocarpina), el cual se ha reportado tiene actividad insecticida (Jiménez et al., 2008) e inhibitoria contra hongos fitopatógenos del género *Colletotrichum* (Martínez et al., 2016). Posteriormente, se evaluó la actividad antifúngica de los derivados contra los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. lindemuthianum* causantes de la antracnosis en cultivos de gran importancia para el país, como papaya (*Carica papaya* L.), mango (*Mangifera indica* L.), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) respectivamente (Adriana et al., 2016; Kawaratani et al., 2015; Siddiqui & Ali, 2014; Obando 2012; Durango et al., 2002).

El desarrollo de la investigación se efectuó en cuatro etapas: 1) obtención del 3,9-dimetoxipterocarpano, 2) preparación de derivados por reacciones de síntesis orgánica, 3) evaluación de la actividad antifúngica de los derivados, 4) análisis cualitativo de la relación entre la actividad antifúngica y la estructura de los derivados. Como materia prima para la obtención del 3,9-dimetoxipterocarpano se seleccionaron los residuos agroindustriales de la especie maderable *Platymiscium gracile* Benth.

Luego de estudiar el efecto de diferentes variables (solvente, tiempo, agitación), se escogieron las mejores condiciones para el proceso en la extracción. Posteriormente, el 3,9-dimetoxipterocarpano se purificó mediante técnicas cromatográficas y se identificó por métodos espectroscópicos convencionales. A partir del compuesto puro, se llevaron a cabo una serie de reacciones entre las que se incluyen nitración, reducción de grupo nitro, oxidación, sustitución y desmetilación. Tras procesos de purificación e identificación, ocho derivados se evaluaron por su efecto inhibitorio (crecimiento micelial y germinación de esporas) contra los hongos *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*. Adicionalmente, para el derivado más activo, se evaluó el efecto inhibitorio sobre frutos de papaya y mango inoculados con *C. gloeosporioides* a condiciones de laboratorio.

El presente estudio realiza una contribución al conocimiento sobre la reactividad de los pterocarpanos y la relación cualitativa entre la estructura y la actividad inhibitoria contra hongos fitopatógenos. Los resultados aportan información valiosa para los programas de búsqueda de agentes de control de enfermedades en cultivos, y nuevas moléculas promisorias. Adicionalmente, el trabajo brinda información para el aprovechamiento sostenible de los residuos agroindustriales de la especie maderable *P. gracile* Benth.

## Objetivos

### GENERAL

Preparar derivados del 3,9-dimetoxipterocarpano y evaluar la actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*.

### ESPECÍFICOS

Aislar y purificar el 3,9-dimetoxipterocarpano a partir de residuos de la especie maderable *Platymiscium gracile*.

Preparar derivados del 3,9-dimetoxipterocarpano por reacciones orgánicas convencionales (nitración, reducción de grupo nitro, oxidación, entre otras).

Purificar los derivados empleando técnicas cromatográficas y confirmar su estructura por métodos espectroscópicos.

Evaluar la actividad antifúngica de los derivados contra *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*.

Describir cualitativamente la relación entre la estructura de los derivados y la actividad antifúngica.



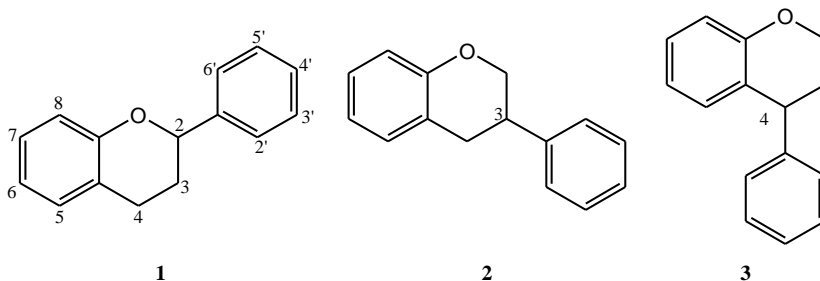
# 1. Estado del arte

La búsqueda de alternativas nuevas para combatir microorganismos fitopatogénicos ha cambiado drásticamente en los últimos años, y ya no se enfoca únicamente hacia la síntesis empírica, tamizaje aleatorio y optimización de sustancias químicas. El conocimiento de las interacciones entre los metabolitos secundarios de la planta y del microorganismo, de sus efectos, de los mecanismos de invasión y del metabolismo, han permitido diseñar moléculas más activas y específicas.

## 1.1 Pterocarpanos: Aspectos generales

Los flavonoides forman un grupo extenso y particular de compuestos con alta incidencia e importancia en la naturaleza. Estructuralmente, son compuestos heterocíclicos tipo fenilbenzopirano que según la posición del anillo aromático en el benzopirano (cromeno) conforman varias clases: los flavonoides (2-benzopiranos, **1**), los isoflavonoides (3-benzopiranos, **2**), y los neoflavonoides (4-benzopiranos, **3**) (Figura 1-1).

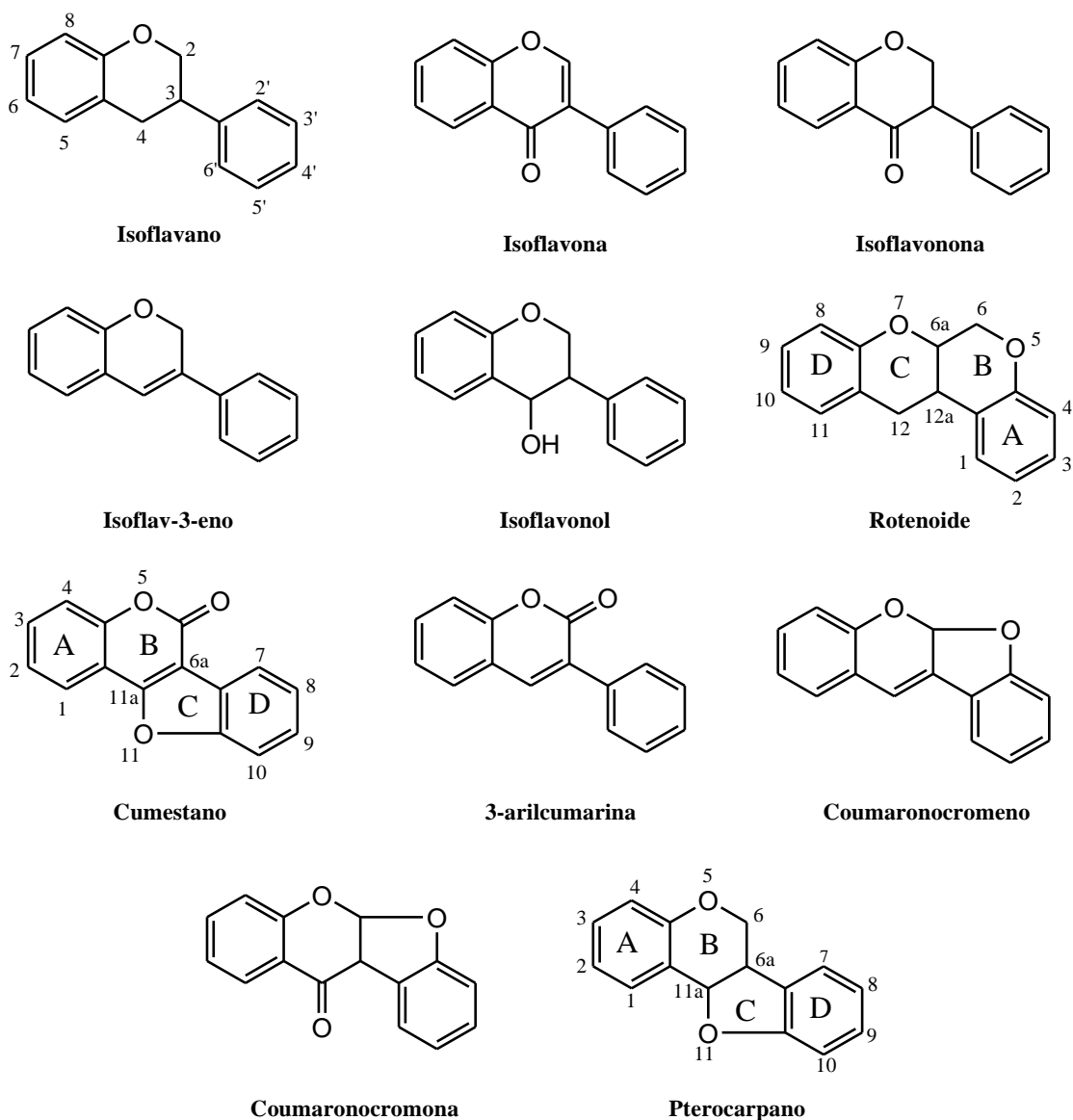
**Figura 1-1:** Tipos de flavonoides.



Los isoflavonoides son la subclase mayoritaria de los flavonoides. Estos compuestos poseen un esqueleto tipo 3-fenilbenzopirano. Dependiendo del tipo de sustituyentes y estados de oxidación son subdivididos en los grupos presentados en la Figura 1-2. Dentro del grupo que conforman los isoflavonoides están los pterocarpanos, los cuales se han

reportado en varias especies vegetales, presentando un amplio rango de actividades biológicas (Jiménez et al., 2007). Estructuralmente, los pterocarpanos están conformados por un sistema tetracíclico de anillos fusionados benzofurano-benzopirano (6a, 11a-dihidro-6*H*-benzofuro [3,2-*c*] cromeno) con dos centros quirales en la posición 6a y 11a generando cuatro isómeros, lo que determina la estereoquímica de la plantilla estructural pterocarpano (Purkayastha, 1995) (Figura 1-3).

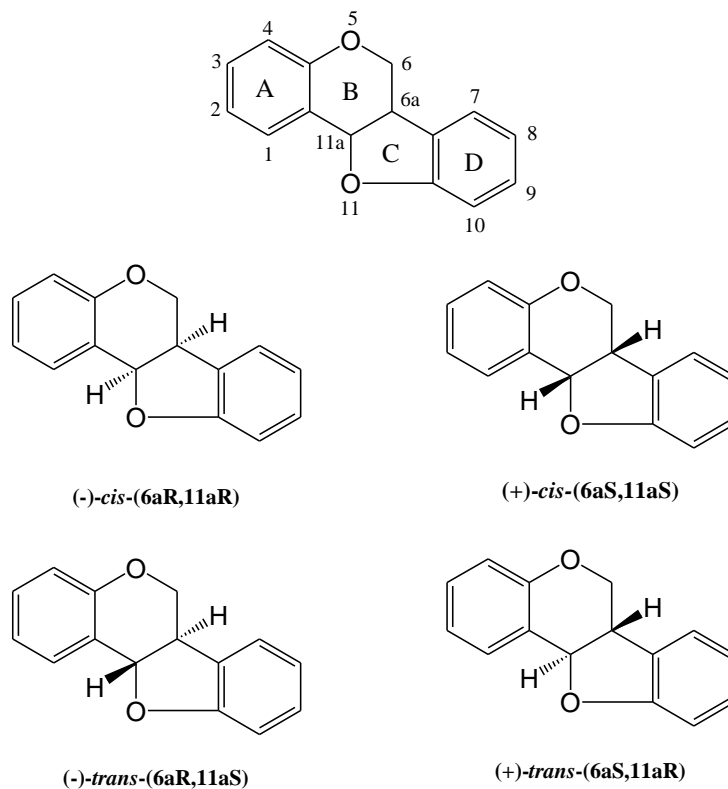
**Figura 1-2:** Grupos de los isoflavonoides.



Se ha planteado que solo el isomero *cis* de los anillos B/C se pueden presentar, debido a que la estructura del isómero *trans* es energéticamente menos estable según estudios

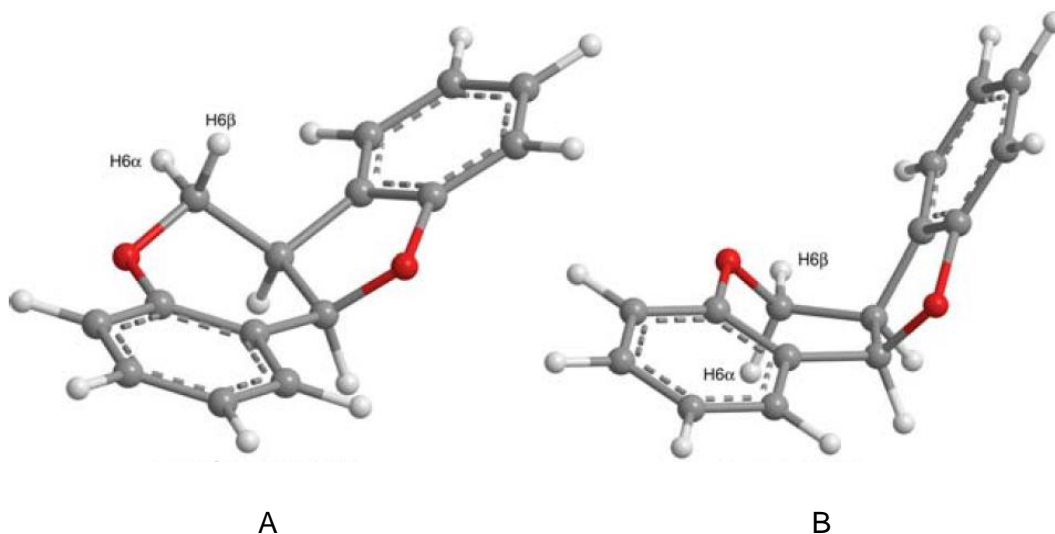
computacionales y experimentales (Friedrichsen & Schoening, 1990). Además la configuración *cis* genera dos posibles conformaciones A y B (Figura 1-4), siendo A la más estable (Goel et al., 2012; Jiménez et al., 2007).

**Figura 1-3:** Estructura del pterocarpano y sus cuatro posibles isómeros.



Los pterocarpanos de origen natural presentan el isomero *cis*, lo que conduce a solo dos configuraciones absolutas. Además, las mediciones polarimétricas han demostrado que la rotación óptica (-) puede asociarse con la configuración  $\alpha, \alpha$  (6aR, 11aR), mientras que la rotación óptica (+) con configuración  $\beta, \beta$  (6aS, 11aS) (Jiménez et al., 2008; Antus et al., 2001; Veloso et al., 2012). La mayoría de los pterocarpanos presentes en la naturaleza presentan en la posición C3, C8 y C9 sustituyentes oxigenados, y derivados de isopreno cerca a una posición oxigenada en el anillo (Jiménez et al., 2007).

**Figura 1-4:** Posibles conformaciones en los pterocarpanos *cis*-(6aR,11aR) (Jiménez et al., 2007).



## 1.2 Actividad antifúngica

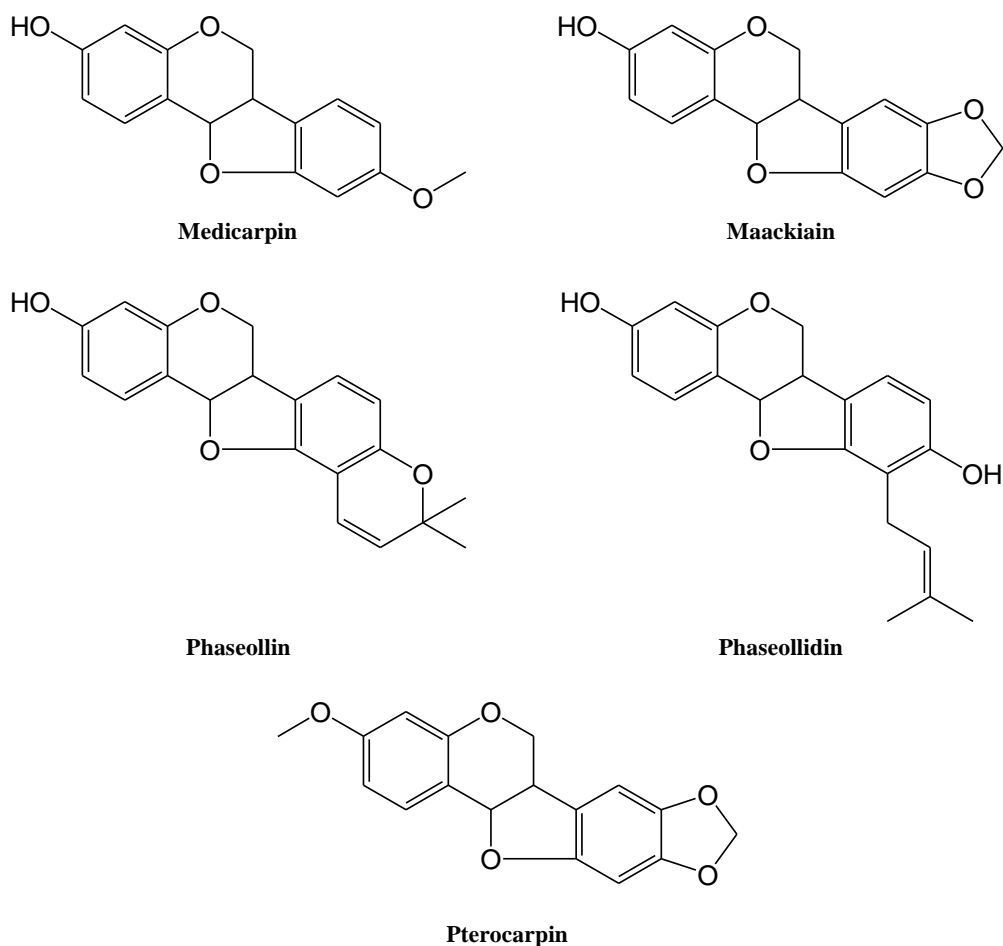
Los pterocarpanos juegan un papel importante en las plantas como compuestos antimicrobianos. Se ha reportado que inhiben el crecimiento y la esporulación de hongos patógenos y presentan varias actividades biológicas importantes (Jiménez et al., 2008; Guest, 2017). Los pterocarpanos medicarpin y maackiain son considerados fitoalexinas (Figura 1-5) (Jiménez et al., 2008); se sintetizan y acumulan en el tejido infectado y circundante, donde se requiere su potencial antimicrobiano. Dependiendo de la familia, las plantas infectadas usualmente producen la misma fitoalexina, independiente del hongo que la ataca (García & Pérez, 2003; Guest, 2017).

De los pterocarpanos registrados como fitoalexinas, el medicarpin, maackiain, pisatin, glyceollin, phaseollin y phaseollidin son los más reconocidos (Goel et al., 2012) (Figura 1-5). Se ha encontrado phaseollin y phaseollidin en fríjol como respuesta a la infección con *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* y *Thielaviopsis basicola* (Jiménez et al., 2008) y su acumulación es diferencial dependiendo de la variedad (Durango et al., 2002). El pterocarpano medicarpin se reporta como fitoalexina en *Medicago sativa* (alfalfa) infectada por *Colletotrichum phomoides*, *Stemphylium loti*, *S. botryosum* y *Phoma herbarum* (Soby et al., 1996). Medicarpin y maackian inhiben la

germinación de esporas de *F. oxysporum* en *Cicer arietinum* (garbanzos), una de las principales fuentes de alimento de humanos y animales (Stevenson et al., 1997).

Ensayos de actividad antifúngica *in vitro* muestran la importancia de estos pterocarpanos. Por ejemplo, cuando pterocarpin fue probado contra *Helminthosporium oryzae*, *Alternaria solani*, y *Curvularia lunata*, se encontró que a concentraciones de 70  $\mu\text{g/L}$  causa inhibiciones del crecimiento superiores al 50%; mientras que a 250  $\mu\text{g/L}$  inhibe un 100% (Mukherjee et al. 1974). El maackiain inhibe el crecimiento de *Pythium graminicola* a una concentración de 20  $\mu\text{g/L}$  (Yagi et al., 1993).

**Figura 1-5:** Pterocarpanos reportados como fitoalexinas (Jiménez et al., 2007).



Debido a que las fitoalexinas pterocarpánicas se relacionan con la resistencia de las plantas a enfermedades, se han postulado como punto de partida para el desarrollo de nuevos agentes de control de hongos, más selectivos y biodegradables (Guest, 2017; García & Pérez, 2003). De un lado, por estar asociados con los mecanismos de defensa

de las plantas y generarse de complejas interacciones bioquímicas resultado de la interacción planta-patógeno, durante la evolución de las plantas (Isman 2006; Dayan et al., 2009; Copping & Duke 2007). Por otra parte, al poseer estructuras químicas relacionadas con el ambiente bioquímico de la planta y el patógeno. En este sentido se abren dos perspectivas de uso para las fitoalexinas pterocarpánicas en el control de hongos: a través de su empleo directo o como plantillas estructurales para el desarrollo de sustancias más activas (Harvey 2007; Costantino & Barlocco, 2006; Koch et al., 2005).

### 1.3 Relación estructura-actividad antifúngica

Varios estudios han tratado de relacionar la estructura de los pterocarpanos y la actividad antifúngica. Inicialmente se estableció a través de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) la conformación de media silla del anillo dihidropirano, el carácter plano del anillo dihidrofurano, y la ubicación perpendicular de los dos biciclos en los pterocarpanos (Goel et al., 2012). Un primer estudio realizado con ocho pterocarpanos y algunos compuestos relacionados, propuso que la actividad antifúngica de los pterocarpanos dependía de la configuración estructural y la presencia de sustituyentes oxigenados en las posiciones C3 y C9. Con este análisis propusieron que posiblemente los biorreceptores de las membranas en el hongo analizado (*Monilinia fructicola*) interactuaban con los pterocarpanos a través de esas posiciones (Perrin & Cruickshank, 1969).

Posteriormente se reevaluó la dependencia de la actividad antifúngica y la conformación tridimensional empleando un amplio rango de sustancias que incluían pterocarpanos, 6a,11a-dihidropterocarpanos, isoflavanos, cumestanos y una isoflavona (Van Etten, 1976). La actividad antifúngica contra los hongos evaluados *Fusarium solani* y *Aphanomyces euteiches* no se relacionó con la conformación 3D ya que varios compuestos de geometrías diversas presentaron actividad antifúngica considerable. Estos resultados mostraron inconsistencias en la dependencia de la actividad con la conformación 3D, propuesta por Perrin y Cruickshank. Esta investigación sugirió que la actividad antifúngica de los isoflavonoides evaluados estaba influenciada por alguna propiedad fisicoquímica en común. Esta propiedad puede ser la lipofiliidad, la cual permite penetrar más fácilmente las membranas de los hongos. Además, se propuso que el mecanismo de acción dependía del tipo de isoflavonoide, ya que podrían presentarse varios tipos. Al relacionar valores de

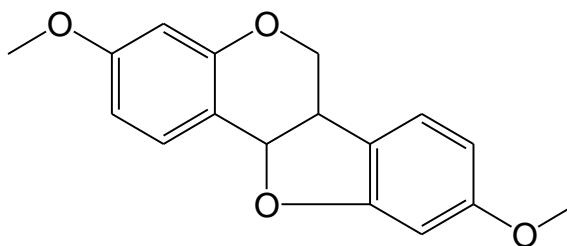
lipofilicidad con los resultados de actividad antifúngica de los compuestos investigados por Van Etten, se encontró que para estructuras similares la actividad aumenta con el carácter lipofílico (Arnoldi & Merlini, 1990). Sin embargo, estos autores revelan que en estructuras de isoflavonoides diferentes no se puede generalizar una correlación entre la actividad y el carácter lipofílico. De esta manera proponen que la lipofilicidad por sí sola no es la causa principal de la actividad antifúngica.

Lo más relevante de estas investigaciones es que ponen en evidencia la posibilidad de alterar la actividad antifúngica a través de modificaciones químicas en plantillas estructurales de pterocarpanos o isoflavonoides bioactivos. Se mostró que pterocarpanos con algunos cambios o inserción de sustituyentes, alcanzaban altos valores de actividad antifúngica. Además, proponen que la inserción de diversos sustituyentes y sus respectivas respuestas de actividad antifúngica también ayudan a comprender la relación actividad-estructura de esta clase de compuestos.

#### 1.4 Homopterocarpina (3,9-dimetoxipterocarpano).

El 3,9-dimetoxipterocarpano u homopterocarpina, es un pterocarpano metoxilado en las posiciones 3 y 9 de los anillos A y D, respectivamente (Figura 1-6).

**Figura 1-6:** Estructura del 3,9-dimetoxipterocarpano.



Varias investigaciones sobre el 3,9-dimetoxipterocarpano evidencian diversas propiedades biológicas. El 3,9-dimetoxipterocarpano y dos pterocarpanos más, el (-)-3,9-dimetoxi-8-hidroxipterocarpano y la hidroxihomopterocarpina, presentaron actividad insecticida contra *Spodoptera litura* F. (Noctuidae) y la termita subterránea *Reticulitermes speratus*. En este trabajo, el 3,9-dimetoxipterocarpano mostró la mayor actividad en comparación con los demás compuestos (Morimoto et al., 2006).

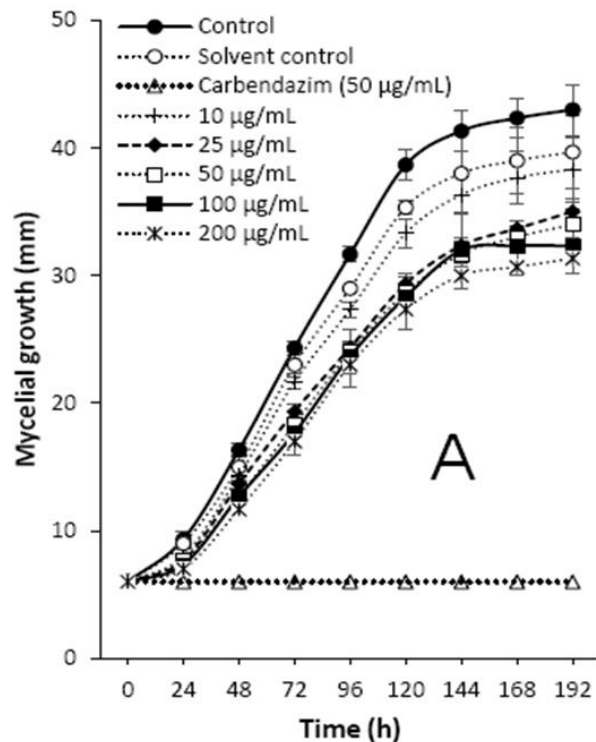
Adicionalmente, el 3,9-dimetoxipterocarpano fue reportado como inductor de apoptosis en células humanas de leucemia HL-60 (Militao et al., 2006). Recientes investigaciones con

la homopterocarquina reportan actividad anticancerígena (Shults et al., 2016), hepatoprotectiva y antioxidante (Akinmoladun et al., 2015).

Por otra parte, la homopterocarquina es uno de los pterocarpanos más abundantes reportados en investigaciones fitoquímicas y uno de los más abundantes en la naturaleza, presente en más de 28 especies (Jiménez et al., 2008). Se ha encontrado en varias especies de género *Platymiscium*, *P. floribundum* (Gadelha Militão et al., 2005) y *P. yucatanum* (Reyes-Chilpa et al., 1998), y en *Pterocarpus* (Jiménez et al., 2007).

En Colombia, la presencia de 3,9-dimetoxipterocarpano (0.39%) fue reportada en residuos del procesamiento de la especie maderable *Platymiscium gracile* Benth, la cual posee gran importancia económica por su utilización en la industria maderera y de ebanistería fina, en el sur de Colombia (Martínez et al., 2016). La homopterocarquina exhibió una actividad antifúngica promisoriosa contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* con porcentajes de inhibición del 40%, a una concentración de 200 µg/mL (Martínez et al., 2016) (Figura 1-7).

**Figura 1-7:** Inhibición del crecimiento micelial de *C. acutatum* con el 3,9-dimetoxipterocarpano (Martínez et al., 2016).



## 1.5 *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*.

*Colletotrichum* es un género de hongos de distribución cosmopolita y con predominio en las regiones tropicales y subtropicales (Xiao et al., 2014). El género *Colletotrichum* posee varias especies causantes de enfermedades de relevancia económica en cultivos de cereales, vegetales, legumbres y cultivos perennes, incluyendo frutas de árbol. En frutas frescas y vegetales, las especies de *Colletotrichum* causan hasta más del 50% de pérdidas (Paull et al., 1997; Awang et al., 2011). Este género fue nominado con el octavo puesto, entre los hongos fitopatógenos más importantes del mundo, por su impacto económico y percepción científica (Dean et al., 2012). *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. es considerada como la especie más desafiante de resolver, comprende la gama de huéspedes más amplia de todas las especies de *Colletotrichum* (Du et al. 2005; Prabhakaran, 2010).

Los hongos *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus Briosi & Cavara) son asociados a la enfermedad llamada Antracnosis, que afecta un amplio número de plantas. Entre las especies afectadas se encuentran la papaya (*Carica papaya* L.) (Molina et al., 2017), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (González et al., 2000), mango (*Mangifera indica* L.) (Sangeetha & Rawal, 2008), aguacate (*Persea americana* Mill.) (Rodríguez et al., 2008) y tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) (Pineda et al., 2012), cultivos de gran importancia económica en Colombia.

Los síntomas de la enfermedad se manifiestan por las afectaciones en ramas y hojas viejas, con manchas negras y muerte de los tejidos a lo largo de las nervaduras. En los frutos la enfermedad se manifiesta en cualquier estado de desarrollo y con mayor gravedad; la sintomatología inicia con lesiones aceitosas que se convierten en manchas de coloración oscura a negra, cubriendo parcial o totalmente el fruto, lo que induce la maduración temprana y posteriormente la caída del fruto (Figura 1-8). Las esporas de *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum* pueden mantenerse latentes por largos periodos de tiempo y así llegan a infectar nuevamente los frutos en poscosecha, cuando se presentan las condiciones de humedad y temperatura óptimas para su desarrollo, ocasionando grandes pérdidas económicas (Pastor-Corrales 1993; Siddiqui & Ali, 2014; Quiroga, 2018). Como ejemplo de lo devastadora que puede llegar a resultar esta enfermedad, se ha reportado en el cultivo de papaya y tomate de árbol pérdidas entre 10 y 80% de los frutos cosechados, aún en cultivos tratados con fungicidas. Además, los elevados costos para el

manejo de la antracnosis por medio de la aplicación de fungicidas comerciales, junto con la pérdida en la calidad de los frutos, representan hasta un 45% de los costos totales de producción (DANE, 2014; DANE 2016).

**Figura 1-8:** Síntomas de la antracnosis en papaya (*C. papaya*) (DANE, 2016) (A) y tomate de árbol (*S. betaceum*) (DANE, 2014) (B).



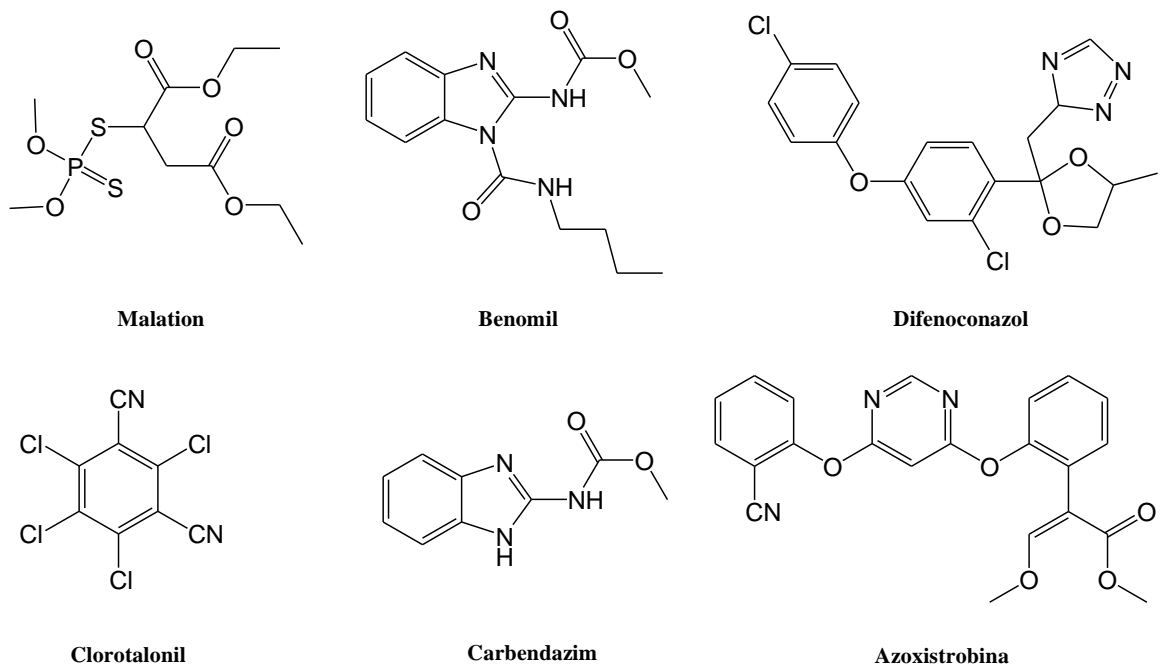
En el caso del frijol, *C. lindemuthianum* ocasiona pérdidas en el rendimiento de hasta el 95%, especialmente cuando se cultivan variedades susceptibles al patógeno en regiones con altos niveles de humedad, temperaturas moderadas y precipitaciones frecuentes. El hongo afecta principalmente la calidad de las vainas de frijol, al inducir lesiones carnosas oscuras que se transforman en chancros hundidos con centros de color salmón; pero también afecta pecíolos y tallos (Gonçalves et al., 2009; Pastor-Corrales 1993; Pastor-Corrales 1994). Las semillas pueden mostrar decoloración, aunque frecuentemente aun estando infectadas se presentan asintomáticas (Melotto et al., 2000).

## 1.6 Estrategias de control.

El control de la antracnosis requiere esfuerzos tecnológicos importantes, desarrollo de metodologías más específicas y además, que prioricen factores ambientales y de salud humana. Comúnmente, la antracnosis se controla con la aplicación de fungicidas

comerciales, si hay más de 4% de incidencia en el cultivo. Usualmente se aplican productos como Mancozeb (3-4 g/L), Clorotalonil (2.5 mL/L), Hidróxido cúprico (1 Kg/Ha), Benomyl (0.5 g/L), Carbendazim (0.3 g/L), Difenconazol (0.4 L/Ha) y Azoxistrobina (1.5 g/L). Adicionalmente se pueden emplear productos para el control de agentes transmisores de la enfermedad, por ejemplo el chinche patas de hojas (*Leptoglossus zonatus*), como Malation (2-2.5 mL/L), Benomil (225 g/L), Clorotalonil (2.6 g/L), Azoxistrobina (4 mL/L), Captan (1.2 g/L), Procholaz (810 ppm), Maned (4 g/L), Tiabendazol (4-8 g/L), Benzotiadiazol (50ppm) y Difenconazole (58%) (Obando 2012; Siddiqui & Ali, 2014) (Figura 1-9).

**Figura 1-9:** Estructuras de algunos fungicidas empleados comúnmente.



Algunas de estas sustancias, como el Benomyl y Mancozeb, registran varias afectaciones contra el medio ambiente y en especial la salud humana, asociadas con la incidencia de cáncer y la aparición de problemas neurológicos y reproductivos (Adriana et al., 2016; Kawaratani et al., 2015; Wilkinson & Killen, 1996).

Actualmente las alternativas de control para *Colletotrichum* sp. son variadas debido a que la estrategia más común, los fungicidas, han causado resistencia en los organismos patógenos. Alternativas de control del patógeno en precosecha y poscosecha o tecnologías emergentes contra la antracnosis se han desarrollado y se emplean

actualmente. Entre los métodos de control se encuentran el uso de tratamientos hidrotérmicos, atmósferas modificadas (Karabulut & Baykal, 2004; Gutiérrez et al., 2004; Ragazzo et al., 2015), luz ultravioleta, y el uso de sustancias reconocidas como seguras (GRAS) (Siddiqui & Ali, 2014), tales como ozono (Ong & Ali, 2015), inductores naturales de defensa en plantas (Kobiler et al., 1993; Prusky & Keen, 1993; Prusky et al., 1990), controles biológicos con microorganismos antagonistas como *Rodhotorula minuta*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp., (Kefialewa & Ayalewb, 2008), sales inorgánicas (Sivakumar et al., 2002), recubrimientos y aceites esenciales (Bosques et al., 2010) entre otros. Infortunadamente estas metodologías de control se encuentran en etapas de desarrollo y los futuros descubrimientos deben reducir la brecha el empleo de tecnologías efectivas y específicas y al mismo tiempo, respetuosas con el medio ambiente ((Siddiqui & Ali, 2014).

En el caso de frijol, el manejo de la antracnosis se fundamenta en la utilización de semilla certificada libre del patógeno y la siembra de variedades resistentes. No obstante, en sistemas de producción con pequeños productores, el acceso a semilla comercial es muy limitado por motivos económicos. Asimismo, la generación de variedades de frijol con resistencia duradera a *C. lindemuthianum* es difícil de lograr, debido a los altos niveles de variabilidad genética y patogénica del hongo, del cual se han identificado a la fecha más de 100 razas en el mundo (Pinto et al., 2012; Apostolos et al., 2009).

## 1.7 Derivatización en la búsqueda de nuevos antifúngicos.

La generación de derivados es una práctica en la que se pretende mejorar la actividad de un compuesto químico bioactivo mediante la modificación de su estructura química. En este proceso, se emplean técnicas de síntesis química para insertar nuevos grupos funcionales en el compuesto y se evalúa la actividad para la nueva estructura. Esto facilita la identificación y determinación de grupos funcionales responsables de generar efectos biológicos en el organismo. En general, lo más interesante es encontrar tendencias, que conduzcan a hipótesis confiables, entre la estructura y la actividad biológica.

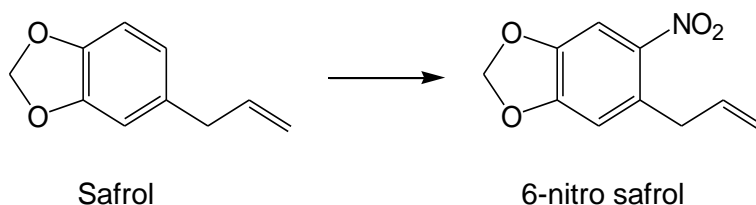
La actividad biológica puede ser expresada cuantitativamente como la concentración necesaria de un compuesto activo para lograr una respuesta específica en un organismo.

En el caso de los hongos fitopatógenos, se tiene como respuesta deseada la inhibición de crecimiento (actividad fungistática) o la muerte de estos (actividad fungicida).

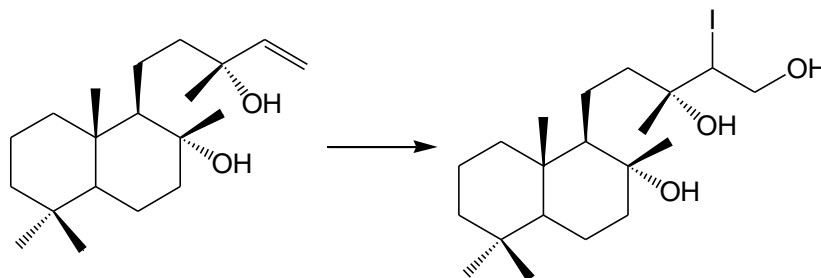
Actualmente, se han realizado varios trabajos con esta dinámica sobre moléculas que poseen una actividad biológica inicial considerable y en las cuales se facilitan modificaciones químicas, obteniéndose muy buenos resultados y generando claridad en el conocimiento de la relación entre la actividad y la estructura. De esta manera el descubrimiento de nuevos compuestos pesticidas modificando metabolitos obtenidos de plantas es actualmente un importante campo de investigación de nuevos agentes de control de plagas (Wu et al., 2015). A continuación, se mencionan varios ejemplos que refuerzan este enfoque:

A partir del 5-(2-Propenil)-1,3-benzodioxol (safrol) aislado de *Piper auritum*, se obtuvo el derivado nitrado 6-nitro-safrol (Figura 1-10), el cual presentó 49 veces más actividad que el safrol a las mismas concentraciones y tiempo de análisis contra *Botryodiplodia theobromae*. Además, la actividad contra *B. theobromae* del 6-nitro-safrol fue comparable a la del fungicida comercial Carbendazim (Vizcaíno et al., 2016).

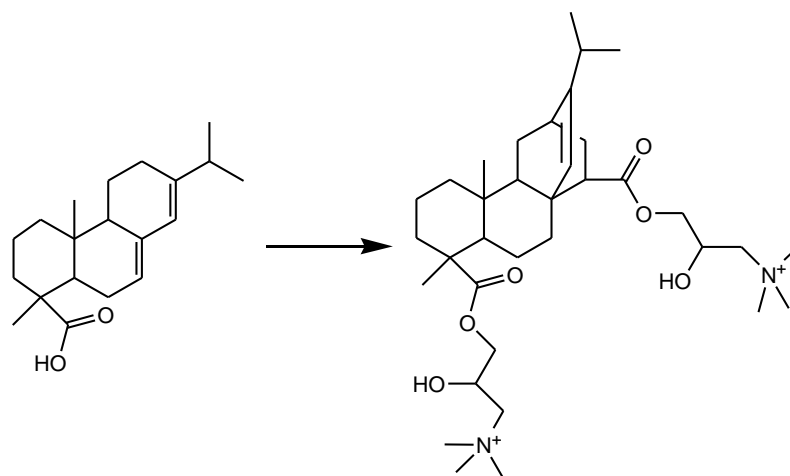
**Figura 1-10:** Derivado de Safrol obtenido por nitración.



En otra investigación se empleó el esclareol, un producto natural proveniente de *Salvia sclarea*, y se generaron 20 derivados. Uno de estos, al cual se le incorporó un sustituyente hidroxilo y un iodo, logró una mejor actividad antifúngica contra *F. coeruleum*, *C. lunata*, *F. graminearum* y *A. brassicae*, con una concentración inhibitoria máxima media (IC<sub>50</sub>) de 13.79, 12.09, 19.27 y 14.47 µg/mL, respectivamente. Estos resultados representan una disminución entre 8.47 y 59.88% del IC<sub>50</sub> del producto de partida esclareol. Asimismo, en *C. lunata* y *A. brassicae* este derivado fue mejor que el fungicida comercial tiabendazol con una disminución del IC<sub>50</sub> de 62.03 y 59.88%, respectivamente (Ma et al. 2015) (Figura -1-11).

**Figura 1-11:** Derivado de esclareol con mayor actividad

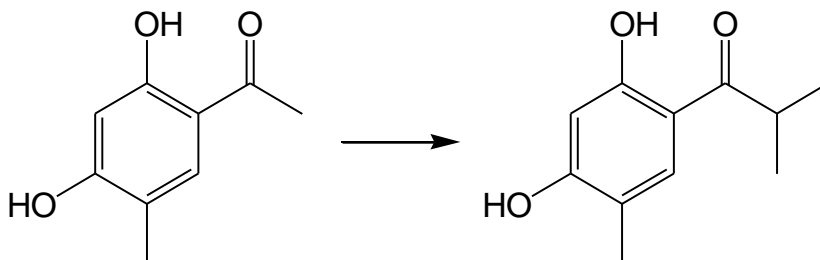
Por otro lado, a partir del ácido abiético, un producto natural proveniente de la colofonia, la cual es producida principalmente por las coníferas, se generaron varios derivados con el fin de realizar un análisis QSAR contra *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*. Uno de los productos obtenidos resultó más activo que el producto de partida, un 162.5% contra *T. versicolor* y 125.0% contra *G. trabeum* (Wang et al. 2015) (Figura 1-12).

**Figura 1-12:** Derivado más activo proveniente del ácido abiético.

A partir de 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona (xantoxilina) y 2,4-dihidroxi-5-metilacetofenona, aisladas de la planta medicinal *Melicope borbonica* y el hongo superior *Polyporus picipes* (Polyporaceae) respectivamente, se prepararon una serie de derivados y se evaluó la actividad antifúngica contra *Cytospora* sp., *Glomerella cingulata*, *Pyricularia oryzae*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*. El derivado más activo que se obtuvo presentó valores  $IC_{50}$  de 24.73, 19.84, 17.28, 32.32 y 37.45  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (Figura 1-13). Para todos los microorganismos evaluados, este derivado presentó una actividad superior al compuesto de partida, alcanzando reducciones del  $IC_{50}$  de mínimo 25.1%. Para

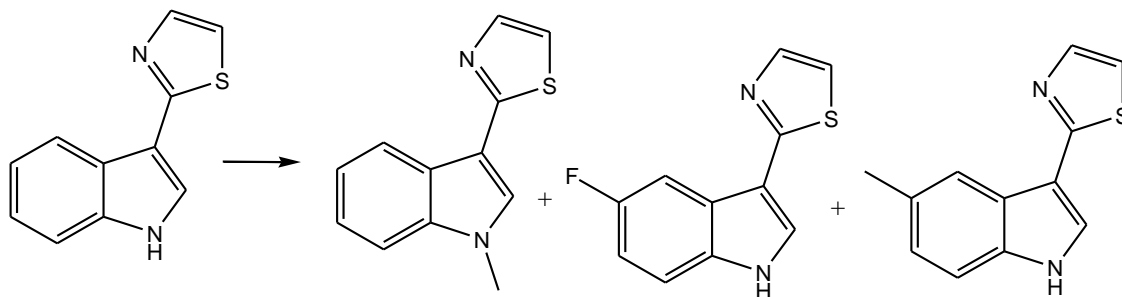
*Cytospora* sp., *G. cingulata*, *P. oryzae* y *A. solani* el derivado más activo presentó valores de  $IC_{50}$  menores a los del fungicida comercial tiabendazol (Wei Shi, 2016).

**Figura 1-13:** Derivado más activo proveniente del 2,4-dihidroxi-5-metilacetofenona.



Otro ejemplo que pone de manifiesto la importancia de optimizar las estructuras mediante modificaciones químicas se reportó para la fitoalexina camalexina, presente en la familia de las crucíferas, a partir de la cual se generaron una serie de derivados con el fin de contrarrestar la especificidad de una enzima detoxificadora de camalexina, producida por *Rhizoctonia solani*. Los resultados mostraron que con los derivados 5-fluorocamalexina, 5-metilcamalexina y 1-metilcamalexina (Figura 1-14) se alcanzó mayor actividad antifúngica contra *R. solani*, que el producto de partida camalexin (Pedras & Liu, 2004).

**Figura 1-14:** Izquierda-derecha: camalexina, 1-metilcamalexina, 5-fluorocamalexina, 5-metilcamalexina.



## 2. Metodología.

### 2.1 Materiales y equipos.

#### 2.1.1 Cepas de *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*.

La cepa de *C. gloeosporioides* se obtuvo de frutos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) infectados. La identificación se realizó mediante características morfológicas, en el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. La cepa del patógeno *C. lindemuthianum* se obtuvo de vainas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con síntomas evidentes de la enfermedad. La identificación se realizó mediante características morfológicas, en los laboratorios de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Las cepas se mantuvieron en medios de cultivo estándares del tipo agar papa-dextrosa (PDA); la temperatura promedio fue de 24°C y la humedad relativa entre 45 y 60 %.

#### 2.1.2 Reactivos.

Los solventes (*n*-hexano; metanol, MeOH; etanol, EtOH; Acetato de etilo, EtOAc; diclorometano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; acetonitrilo, ACN y acetona) de grado síntesis se adquirieron de las casas comerciales Sigma-Aldrich y Merck, y los de grado técnico (ProtoKimica) se purificaron por destilación y posterior secado con sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) anhidro. Los reactivos carbonato de potasio anhidro, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, ácido sulfúrico, ácido acético glacial, ácido nítrico, ácido clorhídrico, tricloruro de aluminio, 2-mercaptoetanol, cloruro de estaño, yoduro de metilo, N-bromosuccinimida (NBS) y 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) se adquirieron de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Alfa Aesar y/o Merck.

### 2.1.3 Instrumentación.

La evaporación a presión reducida se realizó en un rotaevaporador Buchi R-210 a 40°C. La separación y purificación del 3,9-dimetoxipterocarpano ú homopterocarpina (**I**) y los derivados se llevó a cabo empleando cromatografía de columna (CC) con sílica gel 60 (0.040-0.063 mm, Merck) y/o Sephadex LH20. El seguimiento de las reacciones y la elusión de las columnas se realizó por cromatografía de capa fina (TLC), usando cromatoplasmas de aluminio con fase estacionaria de sílica gel (Si 60 F<sub>254</sub>, 0,25 mm, Merck), empleando mezclas diferentes de *n*-hexano/EtOAc como fase móvil. Adicionalmente, la visualización de los derivados en las placas, en las etapas de síntesis y purificación, se realizó con radiación UV (254 y 365 nm) (UVP UVGL-58) y por aspersion con revelador universal ácido acético (AcOH):H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O (143:28:30), seguido de calentamiento. La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un equipo Gilson, con un detector de arreglo de diodos modelo Gilson 170, usando una pre-columna Security Guard Phenomenex C18 (4.0x3.0 mm) seguida por una columna de fase reversa Luna 5µC18 (2) Phenomenex (150 mmx4.6 mm i.d., 5µm) (Torrance, USA).

La elucidación estructural de (**I**) y los productos de síntesis se realizó empleando métodos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear mono- (<sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C-RMN) y bidimensional (COSY, HMQC y HMBC) en un espectrómetro Bruker AMX 300 empleando cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>). Las señales de los desplazamientos se registran en ppm y las constantes de acoplamiento *J* en Hertz (Hz). Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Shimadzu Tracer-100. El análisis de espectrometría de masas se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 (Agilent Technologies) acoplado con un HP 5973 MSD (Detector selectivo de masa-tipo cuadrupolar). Los espectros de UV/VIS se realizaron en un equipo PerkinElmer Lambda 35. Los espectros FT-IR se llevaron a cabo usando CHCl<sub>3</sub> en un espectrómetro Spectrum Two Perkin-Elmer. Las rotaciones ópticas se midieron en solución de CHCl<sub>3</sub> a 25 °C con un polarímetro digital JASCO P-2000.

Los ensayos de actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum* se realizaron en cabina de flujo laminar (CSB 180 A) clase II tipo, esto con el fin de garantizar condiciones de asepsia; de igual forma a los demás instrumentos y materiales empleados se les garantizó inocuidad por medio de esterilización en autoclave horizontal automático (marca Centricol AUA 80 L). Para el conteo de esporas se usó un microscopio Carl Zeiss Primo Star y una Cámara de Neubauer (Deep 1/10 mm, Boeco).

## 2.2 Obtención e identificación del 3,9-dimetoxiptero-carpano (I).

### 2.2.1 Obtención a escala analítica:

El aserrín de madera de *Platymiscium gracile* Benth (783 g) se recolectó en el municipio de Puerto Asís en el departamento de Putumayo. Un voucher (identificado por el Dr. Jorge Mario Vélez) se depositó en el Herbario Gabriel Gutiérrez Villegas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (MEDEL # 64111). Este aserrín desechado en trabajos de ebanistería se extrajo por percolación exhaustiva a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con *n*-hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y EtOAc. Posteriormente, el solvente se removió a presión reducida y a sequedad en un evaporador rotatorio. A cada extracto se le realizó un perfil cromatográfico por HPLC usando un flujo de elución de 0.7 mL/min con el solvente A = MeOH y B = 0.05% ácido acético en agua, con los siguientes incrementos: de 10% A a 70% A en 40 min, luego desde 70% A a 90% A en 20 min, y subsecuentemente se mantuvo durante 8 min hasta reequilibrar la columna, para la siguiente inyección. El volumen inyectado fue 10  $\mu\text{l}$ . El extracto que presentó mayor cantidad de (I) se fraccionó por cromatografía de columna con sílica gel usando como fase móvil mezclas de *n*-hexano-EtOAc con incrementos de polaridad (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, y 5:5). Estas fracciones nuevamente fueron fraccionadas por cromatografía de columna en sílica gel y posteriormente Sephadex LH-20 hasta purificar (I). La estructura de (I) se confirmó por métodos espectroscópicos.

Compuesto (I): Se obtuvo como un sólido cristalino blanco: 60.4 mg; p.f.  $89\text{-}90^\circ\text{C}$ ; p.f. lit  $87.6\text{-}87.8^\circ\text{C}$  (Gadelha Militão et al., 2005). EI-MS  $m/z$ : 284(100)  $[\text{M}]^+$ , 285(18), 283(44), 270 (7), 269(37), 161(13), 148(17). IR  $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ : 1620, 1580, 1490, 1465, 1350, 1275, 1145, 1120, 1025. UV ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )  $\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$  ( $\log \epsilon$ ): 285 (3.9).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.48 (1H, d,  $J = 8.5$ , H-1), 7.18 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-7), 6.70 (1H, dd,  $J = 8.5$ , 2.0, H-2), 6.53-6.49 (3H, m, H-10, H-8, H-4), 5.56 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-11a), 4.29 (1H, dd,  $J = 11.0$  y 4.8 Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.84 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.82 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.68 (1H, t,  $J = 11.0$  Hz, H-6 $\beta$ ), 3.61-3.54 (1H, m, H-6a).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  39.57 (C-6a), 55.40 (-OCH<sub>3</sub>), 55.52 (-OCH<sub>3</sub>), 66.62 (C-6), 78.61 (C-11a), 96.93 (C-8), 101.66 (C-4), 106.38 (C-10), 109.19 (C-2), 112.40 (C-11b), 119.18 (C-6b), 124.78 (C-7), 131.88 (C-1), 156.66 (C-4a), 160.76 (C-3), 161.07 (C-10a), 161.16 (C-9).  $[\alpha]_{\text{D}} = +146^\circ$  (c 0.001,  $\text{CHCl}_3$ ); [lit. =  $[\alpha]_{\text{D}} = +205^\circ$  (c 0.021,  $\text{CHCl}_3$ ) (McMurry et al., 1972)]. Anexo B.

La determinación de concentración del compuesto (I) en los extractos y aserrín de *P. gracile* se determinó por HPLC bajo las mismas condiciones cromatográficas anteriormente mencionadas. Se determinó la curva de calibración para (I) empleando cuatro concentraciones ( $5.05 \cdot 10^{-3}$ ,  $1.02 \cdot 10^{-2}$ ,  $2.08 \cdot 10^{-2}$ ,  $4.35 \cdot 10^{-2}$  y  $8.18 \cdot 10^{-2}$  mg/ml).

### 2.2.2 Obtención a escala preparativa:

Debido a la necesidad de una cantidad abundante de materia prima para las etapas de derivatización, se realizó una optimización de la extracción de (I) a partir del aserrín de *P. gracile*. Inicialmente, se llevó a cabo una extracción por percolación del aserrín de *P. gracile* con etanol y posteriormente se eliminó el solvente por evaporación rotatoria a presión reducida y a sequedad. El extracto seco se redisolvió en una mezcla etanol-H<sub>2</sub>O (80:20) a diferentes proporciones y se sometió a extracción líquido-líquido con *n*-hexano asistida por ultrasonido (EAU) y evaluando el efecto del tiempo de extracción (entre 15 y 180 min), la relación de volúmenes de extracto y *n*-hexano (entre 0.2 y 0.8: volumen *n*-hexano/volumen extracto) y el porcentaje del extracto de *P. gracile* (entre 20 y 80%).

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para determinar la mejor combinación de variables de extracción que generen el máximo rendimiento de (I). Se evaluaron tres variables independientes (relación volumen solvente extractor (*n*-hexano)/volumen extracto, concentración del extracto y tiempo) utilizando el diseño experimental de Box-Behnken (BB) (Zhang et al., 2014), con rendimiento de (I) por unidad de masa de extracto como variable de respuesta (Y). El rango de variables independientes, los niveles y sus valores codificados se muestran en la Tabla 2-1.

**Tabla 2-1:** Rango de variables independiente del diseño BB

Variables independientes	Niveles		
	Bajo	Medio	Alto
X <sub>1</sub> (relación volumen solvente extractor ( <i>n</i> -hexano) / volumen extracto, ml/ml)	0.25	2.12	4.00
X <sub>2</sub> (concentración de extracto, g/100 ml)*100	20.00	50.00	80.00
X <sub>3</sub> (tiempo, min)	15.00	97.50	180.00

El diseño BB para esta optimización se realizó empleando el software STATGRAPHICS Centurión XV y consistió de 17 experimentos, lo cuales se presentan en la Tabla 2-2. Los

experimentos se realizaron en tubos de ensayo de tapa roscada. Se adicionó en ellos la cantidad necesaria de extracto seco de *P. gracile* y posteriormente se agregó el volumen suficiente de etanol-H<sub>2</sub>O (80:20) para alcanzar la concentración de extracto etanólico ( $X_2$ ). Seguidamente se incorporó en los tubos de ensayo el volumen de *n*-hexano suficiente para alcanzar la relación de volúmenes ( $X_1$ ). Finalmente, los tubos de ensayo se introdujeron en un equipo de ultrasonido ULTRASONIK Modelo 28 H de 160W y cada experimento se dejó el tiempo necesario ( $X_3$ ) de acuerdo con la Tabla 2-2.

**Tabla 2-2:** Condiciones de experimentos para el diseño Box-Behnken.

Experimento	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	0.25	20	97.50
2	0.25	80	97.50
3	4.00	20	97.50
4	4.00	80	97.50
5	2.12	20	15.00
6	2.12	80	15.00
7	2.12	20	180.00
8	2.12	80	180.00
9	0.25	50	15.00
10	4.00	50	15.00
11	0.25	50	180.00
12	4.00	50	180.00
13	2.12	50	97.50
14	2.12	50	97.50
15	2.12	50	97.50
16	2.12	50	97.50
17	2.12	50	97.50

$X_3$ = Tiempo (min);  $X_2$ = Concentración extracto (g extracto/ml etanol)\*100;  
 $X_1$ = Relación (ml hexano/ml extracto)

La determinación de la variable respuesta ( $Y$ ) se realizó empleando HPLC con las mismas condiciones de operación y curva de calibración mencionadas anteriormente para determinar ( $I$ ). Para esto, inicialmente se tomó una alícuota de

la fase *n*-hexano al finalizar el tiempo ( $X_3$ ) de cada uno de los 17 experimentos, seguidamente se secó hasta obtener un residuo (**RE**) que posteriormente fue cuantificado. Se prepararon soluciones en 1000 $\mu$ L de metanol con alrededor de 5 mg de cada (**RE**) y estas se hicieron pasar por papel filtro de 0.45  $\mu$ m. Seguidamente se tomó 50  $\mu$ L de cada una de las soluciones filtradas anteriores y se diluyeron con 950  $\mu$ L de metanol grado HPLC para finalmente obtener las muestras para analizar. Como resultado se obtuvo la concentración de (**I**) en cada muestra analizada y con los respectivos factores de dilución se determinó el contenido en mg de (**I**) por gramo de (**RE**) para cada experimento. Con los valores anteriores y teniendo en cuenta los volúmenes totales de la fase *n*-hexano de cada experimento (mg (**RE**)/g de extracto seca de *P. gracile*) se determina el contenido en mg de (**I**) por gramo de extracto seco de *P. gracile* (**Y**) para cada experimento realizado.

## 2.3 Preparación de derivados y purificación

### **Compuesto (II): 3,9-dimetoxi-8-nitropterocarpano**

El compuesto (**I**) (200 mg, 0.704 mmol) se disolvió con 4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se agregó 150  $\mu$ L de una mezcla al 80% de  $\text{HNO}_3$  y 20 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La reacción se llevó a cabo a  $-15^\circ\text{C}$  durante 30 min con agitación constante. Al finalizar la reacción, se adicionó agua (50 mL) y se neutralizó con  $\text{NaHCO}_3$  sólido hasta pH neutro. La solución resultante se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x50 mL) y las fases orgánicas se reunieron y secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. El solvente se removió por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo obtenido se fraccionó por cromatografía de columna usando sílica gel empleando mezcla de *n*-hexano/EtOAc en proporción 8:2. Finalmente se obtuvieron 45 mg (0.167 mmol, rendimiento 23.7%) de un sólido amorfo de color amarillo claro (**II**).

Señales características:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.44 (1H, d,  $J=8.4$ , H-1), 8.01 (1H, s, H-7), 6.70 (1H, dd,  $J=8.4, 2.1$ , H-2), 6.57 (1H, s, H-10), 6.52 (1H, d,  $J=2.1$ , H-4), 5.74 (1H, d,  $J=5.7$ , H-11a), 4.34 (1H, dd,  $J=7.2, 4.3$ , H-6 $\alpha$ ), 3.97(3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.84(3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.81-3.75 (2H, m, H-6 $\beta$ , H-6a).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  39.22 (C-6a), 55.46 ( $-\text{OCH}_3$ ), 56.80 ( $-\text{OCH}_3$ ), 66.13 (C-6), 80.43 (C-11a), 95.46 (C-10), 101.77 (C-4), 109.72 (C-2), 111.26 (C-11b), 119.24 (C-6b), 123.42 (C-7), 131.71 (C-1), 132.86 (C-8), 156.79 (C-4a), 157.03 (C-9), 161.44 (C-3), 165.04 (C-10a). (Anexo B).

**Compuesto (III): 3,9-dimetoxi-2,8,-dinitropterocarpano**

El compuesto (I) (200 mg, 0.704 mmol) se disolvió con 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se agregó 1800 µL de una mezcla al 80% de HNO<sub>3</sub> y 20 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La reacción se llevó a cabo a -15°C durante 2 h con agitación constante. Al finalizar la reacción, se adicionó agua (50 mL) y se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub> sólido hasta pH neutro. La solución resultante se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50 mL) y las fases orgánicas se reunieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El solvente se removió por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo obtenido se fraccionó por cromatografía de columna usando sílica gel empleando mezcla de *n*-hexano/EtOAc en proporción 7:3. Finalmente se obtuvieron 25 mg (0.067 mmol, rendimiento 9.51 %) de producto puro; un sólido amorfo de color amarillo-marrón (III).

Señales características: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.27 (1H, s, H-1), 8.03 (1H, s, H-7), 6.64 (1H, s, H-10), 6.60 (1H, s, H-4), 5.75 (1H, d, *J*=7.2, H-11a), 4.59 (1H, dd, *J*= 10.8, 4.2, H-6ec), 3.99(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.98(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.94-3.82 (2H, m, H-6ax, H-6a). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 38.86 (C-6a), 56.79 (-OCH<sub>3</sub>), 56.90 (-OCH<sub>3</sub>), 66.16 (C-6), 78.70 (C-11a), 95.79 (C-10), 102.00 (C-4), 111.13 (C-11b), 111.13 (C-6b), 123.42 (C-1), 130.04 (C-7), 133.42 (C-2), 155.67 (C-9), 157.15 (C-3), 160.59 (C-4a), 164.54 (C-10a). (Anexo B).

**Compuesto (IV): 3,9-dimetoxi-2,8,10-trinitropterocarpano**

A una solución de (I) (200 mg, 0.704 mmol) y 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se agregaron 4600 µL de una mezcla al 80% de HNO<sub>3</sub> y 20 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 h con agitación constante. Al finalizar la reacción, se adicionó agua (50 mL) y se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub> sólido hasta pH neutro. La solución resultante se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50 mL) y las fases orgánicas se reunieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Posteriormente el solvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se fraccionó por cromatografía de columna con sílica gel empleando mezcla de *n*-hexano/EtOAc en proporción 6:4. Finalmente se obtuvieron 11 mg (0.027 mmol, rendimiento 3.84%) de un sólido amorfo de color amarillo claro (IV).

Señales características: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.27 (1H, s, H-1), 8.14 (1H, s, H-7), 6.66 (1H, s, H-4), 5.99 (1H, d, *J*=6.9, H-11a), 4.51 (1H, dd, *J*= 8.7, 3.3, H-6ec), 4.09(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 4.07(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 4.04-3.97 (2H, m, H-6ax, H-6a). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 39.26 (C-6a), 6.86 (-OCH<sub>3</sub>), 66.57 (C-6), 78.58 (C-11a), 96.95 (C-10), 103.70 (C-4), 106.4 (C-8), 109.83 (C-2), 112.61 (C-11b), 119.15 (C-6b), 124.81 (C-7), 132.25 (C-1), 156.68 (C-4a), 158.10 (C-3), 160.67 (C-10a), 161.13 (C-9). (Anexo B).

**Compuesto (V): 2,8-diamino-3,9-dimetoxipterocarpano**

El compuesto (III) (200 mg, 0.704 mmol) se disolvió en 4 mL de EtOH con 2 g de SnCl<sub>2</sub>. La reacción se llevó a cabo a 45°C durante 12 h con agitación constante. Al finalizar la reacción se eliminó el solvente con roto evaporación y al residuo se le adicionó agua (50 mL). La solución resultante se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50 mL). Las fases orgánicas se reunieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Posteriormente el solvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se fraccionó por cromatografía de columna con sílica gel empleando mezcla de *n*-hexano/EtOAc en proporción 6:4. Se obtuvieron 5 mg (0.016 mmol, rendimiento 2.27%) de un sólido amorfo marrón claro (V).

Señales características: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.88 (1H, s, H-1), 6.70 (1H, s, H-7), 6.48 (1H, s, H-10), 6.46 (1H, s, H-4), 5.43 (1H, d, *J*=6.9, H-11a), 4.23 (1H, dd, *J*= 10.5, 4.8, H-6ec), 3.87 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.85 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.66-3.52 (2H, m, H-6ax, H-6a). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 40.62 (C-6a), 55.61 (-OCH<sub>3</sub>), 55.78 (-OCH<sub>3</sub>), 66.86 (C-6), 78.07 (C-11a), 94.70 (C-10), 99.77 (C-4), 111.46 (C-1), 112.77 (C-11b), 115.68 (C-7), 117.82 (C-6b), 129.55 (C-8), 130.83 (C-2), 146.69 (C-9), 146.74 (C-3), 153.09 (C-4a), 156.58 (C-10a). (Anexo B).

**Compuesto (VI): 3,9-dimetoxicoumestano**

El compuesto (I) (200 mg, 0.704 mmol) disuelto en 25 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se trató con 60 mg de DDQ en agitación constante. La reacción se llevó a cabo temperatura ambiente durante 12 h. Al finalizar la reacción se adicionó salmuera (50 mL) y la solución resultante se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50 mL). Las fases orgánicas se reunieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Luego de decantar, el sobrenadante se concentró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo obtenido se fraccionó por cromatografía de columna empleando mezcla de *n*-hexano/EtOAc en proporción 7:3. Finalmente, se obtuvieron 60 mg (0.160 mmol, rendimiento 22.7%) de un sólido amorfo incoloro (VI).

Señales características. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.99 (1H, d, *J*=8.4, H-1), 7.92 (1H, dd, *J*=8.1, 2.1, H-7), 7.091 (1H, dd, *J*=8.4, 2.2, H-2), 7.21 (1H, d, *J*=2.1, H-4), 7.04-7.00 (2H, dd, *J*=8.4, 2.2 H-8), 7.04-6.73 (2H, dd, *J*=8.4, 2.2 H-10) 3.96 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.95 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 55.87 (2x-OCH<sub>3</sub>), 96.86 (C-10), 101.44 (C-4), 106.16 (C-6a), 113.09 (C-11b), 113.22 (C-8), 115.50 (C-6b), 116.67 (C-2), 121.66 (C-7), 122.50 (C-50), 155.16 (C-4a), 156.50 (C-10a), 158.57 (C-6), 159.27 (C-11a), 160.13 (C-9), 162.62 (C-3). (Anexo B).

**Compuesto (VII): 9-metoxi-3-hidroxipterocarpano**

El compuesto (I) (200 mg, 0.704 mmol) disuelto en 5 mL de acetonitrilo, se trató con 100  $\mu$ L de HCl al 33%. La reacción se llevó a cabo a  $-15^{\circ}\text{C}$  por 30 min con agitación constante. Al finalizar la reacción, se adicionó solución de  $\text{NaHCO}_3$  1M (50 mL) hasta neutralizar. El crudo de reacción fue extraído con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x50 mL). Las fases orgánicas se reunieron y secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Posteriormente, la mezcla se filtró y el solvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se fraccionó por cromatografía de columna con sílica gel empleando mezcla de *n*-hexano/EtOAc en proporción 7:3. Finalmente, se obtuvieron 4 mg (0.015 mmol, rendimiento 2.13%) de un sólido cristalino incoloro (VII).

**Señales características:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.44 (1H, d,  $J=8.4$ , H-1), 7.18 (1H, d,  $J=8.7$ , H-7), 6.59 (1H, dd,  $J=8.4, 2.2$ , H-2), 6.52-6.46 (3H, m, H-10, H-8, H-4), 5.55 (1H, d,  $J=6.6$ , H-11a), 4.29 (1H, dd,  $J=10.0, 4.5$ , H-6ec), 3.83(3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.70-3.57 (2H, m, H-6ax, H-6a).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  39.50 (C-6a), 55.56 ( $-\text{OCH}_3$ ), 66.57 (C-6), 78.58 (C-11a), 96.95 (C-10), 103.70 (C-4), 106.4 (C-8), 109.83 (C-2), 112.61 (C-11b), 119.15 (C-6b), 124.81 (C-7), 132.25 (C-1), 156.68 (C-4a), 158.10 (C-3), 160.67 (C-10a), 161.13 (C-9). Después de comparar los datos espectroscópicos con información de la literatura (Goel A., Kumar A., Raghuvanshi A., 2012) el compuesto fue confirmado como (6aS, 11aS)-3-hidroxi-9-metoxipterocarpan (VII). (Anexo B).

**Compuesto (VIII): 2'-hidroxi-4-(2-hidroxiethylsulfanyl)-7,4'-dimetoxiisoflavano**

El compuesto (I) (200 mg, 0.70 mmol) disuelto en 10 mL de una mezcla 1:1 de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y mercaptoetanol,  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , se trató con 60 mg de cloruro de aluminio,  $\text{AlCl}_3$ , anhidro. La reacción se llevó a cabo con agitación constante y a temperatura ambiente durante 24 h. Al finalizar la reacción, se adicionó agua (50 mL) y la mezcla resultante se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x50 mL). Las fases orgánicas se reunieron y secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Posteriormente la mezcla se decantó y el sobrenadante se concentró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se fraccionó por cromatografía de columna con sílica gel empleando mezcla de *n*-hexano/EtOAc en proporción 1:1. Finalmente, se obtuvieron 95 mg (0.262 mmol, rendimiento 37.22%) de un aceite viscoso incoloro (VIII).

Señales características: IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3300, 300, 2925, 1612, 1580, 1500, 1430, 1205, 1150, 1100, 1030, 825, 750.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.33 (1H, d,  $J=8.4$ , H-5), 7.13

(1H, d,  $J=8.1$ , H-6'), 6.54 (1H, dd,  $J=8.4$ , 2.5, H-6), 6.45-6.41 (3H, m, H-8, H-5'-H-3'), 4.63 (1H, dd,  $J=11.4$ , 3.4, H-2eq), 4.38 (1H, m, H-2ax), 4.23 (1H, d,  $J=5.1$ , H-4), 3.81- 3.765 (8H, m, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, 2''), 3.66 (1H, m, H-3), 2.93-2.77 (1H, m, H-1'). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 33.61 (C-1'), 37.4 (C-3), 44.35 (C-4), 55.30 (2 x-OCH<sub>3</sub>), 61.37 (C-2'), 66.86 (C-2), 101.66 (C-8), 102.34 (C-5'), 105.93 (C-3'), 108.30 (C-6), 113.33 (C-4a), 119.74 (C-1'), 128.53 (C-2'), 131.83 (C-5), 154.54 (C-6), 155.83 (C-8a), 159.53 (C-7), 159.82 (C-4'). (Anexo B).

#### **Compuesto (IX): 4-(2-hidroxiethylsulfanil)-7,4',2'-trimetoxiisoflavano**

El compuesto (VIII) (60 mg, 0.16 mmol) se trató con una mezcla (5 mL) de acetona (25 mL)-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 g) y 180 μL de yoduro de metilo, CH<sub>3</sub>I. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 24 h. Primero se agitó el K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en acetona por 30 minutos y después se adicionó (VIII) y se continuó agitando por 30 min más. Luego se adiciono CH<sub>3</sub>I y se continuó la agitación por 3 horas. Al finalizar la reacción se adicionó agua (50 mL), y la mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50 mL). Las fases orgánicas se reunieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Luego de decantar, el sobrenadante se concentró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se fraccionó por cromatografía de columna con sílica gel empleando mezcla de *n*-hexano/EtOAc en proporción 1:1. Finalmente, se obtuvieron 17 mg (0.045 mmol, rendimiento 28.13%) de un aceite viscoso incoloro (IX).

Señales características: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.29 (1H, d,  $J=8.4$ , H-5), 7.16 (1H, d,  $J=8.2$ , H-6'), 6.53 (1H, dd,  $J=8.5$ , 2.5, H-6), 6.42-6.39 (3H, m, H-8, H-5'-H-3'), 4.56 (1H, dd,  $J=11.4$ , 3.4, H-2eq), 4.40 (1H, m, H-2ax), 4.19 (1H, d,  $J=5.1$ , H-4), 3.88- 3.80 (11H, m, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, 2''), 3.64 (1H, m, H-3), 3.06-2.79 (1H, m, H-1'). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 34.29 (C-1'), 37.13 (C-3), 43.61 (C-4), 55.33 (3 x-OCH<sub>3</sub>), 60.88 (C-2'), 66.12 (C-2), 98.85 (C-8), 101.17 (C-3'), 104.15 (C-5'), 108.19 (C-6), 113.18 (C-4a), 121.11 (C-1'), 128.30 (C-6'), 131.93 (C-5), 155.63 (C-6), 157.75 (C-8a), 159.88 (C-7), 159.88 (C-4'). (Anexo B).

## **2.4 Evaluación de la actividad antifúngica.**

### **2.4.1 Inhibición del crecimiento radial.**

La inhibición del crecimiento radial se evaluó con la técnica de la placa perforada en medio de cultivo sólido PDA (papa, 20%; dextrosa, 2%; agar, 2%, Merck) envenenado, en cajas

Petri de 90 mm de diámetro. El compuesto (I) y los derivados (II-IX) se incorporaron a cinco concentraciones diferentes en el medio de cultivo (35.2, 88.0, 176.0, 352.0 y 704.0  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, las cajas Petri se inocularon en el centro con micelio circular (6 mm diámetro) de *C. gloeosporioides* con 7 días de crecimiento previo en PDA. La evaluación de la actividad se realizó midiendo el diámetro de crecimiento micelial del hongo, empleando una regla milimetrada, a intervalos de 24 horas durante 7 a 8 días aproximadamente para *C. gloeosporioides*. Para *C. lindemuthianum* se empleó la técnica anterior, pero con medio de cultivo Agar-Avena (avena 2%; Agar-Agar 1.8%, Scharlau) y se realizaron las mediciones cada 48 horas en un tiempo de evaluación de 18 días. Los tratamientos se realizaron por triplicado para los dos hongos.

Los resultados se presentaron en términos del crecimiento micelial (mm) y porcentajes de inhibición. Este porcentaje se determinó comparando los diámetros de crecimiento para cada tratamiento, control positivo (carbendazim y timol) y control solvente (DMSO 1%), con el control absoluto (Ver Ecuación 2.1). Esto con el fin de garantizar que los porcentajes de inhibición obtenidos son debidos al efecto neto de los compuestos en estudio.

$$\% \text{ IC} = \frac{\overline{\text{DB}} - \overline{\text{DT}}}{\overline{\text{DB}}} \times 100\% \quad \text{Ecuación (2.1)}$$

Dónde: %IC, Porcentaje de inhibición de crecimiento; DB: Crecimiento promedio del control absoluto; DT: Crecimiento promedio del tratamiento.

#### 2.4.2 Inhibición de la germinación.

La actividad antifúngica de los derivados contra *C. gloeosporioides* se evaluó también a través del porcentaje de inhibición de la germinación. Inicialmente se recolectaron las esporas de *C. gloeosporioides* desde un cultivo en caja Petri de 9.0 cm de diámetro con medio PDA y 7 días de incubación. Para esto se adicionaron 20 ml de agua estéril y se realizó un barrido repetitivo con hisopo de algodón estéril, para solubilizar el mayor número de esporas. La solución de micelio y esporas se filtró con gaza estéril y se diluyó con agua tipo 1 hasta alcanzar una concentración de  $3 \times 10^5$  esporas/ml. Posteriormente, en tubos de microcentrífuga marca Eppendorf de 2 ml, se adicionó 1 ml de la solución de esporas seguido del compuesto a evaluar disuelto en 15  $\mu\text{L}$  de DMSO y 0.5 ml de PDA al 9% seguido de agitación en Vortex V1 Plus hasta homogenizar. El medio de germinación

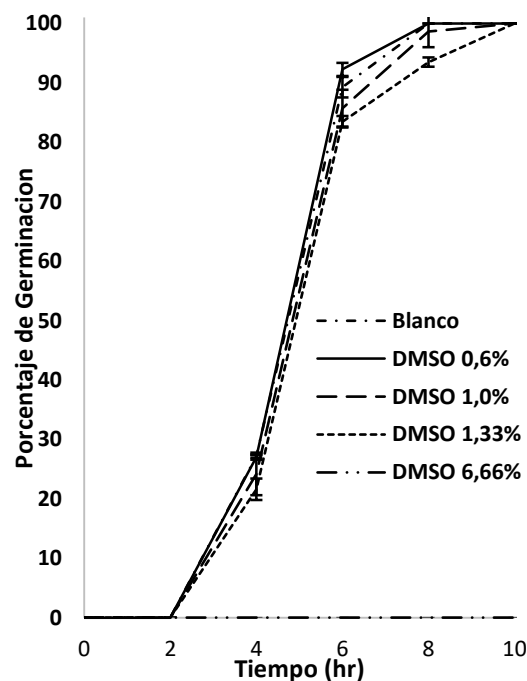
alcanzó una concentración de 3% de PDA y 1% de DMSO la cual no inhibe el crecimiento de las esporas según la curva de germinación de esporas a diferentes concentraciones de DMSO (Figura 2-1).

Los derivados se incorporaron en cantidades que garantizaran concentraciones de 35.2, 88.0, 176.0, 352.0 y 704.0  $\mu\text{M}$ . Finalmente, la evaluación del porcentaje de inhibición de la germinación (%IG) se realizó midiendo a intervalos de 8 y 24 horas, el número de esporas germinadas o que desarrollen una dimensión del tubo germinativo mayor al doble del radio de la espora. Los resultados se presentan en términos de porcentajes de inhibición, al comparar los tratamientos con el control absoluto (Ver Ecuación 2.2). Esto con el fin de garantizar que los porcentajes de inhibición obtenidos son debidos al efecto neto de los compuestos en estudio.

$$\% \text{ IC} = \frac{\overline{\text{DB}} - \overline{\text{DT}}}{\overline{\text{DB}}} \times 100\% \quad \text{Ecuación (2.2)}$$

Dónde: %IC, Porcentaje de inhibición de la germinación; DB: número promedio de esporas germinadas en el control absoluto; DT: número promedio de esporas germinadas en el tratamiento.

**Figura 2-1:** Germinación de esporas de *C. gloeosporioides* en PDA 3% y  $2 \times 10^5$  esporas/mL a diferentes concentraciones de DMSO. Experimento realizado en tubos de microcentrifuga marca Eppendorf de 2 ml de capacidad.



### **2.4.3 Crecimiento de *C. gloeosporioides* en frutos de *C. papaya* y *M. indica*.**

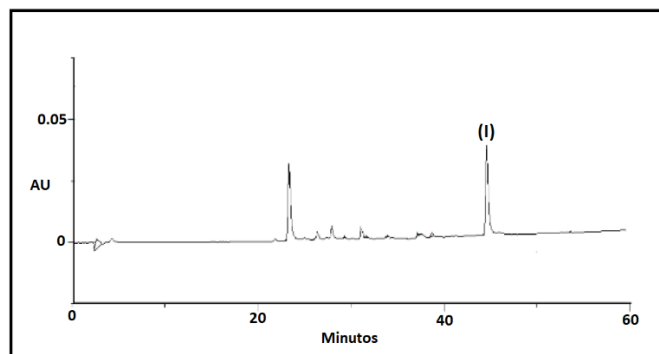
Se adquirieron frutos de papaya (*C. papaya* L. cv. Hawaiana) y Mango (*Mangifera indica* L. cv. Hilacha) en un mercado local (3 frutos por tratamiento) con índice de maduración 4 (Villadiego et al., 2016), con tamaño y color uniforme, libres de daños físicos e infecciones fúngicas. Los frutos se sometieron a un lavado con agua destilada, seguido por desinfección con hipoclorito de sodio (1%) y secado a temperatura ambiente. A continuación, en la parte media de la fruta se realizó una incisión de 6 mm de diámetro y 2 mm de profundidad con un punzón estéril de acero. En este agujero se ubicó micelio de *C. gloeosporioides* con las mismas dimensiones y provenientes de un cultivo en caja Petri en medio PDA con siete días de antigüedad. Los frutos se almacenaron por doce horas en recipientes plásticos sellados con una humedad relativa del 75% obtenida con solución saturada de NaCl. Pasadas 12 horas, los frutos se impregnaron con una dosis del derivado más promisorio y los controles positivos al 1% en EtOH, empleando una brocha fina. Finalmente se volvieron a almacenar en los recipientes plásticos. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado (Pineda et al., 2012). Se usaron como controles positivos el fungicida comercial carbendazim y el metabolito bioactivo timol, el cual ha sido reportado por tener una fuerte actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* (Numpaque et al., 2011). Los frutos se almacenaron en recipientes plásticos a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ). La incidencia se evaluó midiendo el diámetro (en mm) de la infección causada por el hongo a los 7 días para papaya y 15 días para mango.

## 3. Resultados y discusión.

### 3.1 Obtención a escala analítica, identificación y cuantificación de (I).

A partir de la extracción por percolación del aserrín de *P. gracile* (783 g) con *n*-hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y ETOAc se obtuvieron 15.6, 25.1 y 68.3 g de extracto respectivamente. El análisis por HPLC de los tres extractos mostró la presencia de tres picos mayoritarios. En el extracto de *n*-hexano se encontraron dos picos con tiempos de retención (*t<sub>R</sub>*) a 23.41 y 44.59 minutos (Figura 3-1). Los perfiles cromatográficos de los extractos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y ETOAc mostraron picos similares, pero con menor intensidad (Anexo A). Los tres compuestos mayoritarios se purificaron por técnicas cromatográficas y se identificaron por métodos espectroscópicos.

**Figura 3-1:** Cromatograma del extracto de *n*-hexano.

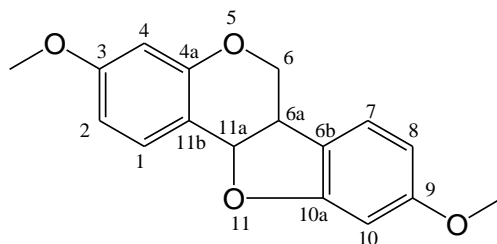


Luego de múltiples cromatografías de columna, el compuesto menos polar y más abundante del extracto en *n*-hexano se obtuvo como un sólido cristalino blanco. La fórmula molecular, según el espectro de masas  $M^+ = 284$  (100) uma, fue C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>. Este compuesto presentó señales para seis protones aromáticos y el patrón característico de los protones H-6, H-6a y H-11a de los pterocarpanos (Figura 3-2). El espectro de <sup>1</sup>H NMR, muestra la presencia de cuatro protones alifáticos a  $\delta_H$  5.56 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-11a), 4.29 (1H, dd,

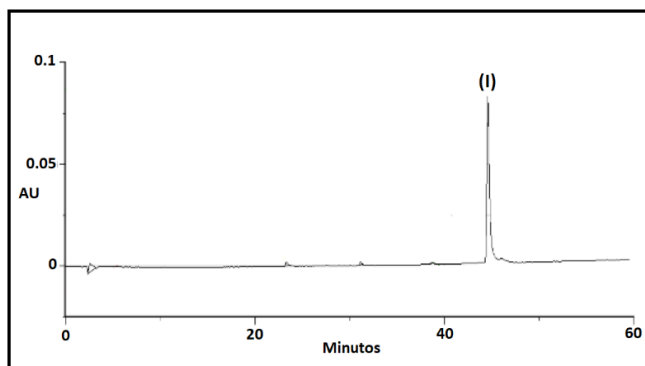
$J = 11.0$  y  $4.8$  Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.68 (1H, t,  $J = 11.0$  Hz, H-6 $\beta$ ) y 3.61-3.54 (1H, m, H-6a), sugiriendo un patrón ABMX típico del sistema heterocíclico de un pterocarpano (Tjahjandarie & Tanjung, 2015). Además, a campo bajo, se observan dos sistemas ABX; uno formado por las señales a  $\delta_H$  7.48 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-1), 6.70 (1H, dd,  $J = 8.5$  y  $2.0$  Hz, H-2) y 6.53-6.49 (1H, m, H-4), y otro formado por  $\delta_H$  7.18 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-7) y 6.53-6.49 (2H, m, H-8 y H-10) indicando la presencia de un pterocarpano disustituido. Adicionalmente, el espectro de  $^1H$  NMR muestra señales características atribuidas a 2 grupos metoxilo con  $\delta_H$  3.82 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>) y 3.84 ppm (3H, s, -OCH<sub>3</sub>).

El espectro de  $^{13}C$  NMR muestra 17 señales consistente con un pterocarpano dimetoxilado. Basado en los espectros de  $^1H$  y  $^{13}C$  NMR, se ubicaron los metoxilos en la posiciones C-3 y C-9. Las asignaciones fueron confirmadas empleando espectros JMOD, DEPT 135, COSY, HSQC y HMBC (Anexo B). A partir del análisis anterior y comparación con datos espectroscópicos reportados en la literatura (Maekawa & Kitao, 1970), se confirmó el compuesto como 3, 9-dimetoxipterocarpano (homopterocarpin). La rotación óptica (+) de la homopterocarpin sugiere una configuración absoluta (6aS, 11aS) (Goel et al., 2012; Veloso et al., 2012). Por lo tanto, el compuesto corresponde al (+) (6aS, 11aS)-3,9-dimetoxipterocarpano (**I**) (Figura 3-2).

**Figura 3-2:** Estructura de 3,9-dimetoxipterocarpano (**I**).



La pureza del compuesto (**I**) se estableció por HPLC (>90%) (Figura 3-3, pico **I**) y posteriormente se determinó la ecuación de la curva de calibración para la cuantificación, que correspondió con  $y = 4.36 \cdot 10^{-08} x - 1.10 \cdot 10^{-03}$  ( $R^2 = 0.99$ ). De esta forma, se determinó una concentración de 191.2 mg/g en el extracto de *n*-hexano y un porcentaje en el aserrín de 0.39%. Según los perfiles cromatográficos (Anexo A), la mayor concentración de (**I**) se obtuvo en el extracto de *n*-hexano.

**Figura 3-3:** Cromatograma del 3,9-dimetoxipterocarpano (I).

### 3.2 Obtención a escala preparativa.

Una vez purificado e identificado el compuesto (I), se llevó a cabo un proceso de optimización de la extracción a partir de residuos de *P. gracile*, con el fin de obtener de manera rápida y fácil (sin el uso de varias columnas cromatográficas) una cantidad abundante de materia prima para la preparación de los derivados. El rendimiento de la extracción de (I) (Y) para los 17 experimentos se presenta en la Tabla 3-1. En general, el rendimiento de la extracción de (I) osciló entre 0.04 y 1.67 mg/g de extracto seco de *P. gracile*.

A partir del análisis de los experimentos (Tabla 3-1) y la metodología de superficie de respuesta (RSM) con el diseño experimental BB, se tiene que el rendimiento de la extracción observado (Y) para el compuesto (I) puede expresarse utilizando la siguiente ecuación polinómica secundaria en términos de las variables  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ :

$$Y=0.32716 - 0.67309X_1 - 0.00106X_3 + 0.00008X_2X_3 - 0.13958(X_1)^2 + 0.00154X_1X_3$$

La calidad del modelo se midió a través del análisis de varianza (ANOVA). Los valores  $p$  se usaron para determinar la significancia de cada variable independiente ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) y la fuerza de interacción entre ellas. Cuanto menor sea el valor  $p$ , más significativas serán las variables correspondientes. El resultado de ANOVA mostrado en la Tabla 3-2 reveló que los términos de primer orden de las variables independientes ( $X_1$  y  $X_3$ ), el término cuadrático ( $X_1$ )<sup>2</sup>, junto con la interacción de términos ( $X_2X_3$ ,  $X_1X_3$ ) afectaron significativamente el rendimiento de la extracción (Y) del compuesto (I) con valores de  $p$  muy pequeños ( $p < 0.05$ ). Los otros parámetros del modelo ( $X_2$ ,  $X_2X_2$ ,  $X_2X_1$ ,  $X_3X_3$ )

presentaron efectos no significativos ( $p > 0.05$ ). Por lo tanto, se eliminaron de la ecuación por no contribuir al ajuste adecuado del modelo.

**Tabla 3-1:** Resultados del rendimiento obtenidos en los experimentos.

Experimento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y
1	0.25	20	97.5	0.04
2	0.25	80	97.5	0.09
3	4.00	20	97.5	1.18
4	4.00	80	97.5	1.67
5	2.12	20	15.0	1.08
6	2.12	80	15.0	0.65
7	2.12	20	180.0	1.22
8	2.12	80	180.0	1.58
9	0.25	50	15.0	0.04
10	4.00	50	15.0	0.67
11	0.25	50	180.0	0.07
12	4.00	50	180.0	1.65
13	2.12	50	97.5	1.18
14	2.12	50	97.5	1.20
15	2.12	50	97.5	1.18
16	2.12	50	97.5	1.22
17	2.12	50	97.5	1.24

X<sub>1</sub>= Relación volumen solvente extractor (n-hexano) – volumen extracto, ml/ml; X<sub>2</sub>= Concentración extracto (g extracto/ml etanol)\*100; X<sub>3</sub>= Tiempo (min)

**Tabla 3-2:** Análisis de variancia para el rendimiento de la extracción de (I), Y.

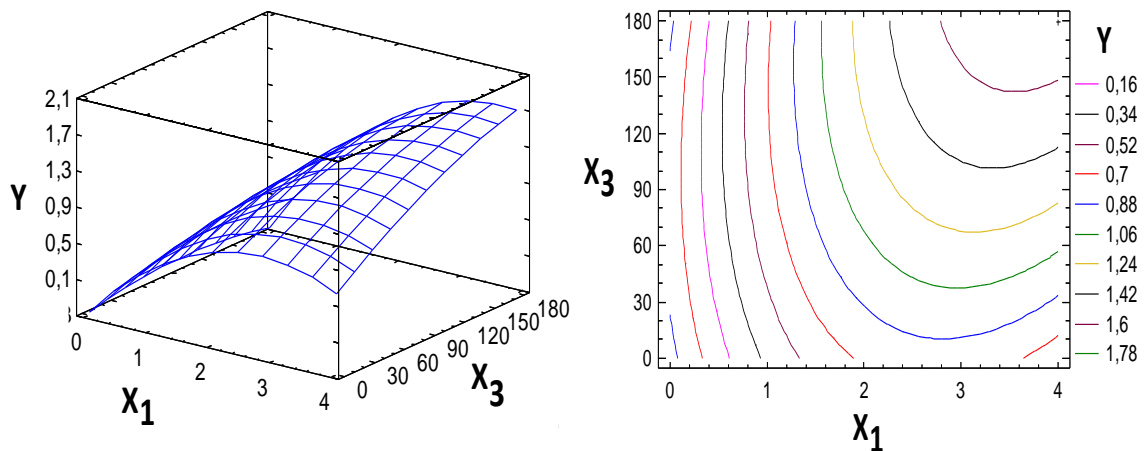
Variable	SC	GL	ECM	Valor F	Valor P
X <sub>1</sub>	3.04	1	3.04	257.99	0.00*
X <sub>2</sub>	0.03	1	0.03	2.46	0.16
X <sub>3</sub>	0.54	1	0.54	45.98	0,00*
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	0.00	1	0.00	0.36	0,56
X <sub>2</sub> X <sub>1</sub>	0.05	1	0.05	4.17	0,08
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.16	1	0.16	13.27	0,00*
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	1.01	1	1.01	85.91	0.00*
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.23	1	0.23	19.33	0,00*
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	0.05	1	0.05	4.06	0,08

\*fueron significantes con  $P < 0.05$ ; SC = suma de cuadrados; GL= grados de libertad; ECM= error cuadrático medio.

$R^2$  se usó como una herramienta para probar la bondad de ajuste de la ecuación de regresión. El coeficiente de correlación ( $R^2 = 0.984$ ) del modelo mostró que solo el 1.6% de la variación total no se explicó en este modelo, lo que demuestra su validez. Además, el coeficiente de correlación ajustado ( $R^2_{Adj} = 0.964$ ) también confirmó que el modelo tiene un buen ajuste y es altamente significativo para la ecuación de regresión propuesta. El error estándar de la estimación muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0.11 y el error absoluto medio (MAE) de 0.057. Estos valores bajos de error, confirman un alto grado de fiabilidad entre los datos observados y predichos.

La gráfica del contorno bidimensional y tridimensional de la interacción entre  $X_3$  y  $X_1$ , con  $X_2$  fija en 50% se muestra en la Figura 3-4. Este resultado indica que estas dos variables provocaron un efecto significativo sobre el rendimiento de (I). El rendimiento de (I) mejoró rápidamente al aumentar el tiempo ( $X_3$ ) y la relación de volúmenes ( $X_1$ ). Lo anterior sugiere que el tiempo y la relación de volúmenes apropiada para obtener rendimientos altos es próxima a los valores máximos evaluados. De este gráfico deducimos que se obtienen mayores rendimientos con un tiempo prolongado y relación de volúmenes alta.

**Figura 3-4:** Superficie de respuesta y contorno estimado con  $X_2 = 50\%$  para  $X_1$  y  $X_3$ .



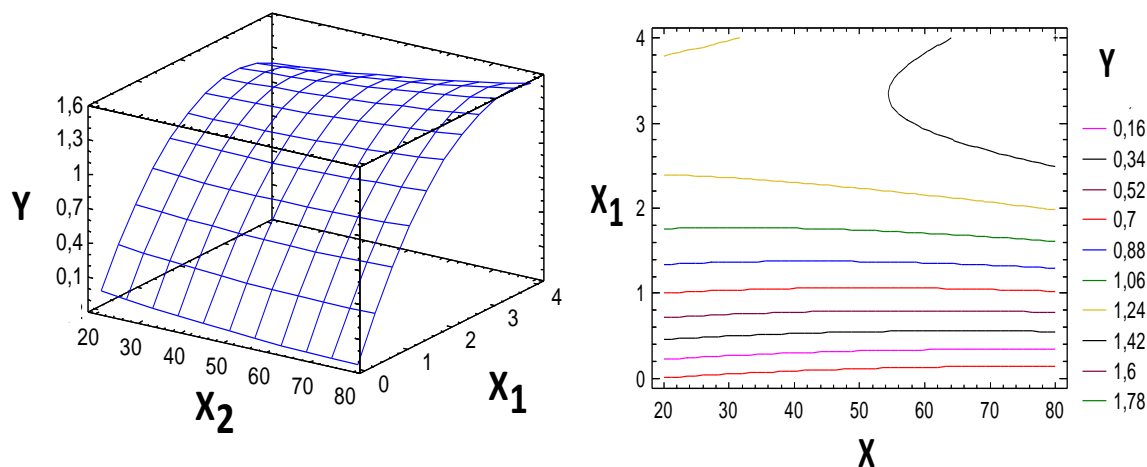
La gráfica del contorno bidimensional y tridimensional de la relación de interacción entre el porcentaje del extracto ( $X_2$ ) y la relación de volúmenes ( $X_1$ ) con el tiempo ( $X_3$ ) fijo en 97.5 min se muestra en la Figura 3-5. La gráfica del contorno bidimensional indicó que  $X_1$  a diferencia de  $X_2$  provocó un efecto significativo sobre el rendimiento de la extracción de (I). El rendimiento mejoró considerablemente al aumentar la relación de volúmenes ( $X_1$ ), lo que nuevamente indica que la relación de volúmenes para obtener rendimientos altos de

extracción es próxima a los niveles máximos evaluados. De este gráfico deducimos nuevamente que se obtuvieron mayores rendimientos con relaciones de volúmenes altas.

Al analizar el efecto de las condiciones de extracción sobre el rendimiento de (I), se encontraron cambios sustancialmente con la variación de  $X_3$  y  $X_1$  principalmente. La ecuación del modelo experimental se empleó para predecir el máximo rendimiento de extracción de (I) de *P. gracile*. Este modelo reveló que las condiciones óptimas para el máximo rendimiento son las siguientes: Tiempo de 179.4 min, concentración de extracto de 80% y una relación entre el volumen de *n*-hexano y el volumen de extracto de 4. El modelo para estas condiciones predijo un valor de respuesta máximo de 2.12 mg de (I)/ g de extracto seco de *P. gracile*.

El rendimiento máximo previsto y el rendimiento experimental de (I) se presentan en la Tabla 3-3. La buena correlación entre estos resultados confirmó que el modelo de superficie de respuesta fue adecuado.

**Figura 3-5:** Superficie de respuesta y contorno estimado con  $X_3 = 97.5$  min para  $X_2$  y  $X_1$ .



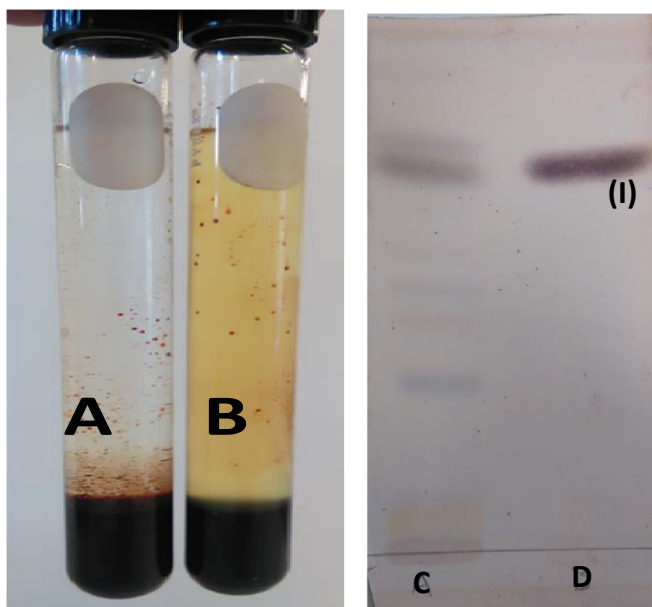
**Tabla 3-3:** Análisis de variancia para el rendimiento de la extracción de (I), Y.

	Y
Valor de modelo	2.12
Valor experimental	2.22 ±0.09

Y= mg (I)/g de extracto.

De forma global el proceso de optimización realizado presenta de manera modesta información exploratoria importante para la obtención de (I) a partir de residuos de *P. gracile*. En general se sugiere que para obtener mayor cantidad de (I) por medio de extracción L-L asistida por ultrasonido del extracto etanólico de *P. gracile* es necesario emplear periodos prolongados de extracción y un alta proporción de volumen de *n*-hexano. De esta forma se logra un extracto rico en (I) que se separa empleando una sola columna de sílica gel 60, Figura 3-6.

**Figura 3-6:** Experimento de extracción L-L antes (A) y después (B) de ser sometido a ultrasonido. Perfil en TLC de extracto obtenido en las condiciones óptimas de extracción (C) y de (I) purificado posteriormente por cromatografía de columna (D).

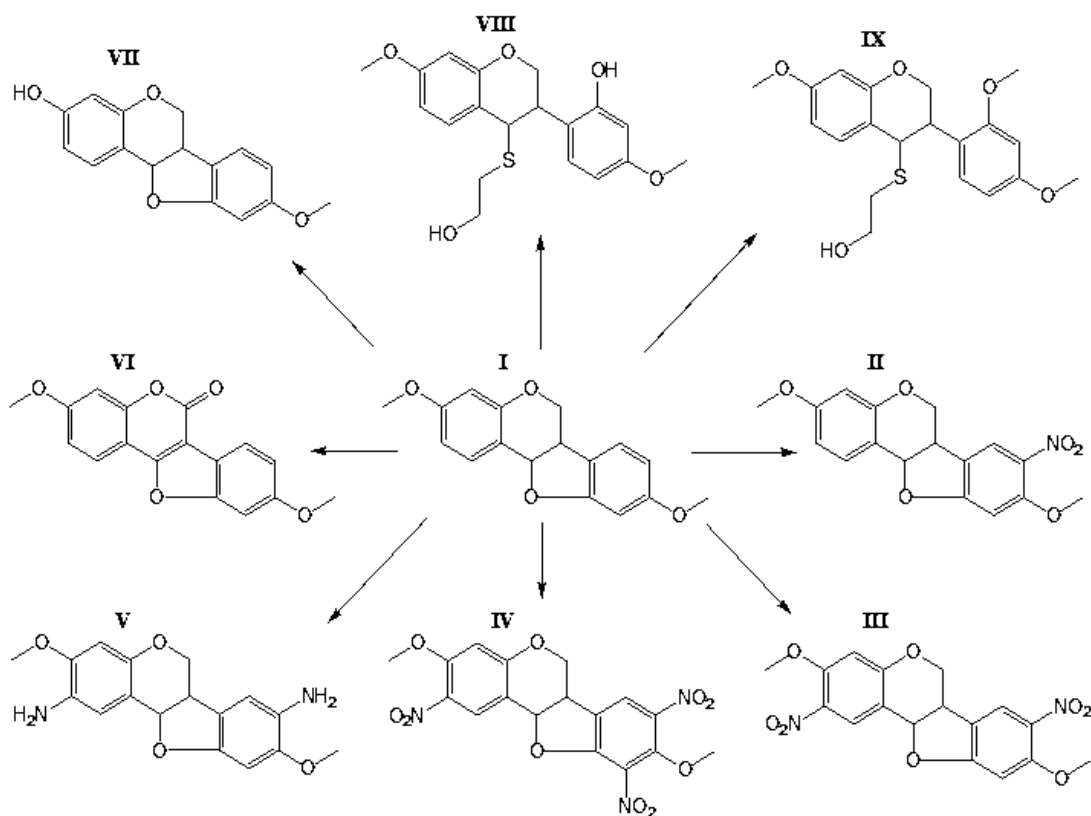


Además y no menos importante, emplear la extracción L-L asistida por ultrasonido brinda la posibilidad de ahorrar tiempo y recursos. En la metodología analítica utilizada inicialmente se hizo necesario emplear grandes cantidades de materiales como sílica gel 60 y Sephadex LH20 y demandó varios días. Cabe resaltar que este proceso de optimización fue de vital importancia al momento de establecer las condiciones óptimas para obtener el compuesto (I) empleado en la preparación de los derivados.

### 3.3 Preparación de derivados y purificación.

A partir de (I) se generaron 8 compuestos. Estos se presentan esquemáticamente en la Figura 3-7.

**Figura 3-7:** Esquema general de los derivados obtenidos a partir de I.



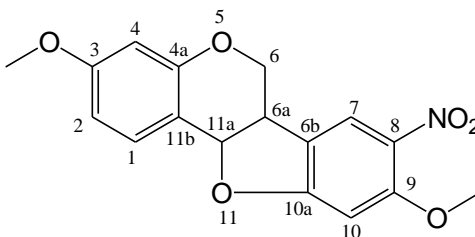
Los compuestos (II), (III) y (IV) se obtuvieron por sustitución electrofílica aromática (SEAr) con ion nitronio como electrófilo, proveniente de una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico (Figura 3-7). Esta sustitución es favorecida en las posiciones *orto* respecto a los sustituyentes metoxilo debido a su naturaleza electrón-donadora, lo cual aumenta la densidad electrónica en dichas posiciones. Por lo anterior, además de C-8, también se encuentran enriquecidas en densidad electrónica las posiciones C-10, C-2 y C-4 del compuesto (I). Para obtener los derivados nitrados (II), (III) y (IV) se realizó un control estequiométrico de la mezcla reactiva y seguimiento riguroso por TLC.

### 3.3.1 Compuesto (II): 3,9-dimetoxi-8-nitropterocarpano.

Este compuesto se generó por nitración en la posición C-8, a través de la reacción de (I) con la mezcla de ácido nítrico con 20% de ácido sulfúrico (150  $\mu$ L). La formación del producto mononitrado (II) indica que la posición C-8 es la más favorecida para la sustitución electrofílica en (I). El espectro de  $^1\text{H}$  RMN de (II) presentó señales para cinco protones aromáticos y el sistema ABMX correspondiente a H-6, H-6a y H-11a característico de los pterocarpanos (Anexo B). A campo bajo, se observó un sistema ABX con  $\delta_{\text{H}}$  7.44 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-1), 6.70 (1H, dd,  $J = 8.4$  y 2.1 Hz, H-2) y 6.52 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-4). Dos señales singlete a  $\delta_{\text{H}}$  8.01 (1H, s, H-7) y 6.57 (1H, s, H-10) indican la presencia de un anillo con dos protones aromáticos en posición relativa *para*. Además, el espectro de  $^1\text{H}$  NMR muestra señales características atribuidas a 2 metoxilos con  $\delta_{\text{H}}$  3.97 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ) y 3.84 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ).

Al comparar los espectros de los compuestos (I) y (II) se observó que la inserción del grupo nitro ocasionó un fuerte desplazamiento del protón H-7 [de  $\delta_{\text{H}}$  7.18 en (I) a 8.01 en (II)], mientras que los protones H-1, H-2 y H-4 no mostraron cambios drásticos en el desplazamiento químico; lo anterior sugiere que el grupo nitro se enlazó a la posición C-8, lo que explicaría estas variaciones en el desplazamiento químico y las multiplicidades de los protones cercanos. El espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR mostró 17 señales, consistente con un pterocarpano dimetoxilado; una de las cuales C-8 cambió notablemente en su desplazamiento químico al comparar los espectros de los compuestos (I) y (II) de  $\delta_{\text{C}}$  106.4 (CH) en (I) a 132.5 (C cuaternario) en (II)]; lo anterior confirma la inserción del grupo nitro en C-8. Las asignaciones se confirmaron empleando espectros COSY y HSQC (Anexo A).

**Figura 3-8:** Estructura de 3,9-dimetoxi-8-nitropterocarpano (II).

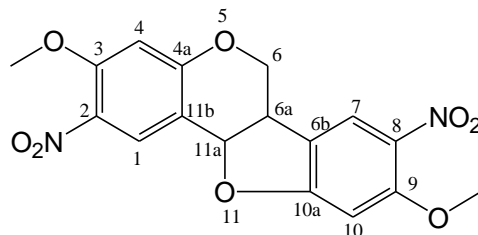


### 3.3.2 Compuesto (III): 3,9-dimetoxi-2,8,-dinitropterocarpano.

Este compuesto se generó por nitración consecutiva en las posiciones C-8 y C-2 de (I) con la mezcla de ácido nítrico con 20% de ácido sulfúrico (1650  $\mu$ L). Para la obtención del

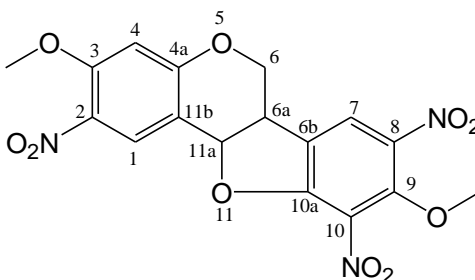
derivado dinitrado (**III**) se realizó un control estequiométrico y seguimiento continuo con TLC. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN de (**III**) presentó señales para cuatro protones aromáticos y el sistema ABMX correspondiente a H-6, H-6a y H-11a característico de los pterocarpanos (Anexo B). A campo bajo, el espectro muestra la presencia de cuatro singletes, correspondientes a los protones en C-1, C-4, C-7 y C-10; en  $\delta_{\text{H}}$  6.60 (1H, s, H-4), 6.63 (1H, s, H-10), 8.03 (1H, s, H-7) y 8.27 (1H, s, H-1). Lo anterior sugiere un pterocarpano tetra-sustituido. En el espectro también se visualizan los dos grupos metoxilo con  $\delta_{\text{H}}$  3.98 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ) y 3.99 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ). El espectro  $^{13}\text{C}$  NMR mostró 17 señales, consistente con un pterocarpano dimetoxilado. Basado en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR, se ubicaron los metoxilos en la posición C-3 y C-9 y los dos grupos nitro en C-8 y C-2. Las asignaciones fueron confirmadas empleando espectros COSY y HSQC (Anexo B).

**Figura 3-9:** Estructura de 3,9-dimetoxi-2,8-dinitropterocarpano (**III**).



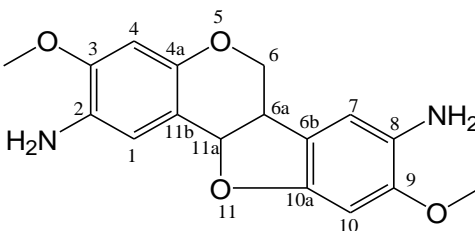
### 3.3.3 Compuesto (**IV**): 3,9-dimetoxi-2,8,10-trinitropterocarpano.

Este compuesto se generó por nitración consecutiva en las posiciones C-8, C-2 y C-10 de (**I**) por reacción con la mezcla de ácido nítrico con 20% de ácido sulfúrico (2850  $\mu\text{L}$ ). El espectro de  $^1\text{H}$  RMN del derivado trinitrado (**IV**) presentó señales para tres protones aromáticos y el sistema ABMX correspondiente a H-6, H 6a y H-11a característico de los pterocarpanos (Anexo A). A campo bajo se aprecian tres singletes  $\delta_{\text{H}}$  6.66 (1H, s, H-4), 8.14 (1H, s, H-7) y 8.27 (1H, s, H-1) indicando la presencia de un pterocarpano penta-sustituido. Además, se observan los singletes correspondientes a los dos grupos metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  4.09 (3H, s) y 4.07 (3H, s). Basado en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, se ubicaron los dos grupos metoxilos en las posiciones C-3 y C-9 y los tres grupos nitro en C-8, C-2 y C-10. Las asignaciones se confirmaron empleando espectros COSY, HMBC y HSQC (Anexo B).

**Figura 3-10:** Estructura de 3,9-dimetoxi-4,8,10-trinitropterocarpano (IV).

### 3.3.4 Compuesto (V): 4,10-diamino-3,9-dimetoxipterocarpano.

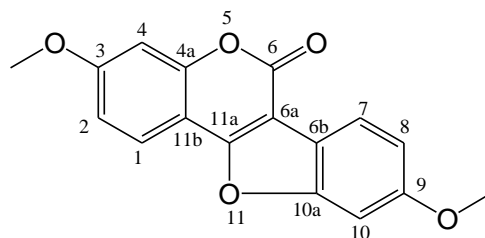
Este compuesto se generó por reducción de los grupos nitro en posición C-8 y C-2 de (III) empleando  $\text{SnCl}_2$  y etanol como solvente. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostró señales para cuatro protones aromáticos y el sistema ABMX correspondiente a H-6, H-6a y H-11a característico de los pterocarpanos. A campos bajos se observaron cuatro señales singlete a  $\delta_{\text{H}}$  6.88(1H, s, H-1), 6.46 (1H, s, H-4), 6.70 (1H, s, H-7) y 6.48 (1H, s, H-10), indicando la presencia de un pterocarpano tetra-sustituido. A campos altos se observaron cuatro señales singlete a  $\delta_{\text{H}}$  3.86(3H, s) y 3.84 (3H, s). Una comparación entre los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de (V) y el reactivo de partida (III) permite observar que la reducción de los grupos nitro ocasiona un desplazamiento fuerte de las señales singlete correspondiente a H-1 y H-7, pasando de  $\delta_{\text{H}}$  8.27 y 8.15 en (III) a 6.88 y 6.70 en (V). Este desplazamiento a campo alto de H-1 y H-7, como resultado de la reducción de los grupos nitro, concuerda con el carácter electrón-donador de los grupos amino y el incremento en la densidad electrónica en las posiciones relativas *orto*. El espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR muestra 17 señales consistentes con un pterocarpano dimetoxilado. Basado en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR, se ubicaron los metoxilos en la posición C-3 y C-9 y los grupos amino en las posiciones C-8 y C-2. Las asignaciones se confirmaron empleando espectros COSY y HSQC (Anexo B).

**Figura 3-11:** Estructura de 4,10-diamino-3,9-dimetoxipterocarpano (V).

### 3.3.5 Compuesto (VI): 3,9-dimetoxicoumestano.

Este compuesto, de geometría plana, se generó por oxidación de (I) con DDQ (2,3-Dicloro-5,6-Diciano-1,4-Benzoquinona). Una comparación entre los espectros de  $^1\text{H}$  RMN del reactivo de partida (I) y el producto (VI), permite observar la desaparición del sistema ABMX característico de los pterocarpanos. Lo anterior sugiere que, como resultado de la oxidación de (I), se ha formado un nuevo núcleo estructural, un cumestano. Esto se confirma por la presencia en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de una señal a  $\delta_{\text{C}}$  162.6, correspondiente al grupo carbonilo de una lactona (un éster cíclico). Además, el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de (VI) mostró la presencia de seis protones aromáticos, en dos sistemas ABX con  $\delta_{\text{H}}$  7.99 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-1), 7.09 (1H, dd,  $J = 8.4$  y 2.2 Hz, H-2) y 7.21 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-4), y con  $\delta_{\text{H}}$  7.92 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-7), 7.04-7.00 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz y 2.0 Hz, H-8) y 7.04-7.00 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-10) indicando la presencia de un cumestano disustituido. Adicionalmente, el espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostró un singlete a campos más altos que integra para seis hidrógenos, y corresponde a los dos grupos metoxilo en  $\delta_{\text{H}}$  3.96 (6H, s, 2x-OCH<sub>3</sub>). El espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR mostró 17 señales consistente con un cumestano dimetoxilado. Las asignaciones se confirmaron empleando espectros JMOD, DEPT 135, COSY, HSQC y HMBC (Anexo B).

**Figura 3-12:** Estructura de 3,9-dimetoxicoumestano (VI).

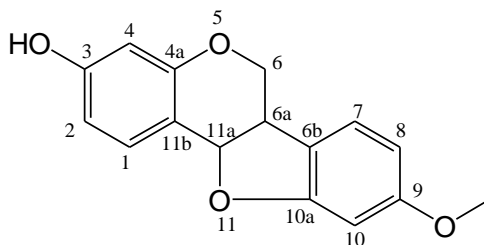


### 3.3.6 Compuesto (VII): 9-metoxi-3-hidroxipterocarpano.

Este compuesto se generó por desmetilación en ácido fuerte y se obtuvo un sólido cristalino incoloro. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostró la presencia a campo alto de cuatro protones alifáticos, sugiriendo el sistema ABMX característico de los pterocarpanos. Además, se observaron señales a campo bajo para seis protones aromáticos correspondientes a dos sistemas ABX, uno a  $\delta_{\text{H}}$  7.44 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-1), 6.59 (1H, dd,  $J = 8.5$  y 2.1 Hz, H-2), 6.52-6.46 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-4) y otro a  $\delta_{\text{H}}$  7.18 (1H, d,  $J = 8.0$

Hz, H-7) y 6.52-6.46 (2H, m, H-8 y H-10), indicando un pterocarpano di-sustituido. Adicionalmente, el espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostró un singlete a campo alto [ $\delta_{\text{H}}$  3.83 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>)] para un grupo metoxilo. El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN presentó 16 señales, consistente con un pterocarpano metoxilado. El análisis de correlación a larga distancia (HMBC) reveló que tanto los hidrógenos del grupo metoxilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.83) como los de H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  7.18) se encuentran a larga distancia del carbono C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  161.1). Basado en lo anterior, el grupo metoxilo se ubicó en la posición C-9. Las asignaciones fueron confirmadas empleando espectros JMOD, DEPT 135, COSY, HSQC y HMBC (Anexo B).

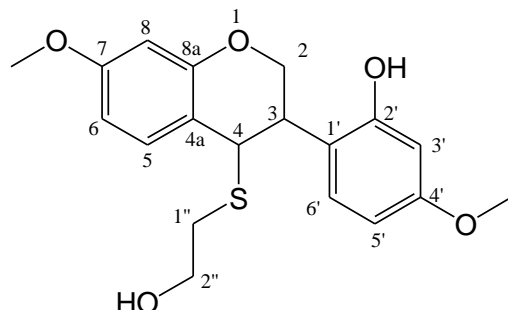
**Figura 3-13:** Estructura de 9-metoxi-3-hidroxipterocarpano (VII).



### 3.3.7 Compuesto (VIII): 6'-hidroxi-4-(2-hidroxiethylsulfanil)-7,4'-dimetoxiisoflavano.

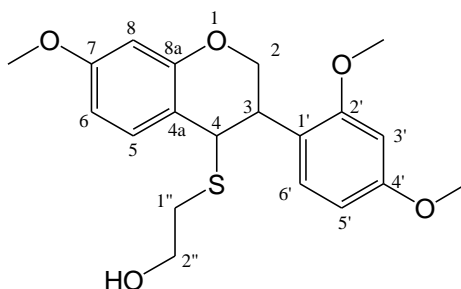
Este compuesto se generó por ruptura del enlace entre el oxígeno y el C-11a del compuesto (I) y adición de un grupo hidroxietilsulfanil en la posición C-4 empleando 2-mercaptoetanol y  $\text{AlCl}_3$ . El espectro de  $^1\text{H}$  NMR, mostró la presencia de cuatro protones alifáticos (H-2, H-3 y H-4) y seis aromáticos. A campos medios se observó un sistema ABMX constituido por los cuatro protones alifáticos a  $\delta_{\text{H}}$  3.66 (1H, m, H-3), 4.23 (1H, d,  $J=5.1$ , H-4), 4.63 (1H, dd,  $J=11.4$ , 3.4, H-2eq) y 4.38 (1H, m, H-2ax). A campos bajos se detectaron seis protones aromáticos sugiriendo dos sistemas AMX a  $\delta_{\text{H}}$  7.33 (1H, d,  $J = 8.4$ , H-5), 6.54 (1H, dd,  $J = 8.4$ , 2.5, H-6), 6.43 (1H, d,  $J = 2.5$ , H-8) y otro a 7.13 (1H, d,  $J = 8.1$ , H-6'), 6.42 (1H, d,  $J = 2.2$ , H-3'), 6.43 (1H, dd,  $J = 8.1$ , 2.2, H-5'), indicando la presencia de un isoflavano tetra-sustituido. Además, el espectro de  $^1\text{H}$  RMN presentó señales a campos altos para cuatro protones alifáticos a  $\delta_{\text{H}}$  3.82 (2H, m, H-2'') y  $\delta$  2.83 (2H, m, H-1'') sugiriendo la presencia del sustituyente hidroxietilsulfanil. Finalmente, se aprecian dos señales singlete a  $\delta_{\text{H}}$  3.81 (3H, s) y 3.76 (3H, s) atribuidas a dos grupos metoxilo (Anexo B).

**Figura 3-14:** Estructura de 2'-hidroxi-4-(2''-hidroxietilsulfanil)-7,4'-dimetoxiisoflavano (**VIII**).



### 3.3.8 Compuesto (**IX**): 4-(2''-hidroxietilsulfanil)-7,4',2'-trimetoxiisoflavano.

Este compuesto se generó por metilación del grupo hidroxilo de la posición C-2' del compuesto (**VIII**), empleando  $\text{CH}_3\text{I}$  y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en acetona como solvente. El espectro de  $^1\text{H}$  NMR mostró la presencia de seis protones aromáticos y diecisiete protones alifáticos. A campos medios, se observó un sistema ABMX correspondiente a los hidrógenos H-2, H-3 y H-4 a  $\delta_{\text{H}}$  3.64 (1H, m, H-3), 4.19 (1H, d,  $J = 5.1$ , H-4), 4.56 (1H, dd,  $J = 11.4, 3.4$ , H-2eq) y 4.40 (1H, m, H-2ax). A campos bajos se observaron señales para seis protones aromáticos, distribuidos en dos sistemas ABX a  $\delta_{\text{H}}$  7.29 (1H, d,  $J = 8.4$ , H-5), 6.53 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.5$ , H-6), 6.42 (1H, d,  $J = 2.5$ , H-8) y a 7.15 (1H, d,  $J = 8.5$ , H-6'), 6.50 (1H, d,  $J = 2.2$ , H-3'), 6.39 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.2$ , H-5'), indicando la presencia de un isoflavano tetra-sustituido (Anexo B). A campos altos, además de los tres grupos metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.80 (9H, s), se observaron señales de hidrógenos alifáticos a  $\delta_{\text{H}}$  3.88 (2H, m, H-2'') y 2.91 (2H, m, H-1''). Por las condiciones de la reacción, se sugiere que la metilación se llevó a cabo en el grupo hidroxilo fenólico (más ácido). Además, si se comparan los espectros del compuesto de partida (**VIII**) y el producto de reacción (**IX**), se observa que los protones H-1'' y H-2'' no presentan diferencias en los desplazamientos químicos como resultado de la reacción, mientras que H-3' sí se desplazó a campos más bajos. Estos cambios resultan del efecto de desapantallamiento sobre el anillo aromático como resultado de la metilación y sugieren que la reacción se lleva a cabo sobre el grupo hidroxilo fenólico (Figura 3-15).

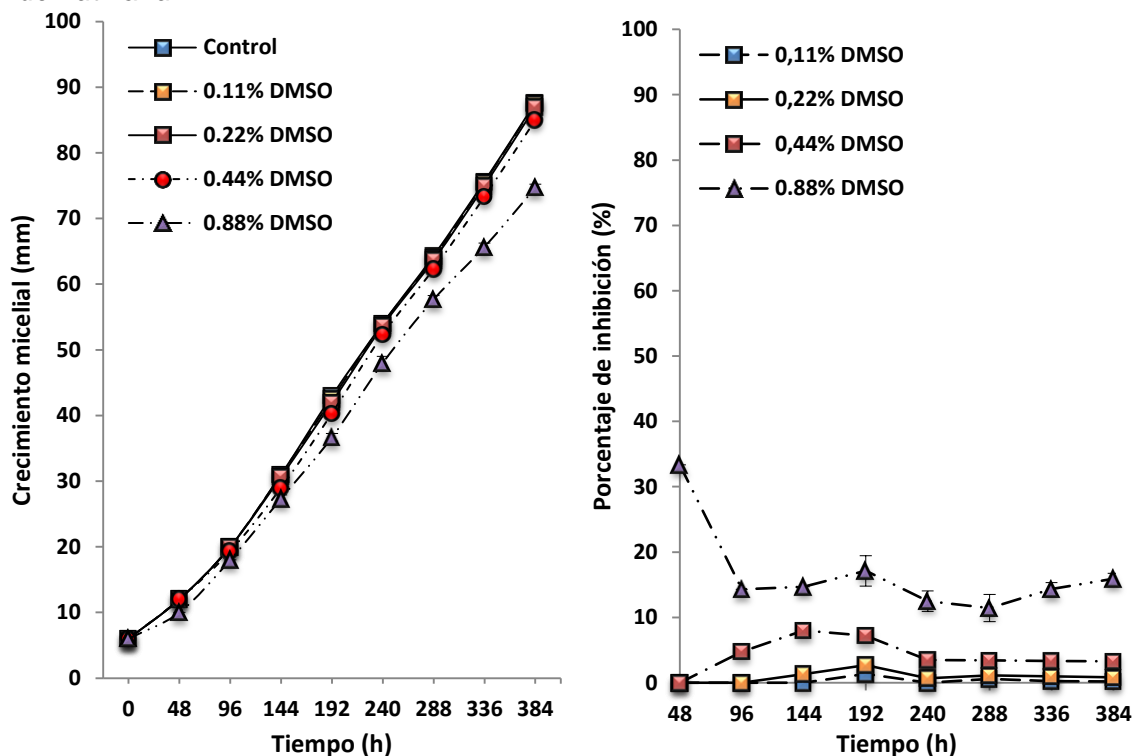
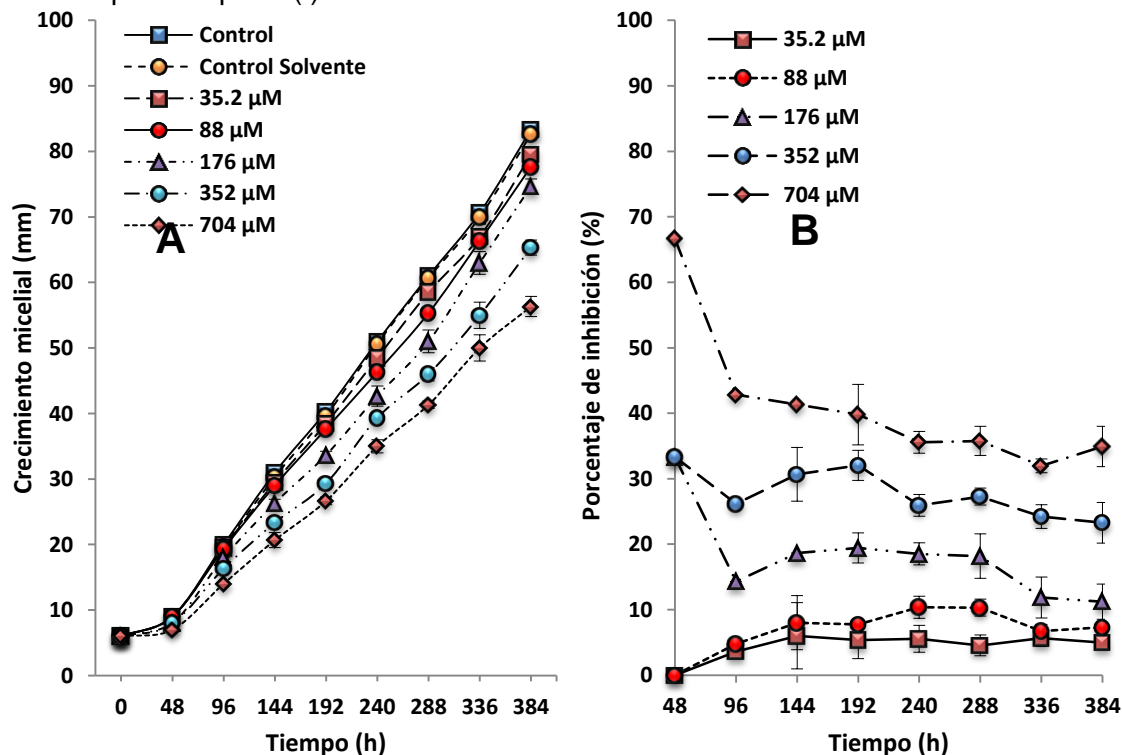
**Figura 3-15:** Estructura de 4-(2''-hidroxietilsulfanil)-7,4', 2'-trimetoxiisoflavano (**IX**).

### 3.4 Actividad antifúngica de los derivados obtenidos.

#### 3.4.1 Actividad Antifúngica Contra *C. lindemuthianum*.

Previo a la evaluación del efecto inhibitorio de los derivados de (**I**) contra el hongo *C. lindemuthianum*, se llevó a cabo un estudio del efecto del solvente (dimetilsulfóxido, DMSO) usado para disolver los derivados, sobre el crecimiento micelial. Los resultados de toxicidad a cuatro niveles (0.11, 0.22, 0.44 y 0.88%) indican que concentraciones de DMSO inferiores a 0.22% no influyen significativamente ( $P < 0.05$ ) en el crecimiento de *C. lindemuthianum*. Estas concentraciones presentaron porcentajes de inhibición inferiores al 5% durante el periodo de evaluación (Figura 3-16). Por esta razón los bioensayos posteriores emplean DMSO para disolver los derivados, que posteriormente se incorporaron al medio de cultivo PDA alcanzando una concentración de 0.22%.

Posteriormente se evaluó la actividad antifúngica del compuesto (**I**) y los controles positivos, timol (2-Isopropil-5-metilfenol) y carbendazim (metilbenzimidazol-2-il carbamato). Los valores de crecimiento micelial e inhibición del crecimiento para el compuesto (**I**) se reportan en la Figura 3-17 A y B, respectivamente. Los resultados indican que todas las concentraciones evaluadas inhiben significativamente el crecimiento del hongo. En general, el crecimiento micelial fue dependiente de la concentración. No obstante, el compuesto (**I**) exhibió una acción moderada sobre *C. lindemuthianum*. Particularmente, a la concentración máxima evaluada (704  $\mu\text{M}$ ), se presentaron valores de inhibición entre 41 y 32% después de 96 horas y con una leve tendencia de disminución. La inhibición máxima de 67% se alcanzó sólo en las primeras 48 horas y decayó drásticamente a 43% a las siguientes 48 horas.

**Figura 3-16:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del DMSO contra *C. lindemuthianum*.**Figura 3-17:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) de 3,9-dimetoxiptero-carpano (I) contra *C. lindemuthianum*.

Los controles positivos timol y carbendazim presentaron una actividad antifúngica fuerte contra *C. lindemuthianum*, afectando de forma considerable el crecimiento micelial. En general, la inhibición del crecimiento micelial fue dependiente de la concentración del compuesto. Timol a concentraciones superiores a 88  $\mu\text{M}$  inhibió más del 50% del crecimiento; esta inhibición decreció moderadamente con el tiempo (Figura 3-18 A y B). Es de resaltar que a contracciones de 352 y 704  $\mu\text{M}$ , el timol inhibió el crecimiento por completo y de forma constante durante el período de evaluación. En comparación con (I), timol a las mismas concentraciones presentó mayor afectación en el crecimiento de *C. lindemuthianum*.

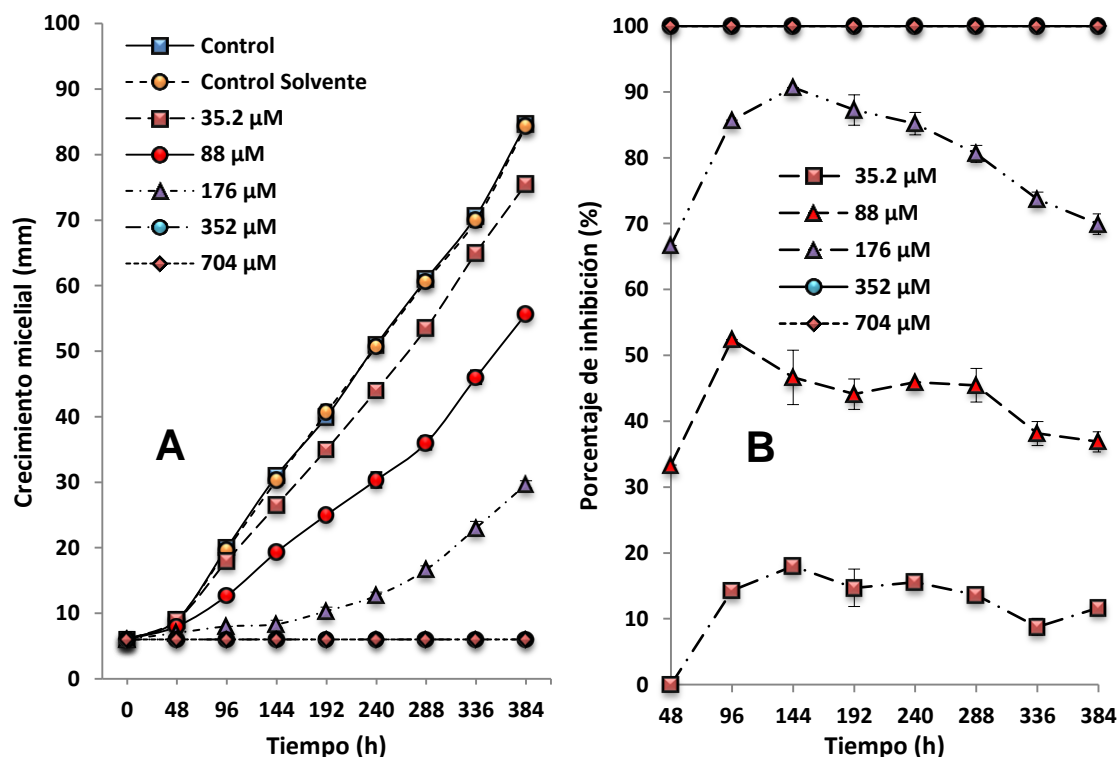
El timol es un reconocido compuesto antifúngico aislado de tomillo (*Thymus vulgaris*) que ha sido reportado por tener actividad contra especies del género *Colletotrichum* (Numpaque et al., 2011). Se ha propuesto que la actividad del timol se relaciona con la presencia del grupo hidroxilo fenólico y la hidrofobicidad impartida por las cadenas alquílicas, que mejoran la permeabilidad a través de la membrana lipídica (Ultee et al., 2002). Algunos estudios proponen que la presencia de grupos hidroxilos libres es esencial para la actividad antimicrobiana de algunos compuestos como timol. Estos consiguen insertarse en la membrana citoplasmática, cambiando las propiedades físico-químicas y afectando la estabilidad de la bicapa, lo que resulta en un incremento del flujo pasivo de protones a través de la membrana (Xu et al., 2008; Ultee et al., 2002). El control positivo carbendazim, presentó 100% de inhibición del crecimiento incluso a la concentración más baja evaluada (35.2  $\mu\text{M}$ ) y durante todo el periodo de evaluación.

Una vez establecida la toxicidad del solvente (DMSO), el compuesto (I) y los controles positivos (timol y carbendazim) se procedió a evaluar el efecto de los derivados en el crecimiento de *C. lindemuthianum*. En la Figura 3-19 se presentan las curvas de crecimiento del hongo en presencia de los derivados (II, III, IV y V).

Los resultados muestran que la inhibición del crecimiento micelial fue dependiente de la concentración. En general, los derivados mononitrado (II), dinitrado (III), trinitrado (IV) y diaminado (V) presentaron baja afectación del crecimiento radial de *C. lindemuthianum* comparado con el compuesto de partida (I). Además, se observa que a medida que incrementa el número de grupos nitro en la estructura, disminuye levemente el porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. lindemuthianum*. Particularmente, a la dosis más alta (704  $\mu\text{M}$ ), el derivado (II) presentó una disminución en el porcentaje de inhibición desde 40

a 33% entre las 96 y 384 horas; el derivado (III) desde 44 a 26%; el derivado (IV) desde 43 a 15 % y el derivado (V) desde 40 a 21 %. Lo anterior sugiere que los efectos electrónicos, resultantes del aumento en el número de grupos nitro o la reducción del grupo nitro (electrón-atractor) a amino (electrón-donador), no afecta considerablemente la actividad antifúngica.

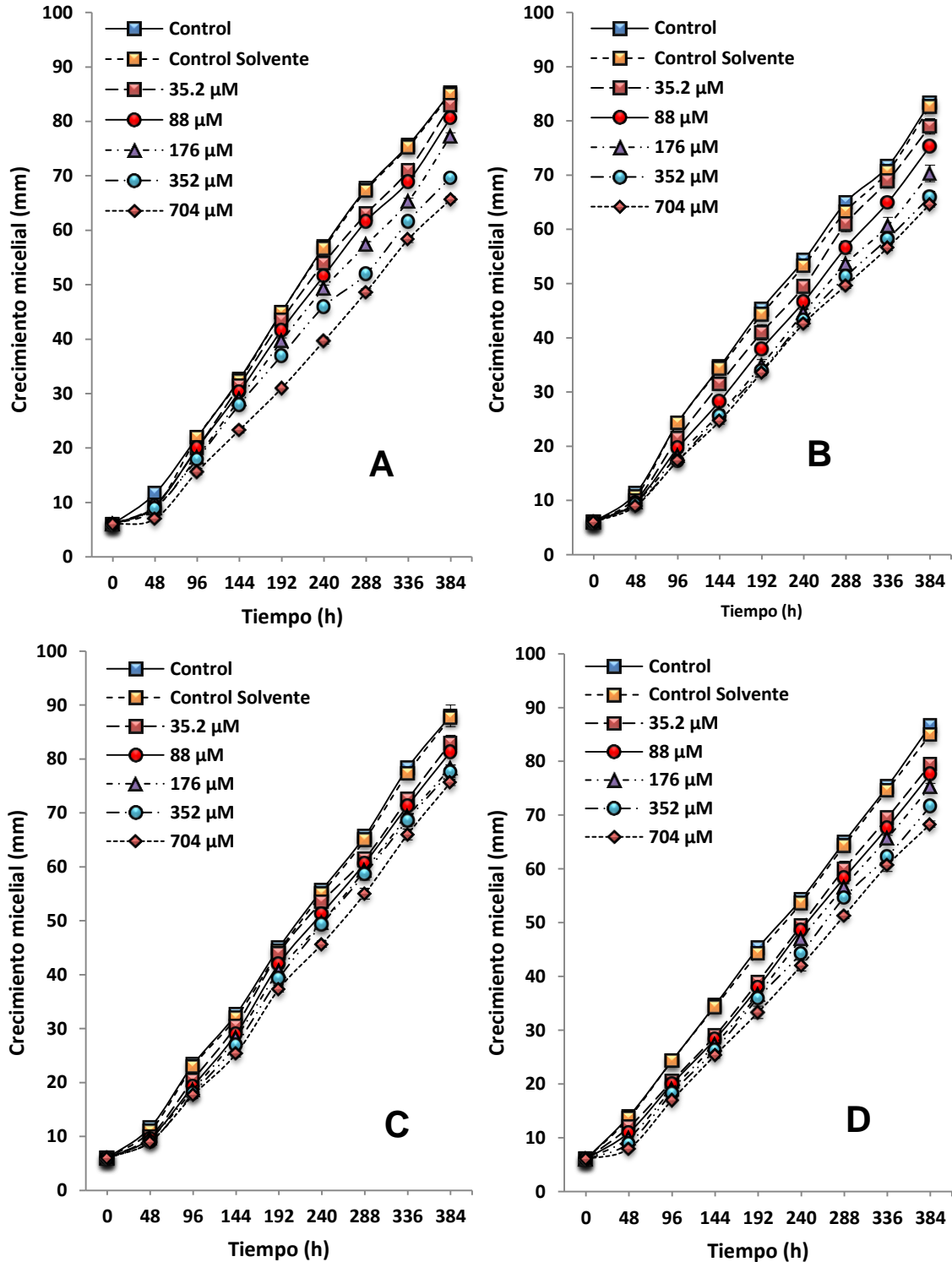
**Figura 3-18:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) de timol contra *C. lindemuthianum*.



Los resultados muestran que la inhibición del crecimiento micelial fue dependiente de la concentración. En general, los derivados mononitrado (II), dinitrado (III), trinitrado (IV) y diaminado (V) presentaron baja afectación del crecimiento radial de *C. lindemuthianum* comparado con el compuesto de partida (I). Además, se observa que a medida que incrementa el número de grupos nitro en la estructura, disminuye levemente el porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. lindemuthianum*. Particularmente, a la dosis más alta (704 μM), el derivado (II) presentó una disminución en el porcentaje de inhibición desde 40 a 33% entre las 96 y 384 horas; el derivado (III) desde 44 a 26%; el derivado (IV) desde 43 a 15 % y el derivado (V) desde 40 a 21 %. Lo anterior sugiere que los efectos electrónicos, resultantes del aumento en el número de grupos nitro o la reducción del grupo

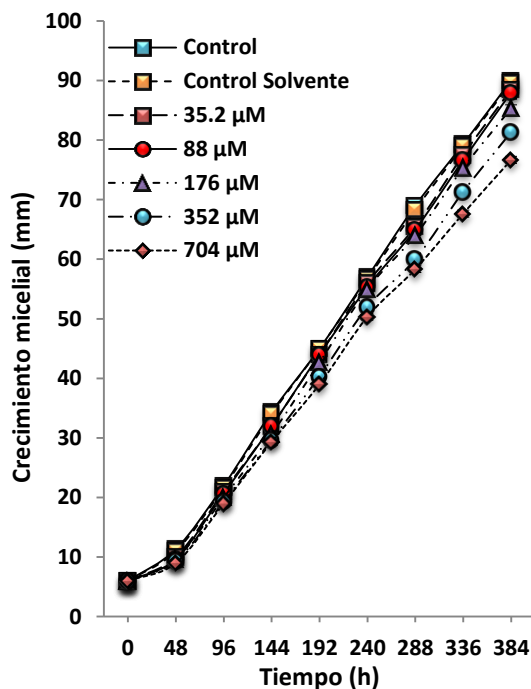
nitro (electrón-atractor) a amino (electrón-donador), no afecta considerablemente la actividad antifúngica.

**Figura 3-19:** Crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* en presencia de los compuestos (II) (A); (III) (B); (IV) (C) y (V) (D).



Entre los derivados preparados, el cumestano dimetoxilado (**VI**), presentó la menor inhibición del crecimiento de *C. lindemuthianum* (Figura 3-20). Este compuesto a la concentración de 704  $\mu\text{M}$  disminuyó el porcentaje de inhibición del crecimiento desde 19 a 16% entre las 96 y 384 horas. Adicionalmente, el compuesto (**VI**) presentó inconvenientes al disolverlo en el solvente (DMSO). Lo anterior sugiere que la oxidación del sistema pterocarpánico y formación del cumestano, reduce considerablemente la actividad antifúngica contra *C. lindemuthianum*.

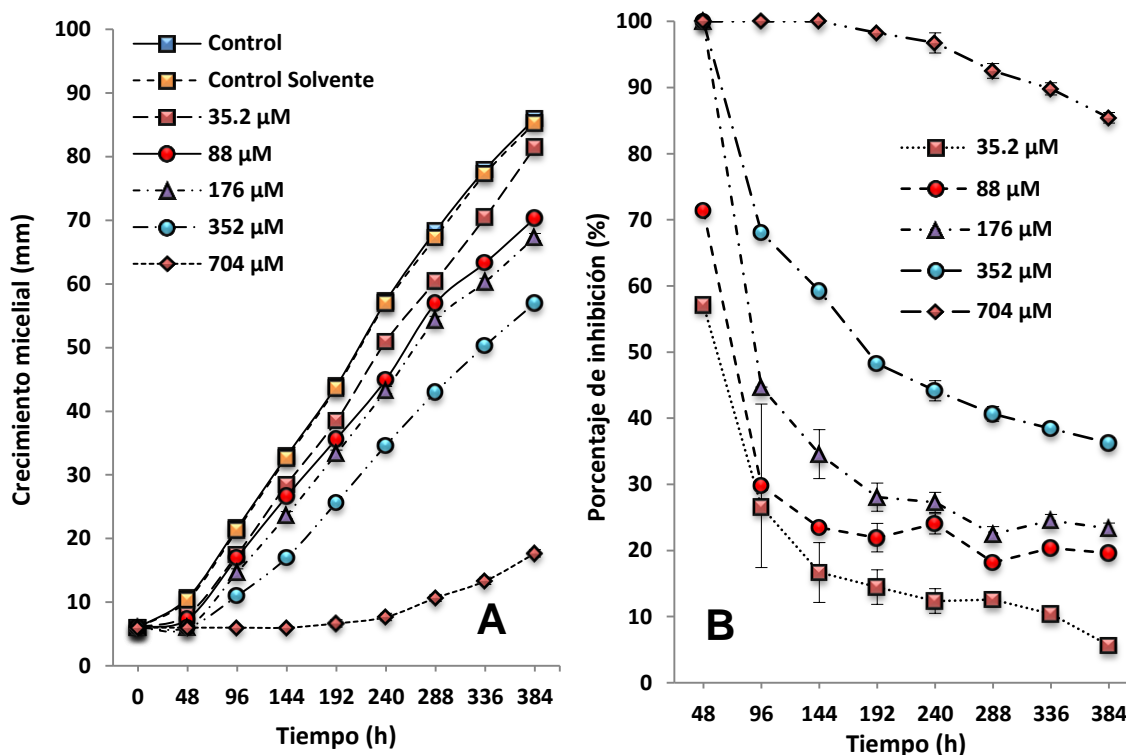
**Figura 3-20:** Crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* en presencia del compuesto (**VI**).



En contraste, el compuesto (**VII**), medicarpin, mostró un efecto fungiestático fuerte contra *C. lindemuthianum* (Figura 3-21 A y B) comparado con (**I**). En general, la inhibición del crecimiento micelial fue dependiente de la concentración. Para todas las concentraciones evaluadas, se observó un efecto inhibitorio significativo. Particularmente a la mayor dosis evaluada (704  $\mu\text{M}$ ), este derivado inhibió el 100% del crecimiento micelial durante las primeras 144 horas y posteriormente descendió suavemente hasta 85% a las 384 horas. A concentraciones menores a 704  $\mu\text{M}$ , se observó un rápido descenso en la actividad antifúngica con el transcurso del tiempo, lo que posiblemente sea el resultado de un proceso de desintoxicación del medio por parte del hongo. Estructuralmente el compuesto

(VII) se diferencia de (I) por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-3 en lugar del grupo metoxilo.

**Figura 3-21:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) de *C. lindemuthianum* en presencia del compuesto (VII).

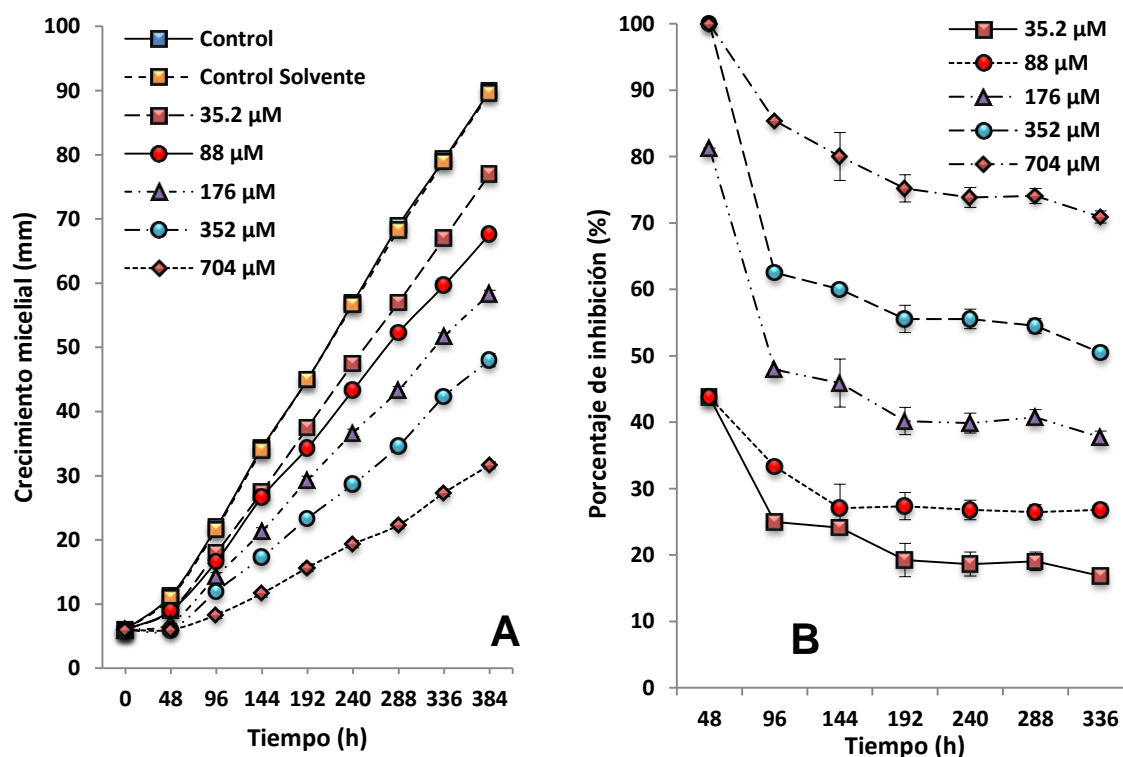


El medicarpin ha sido reportada como una fitoalexina (compuesto antimicrobiano de bajo peso molecular producido en respuesta a una infección) de la familia Fabaceae (Ahuja et al., 2012; Bhargavan et al., 2012) y particularmente en plantas atacadas por *C. lindemuthianum* (Kessmann et al., 1990). Se ha reportado su síntesis y acumulación en *Medicago sativa* (alfalfa) como resultado de la infección por *Colletotrichum phomoides*, *Stytemphylium loti*, *S. botryosum*, y *Phoma herbarum* (Soby et al., 1996). Además el compuesto (VII), inhibe la germinación de esporas de *F. oxysporum* en *C. arietium* (garbanzos), una fuente de alimento importante para humanos (Stevenson et al., 1997). Recientemente se ha reportado que el compuesto (VII) posee importantes propiedades como agente osteogénico (Bhargavan et al., 2012).

Por otro lado el derivado tipo isoflavano (VIII), sustituido con el grupo hidroxietilsulfanil en C-4, exhibió una inhibición del crecimiento de *C. lindemuthianum* fuerte a concentraciones

de 352 y 704  $\mu\text{M}$  (Figura 3-22 A). A estos niveles, el compuesto (VIII) redujo el crecimiento micelial entre 86 (a las 96 horas) y 71% (a las 384 horas) y entre 63 (a las 96 horas) y 51% (a las 384 horas), respectivamente. Cabe resaltar que el efecto inhibitorio a estas dosis disminuyó sólo de forma leve en el transcurso del tiempo, lo que sugiere un efecto fungistático duradero sobre el microorganismo (Figura 3-22 B). El compuesto (VIII) mostró una actividad antifúngica contra *C. lindemuthianum* superior a la observada para el compuesto de partida (I).

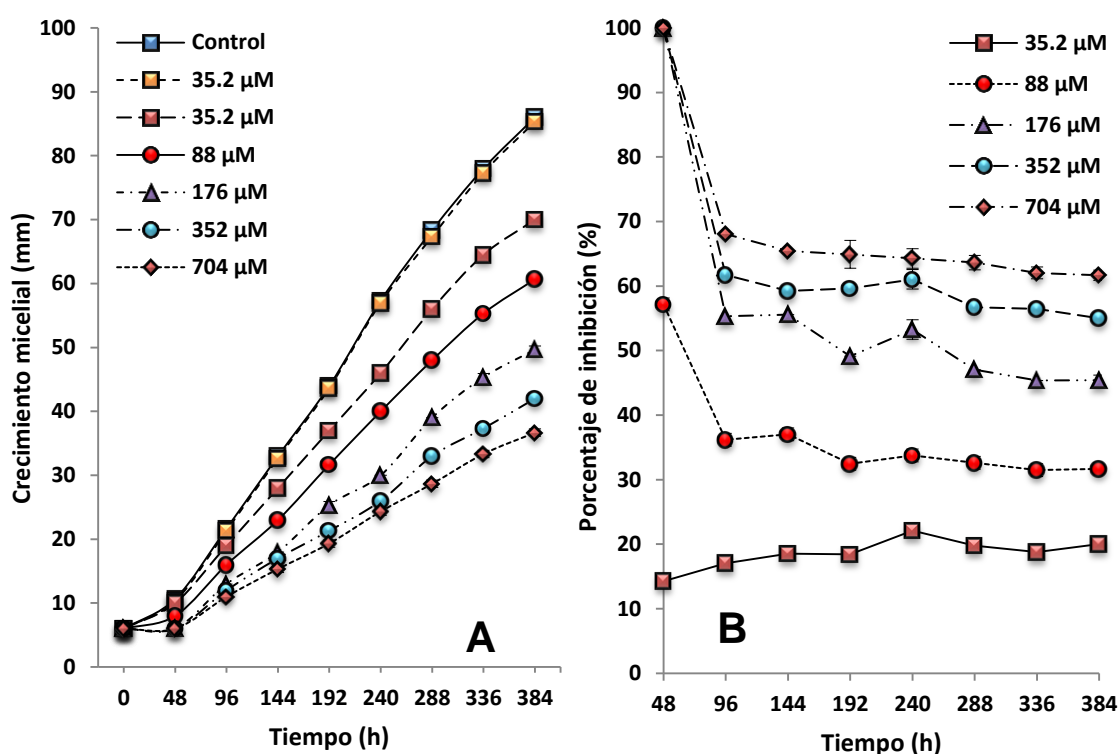
**Figura 3-22:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (VIII) contra *C. lindemuthianum*.



El compuesto (IX), el cual se obtuvo a partir de la metoxilación del hidroxilo de la posición C-2' del derivado (VIII), presentó una actividad superior contra *C. lindemuthianum* (Figura 3-23 A) en comparación con el compuesto (I). La inhibición del crecimiento fue dependiente de la concentración. En general, todas las concentraciones inhibieron significativamente el crecimiento del hongo. Particularmente, el compuesto (IX) exhibió una inhibición entre 68 y 62% durante las 96 y 384 horas de evaluación, a la concentración mayor evaluada (704  $\mu\text{M}$ ). Para todas las concentraciones, se observó una disminución leve en la inhibición en

el transcurso del tiempo (Figura 3-23 B). Comparando los compuestos (VIII) y (IX), se puede concluir que el primer compuesto presentó una actividad antifúngica mayor contra *C. lindemuthianum*. Lo anterior permite suponer que la metilación de (VIII) para producir (IX) reduce el efecto fungiestático; la presencia de los grupos hidroxilo libres además de mejorar la solubilidad en el medio, podría estar impartiendo un balance hidrofílico-hidrofóbico necesario para afectar la membrana del hongo (Numpaquet et al., 2011).

**Figura 3-23:** Crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* en presencia del compuesto (IX).

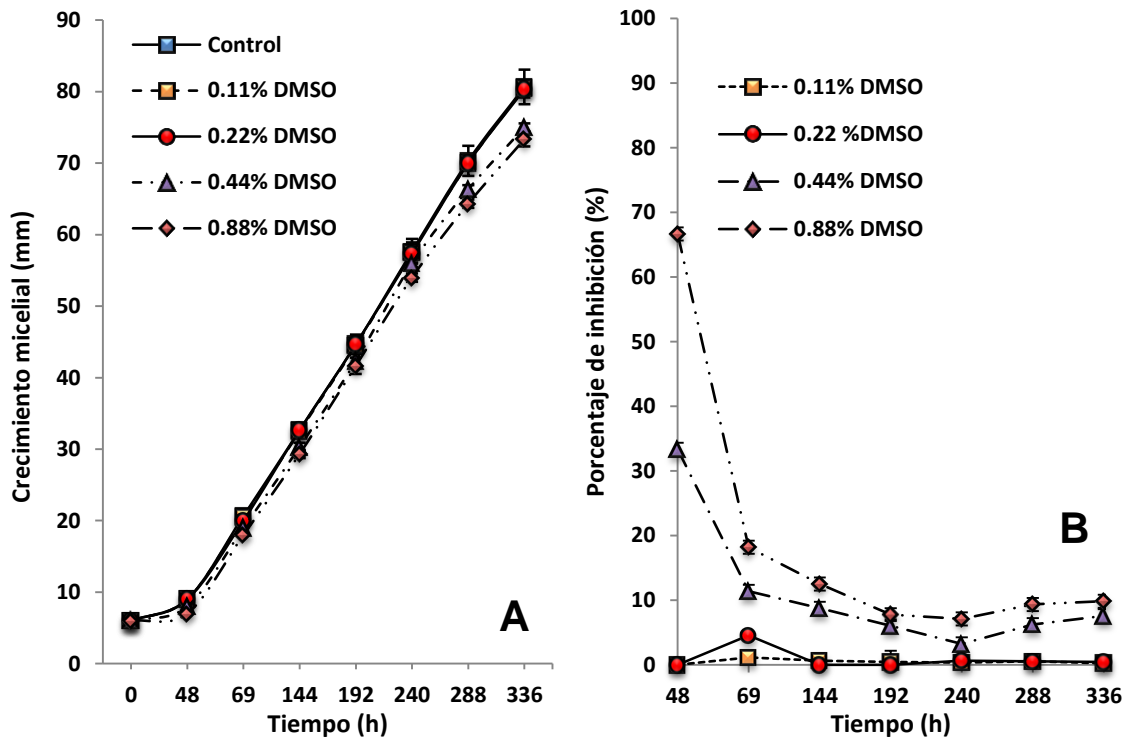


### 3.4.2 Actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*.

Previo a la evaluación del efecto inhibitorio de los derivados de (I) contra el hongo *C. gloeosporioides*, se llevó a cabo un estudio del efecto del solvente (DMSO) usado para disolver los derivados, sobre el crecimiento micelial. Los resultados indican que concentraciones de DMSO inferiores a 0.22% no influyen significativamente ( $P < 0.05$ ) en el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Con estas concentraciones se presentó un porcentaje de inhibición inferior al 5% durante el periodo de evaluación (Figura 3-24). Los bioensayos posteriores emplearon DMSO para disolver los derivados, que posteriormente

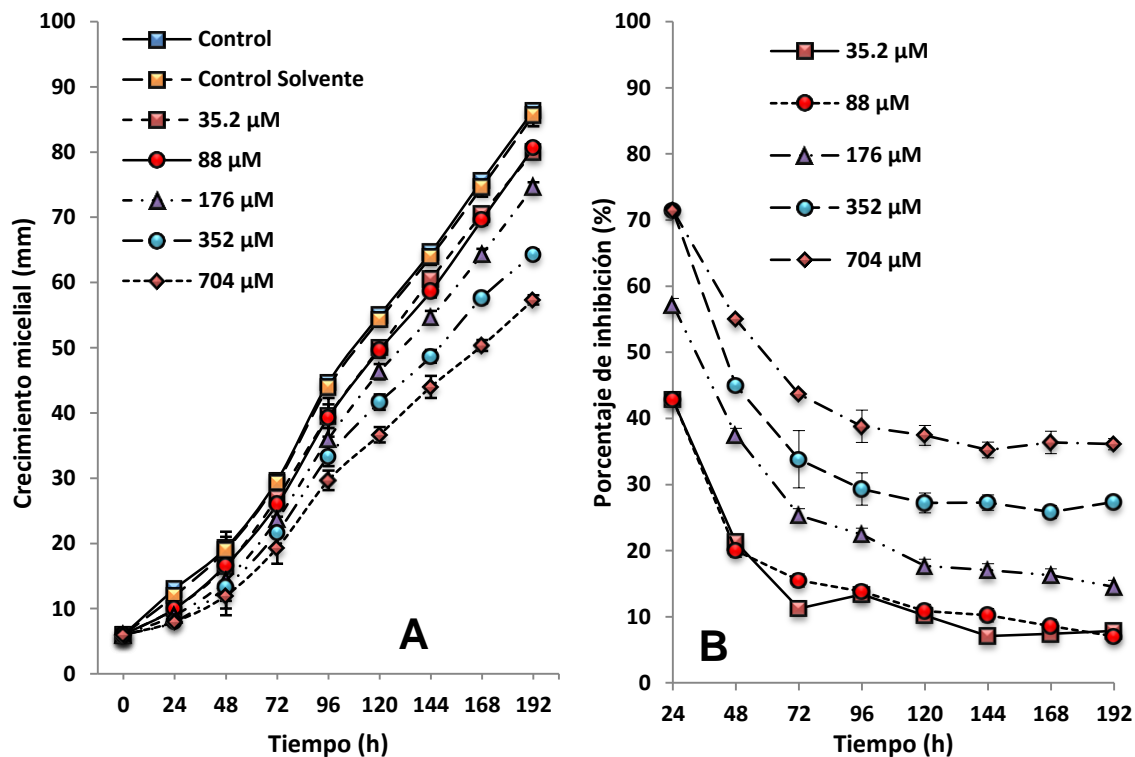
se incorporaron en el medio de cultivo Agar-Avena. El DMSO alcanzó una concentración final de 0.22% en el medio de cultivo.

**Figura 3-24:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) de DMSO contra *C. gloeosporioides*.



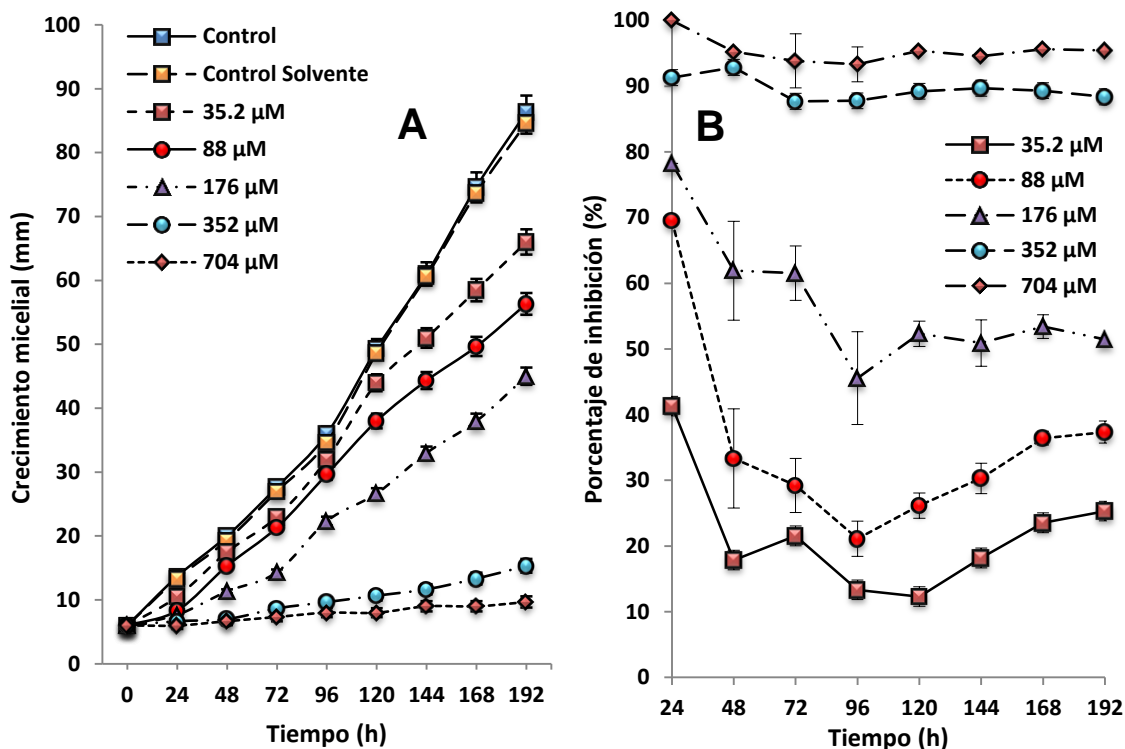
Posteriormente se evaluó la actividad antifúngica del compuesto (I) y los controles positivos, timol y carbendazim. El crecimiento micelial y porcentaje de inhibición para el compuesto (I) se reportan en la figura 3-25 A y B, respectivamente. Los resultados indican que las concentraciones empleadas de timol exhiben un efecto moderado sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*. Este compuesto presentó un porcentaje de inhibición del 72% a la concentración máxima evaluada (704  $\mu\text{M}$ ) y al cabo de 24 horas (Figura 3-25 B). A esta concentración, el compuesto (I) presentó un rango de inhibición del crecimiento entre 55 y 36% desde las 48 y hasta las 192 horas, lo que demuestra una disminución rápida de dicho porcentaje con el tiempo.

**Figura 3-25:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (I) contra *C. gloeosporioides*.



Similar a lo encontrado para *C. lindemuthianum*, los controles positivos empleados timol y carbendazim redujeron fuertemente el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (Figura 3-26 A). Timol a concentraciones superiores a 176  $\mu\text{M}$  inhibió más del 50% del crecimiento micelial. Además, se observó una disminución moderada de la inhibición con el transcurso del tiempo. Se resalta que a 704  $\mu\text{M}$ , el timol inhibió el crecimiento entre 95 (a las 48 horas) y 93% (a las 192 horas), lo que demuestra una leve reducción de la actividad antifúngica con el tiempo (Figura 3-26 B).

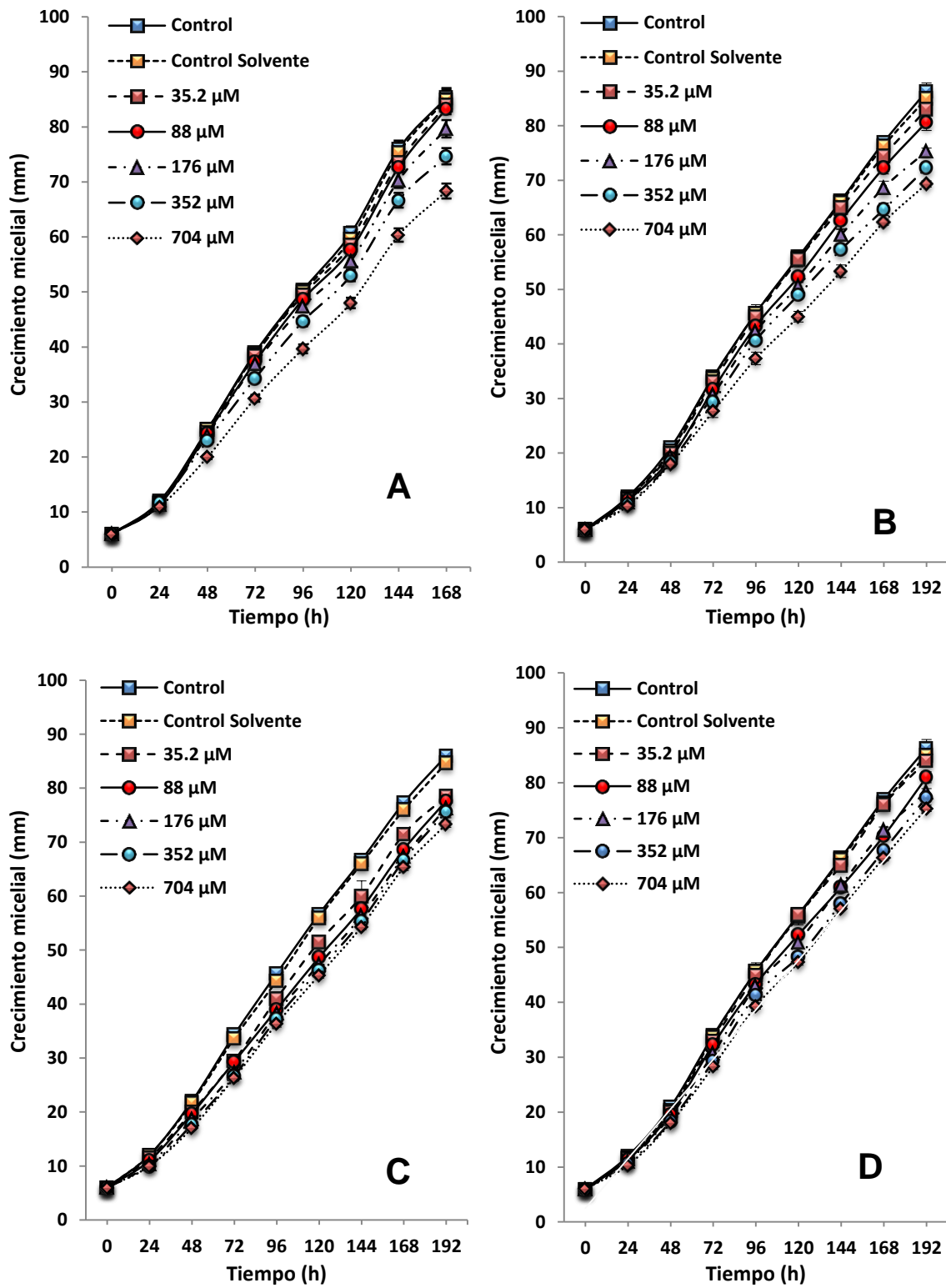
El control positivo carbendazim presentó el 100% de inhibición del crecimiento a la concentración más baja evaluada (35.2  $\mu\text{M}$ ) y superiores. Una vez establecida la toxicidad del solvente (DMSO), el compuesto (I) y los controles positivos (timol y carbendazim) se procedió a evaluar el efecto de los derivados en el crecimiento de *C. gloeosporioides*.

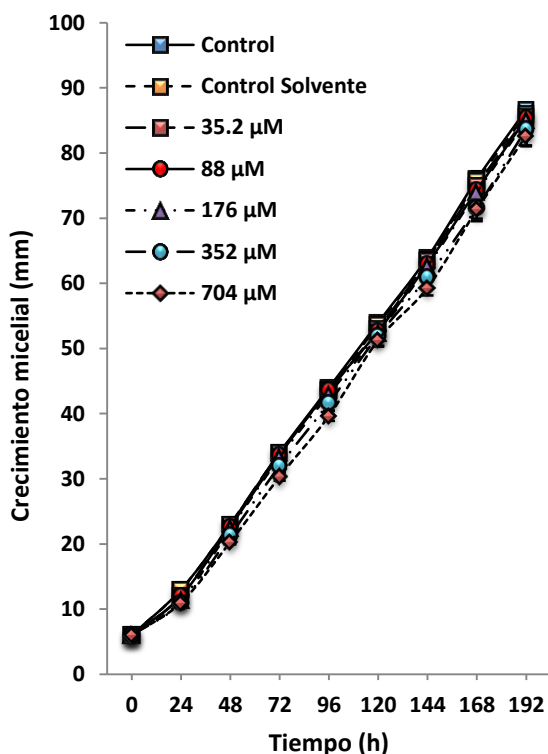
**Figura 3-26:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del timol contra *C. gloeosporioides*.

Los derivados (II), (III), (IV) y (V) presentaron una inhibición débil del crecimiento radial de *C. gloeosporioides*; en general, la actividad antifúngica de los derivados fue dependiente de la concentración y menor a la encontrada para el compuesto de partida (I) y los controles positivos (Figura 3-27). A la dosis más alta (704  $\mu\text{M}$ ) y en el período de 24 y 192 horas, el derivado (II) presentó una disminución en el porcentaje de inhibición de crecimiento entre 28 y 26%; el derivado (III) entre 26 y 20%; el derivado (IV) entre 40 y 20 % y el derivado (V) entre 28 y 14%.

Al igual que para *C. lindemuthianum*, el compuesto (VI), el cumestano dimetoxilado, mostró la menor inhibición del crecimiento para *C. gloeosporioides* entre los derivados (Figura 3-28). A la concentración máxima evaluada (704  $\mu\text{M}$ ), el compuesto (VI) presentó porcentajes de inhibición comprendidos entre 29 y 7%, para el periodo de 24 a 192 horas, respectivamente.

**Figura 3-27:** Crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* en presencia (II) (A); (III) (B); (IV) (C) y (V) D.



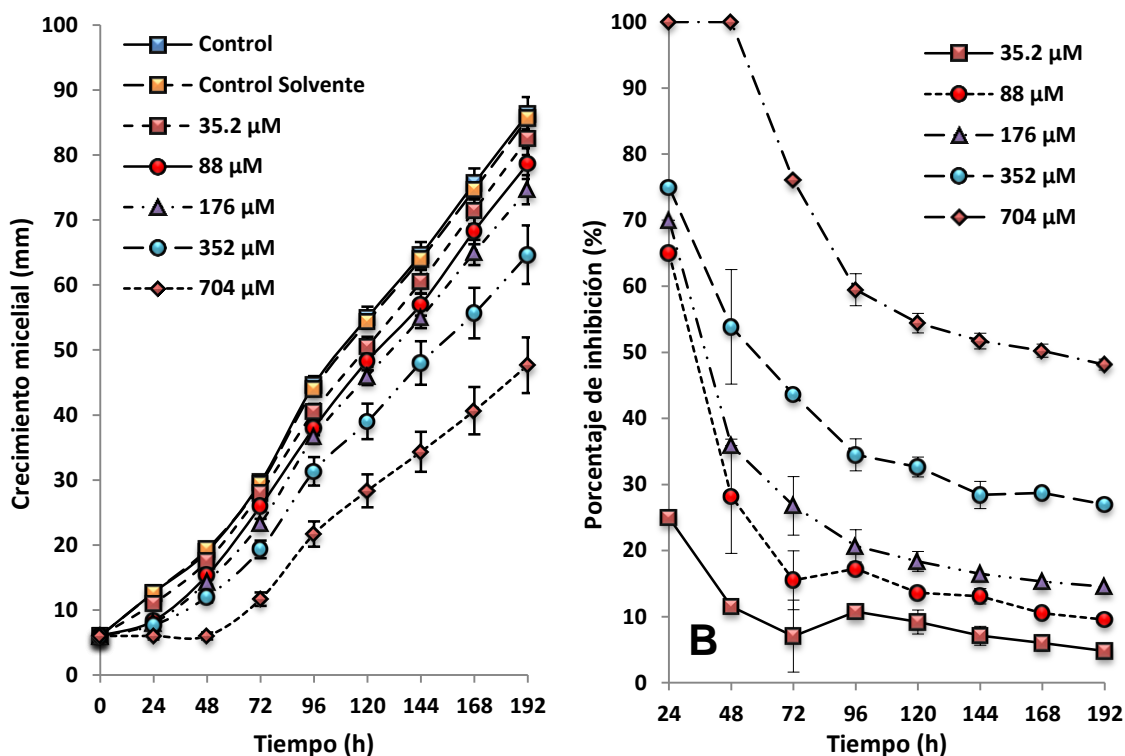
**Figura 3-28:** Crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* en presencia del compuesto (VI).

En la Figura 3-29 se presenta el crecimiento micelial y la inhibición de *C. gloeosporioides* con el compuesto (VII). Los resultados muestran que el efecto fungiestático fue dependiente de la concentración; en general, todas las concentraciones redujeron significativamente el crecimiento. Además, el compuesto (VII) exhibió una inhibición de *C. gloeosporioides* superior a la encontrada para el compuesto de partida (I) (Figura 3-29 A). Particularmente, a la mayor concentración (704 µM), el compuesto (VII) inhibió el 100% del crecimiento durante las primeras 48 horas. Luego, la inhibición disminuyó rápidamente hasta 48% a las 192 horas de análisis. Una observación similar se presentó para concentraciones del compuesto (VII) menores que 704 µM (Figura 3-27 B). Esto sugiere una posible desintoxicación del medio por parte de *C. gloeosporioides*.

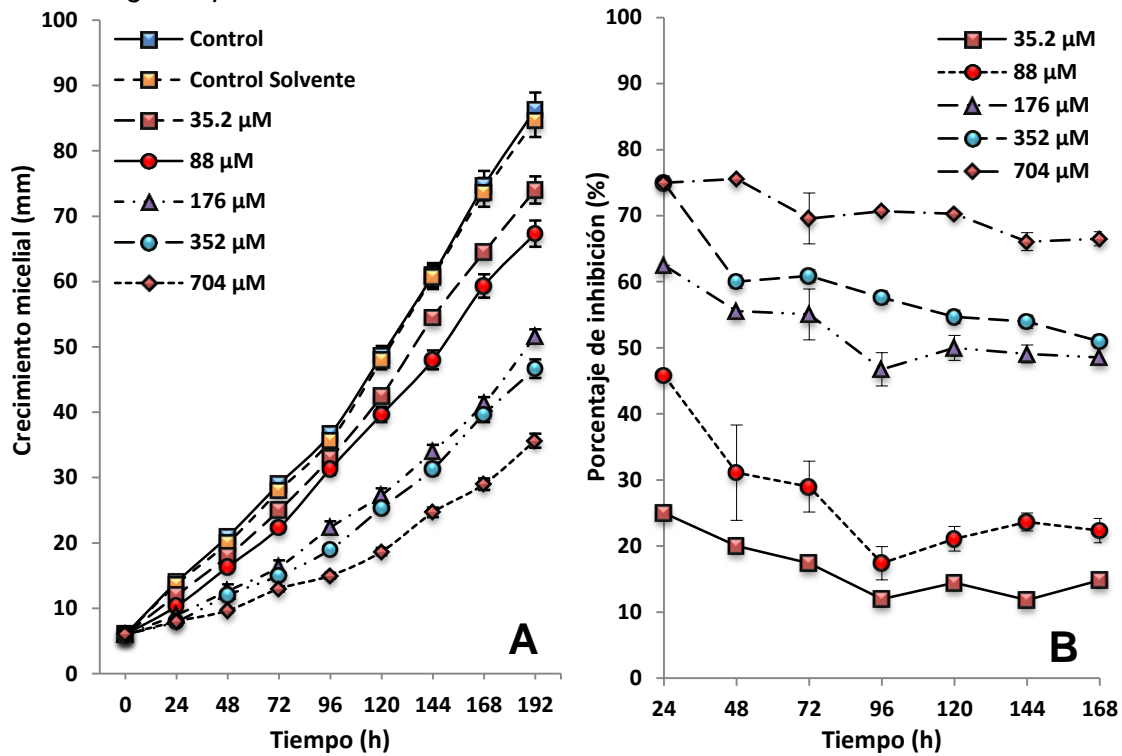
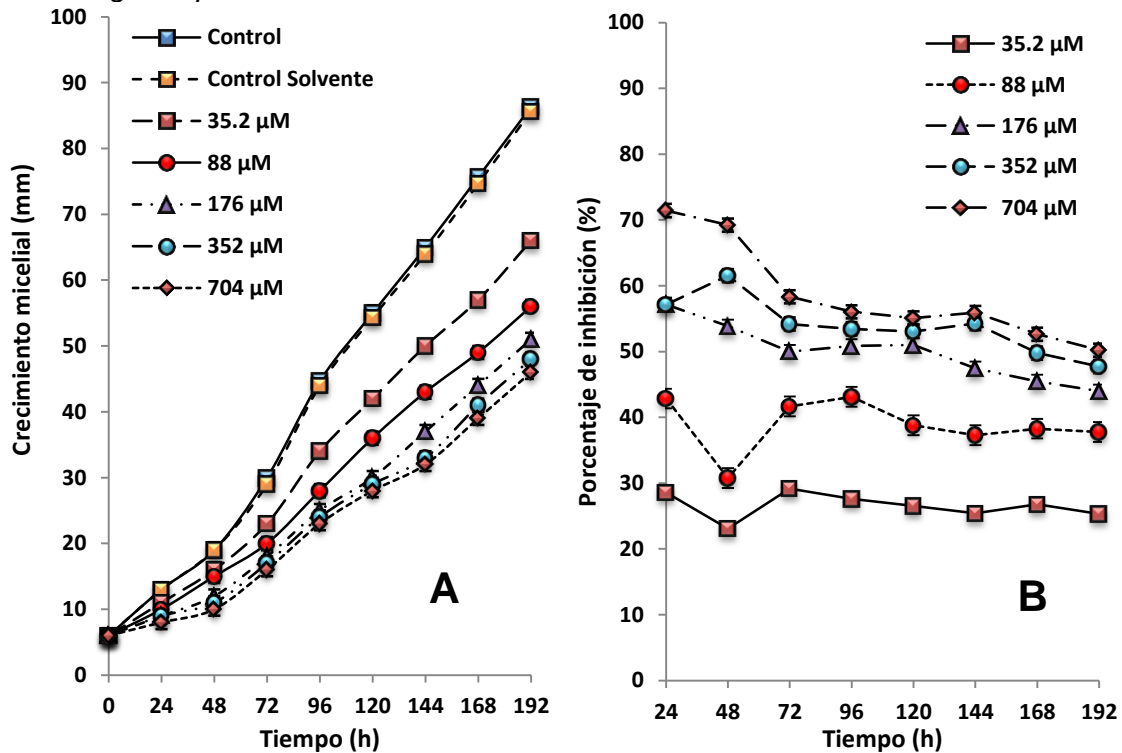
De forma semejante a como se encontró para *C. lindemuthianum*, el derivado (VIII) presentó mayor efecto fungiestático contra *C. gloeosporioides* (Figura 3-30 A) que el compuesto de partida (I). La actividad antifúngica del compuesto (VIII) fue dependiente de la concentración. Todas las concentraciones evaluadas inhibieron significativamente el crecimiento de *C. gloeosporioides*. A 704 y 352 µM, el derivado (VIII) inhibió el crecimiento

entre 76 a 67% y 62 a 51% respectivamente, durante las 24 y 192 horas. El efecto de inhibición para las dosis evaluadas disminuyó levemente con el transcurso del tiempo (Figura 3-30 B).

**Figura 3-29:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (VII) contra *C. gloeosporioides*.



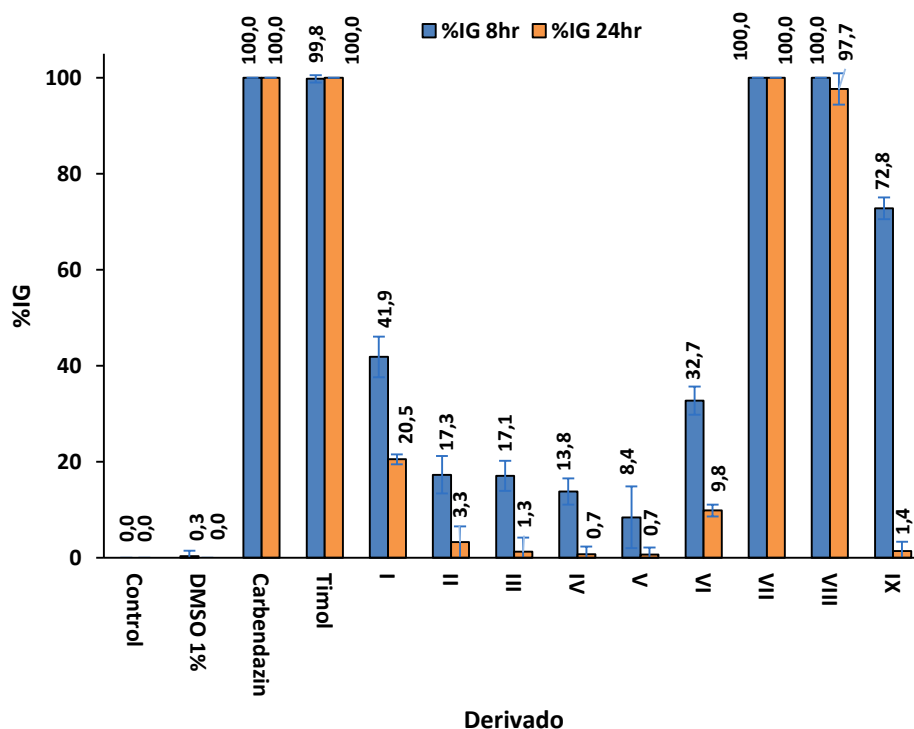
El crecimiento micelial y la inhibición del compuesto (IX) se presentan en la Figura 3-31. Los resultados muestran que el compuesto (IX), resultante de la metilación de (VIII), exhibió una actividad inhibitoria dependiente de la concentración. En general, todas las concentraciones inhibieron significativamente el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Comparado con el material de partida (I), el compuesto (IX) reveló un mayor efecto fungiestático contra este hongo. A la mayor concentración (704  $\mu$ M), el compuesto (IX) inhibió entre 71 a 50% durante las 24 y 192 horas. No obstante, los resultados muestran que la metilación de (VIII) para la formación de (IX), reduce significativamente ( $p < 0.05$ ) el efecto inhibitorio contra *C. gloeosporioides*; lo anterior indica, que la presencia de grupos hidroxilo en el derivado es un requerimiento estructural importante para la actividad antifúngica. A todas las concentraciones, las propiedades antifúngicas de (IX) decrecieron levemente con el tiempo (Figura 3-31 B).

**Figura 3-30:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (VIII) contra *C. gloeosporioides*.**Figura 3-31:** Crecimiento micelial (A) y porcentaje de inhibición (B) del compuesto (IX) contra *C. gloeosporioides*.

### 3.4.3 Inhibición de la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* con los derivados.

Los porcentajes inhibición de la germinación de esporas (%IG) obtenidos para *C. gloeosporioides* se presentan en la Figura 3-32. Las evaluaciones se llevaron a cabo a las 8 y 24 horas. Según los resultados, se evidenció un marcado efecto de algunos derivados en comparación con (I). A las 8 horas de análisis, tiempo en el cual germina el 100% de las esporas del blanco absoluto, se encontraron %IG cercanos al 100% por parte de los controles positivos (timol y carbendazim) y los derivados (VII) y (VIII). El compuesto (IX) inhibió la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* el 72.8% a las 8 horas, luego de lo cual disminuyó considerablemente hasta 1.4% en 24 h. En contraste, los compuestos (VII) y (VIII) conservaron el efecto antifúngico fuerte después de 24 h. Resulta notable que la actividad inhibitoria de la germinación de esporas de los compuestos (VII) y (VIII) es comparable con la del reconocido antifúngico natural timol y el fungicida sintético comercial carbendazim.

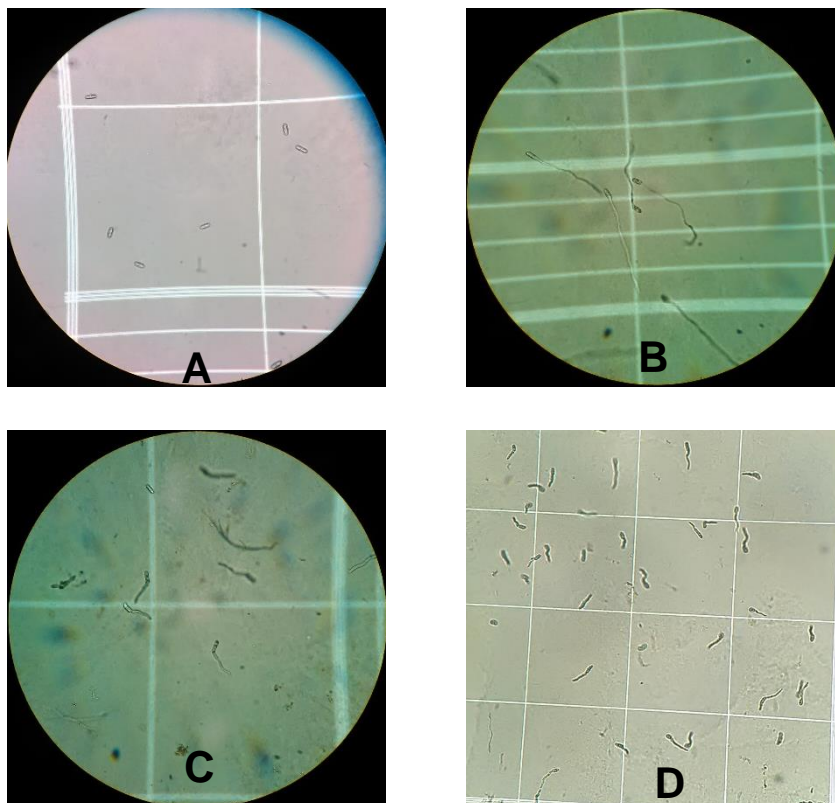
**Figura 3-32:** Inhibición de la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* (%IG) de los derivados (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX) evaluados a 704  $\mu$ M



Por otra parte, los derivados (II), (III), (IV), (V) y (VI) presentaron inhibiciones de la germinación bajas a las 8 horas (%IG entre 32.7%-17.3%) y que posteriormente disminuyeron drásticamente (%IG entre 9.8% y 0.7%) a las 24 horas. En general, estos compuestos exhibieron %IG inferiores a los encontrados para (I) (%IG de 41.9 y 20.5% a 8 y 24 horas).

Morfológicamente, las esporas que fueron inhibidas por tratamiento con los compuestos carbendazim, timol, (VII) y (VIII) conservaron la forma cónica típica presentada en la Figura 3-33 A. Las esporas del control absoluto y control solvente (DMSO 1%), lograron desarrollar extensamente el tubo germinativo superando en más del doble la dimensión de la espora (Figura 3-33 B). Interesantemente, aunque los compuestos (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) y (IX) no inhibieron fuertemente la germinación de las esporas, si ocasionaron un desarrollo defectuoso de los tubos germinativos y con longitudes inferiores a los encontrados para los controles absoluto y solvente (Figura 3-33 C y D).

**Figura 3-33:** Fotografía de las esporas de *C. gloeosporioides*. **A:** espora sin germinar; **B:** espora germinada; **C y D:** esporas parcialmente germinadas con afectación del tubo germinativo.



### 3.4.4 Efecto del compuesto (VIII) contra *C. gloeosporioides* en *Carica papaya* L. (cv. Hawaiana) y *Mangifera indica* L. (cv. Hilacha).

Con el fin de estudiar la efectividad “*in vivo*” como agentes fungistáticos, frutos de *C. papaya* inoculados con *C. gloeosporioides* se trataron con (VIII) y los respectivos controles. Se escogió (VIII) como el derivado más prometedor teniendo como criterio de elección los resultados del ensayo *in vitro*, el %IG y el rendimiento de la reacción de obtención (37.42%). Los resultados muestran que hubo una reducción del 82.9, 34.1, 14.6, y 55.4% del diámetro de la lesión en los tratamientos con carbendazim, timol, (I) y (VIII) respectivamente, en comparación con los controles (frutas no tratadas, A) y frutas tratadas solo con EtOH, B) (Figuras 3-34 y 3-35).

**Figura 3-34:** Crecimiento de la lesión causada por *C. gloeosporioides* en *C. papaya* L. cv. Hawaiana evaluada al día 7. A (blanco Absoluto); B (blanco solvente); C (carbendazim); D (timol); E (I); F (VIII).

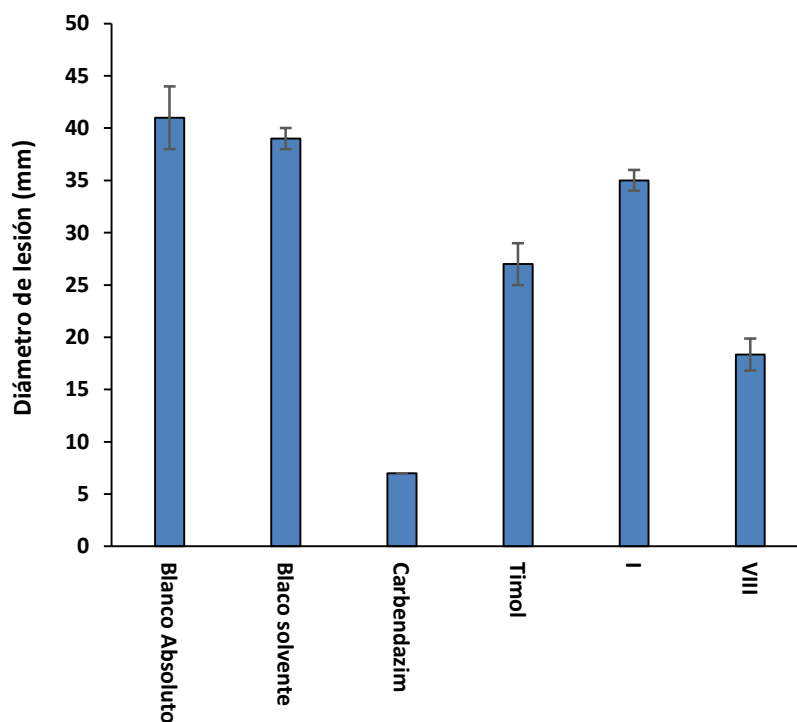


El derivado (VIII) mostró considerable disminución del crecimiento de *C. gloeosporioides* (55.4%), siendo superior que el compuesto de partida (I) (14.6%). Además, el compuesto (VIII) presentó un efecto fungistático superior que el antifúngico natural timol, con 34.1%. El fungicida comercial carbendazim fue el más efectivo de los tratamientos, con una reducción del crecimiento de *C. gloeosporioides* del 82.9%. En general, el progreso de la

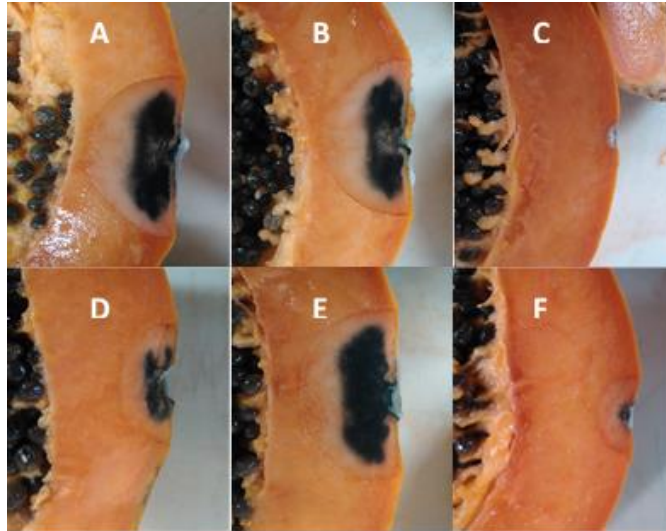
lesión en superficie de la fruta fue menor en el tratamiento con carbendazim seguido del compuesto (VIII), timol y (I) (Figuras 3-35).

De otro lado, el tejido interno en el área infectada mostró una decoloración blanca grisácea que fue más profunda en ambos controles absoluto y solvente, como se muestra en la imagen A y B de la Figura 3-36. Hubo una profundidad promedio de 3, 12, 17 y 9 mm para la lesión en los tratamientos con carbendazim, Timol, (I) y (VIII), respectivamente. En comparación con los controles (frutas no tratadas, **A** y frutas tratadas solo con EtOH, **B**), el progreso de la lesión en el parénquima del fruto fue menor en los tratamientos con carbendazim y (VIII) (Figuras 3-37). El compuesto (VIII) mostró menor profundidad en la lesión (9 mm) que el compuesto de partida (I) (17 mm) y el agente antifúngico natural timol (12 mm). En general, el compuesto (VIII) presentó una actividad contra *C. gloeosporioides* relativamente elevada y baja fitotoxicidad en la cáscara de la fruta.

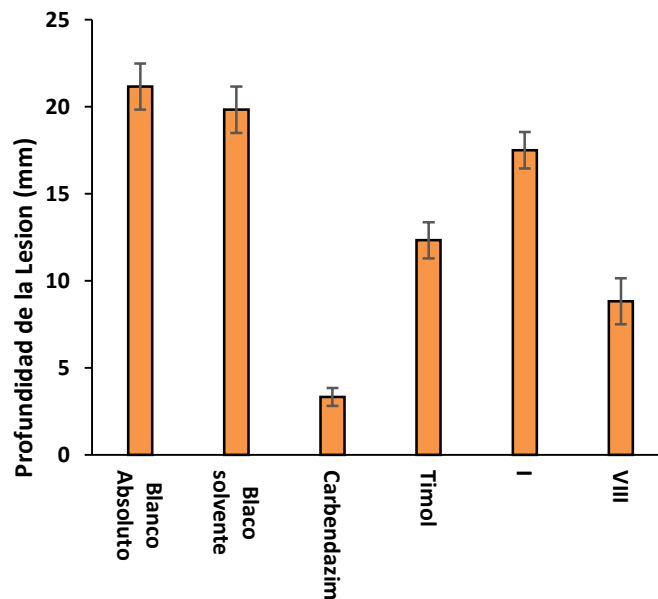
**Figura 3-35:** Diámetro de la lesión en *C. papaya* causada por *C. gloeosporioides* evaluado a los siete días de incubación.



**Figura 3-36:** Profundidad de la lesión en *C. papaya* causada por *C. gloeosporioides* evaluado en siete días. **A** (blanco Absoluto); **B** (blanco solvente); **C** (carbendazim); **D** (timol); **E** (I); **F** (VIII).

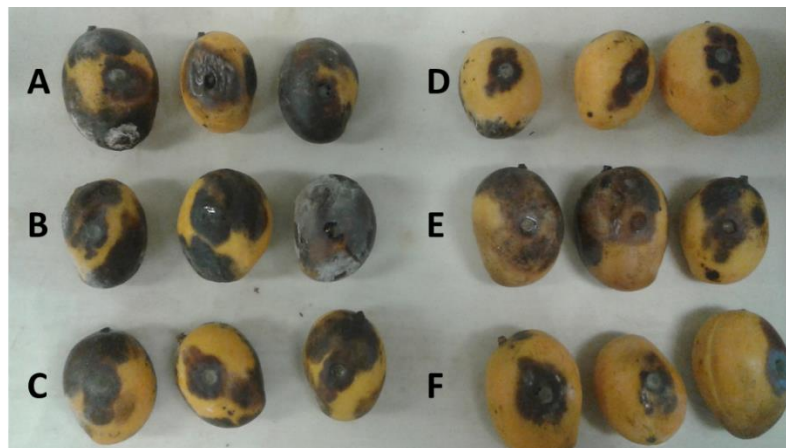


**Figura 3-37:** Profundidad de la lesión causada por *C. gloeosporioides* evaluada en siete días.



Por otro lado, los resultados de la actividad antifúngica “*in vivo*” contra *C. gloeosporioides* en *Mangifera indica* L. cv. Hilacha no presentaron un crecimiento radial homogéneo que permitiera cuantificar la inhibición basado en el diámetro de la lesión, pero se logra evidenciar cualitativamente niveles diferentes de afectación por parte de *C. gloeosporioides*, Figura 3-38.

**Figura 3-38:** Efecto en el crecimiento de lesión en *Mangifera indica* causada por *C. gloeosporioides* evaluado en 15 días. **A** (blanco Absoluto); **B** (blanco solvente); **C** (timol); **D** (carbendazim); **E** (I); **F** (VIII).



Los resultados muestran cualitativamente un efecto inhibitorio por parte del derivado (VIII) superior al causado por el compuesto (I) y el control timol. En el tratamiento con (I) al igual que los controles se afectó fuertemente el fruto. Cabe resaltar que el tratamiento con el derivado (VIII) presentó un retraso en el progreso de la lesión similar al presentado por el fungicida comercial carbendazim, lo que sugiere potencial en este derivado como agente de control.

### 3.5 Análisis cualitativo de la relación entre la actividad y estructura.

Se obtuvieron derivados con mayor y menor actividad antifúngica que el compuesto de partida (I) lo cual sugiere la posibilidad de generar compuestos más activos contra los hongos evaluados a partir de este pterocarpano. Los resultados obtenidos en este trabajo revelan la influencia en la actividad antifúngica de grupos nitro, amina, hidroxilo y la oxidación y formación de isoflavano, figura 3-39.

Se evidenció que adicionar grupos nitro en la estructura de (I) genera derivados con menor actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*. El porcentaje de inhibición de crecimiento de los derivados nitrados (II), (III) y (IV) a 704  $\mu\text{M}$  presentaron valores contra *C. lindemuthianum* entre 39.6 a 14.0% lo cual fue inferior al rango entre 42.8 a 34.9 reportado por (I) en el periodo de 96 a 384 horas; De igual forma contra *C. gloeosporioides* estos derivados presentaron un rango menor de inhibición de crecimiento

(40 a 20.6%) comparado con (I) (55 a 36.1%) en el periodo de 48 a 192 horas, Figura 3-39. Cabe resaltar que se evidenció la disminución de la actividad con el incremento de los sustituyentes nitro en la estructura del derivado.

También baja actividad se presentó en el derivado generado por la reducción de grupo nitro a amino en la estructura de (I). El derivado (V) presentó rangos de inhibición entre (20 a 13.7%) y (40 a 22%) para *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum* respectivamente, los cuales fueron inferiores a los presentados por (I). Recopilando la información anterior y comparando los porcentajes de inhibición de (I), (II), (III), (IV) y (V) se evidenció una fuerte disminución de la actividad por parte de este tipo de sustituyentes nitrogenados lo cual puede sugerir un efecto desactivante de actividad biológica debida posiblemente a efectos electrónicos.

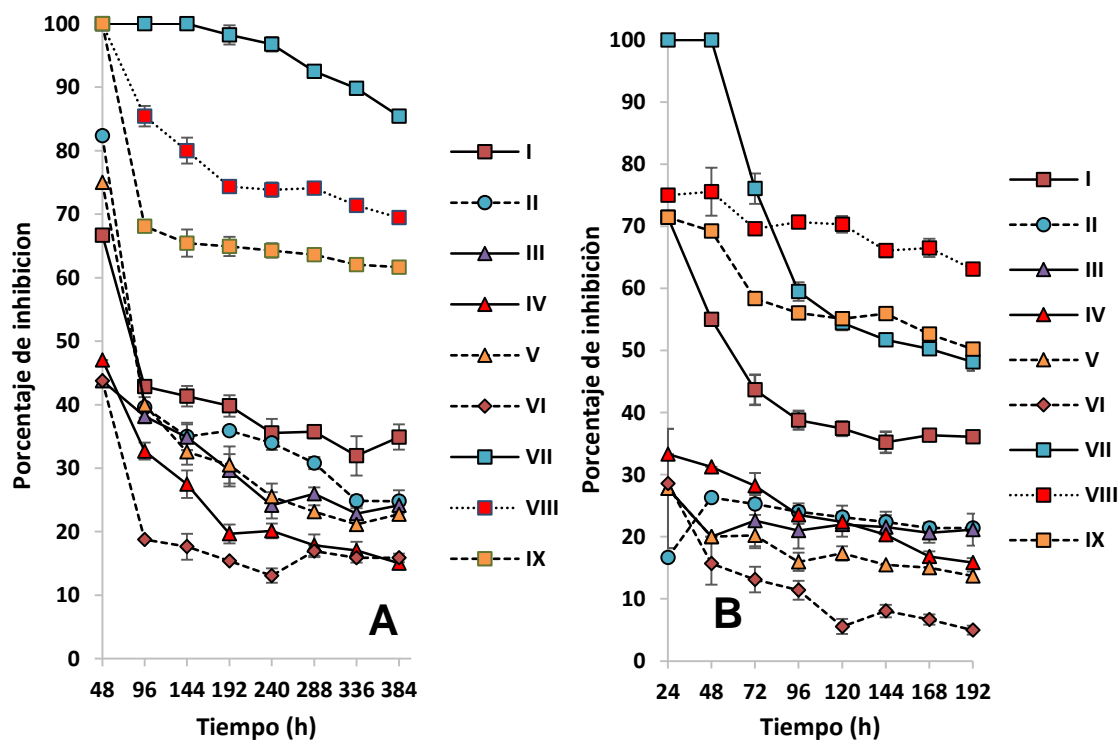
El derivado (VI), generado por la oxidación con DDQ de los carbonos bencílicos y alquílicos del compuesto (I), presentó el menor porcentaje de actividad contra *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*. Este compuesto particularmente presenta baja solubilidad en etanol y estructura tridimensional plana diferente a (I) y los demás derivados, lo cual se propuso como causa de la baja actividad antifúngica en cumestanos (Perrin & Cruickshank, 1969). El derivado (VI) presentó rangos de inhibición entre (28.6 a 4.9%) entre 24 y 192 horas contra *C. gloeosporioides* y (18.7 a 15.9%) entre 48 y 348 horas contra *C. lindemuthianum*. El derivado (VI) en ambos hongos presentó un descenso vertiginoso en el transcurso del tiempo en el efecto inhibitorio de crecimiento micelial como se puede evidenciar en la figura 3-39.

El compuesto (VII) el cual se diferencia de (I) por el cambio del grupo metoxilo por un hidroxilo en la posición C-3, alcanzó altos niveles de la actividad biológica. Este compuesto presentó una afectación considerable y poco variable principalmente contra *C. lindemuthianum* reflejado en el rango de inhibición del crecimiento durante el tiempo del bioensayo entre 100 y 85%, Figura 3-39. De manera similar (VII) influye negativamente en el crecimiento de *C. gloeosporioides* las primeras 48 horas inhibiendo 100% su crecimiento. A pesar de este buen comienzo el efecto inhibitorio conferido por el grupo hidroxilo fenólico decae drásticamente hasta 63% en 192 horas. Esto supone capacidad importante de desintoxicación de (VII) por parte de *C. gloeosporioides*, Figura 3-39.

Se resalta que a (VII) se le ha reportado mayor actividad que el fungicida comercial Benlate y además se demostró la influencia del grupo hidroxilo para la actividad antifúngica a través de la acetilación de este sustituyente. De esta forma se obtuvo el derivado 3-acetoxi-9-metoxipterocarpano que presentó menor actividad antifúngica que (VII) contra

*Cladosporium cladosporioides*. (Ratnayake et al., 1989). La presencia del grupo hidroxilo fenólico podría relacionarse con afectaciones a la integridad de la membrana citoplasmática en los hongos, de manera similar a como ha sido propuesto para el timol y compuestos relacionados (Ultee et al., 2002).

**Figura 3-39:** Inhibición de crecimiento micelial de derivados a 704  $\mu\text{M}$  contra *C. lindemuthianum* (A) y *C. gloeosporioides* (B).

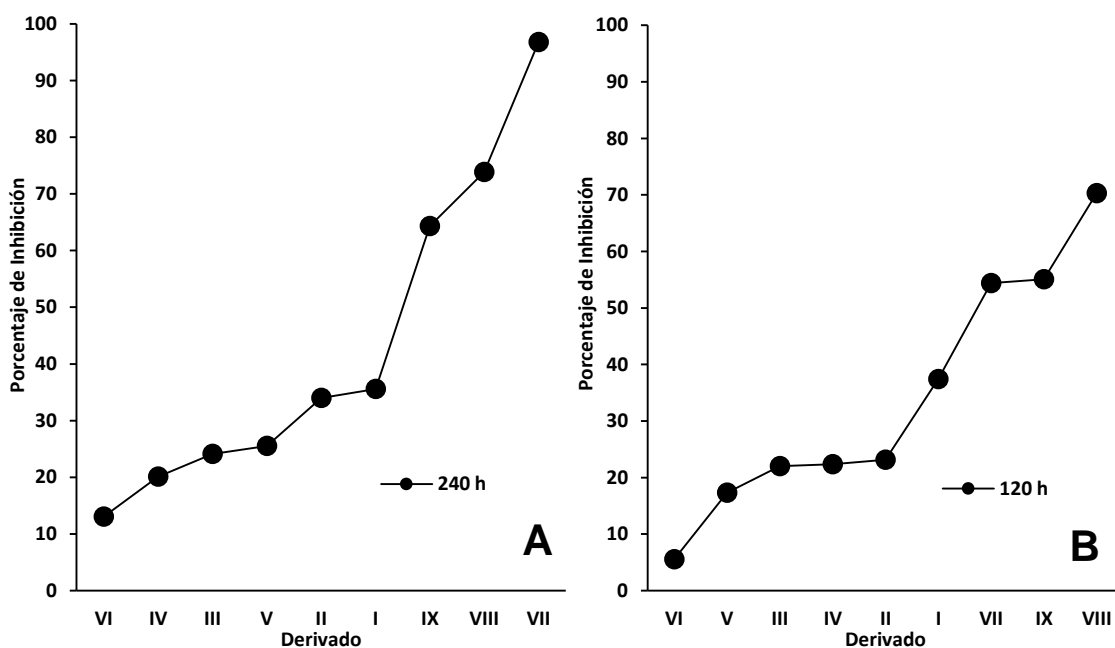


La transformación de (I) al derivado (VIII), un isoflavano hidroxilado en posición C-2' y con un sustituyente hidroxietilsulfanil en C-4, genero un compuesto con mejor solubilidad en etanol y considerable actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum* a los que inhibió entre 75 a 63% y 85.4 a 69.4% respectivamente, Figura 3-39.

Particularmente con los resultados de (IX), el cual presenta un grupo metoxilo reemplazando el hidroxilo de la posición C-2' presente en (VIII), se logra confirmar la influencia del sustituyente hidroxilo para la actividad antifúngica. El compuesto (IX) presento menor inhibición que el derivado (VIII) y mayor inhibición que (I). Con (IX) se logró inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* entre 69.2 a 50.2% y a *C. lindemuthianum* entre 68.1 y 61.7%, Figura 3-39.

Seguidamente se comparo la relevancia de la actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum* entre todos los derivados. Este análisis se realizo para *C. gloeosporioides* a las 120 horas y para *C. lindemuthianum* a las 240 horas, Figura 3-40. El periodo de tiempo que se elijio presento una tendencia estacionaria en el crecimiento. En la figura 3-40 y tabla 3-4 se evidencia los resultados comparativos entre derivados. Se puede notar una tendencia de aumento de actividad antifúngica de los derivados (VII), (VIII) y (IX) y disminución para (II), (III), (IV), (V) y (VI) tomando el compuesto (I) como referencia.

**Figura 3-40:** Inhibición de crecimiento micelial de derivados a 704  $\mu\text{M}$  contra *C. lindemuthianum* (A) a 240 horas y *C. gloeosporioides* a 120 horas (B).



El porcentaje de incremento o disminución de la actividad antifúngica de los derivados se presentan en la tabla 3-4. En general los grupos nitro, amina no son adecuados sustituyentes para aumentar la actividad antifúngica en el núcleo estructural de (I) de igual forma la oxidación a cumestano de (I). En cambio se logra aumentar la actividad antifúngica de (I) transformando el grupo metoxilo del C-9 a grupo hidroxilo (VII) o transformando (I) en los isoflavanos (VIII) y (IX).

**Tabla 3-4:** Variación de del porcentaje de inhibición de crecimiento a 120 y 240 horas para *C. lindemuthianum* y *C. gloeosporioides* de derivados comparados con (I).

<b>Derivado</b>	<b><i>C. lindemuthianum</i></b>	<b>Derivado</b>	<b><i>C. gloeosporioides</i></b>
<b>VI</b>	-63.07 %	<b>VI</b>	-85.15 %
<b>IV</b>	-43.37 %	<b>V</b>	-53.67 %
<b>III</b>	-32.11 %	<b>III</b>	-41.20 %
<b>V</b>	-28.23 %	<b>IV</b>	-40.22 %
<b>II</b>	-4.41 %	<b>II</b>	-38.07%
<b>IX</b>	80.80 %	<b>VII</b>	45.45 %
<b>VIII</b>	107.72 %	<b>IX</b>	47.27 %
<b>VII</b>	172.12 %	<b>VIII</b>	87.93 %

(-) *disminución* y (+) *aumento de porcentaje de Inhibición de crecimiento.*

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

El presente estudio sugiere la posibilidad de aprovechar racionalmente residuos proveniente de *P. gracile* debido al contenido de compuestos bioactivos presentes. Se logró determinar el contenido de 3,9-dimetoxipterocarpano (I) empleando técnicas cromatográficas y se propuso de forma preliminar una metodología sencilla de obtención para (I) a nivel de laboratorio.

A partir del compuesto (I) se logró preparar, purificar e identificar ocho compuestos con diversidad estructural.

De acuerdo a los resultados de inhibición de crecimiento radial, se obtuvo un grupo de compuestos conformado por (II), (III), (IV), (V) y (VI) con menor actividad que la sustancia de partida (I), evaluados contra *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*.

El compuesto (VIII) en las pruebas *in vivo* contra *C. gloeosporioides* en condiciones de laboratorio en papaya y mango presento un considerable retraso del avance de crecimiento mayor al ocasionado por los controles.

Los resultados determinaron que grupos nitro y aminos adicionados en la estructura de (I) y su oxidación a cumestano generan compuestos con menor actividad biológica contra *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*. Se observó con los compuestos (II), (III) y (IV) que el aumento de grupos nitro adicionados en (I) agudiza la disminución de la actividad. También se evidenció al comparar (III) y (V) que el efecto electrónico del grupo nitro y amino no provoca aumento en actividad en la estructura de (I).

Por otra parte, los resultados de (VII), (VIII) y (IX) evidenciaron mayor actividad que (I) y para el caso de (VIII) se mantuvo su efecto contra *C. gloeosporioides* inhibiendo el crecimiento micelial, inhibiendo la germinación de esporas y retrasando el avance del crecimiento en frutos de papaya y mango.

El compuesto (VII) muestra la influencia positiva de los grupos hidroxilo para la actividad antifúngica, lo cual está en acuerdo con otros autores. La conversión de (I) en el isoflavano (VIII), sugiere un aporte importante a la actividad de este compuesto por parte del sustituyente hidroxilo y la cadena carbonada hidroxietilsulfanil; esto se hipotetiza por el posible balance hidrofóbico-hidrofílico de estos sustituyentes y además por los pocos reportes encontrados de actividad antifúngica de isoflavanos. Finalmente, al comparar los resultados y estructuras de (VIII) y (IX) se confirma el efecto en la actividad antifúngica de los grupos hidroxilo. El derivado (IX) generado por metoxilación del grupo hidroxilo de la posición C-2' en (VIII), presentó menor actividad antifúngica que (VIII) pero fue mayor que la actividad de (I).

Sin embargo, estos argumentos son susceptibles de controversia, razón por la cual es necesario llevar a cabo estudios adicionales.

## 4.2 Recomendaciones

A continuación, los autores del presente estudio detallan algunos aspectos esenciales que consideran trascendentes en aras de desarrollar un agente de control fúngico partir de 3,9-dimetoxipterocarpano:

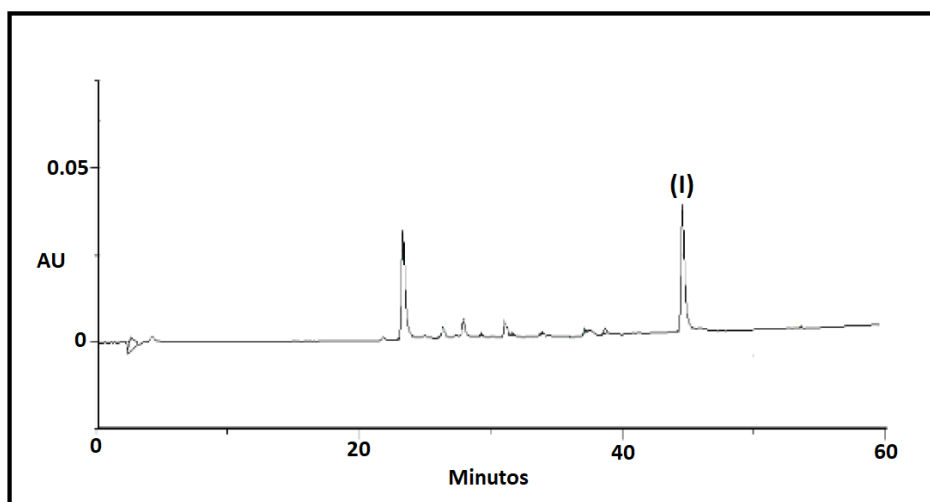
1. Desarrollar nuevos derivados a partir de (I) que ayuden a aclarar la relación estructura-actividad.
2. Obtener un considerable número de derivados de (I) para poder utilizar metodologías computacionales que ayuden a describir estas moléculas y permitan cuantificar el efecto de las modificaciones químicas en la actividad biológica. Esto además ayudaría a direccionar el diseño de nuevos agentes de control a partir del pterocarpano (I) ya que se contaría con una guía para determinar las modificaciones en el compuesto de partida.

3. Estudio detallado y específico de las enzimas involucradas en el proceso de desintoxicación de *C. gloeosporioides* y *C. lindemuthianum*. Esto ayudaría a comprender el ambiente bioquímico de estos hongos y conocer los mecanismos de desintoxicación lo cual permitiría diseñar moléculas que bloqueen o interfieran en estos mecanismos.

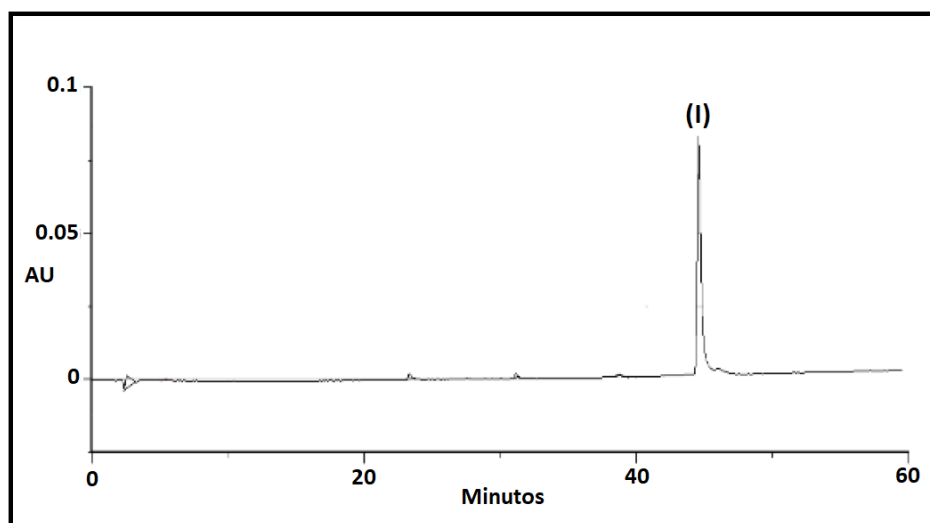


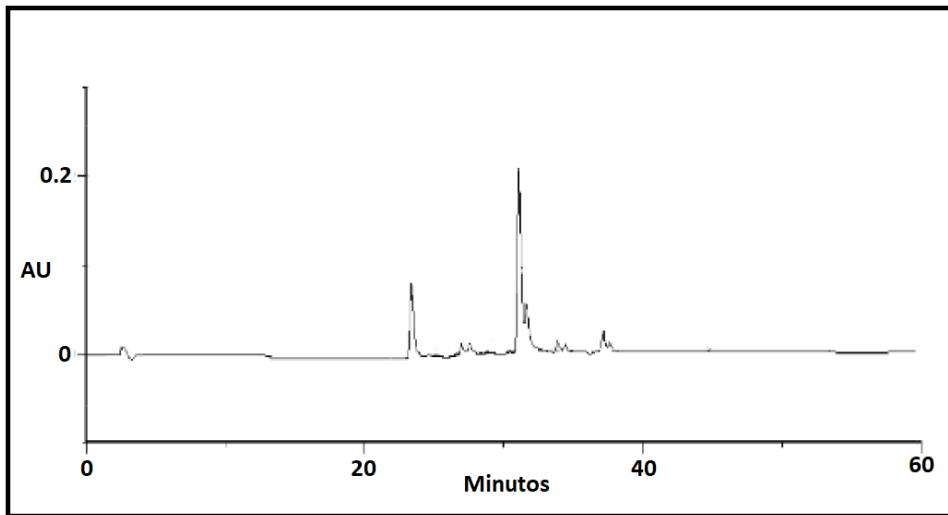
## A. Anexo: Cromatogramas de análisis por HPLC

Cromatograma extracto de *n*-hexano

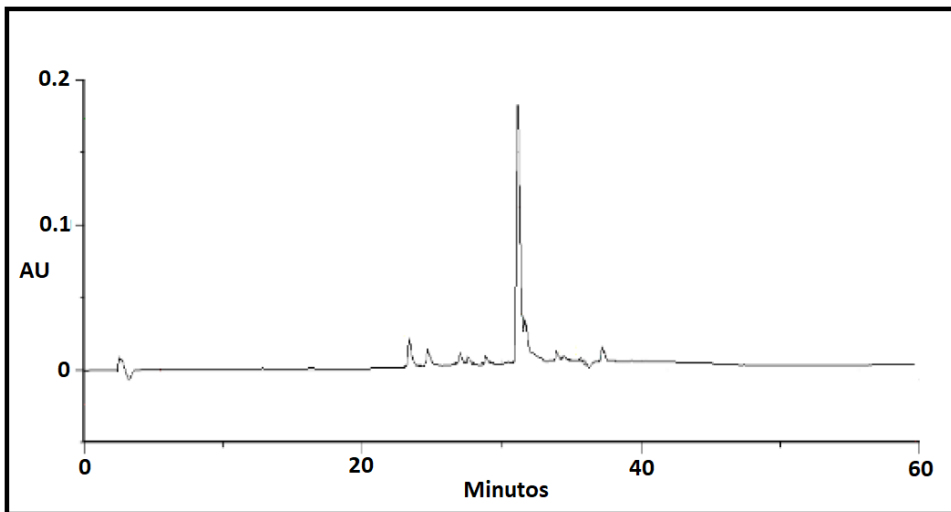


Cromatograma compuesto (I)



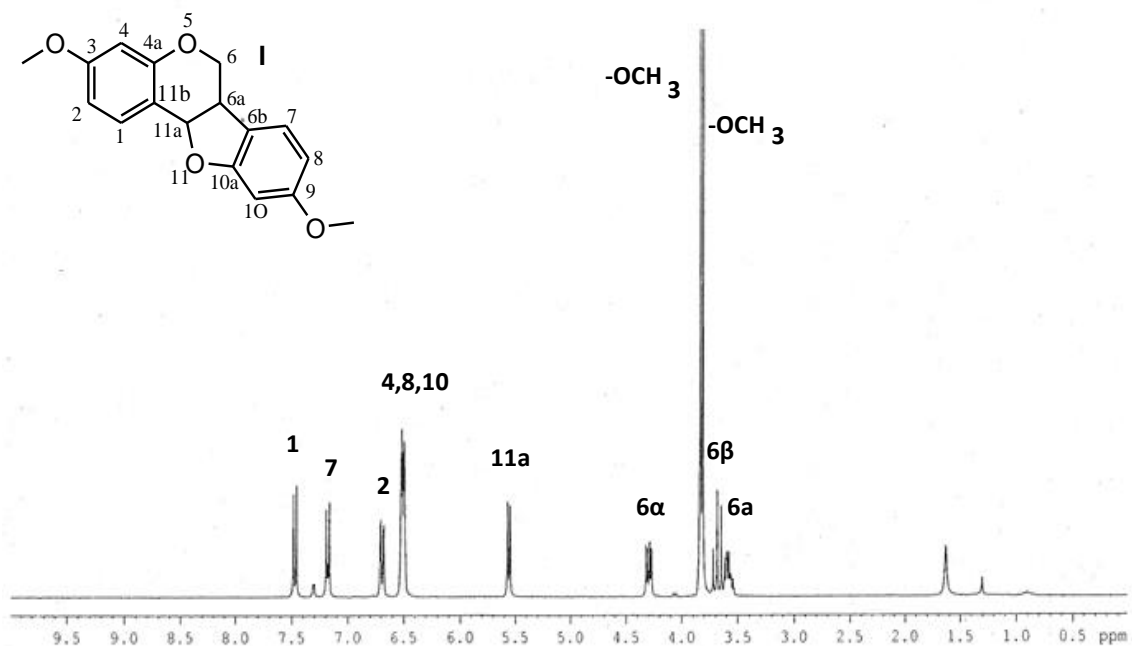
Cromatograma extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Cromatograma extracto de EtOAc

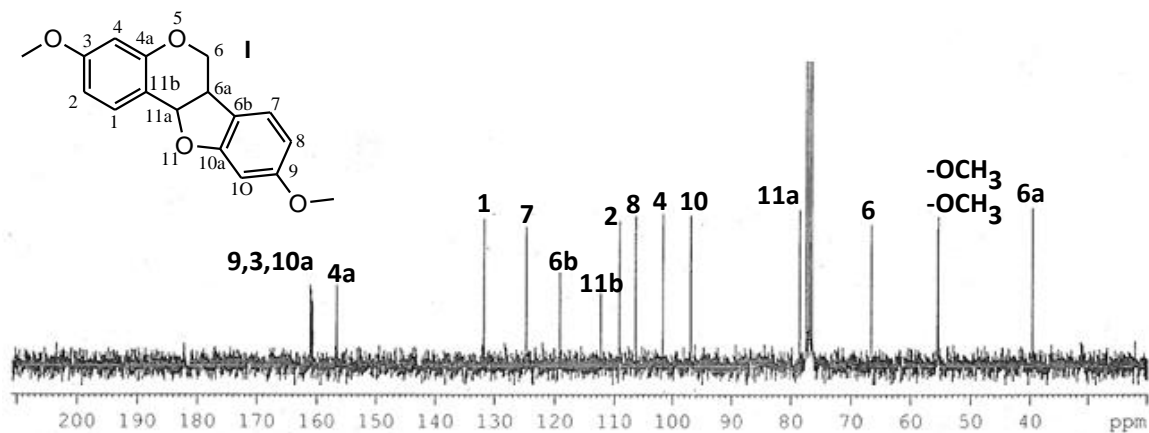


## B. Anexo: Espectros RMN y IR de derivados.

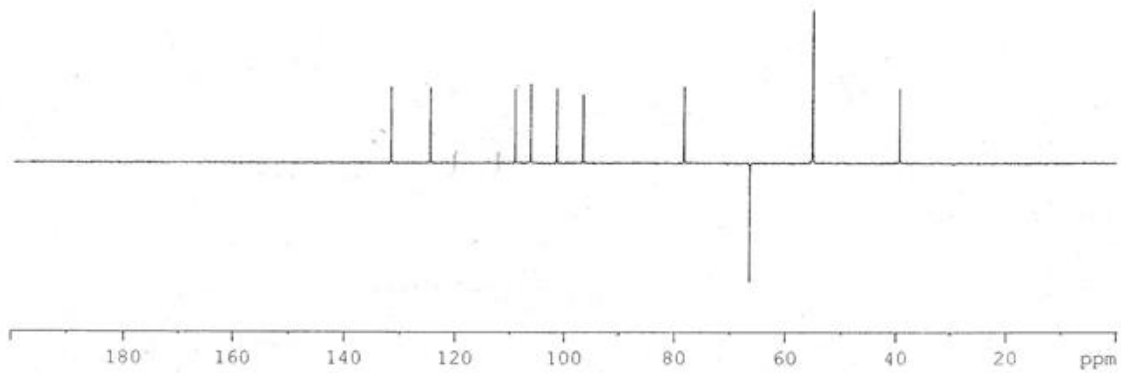
$^1\text{H}$  RMN (I)



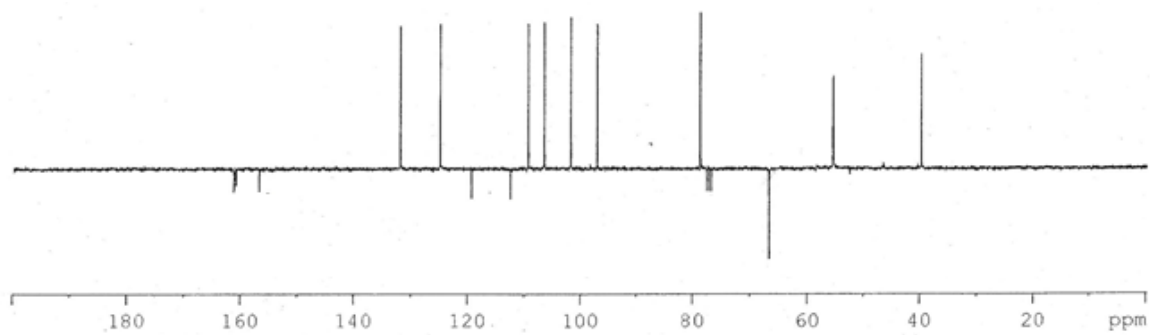
$^{13}\text{C}$  RMN (I)



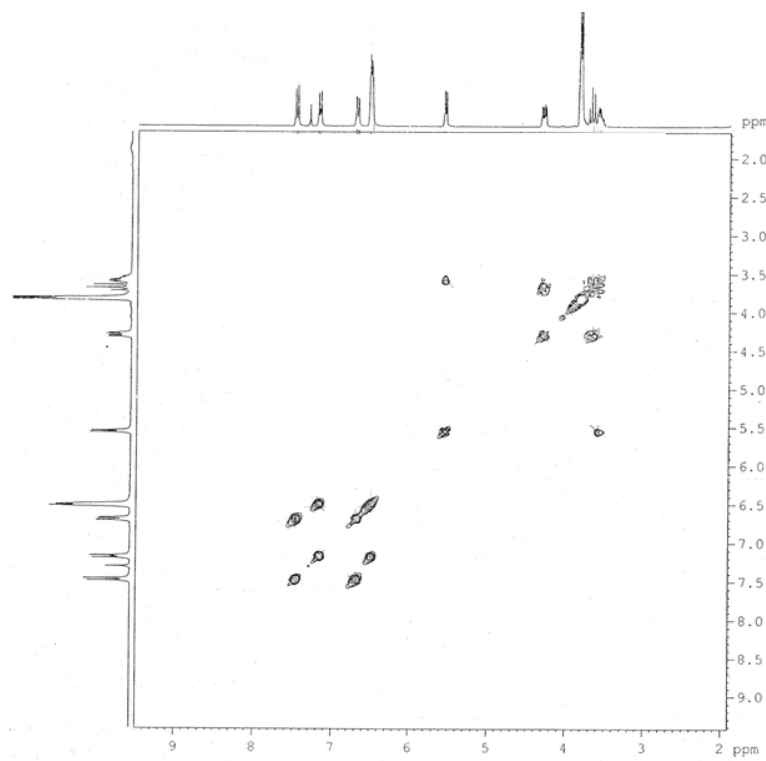
Dept 135 (I)

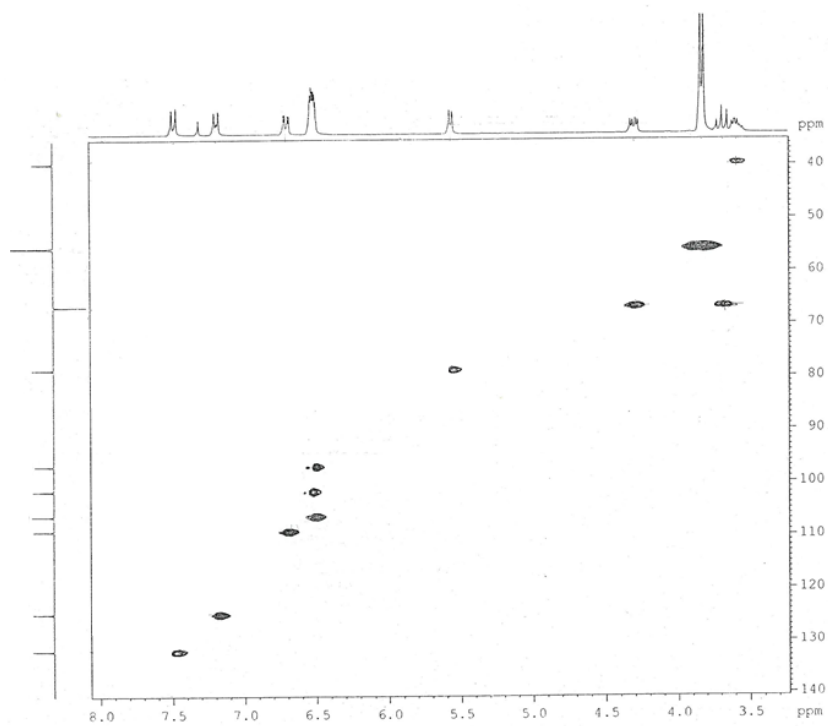
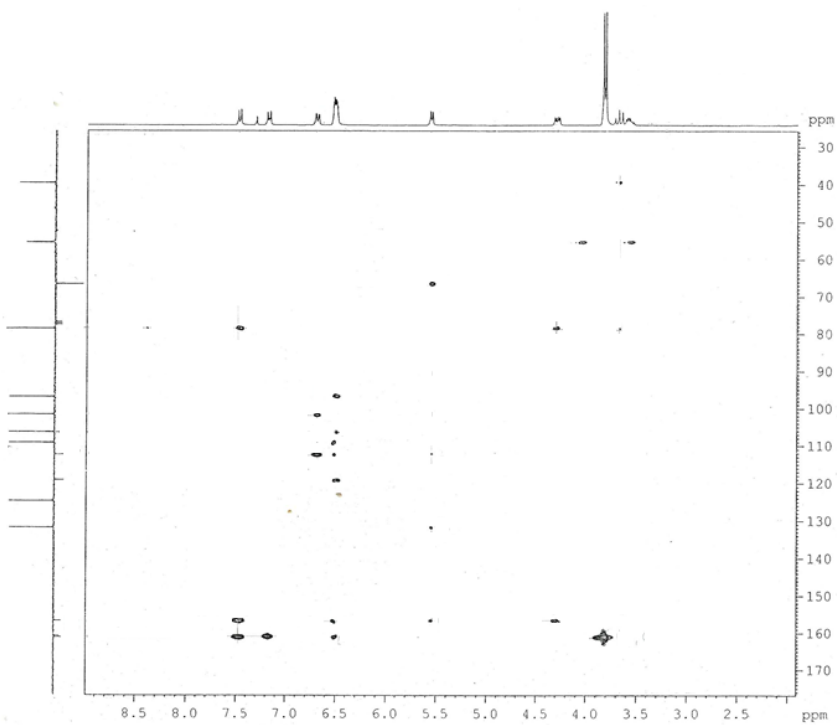


APT 135 (I)

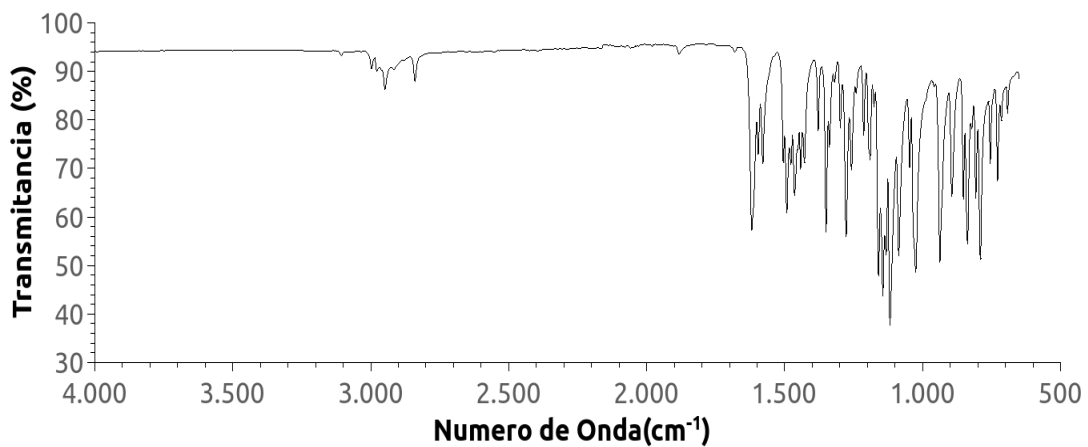
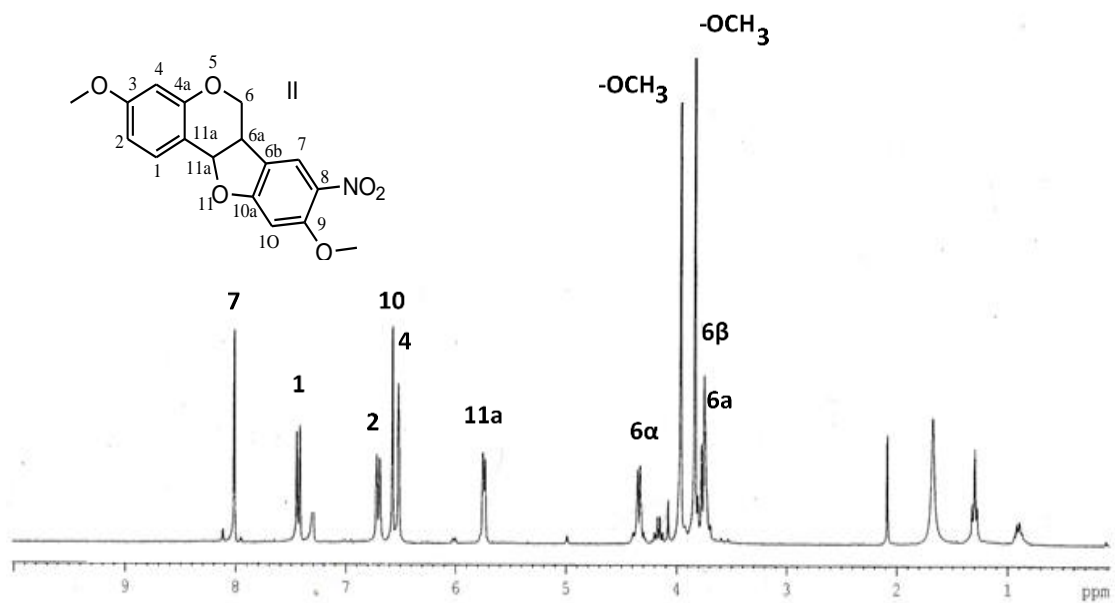


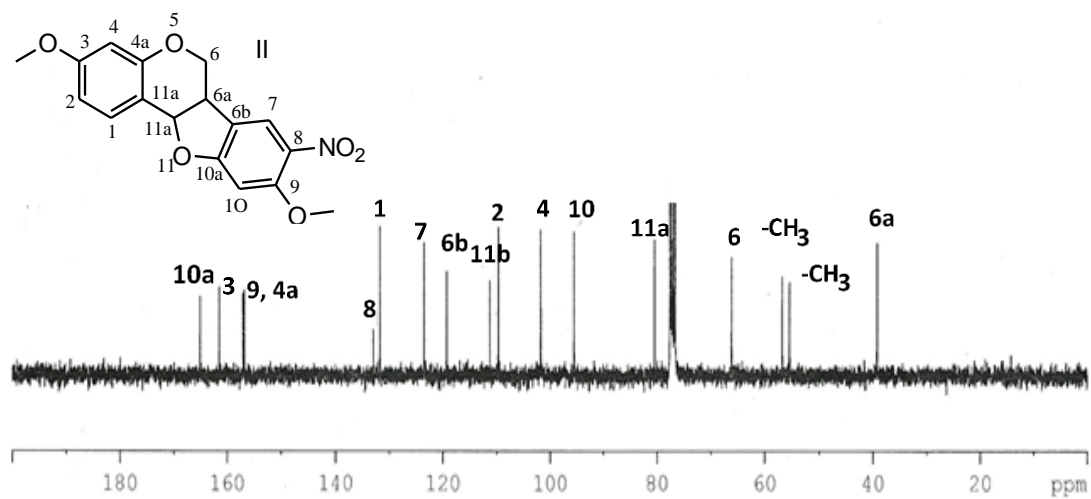
COSY HH (I)



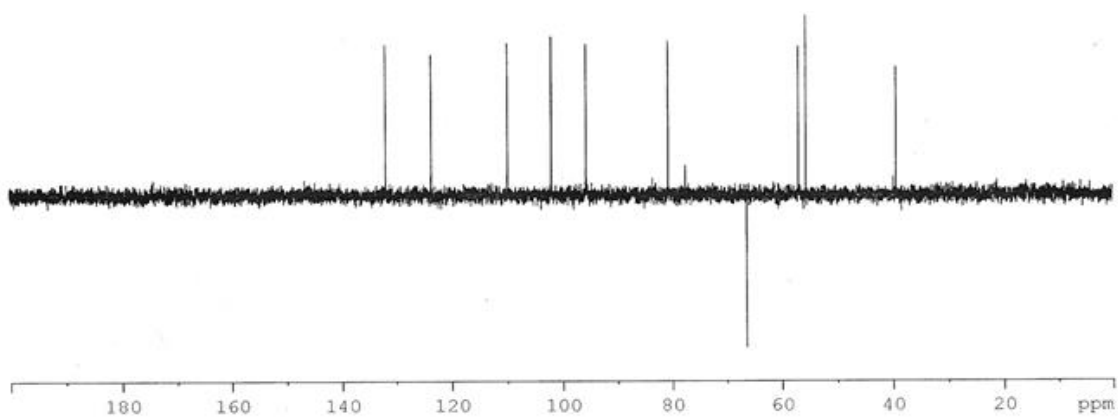
HSQC H-<sup>13</sup>C (I)HMBC H-<sup>13</sup>C (I)

## Espectro IR (I)

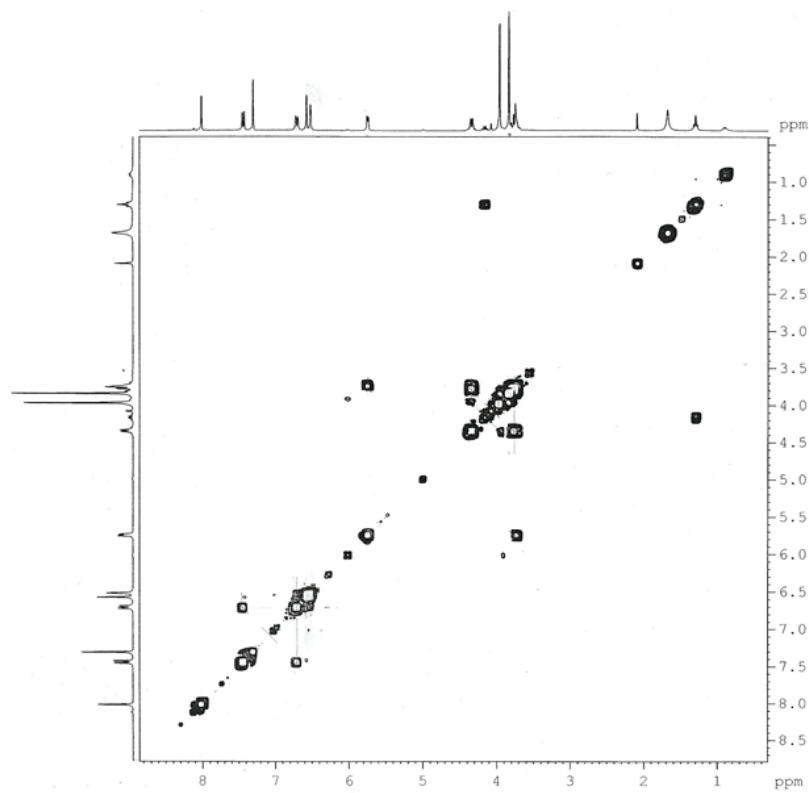
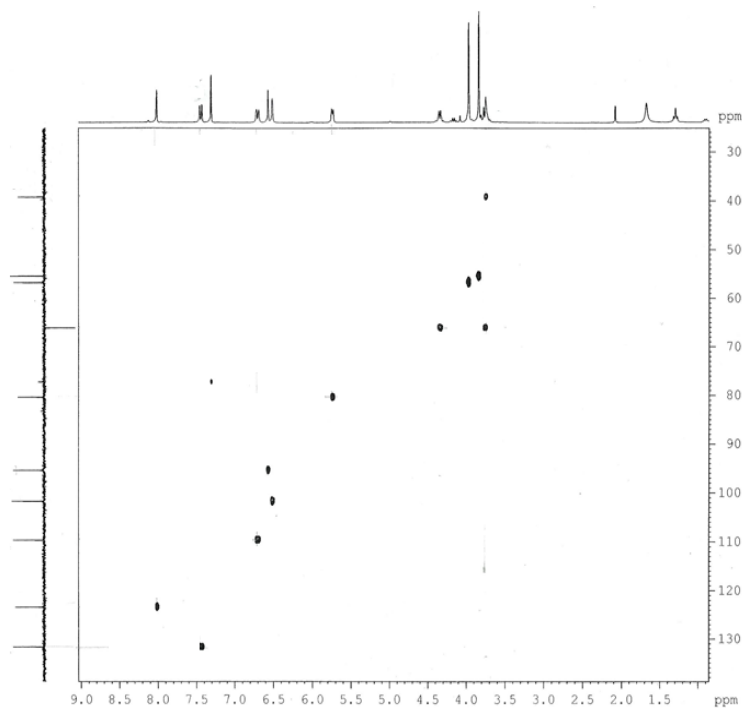
<sup>1</sup>H RMN (II)

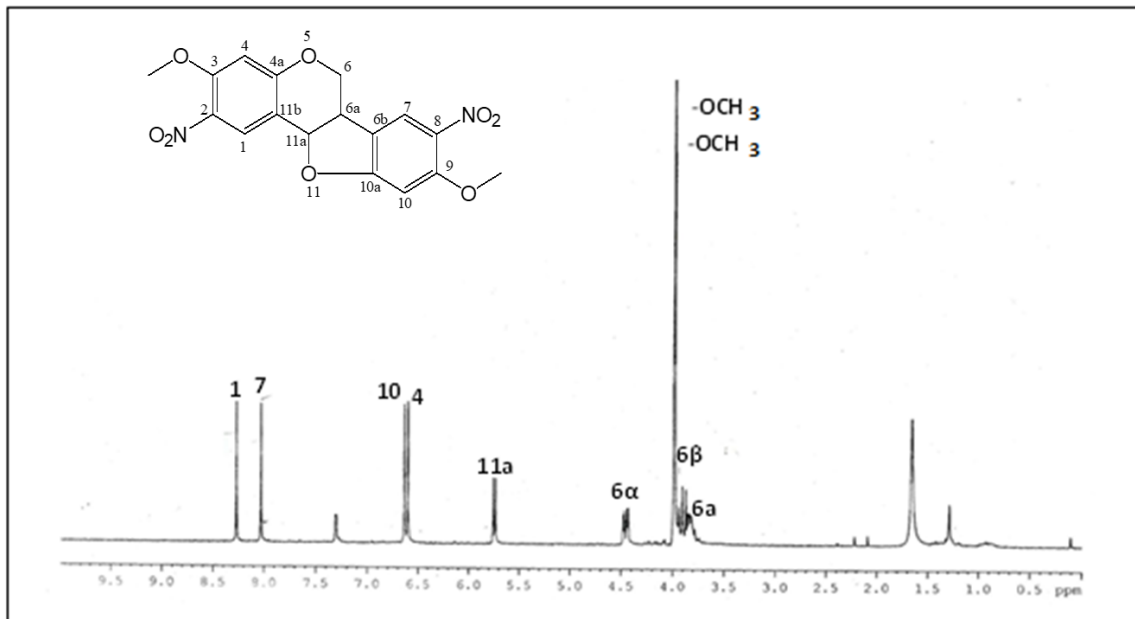
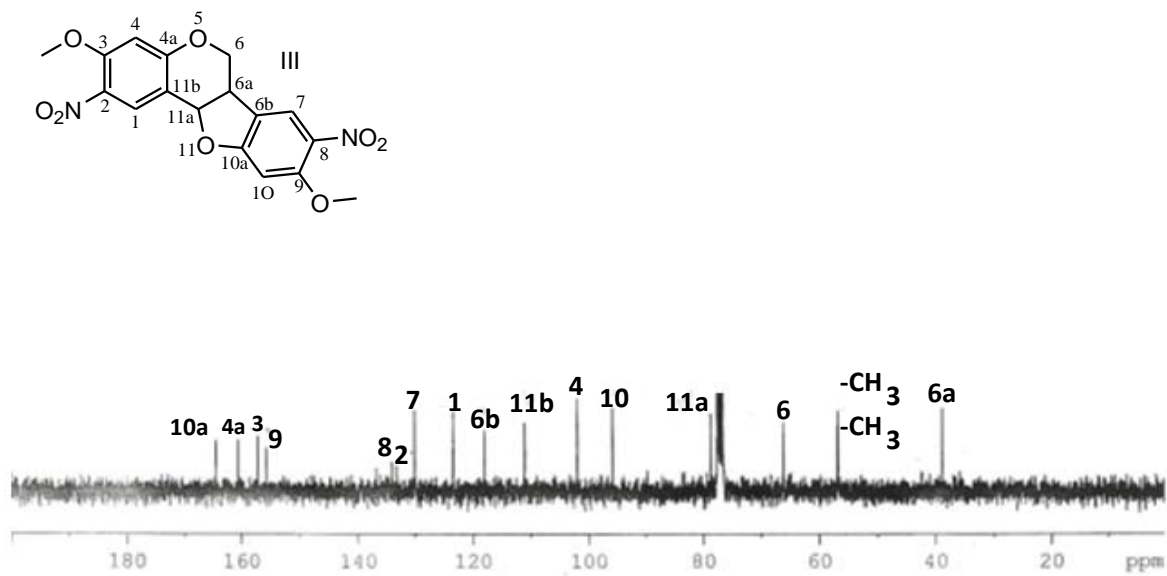
$^{13}\text{C}$  RMN (II)

## Dept 135 (II)



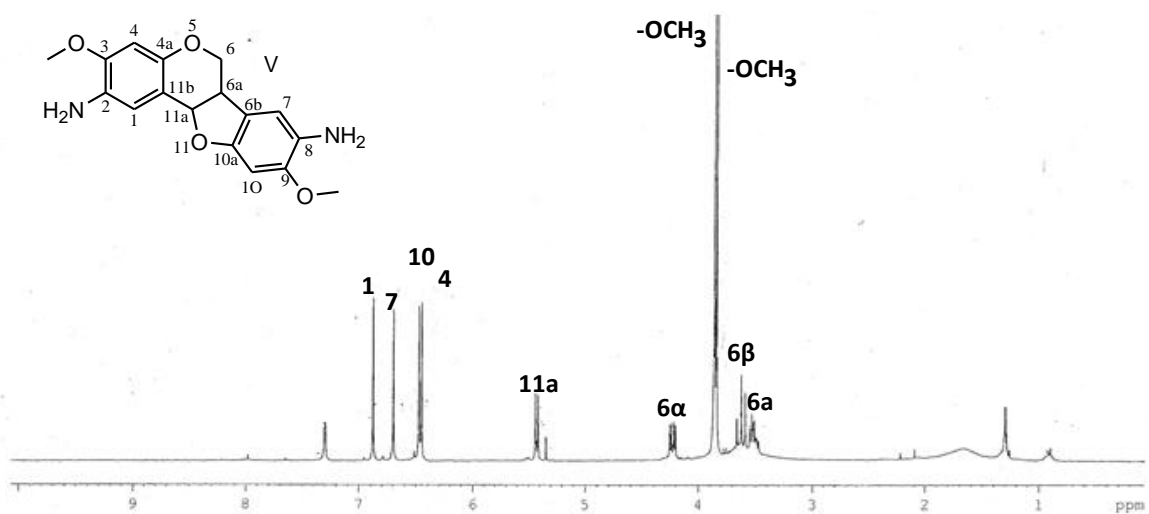
## COSY HH (II)

HSQC H-<sup>13</sup>C (II)

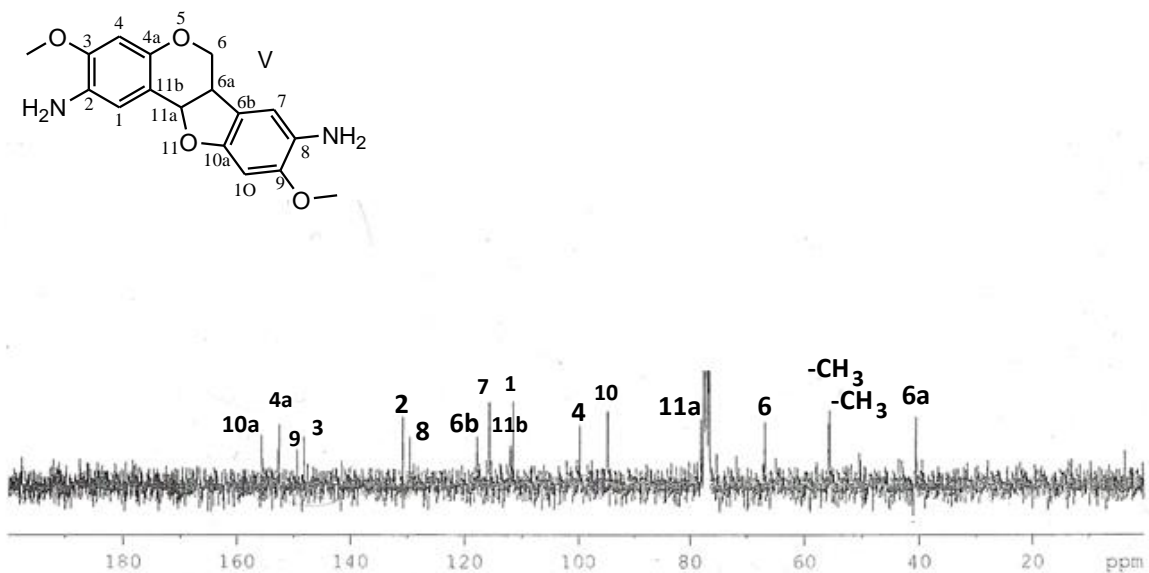
$^1\text{H}$  RMN (III) $^{13}\text{C}$  RMN (III)



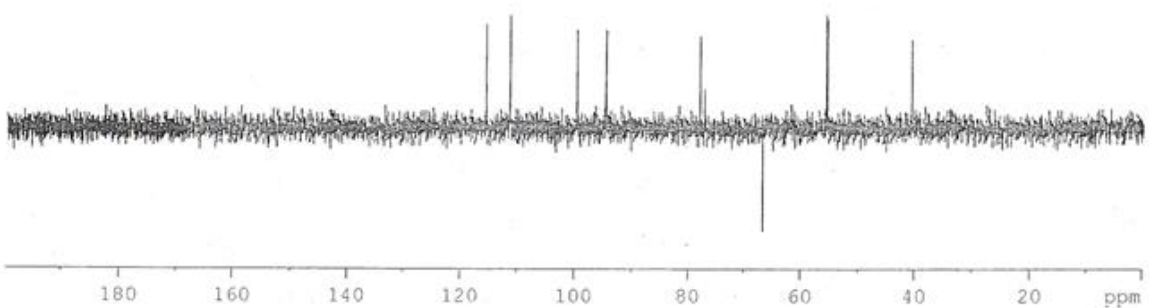
<sup>1</sup>H RMN (V)

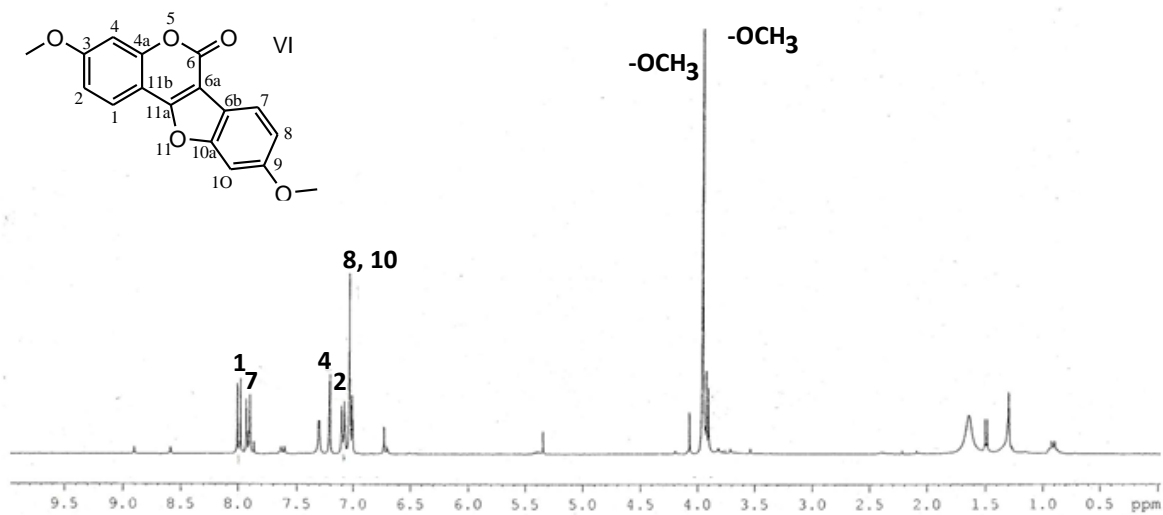
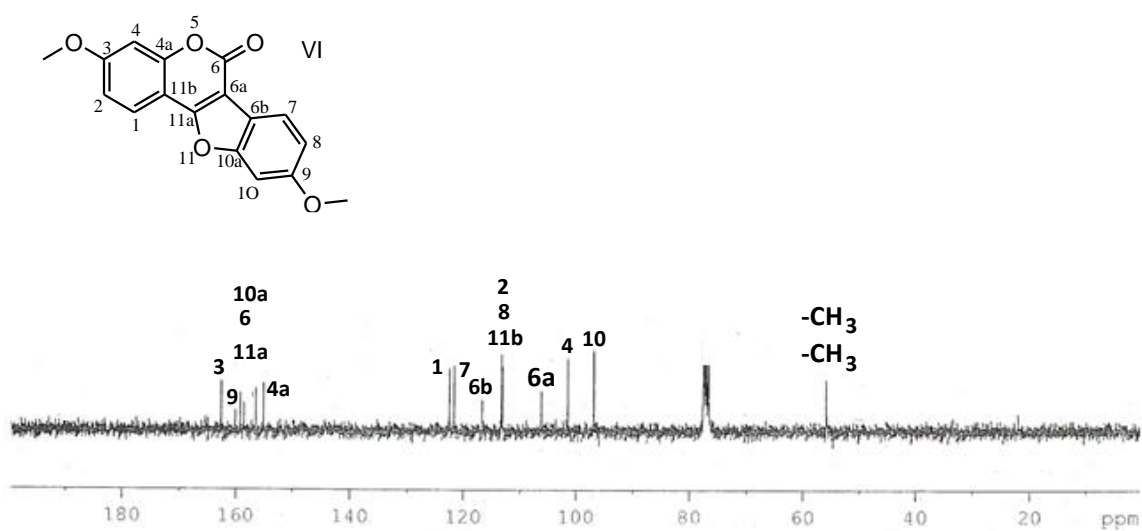


<sup>13</sup>C RMN (V)

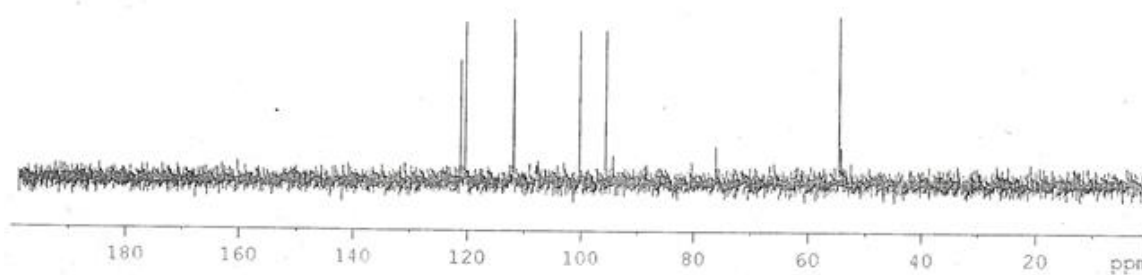


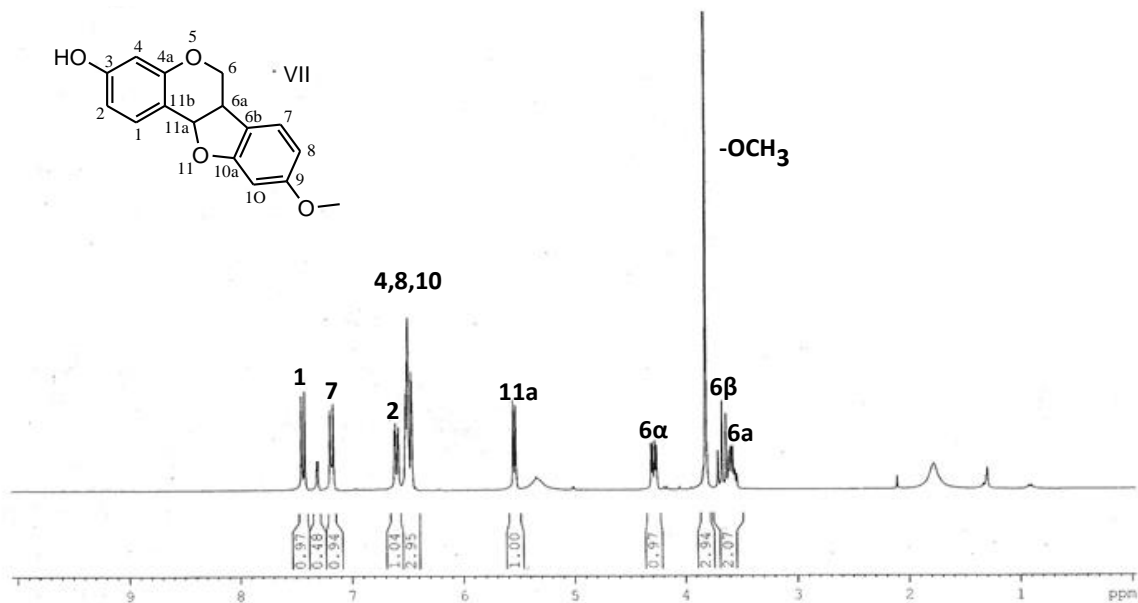
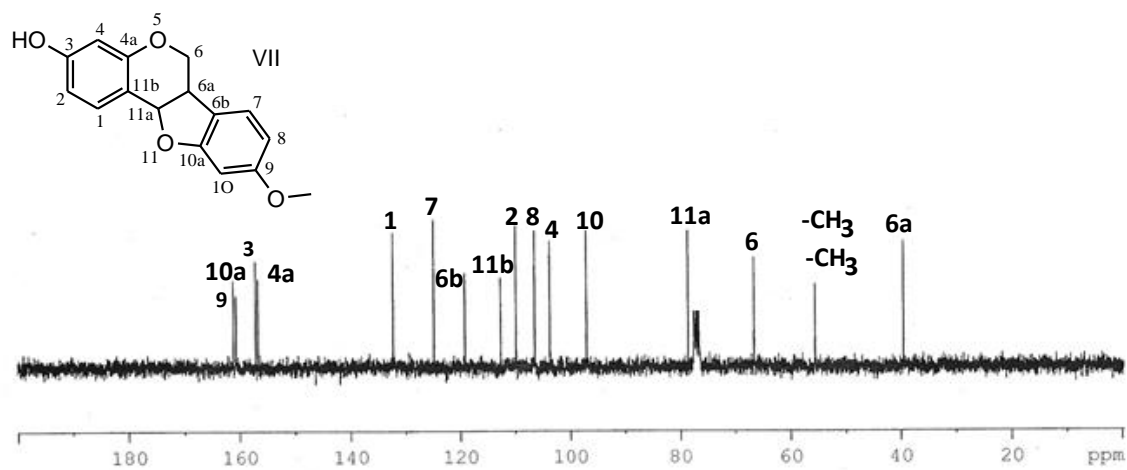
Dept 135 (V)



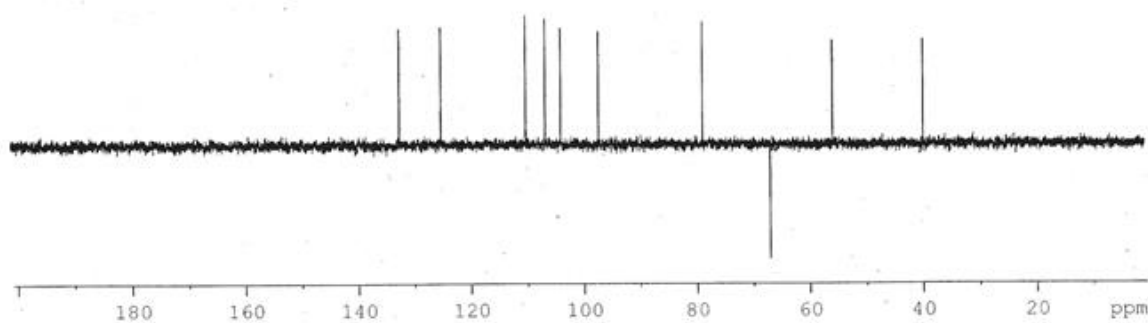
$^1\text{H}$  RMN (VI) $^{13}\text{C}$  RMN (VI)

## Dept 135 (VI)

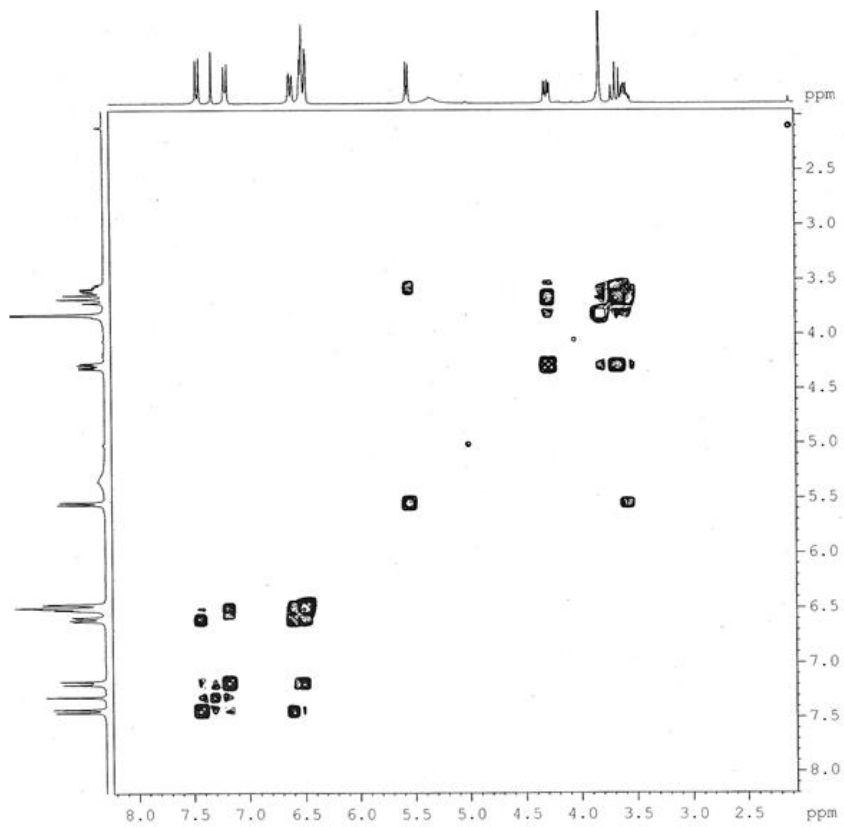
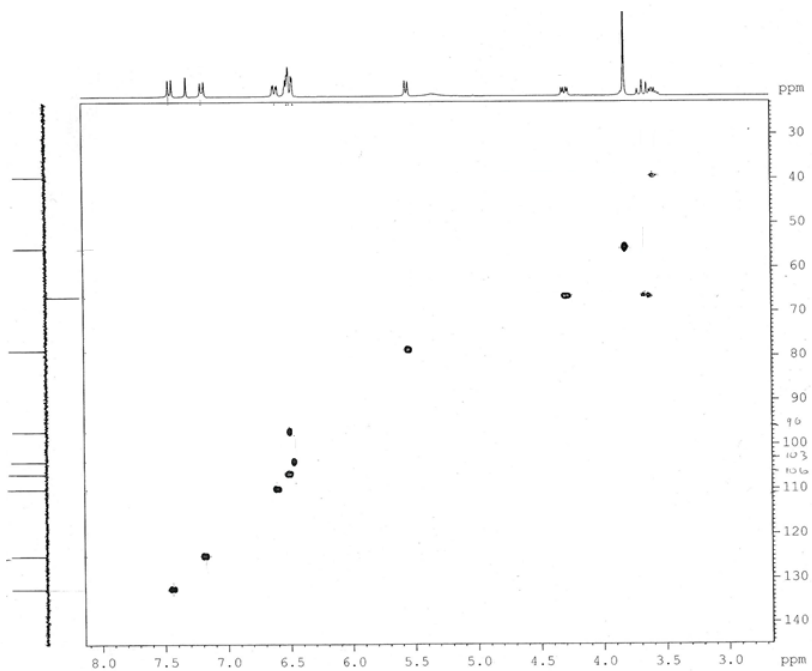


$^1\text{H}$  RMN (VII) $^{13}\text{C}$  RMN (VII)

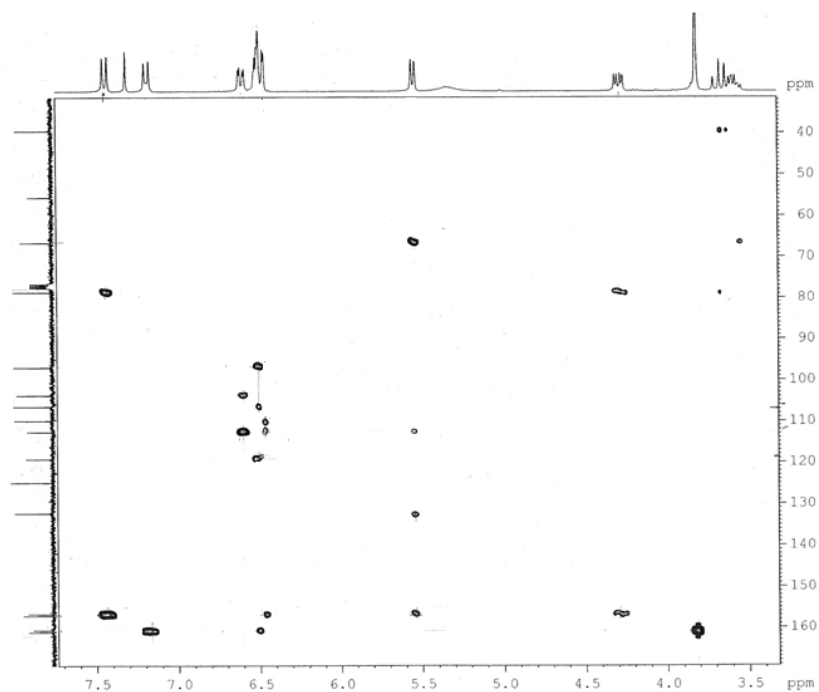
## Dept 135 (VII)



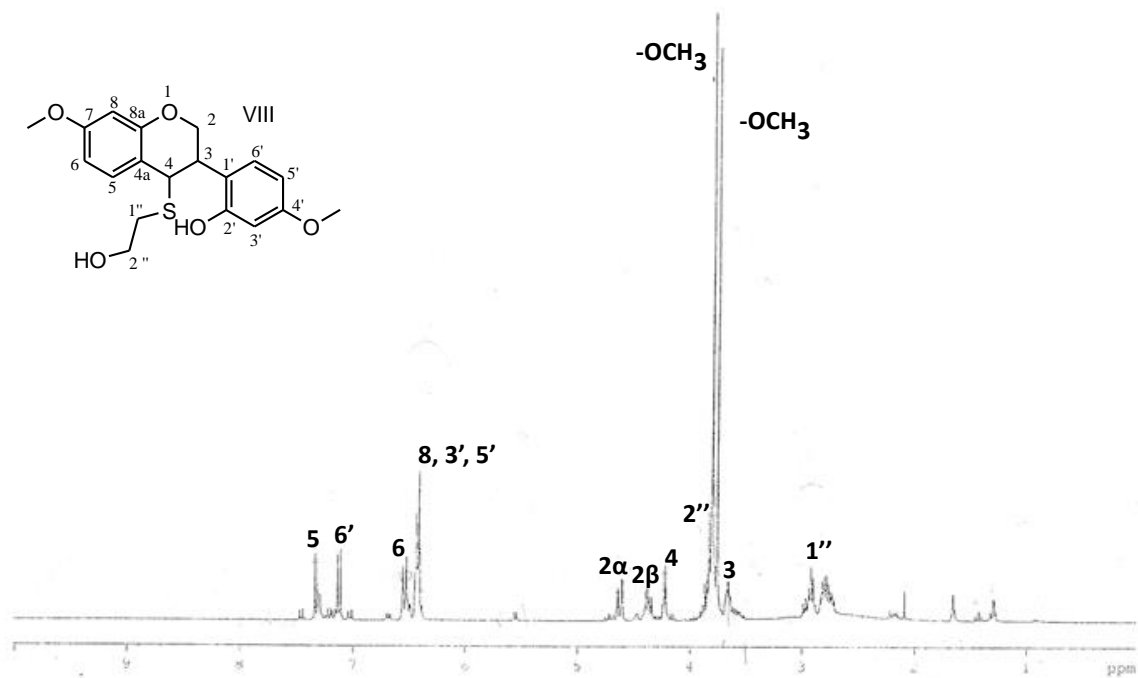
## COSY HH (VII)

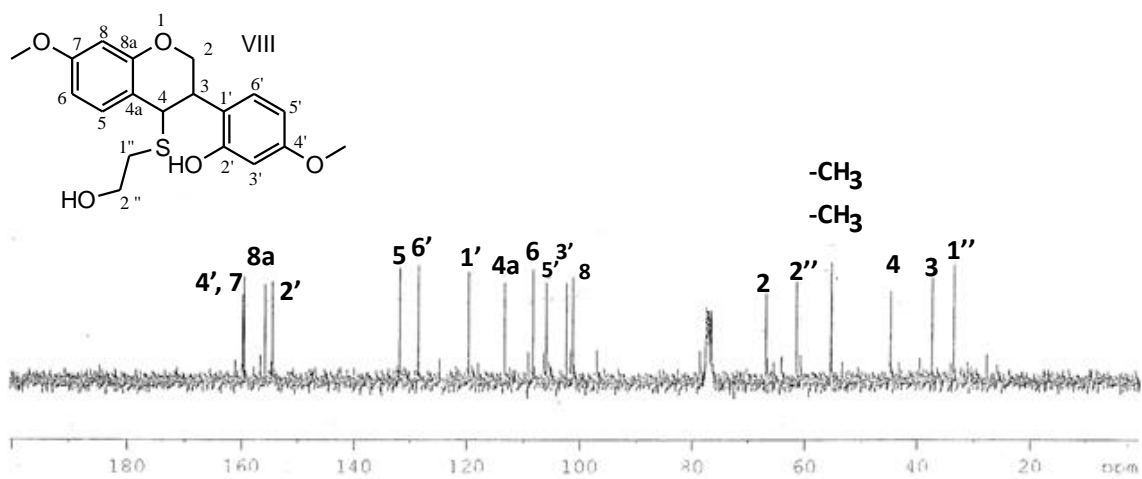
HSQC H-<sup>13</sup>C (VII)

HMBC H-<sup>13</sup>C (VII)

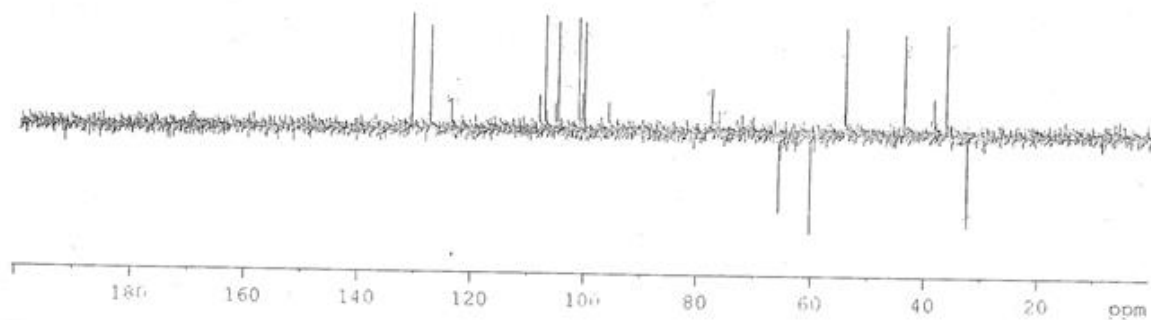


<sup>1</sup>H RMN (VIII)

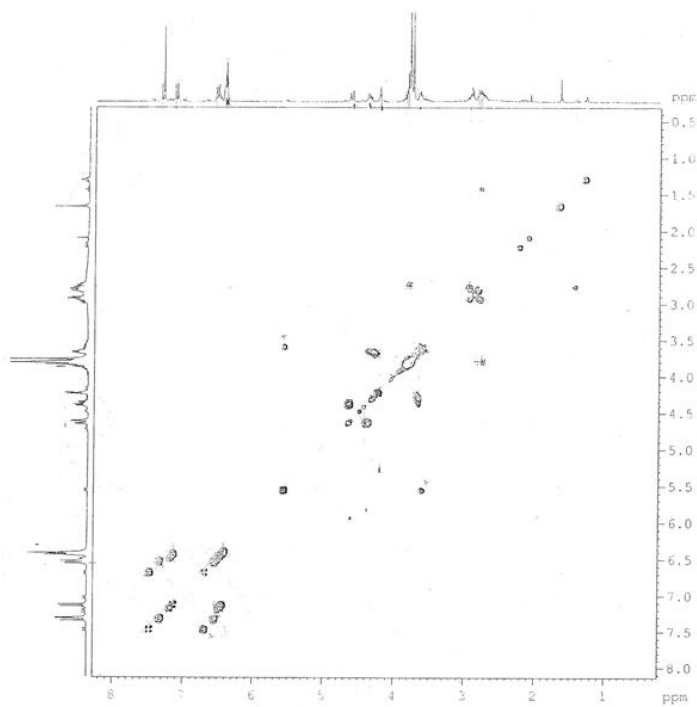


$^{13}\text{C}$  RMN (VIII)

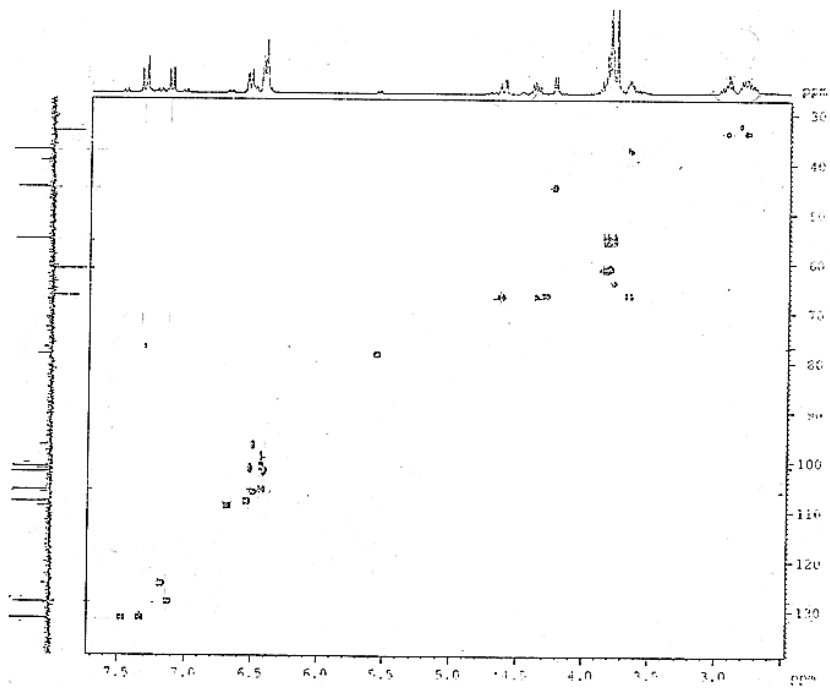
## Dept 135 (VIII)

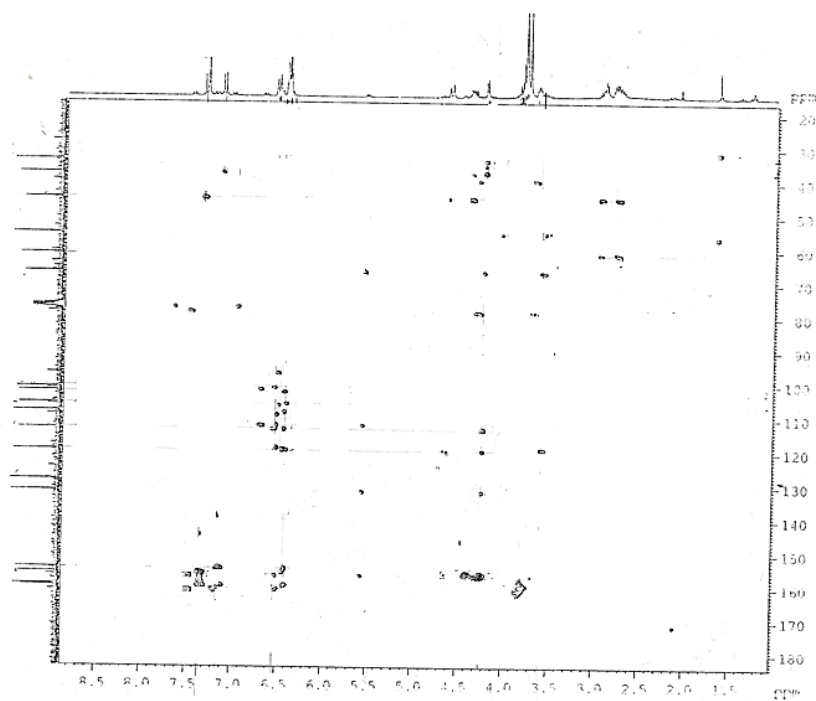


COSY HH (VIII)

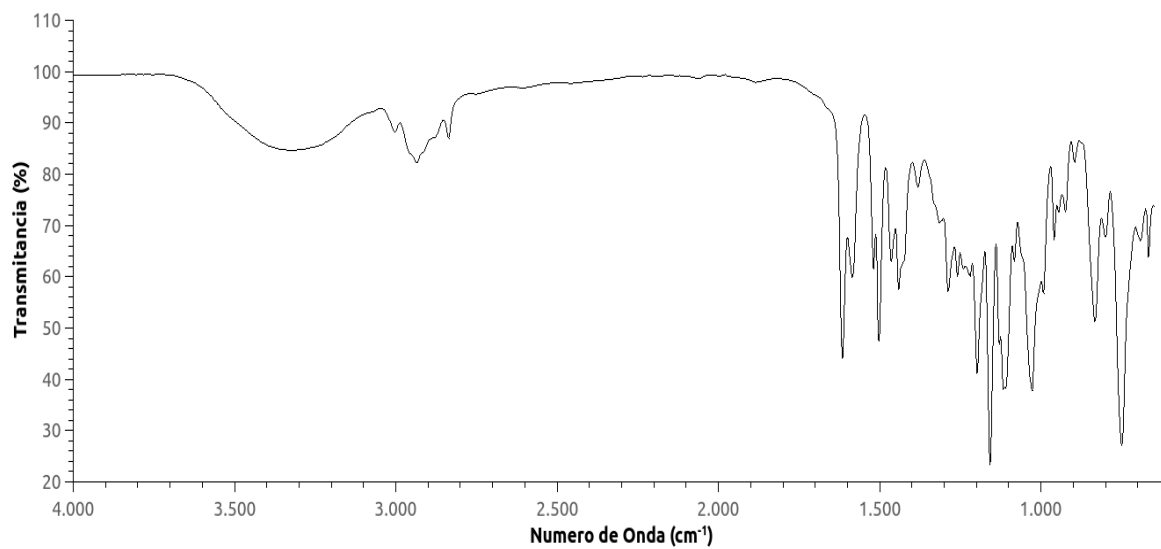


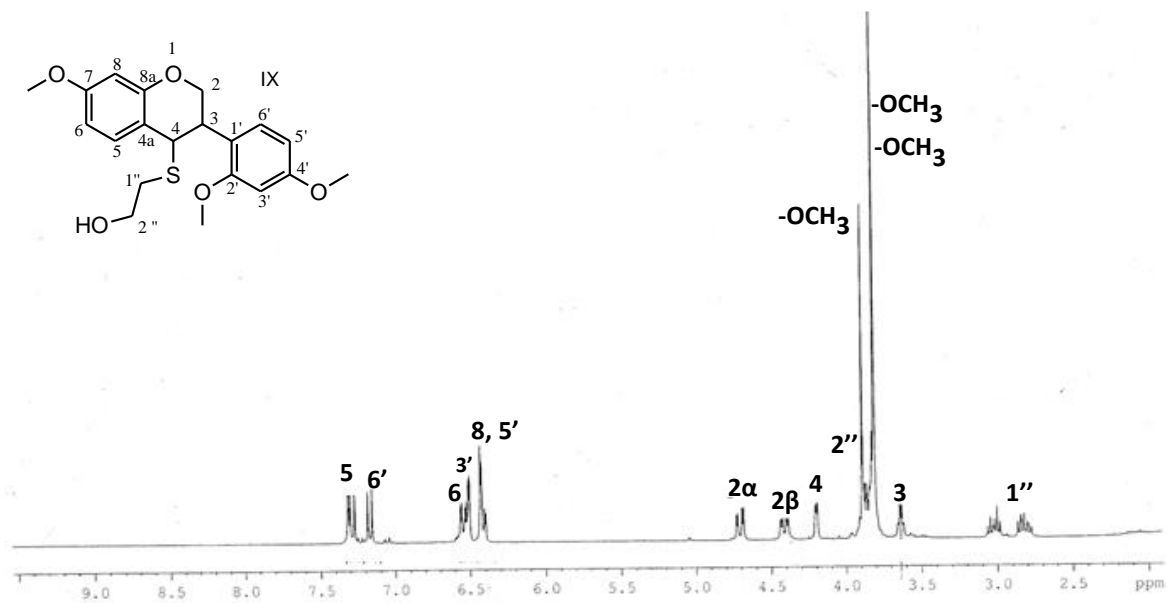
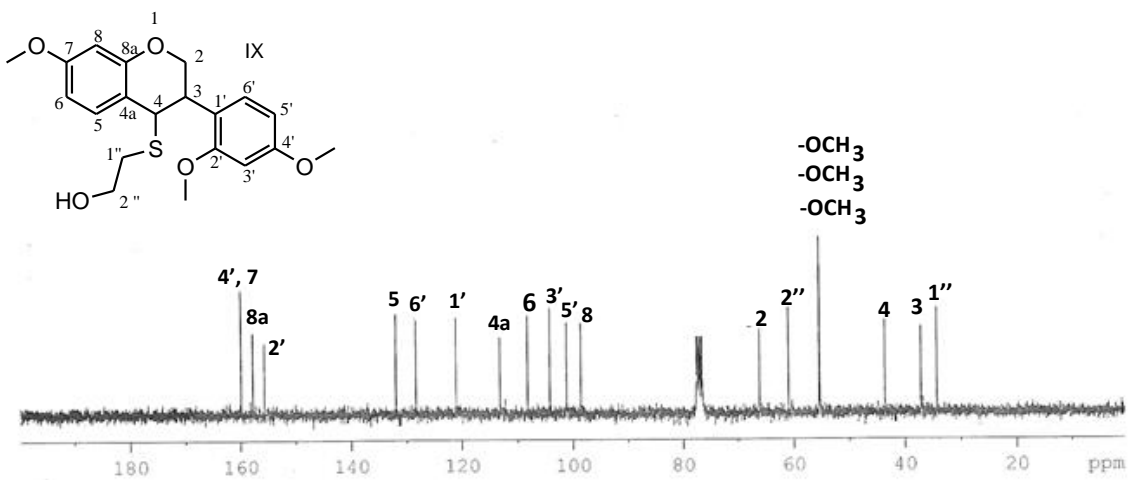
HSQC H-<sup>13</sup>C (VIII)



HMBC H-<sup>13</sup>C (VIII)

## Espectro IR (VIII)



$^1\text{H}$  RMN (IX) $^{13}\text{C}$  RMN (IX)



## Bibliografía

- Adriana, A., Stellavatoa, A., La Gattaa, A., Lambertib, M., Schiraldi, S. (2016). Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. *Toxicology Letters*, 249, 1–4.
- Ahuja I., Kissen R., Bones A. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17 (2), 73-90.
- Akinmoladun A., Tolulope M., Komolafe K., Adetuyi A., Akindahunsi A. (2015) .Effect of homopterocarpin, an isoflavonoid from *Pterocarpus erinaceus*, on indices of liver injury and oxidative stress in acetaminophen-provoked hepatotoxicity. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 26 (6):555-62.
- Ali A., Maqbool M., Ramachandran S., Alderson P. (2010). Gum Arabic as a Novel Edible Coating for Enhancing Shelf-Life and Improving Postharvest Quality of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 58: 42–47.
- Amiri, A., R. Dugas, A.L. Pichot, and G. Bompeix. (2008). In vitro and in vitro activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 126:13-19.
- Antus, S., Kurtan, T., Juhász, L., Kiss, L., Hollósi, M., & Májer, Z. S. (2001). Chiroptical properties of 2, 3-dihydrobenzo [b] furan and chromane chromophores in naturally occurring O-heterocycles. *Chirality*, 13(8), 493-506.
- Apostolos G., Koutita O., Tzavella K. (2009). Molecular Diversity and Assessment of Biological Characteristics of Greek *Colletotrichum lindemuthianum* Populations. *J. Phytopathol*, 157:311–318.
- Bernabò I., Guardia A., Macirella R., Sesti S., Crescente A., Brunelli E. (2016). Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicology*, 172, 56–66.

- Bhargavan B., Singh D., Gautam As., Mishra J., Kumac A., Goel A., Dixit M., Pandey R., Manickavasagam L., Dwivedi S., Chakravarti B., Jain G., Ramachandran R., Maurya R., Trivedi A., Chattopadhyay N., Sanyal S. (2012). Medicarpin, a legume phytoalexin, stimulates osteoblast differentiation and promotes peak bone mass achievement in rats: evidence for estrogen receptor  $\beta$ -mediated osteogenic action of medicarpin. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 27–38
- Blankson G., Osei-Fosu P., Adeendze E., Ashie D. (2015). Dissipation of four fungicides on greenhouse strawberries and an assessment of their risks. *Food Control*, 55, 215-220.
- Boland G. & Donnelly D. (1998). Isoflavonoids and Related Compounds. *Natural Product Reports*, 15(3), 241-260.
- Bosquez E., Ronquillo E., Bautista S., Verde J., Morales J. (2010). Inhibitory Effect of Essential Oils Against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus Stolonifer* in Stored Papaya Fruit and their Possible Application in Coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 57 132–137
- Carrière Y., Roff D. (1995). Change in Genetic Architecture Resulting From the Evolution of Insecticide Resistance: A Theoretical and Empirical Analysis. *Heredity* 75, 618-629.
- Cantrell C., Dayan F., Duke S. (2012). Natural Products As Sources for New Pesticides. *J. Nat. Prod.*, 75, 1231–1242
- Chung W., Chung W., Peng M., Yang H., Huang J. (2010). Specific Detection of Benzimidazole Resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* From Fruit Crops by PCR-RFLP. *New Biotechnology*, 27 (1): 17-24.
- Copping L., Duke S. (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Manage. Sci* 63, 524
- Costantino L., Barlocco D. (2006). Privileged Structures as Leads in Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem* 13, 65.
- Crombie L. (1999). Natural Products Chemistry and its Part in the Defence against Insects and Fungi in Agricultura. *Pestic. Sci.*, 55, 761-774.
- DANE Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2014). Boletín mensual insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Recuperado de

- [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/sipsa/insumos\\_factores\\_de\\_produccion\\_ene\\_2014.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/sipsa/insumos_factores_de_produccion_ene_2014.pdf)
- DANE Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2016). Boletín mensual insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Recuperado de [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/sipsa/Bol\\_Insumos\\_may\\_2016.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/sipsa/Bol_Insumos_may_2016.pdf)
- Dayan, F., Romagni J., Duke S. (2000). Investigating the Mode of Action of Natural Phytotoxins. *J Chem Ecol* 26: 2079.
- Dayan F., Cantrell C., Duke S. (2009). Natural Products in Crop Protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 4022-4034.
- Durango, D., Quiñonez, W., Torres, R., Gil, J., & Echeverri, F. (2002). Phytoalexin Accumulation in Colombian Bean Varieties and Aminosugars as Elicitors. *Molecules*, 7, 817-832.
- García R. y Pérez R. (2003). Fitoalexinas: Mecanismo de Defensa de las Plantas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 9(1): 5-10.
- Gwinn, K. D. (2018). Bioactive Natural Products in Plant Disease Control. *Studies in Natural Products Chemistry*, 56, 229-246.
- Goel, A., Kumar, A., Raghuvanshi, A. (2012). Synthesis, Stereochemistry, Structural Classification, and Chemical Reactivity of Natural Pterocarpans. *Chemical Reviews*, 113(3), 1614-1640.
- Gonçalves M., Vidigal P., Medeiros A., Pastor-Corrales M. (2009). Common Bean Landrace Jalo Listras Pretas Is the Source of a New Andean Anthracnose Resistance Gene. *Crop Sci*, 49:133–138.
- González F., Frías G., García A., Flores A. (2000). Resistencia de Genotipos de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a Razas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. y Magn.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18 (2): 87-91.
- Guest, D. (2017). Phytoalexins, Natural Plant Protection. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2 (3), 1152-1159.
- Kawaratani, Y., Matsuoka, T., Hirata, Y., Fukata, N., Nagaoka, Y., Uesato, S. (2015). Influence of the carbamate fungicide benomyl on the gene expression and activity of aromatase in the human breast carcinoma cell line MCF-7. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39, 292–299.

- Kessmann H., Choudhary A., Dixon R. (1990). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) III. Induction of medicarpin and cytochrome P450 enzyme activities in elicitor-treated cell suspension cultures and protoplasts. *Plant Cell Reports* 9:38-41.
- Khewkhom, N., and S. Shangchote. (2009). Postharvest antifungal activity of extracts and compounds from *Cinnamomum zeylanicum*, *Boesenbergia pandurata* and *Syzygium aromaticum* against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botryodiplodia theobromae*. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2, 125-132.
- Harvey, A. (2007). Natural products as a screening resource. *Curr. Opin. Chem. Biol* 11, 480.
- Hollomon D. (2012). Do We Have the Tools to Manage Resistance in the Future?. *Pest Manag Sci* 68, 149-154.
- Isman M. (2006). Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated Word. *Annu. Rev. Entomol* 51, 45-66.
- Jiménez-González, L., Álvarez-Corral, M., Muñoz-Dorado, M., Rodríguez-García, I. (2008). Pterocarpan: Interesting Natural Products with Antifungal Activity and other Biological Properties. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 125-154.
- Kefialew Y., Ayalew A. (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology*, 50: 8–11
- Koch M., Schuffenhauer A., Scheck M., Wetzel S., Casaulta M., Odermatt A., Ertl P., Waldmann H.(2005). Charting Biologically Relevant Chemical Space: A Structural Classification Of Natural Products (SCONP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17272.
- Mallet J. (1989). The Evolution of Insecticide Resistance: Have the Insects Won?. *Trends Ecol. Evol.* 4, 336-340.
- Melotto M., Balardin R., Kelly J. (2000). Host-Pathogen Interaction and Variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. D. Prusky, S. Freeman, and M.B. Dickman (Ed.), *Colletotrichum* host specificity, pathology, and host-pathogen interaction (pp. 346-361). APS press St. Paul, MN, USA.

- Mimbs W., Cusaac J., Smith L., McMurry S., Belden J. (2016). Occurrence of current-use fungicides and bifenthrin in Rainwater Basin wetlands. *Chemosphere*, 159, 275-281.
- Molina A., Gómez L., Umaña G. (2017). Identificación de especies del género *colletotrichum* asociadas a la antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.) en costa rica. *Agronomía Costarricense* 41(1): 69-80.
- Nakano V., Kussumi T., Lemes V., Kimura I., Rocha S., Alaburda J., Oliveira M., Ribeiro R., Faria A., Waldhelm K. (2016). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 36 (1), 40-48.
- Numpaque, M.A., L.A. Oviedo, J.H. Gil, C.M. García, and D.L. Durango. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology* 36:3-13.
- Obando, J. (2012). Selección de genotipos mejorados de tomate de árbol provenientes de semillas resistentes a la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). Sangolquí. Tesis (Ingeniería Agropecuaria). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sangolquí, Ecuador. Recuperada de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/7390>.
- Ong M., Alia A. (2015). Antifungal Action Of Ozone Against *Colletotrichum gloeosporioides* And control Of Papaya Anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*, 100: 113–119
- Ortiz M., Sánchez E., Castrejón M., Dantan E., Popoca E. (2013). Mechanisms And Strategies For Pesticide Biodegradation: Opportunity For Waste, Soils And Water Cleaning. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 29, 85-104
- Pastor-Corrales M., Otoyá M., Maya M. (1993). Diversidad de la virulencia de *Colletotrichum lindemuthianum* en mesoamerica y la región andina. *Fitopatología Colombiana*. 4(1): 44-54.
- Pastor-Corrales M., Tu J. (1994). Antracnosis. Marcial Pastor-Corrales y Howard F. Schwartz (Ed.), Problemas de producción de frijol en los tropicos (pp. 87-119). Cali, Valle del Cauca: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Petrosky R., Stanley D. (2009). Natural Compounds for Pest and Weed Control. *J. Agric. Food Chem* 57, 8171-8179.

- Pillmoor J., Wright K., Terry A. (1993). Natural Products as a Source of Agrochemicals and Leads for Chemicals Synthesis. *Pestic. Sci.*, 39, 131-140.
- Pineda R., Vizcaíno S., García C., Gil J., Durango D. (2012). Chemical Composition and Antifungal Activity of *Piper auritum* KUNTH and *Piper holtonii* C.DC. Against Phytopathogenic Fungi. *Chilean Journal Of Agricultural Research* 72(4): 507-515.
- Pinto J., Pereira R., Mota S., Ishikawa F., Souza E. (2012). Investigating Phenotypic Variability in *Colletotrichum lindemuthianum* Populations. *Phytopathology*. 102:490 – 497.
- Prusky, D., Keen, N.T. (1993). Involvement Of Preformed Antifungal Compounds In The Resistance Of Subtropical Fruits To Fungal Decay. *Plant Dis*, 77, 114–119.
- Prusky, D., Karni, L., Kobil, I., Plumbley, R.A. (1990). Induction Of The Antifungal Diene In Unripe Avocado Fruits: Effect Of Inoculation With *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 37, 425–435.
- Quiroga, I. A. (2018). Antracnosis, una enfermedad limitante para la producción de papaya. Recuperado en Agosto 20 de 2018 de <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/antracnosis>
- Ratnayake B., Savitri N., Swarna K. (1989). An Antifungal Constituent From The Stem Bark Of *Butea monosperma*. *Journal of Ethnopharmacology*, 25:73-75.
- Rodríguez E., González J., Mayek N. (2008). La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27 (1): 53-63.
- Sangeetha C., Rawal R. (2008). Nutritional Studies of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. The Incitant of Mango Anthracnose. *World Journal of Agricultural Sciences* 4 (6): 717-720.
- Saraiva A., Diniz M., Ferreira V., Marcos M., Mourão A., Vieira V., Ribeiro M., Pinheiro E. (2013). *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 8 (1), 62-72.
- Selvan C., Jordan B., Prakash S., Mutisya D., Thilagavathi R. (2017). Pterocarpan: A natural lead molecule wjth diverse pharmacological properties. *European Journal od Medicinal Chemistry* 128: 219-236.

- Shults E., Shakirov M., Pokrovsky M., Petrova T., Pokrovsky A., Gorovoy P. (2016). Phenolic compounds from *Glycyrrhiza pallidiflora* Maxim. and their cytotoxic activity. *Natural Product Research*, 31:4, 445-452.
- Siddiqui, Y., Ali, A. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00011-9>.
- Sivakumar D., Hewarathgamagae N., Wijeratnam R., Wijesundera R. (2002). Effect Of Ammonium Carbonate And Sodium Bicarbonate On Anthracnose Of Papaya. *Phytoparasitica*, 30, 486–492.
- Smalling K., Reilly T., Sandstrom M., Kuivila K. (2013). Occurrence And Persistence Of Fungicides In Bed Sediments And Suspended Solids From Three Targeted Use Areas In The United States. *Science of the Total Environment*, 447,179–185.
- Ultee A., Bennik M., Moezelaar R. 2002. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4) : 1561–1568.
- VanEtten H. 1967. Antifungal Activiti of Pterocarpans and Other selected Isoflavonoids. *Phytochemistry* 15:655-659.
- Veloso PA, Pimenta AT, de Sousa FM, Falcão MJ, Gramosa NV, da Silva JN, Silveira ER, Lima MA. 2012. New flavonoids and coumarins from *Platymiscium floribundum* Vogel. *J. Braz. Chem. Soc.* 23: 1239-1243.
- Villadiego, F., Villalba, M., & Arrázola, G. (2016). Relación del grado de madurez con las propiedades fisicoquímicas de la papaya (*Carica papaya* L.) Tainung. *Agronomía Colombiana*, 34(1Supl), S929-S932.
- Wang Z., Cang T., Qi P., Zhao X., Xu H., Wang X., Zhang H., X Wang. (2015). Dissipation Of Four Fungicides On Greenhouse Strawberries And An Assessment Of Their Risks. *Food Control*, 55, 215-220
- Weichenthal S., Moase C., Chan P. (2012 ). A Review Of Pesticide Exposure And Cancer Incidence In The Agricultural Health Study Cohort. *Ciência & Saúde Coletiva*, 17 (1), 255-270.
- Wilkinson, C., Killeen, J. (1996). A Mechanistic interpretation of the oncogenicity of chlorothalonil in rodents and an assessment of Human relevance. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, 24, 69–84.

- Wu D., Zhang S., Liu Y., Wu X., Zhu G., Zhang Y., Wei W., Liu H., Chen A. (2015). Synthesis, Biological Activities, and Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Study of Novel Camptothecin Analogues. *Molecules*, 20, 8634-8653.
- Xavier N., Facchinib L., Gastal A., Tomasic E. (2012). Pesticides and respiratory symptoms among farmers. *Rev Saúde Pública*. 39(6), 973-981.
- Xu J., Zhou F., Ji B., Pei R., Xu N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 47: 174–179
- Yagi, A., Fukanaga, M., Akita, K., Fujimoto, K., & Okuzako, N. (1993). Antifungal pterocarpan derivatives. *The japanese Society of Pharmacognosy*, 47(2), 105-110.
- Zhang H., Zhang L., Hu X., Zhou Y., Ding C., Yang R., Wang X., Li D. (2014). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Artemisinin from *Artemisia annua* L. by Response Surface Methodology. *Separation Science and Technology*, 49: 673–681.