



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Búsqueda de agentes fitosanitarios
provenientes de especies del género
Piper (Piperaceae) para el control de
Fusarium oxysporum f.sp.
*passiflorae***

Jorge Emilio Parra Amin

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia

2019

II Búsqueda de agentes fitosanitarios provenientes de especies del género *Piper* (Piperaceae)
para el control de *Fusarium oxysporum f.sp.passiflorae*

Búsqueda de agentes fitosanitarios provenientes de especies del género *Piper* (Piperaceae) para el control de *Fusarium oxysporum f.sp.* *passiflorae*

Jorge Emilio Parra Amin

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctorado en Ciencia Química

Director:

Ph.D. Luis Enrique Cuca Suárez

Línea de Investigación:

Productos Naturales Vegetales.

Grupo de Investigación:

Estudio Químico y de Actividad Biológica de Rutaceae y Myristicaceae Colombianas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C, Colombia

2019

A Dios Todopoderoso

A mis padres y hermanos

A mis niñas lindas

«Al infinito ... ¡y más allá!» "Buzz Lightyear"

Agradecimientos

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, sede Bogotá por permitirme realizar mis estudios a nivel de Doctorado.

A COLCIENCIAS por la Beca Doctorado -Nacional 6172.”

Al profesor Diego Gamba de la Universidad de los Andes, por permitirme realizar la pasantía en su grupo “Laboratorio de síntesis asimétrica bio y organocatálisis”. Para realizar la parte sintética de este trabajo.

A la profesora Azucena González por guiarme en mi pasantía en Madrid-España en el Instituto de Ciencias Agrarias (ICA), CSIC donde aprendí a realizar los ensayos de actividad biológica.

A mis padres por ese apoyo de padres que siempre necesitamos a mis hermanos por su comprensión.

A mi director de tesis el Dr Luis Enrique Cuca Suárez que me acogió por todos estos años desde la maestría, por su paciencia, su confianza, enseñanzas y todos los momentos vividos en el grupo Productos Naturales. A los profesores Wilman Delgado, Mónica Ávila y Fabian López por sus conocimientos.

De forma muy especial a mis amigos, colegas Julieth Prieto, Oscar Patiño y Diego Muñoz, por todo su tiempo enseñándome, por depositar en mi confianza, gracias.

A todos los compañeros que conocí durante este proceso, a mis amigos UniAndinos,(Milton, Nataly, Juan Manuel, Gómez, Álvaro, Andrea) por su acogida en el laboratorio y enseñanzas en especial a Andrés Garzón.

A mis amigos “Españoles” que me acogieron y me brindaron sus conocimiento y amistad, Lucia, Enrique, Felipe en especial a Álvaro, Beatriz y Viri “la mexicana”.

A mis amigos y segunda familia: Tatiana, Erika, Jeison, Ilya, Dalia, Juan, Alberto, Eduar, Laura, Laurita, Luis Fernando, Jenifer, Harold, Andres, Daniela, Stephanie y a las semillas.

Resumen

El presente trabajo contribuyó en la búsqueda de agentes fitosanitarios para el control de *Fusarium oxysporum f.sp.passiflorae* mediante el estudio fitoquímico del extracto de inflorescencias de *Piper cumanense*, que permitió el aislamiento y la identificación de diferentes compuestos, cinco derivados de ácido benzoico abiertos y cerrados (cromenos) entre ellos un nuevo compuesto llamado ácido (2S)-2-metil-2-(4'-metil-pent-3'-enil-8-(3''-metil-but-2''-enil))-4-oxo-cromano-6-carboxílico **N9**, el cual se denominó ácido oxocuménico, un sesquiterpeno y mezcla de esteroides. Se realizó la síntesis de análogos y derivados de cromenos, obteniendo 41 compuestos sintéticos. Posteriormente se evaluó la actividad antifúngica y los efectos tóxicos de los compuestos naturales y sintéticos, encontrando que los compuestos naturales ácido-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico **N10** y ácido (2'Z) cumenico **N2**, presentaron los menores valores de CI_{50} 7,2 y 18,7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. El compuesto **N10** es el único compuesto de los evaluados que presentó actividad fungicida. Los compuestos sintéticos la cromona y el cromanol bromado **S3b** y **S4b**, fueron los compuestos con los menores valores de CI_{50} 6,0 y 6,4 $\mu\text{g/mL}$ correspondientemente. Estos compuestos naturales y sintéticos también presentaron los menores efectos tóxicos.

En comparación con el control positivo Benomil® utilizados por los campesinos en el control de esta enfermedad en los cultivos de Gulupa, estos compuestos presentan concentraciones y efectos tóxicos bajos, haciéndolos agentes fitosanitarios promisorios. Por último, se planteó un modelo computacional basado en farmacóforo, utilizando las características farmacofóricas de los compuestos más activos para predecir 16 nuevos compuestos activos.

Palabras clave: *Piper cumanense*, antifúngico, cromeno, *Fusarium oxysporum f.sp.passiflorae*. fitotoxicidad, farmacóforo.

Abstract

The present study contributed in the search of phytosanitary agents for the control of *Fusarium oxysporum f.sp.passiflorae* by means of the phytochemical study of the inflorescence extract of *Piper cumanense*, which allowed the isolation and identification of different compounds, five benzoic acid derivatives, opened and closed (chromenes) including a new compound called (2*S*)-2-methyl-2-(4'-methyl-pent-3'-enyl-8-(3"-methyl-but-2"-enyl)-4-oxo-chroman-6-carboxylic acid **N9**, which was called oxocumnic acid, a sesquiterpene and a mixture of sterols. As a result of the synthesis of chromosome analogs and derivatives, 41 synthetic compounds were obtained. Later the antifungal activity and the toxic effects of the natural and synthetic compounds were evaluated, finding that the natural compounds 2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carboxylic acid **N10** and (2'*Z*) cumenic acid **N2**, showed the lowest values of IC₅₀ 7.2 and 18.7 µg/mL respectively. The compound **N10** is the only compound of the evaluated that presented fungicidal activity. The synthetic compounds chromone and brominated chromanol **S3b** and **S4b**, were the compounds with the lowest values of IC₅₀ 6.0 and 6.4 µg/mL correspondingly. These natural and synthetic compounds also had the least toxic effects.

In comparison with the Benomil® positive control used by farmers in the control of this disease in Gulupa crops, these compounds have low toxic concentrations and effects, making them promising plant protection agents. Finally, a computational model based on pharmacophore was proposed, using the pharmacoforic characteristics of the most active compounds to predict 16 new active compounds.

Key words: *Piper cumanense*, antifungal, chromene, *Fusarium oxysporum f.sp.passiflorae*, phytotoxicity, pharmacophore.

Contenido

	Pág.
Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Tablas	XV
Abreviaturas y acrónimos.....	XVI
Introducción general.....	1
1. Estudio fitoquímico de <i>Piper cf cumanense</i> Kunth	4
1.1 Introducción.....	4
1.2 Generalidades del género <i>Piper</i>	6
1.2.1 Descripción botánica y morfológica del género <i>Piper</i>	6
1.2.2 Distribución geográfica del género <i>Piper</i>	7
1.2.3 Estudios etnobotánicos, fitoquímicos y actividad biológica en el género <i>Piper</i>	7
1.2.4 Metabolitos aislados del género <i>Piper</i> con actividad antifúngica.....	8
1.3 Parte experimental	13
1.3.1 Procedimientos generales.	13
1.3.1.1 Cromatografía.....	13
1.3.1.2 Técnicas empleadas para la elucidación y caracterización de los compuestos.....	14
1.3.1.3 Recolección de la muestra.....	14
1.3.1.4 Preparación de extractos etanólicos.	14
1.3.1.5 Ensayo de bioautografía.....	15
1.3.1.6 Fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto de inflorescencias de <i>P. cf. cumanense</i>	15
1.4 Resultados y discusión de resultados.....	18
1.4.1 Estudio fitoquímico realizado en inflorescencias de <i>P. cf cumanense</i> Kunth..	18
1.4.2 Elucidación estructural de los compuestos N1 y N2	20
1.4.3 Elucidación estructural del compuesto N9	20
1.4.4 Determinación de la presencia de los compuestos aislados en los extractos provenientes de otros órganos de <i>Piper cumanense</i>	26
1.5 Conclusiones.....	30
1.6 Anexos fitoquímica.....	31
1.7 Anexos de cromatografía	44

XII Búsqueda de agentes fitosanitarios provenientes de especies del género *Piper* (Piperaceae)
para el control de *Fusarium oxysporum f.sp.passiflorae*

Lista de figuras

Figura 1-1 Principales características morfológicas de especies del género <i>Piper</i> . Se caracterizan principalmente por las inflorescencias (1), nudos en los Tallo (2) y presentan variedad de hoja (3).	7
Figura 1-2 Esquema general de fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en las inflorescencias de <i>Piper cf. cumanense</i> Kunth	17
Figura 1-3 compuestos aislados de las inflorescencias de <i>Piper cf. cumanense</i> Kunth. .	19
Figura 1-4 fotos de los compuestos N1 y N2	20
Figura 1-5 Espectro RMN ¹ H para el compuesto N9 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	21
Figura 1-6 Espectro ATP para el compuesto N9 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	22
Figura 1-7 Espectro HMQC para el compuesto N9 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	23
Figura 1-8 Espectro COSY ¹ H- ¹ H para el compuesto N9 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	24
Figura 1-9 Espectro HMBC para el compuesto N9 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	25
Figura 1-10 Estructura del ácido oxocumenico N9	26
Figura 1-11 (A) : Cromatograma del extracto de hojas, obtenido por los detectores DAD y ELSD, (en negro UV 254 nm y en azul Light scattering). (B) Cromatograma del extracto de hojas obtenido por LC-MS.	27
Figura 1-12 Perfiles cromatográficos del extracto de inflorescencias y los compuestos mayoritarios, identificados por comparación de tiempo de retención, espectros UV y de masas.	29

XIV Búsqueda de agentes fitosanitarios provenientes de especies del género *Piper* (Piperaceae)
para el control de *Fusarium oxysporum f.sp.passiflorae*

Lista de tablas

Tabla 1-1 Clasificación taxonómica del género <i>Piper</i>	6
Tabla 1-2 Comparación de la presencia de compuestos aislados en los diferentes extractos de <i>P. cumanense</i> , indicando los tiempos de retención por las dos metodologías y los valores de m/z de cada compuesto aislado del extracto de inflorescencias.	29

Abreviaturas y acrónimos

AcOEt	Acetato de etilo
AcOiP	Acetato de isopropilo
APT	Attached Proton Test
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CF	Cromatografía en columna Flash
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLV	Cromatografía Líquida al vacío.
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
d	Doblete
DAD	detector de arreglo de diodos
dd	Doble doblete
DEPT	Distorsionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetil sulfóxido
EdP	Eter de petróleo
ELSD	Light scattering detector
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectros de masa de alta resolución
ESI	Ionización por electro spray
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
HMBC	¹ H-Detected Multiple Bond Heteronuclear Multiple Quantu
HMQC	¹ H-Detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IR	Espectroscopia infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m/z	Relación masa / carga
m/z	Relación masa / carga
Me	Metilo
MeOH	Metanol
QTOF- LCMS	Quadrupole Time of Flight Liquid Chromatography Mass Spectrometry
RMN	Espectroscopia Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrogeno

s	Singlete
t	Triplete
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamientos Químicos (RMN)

Introducción general

La actividad agrícola ha sido desarrollada por el hombre desde tiempos remotos para la producción de alimentos y de diversos productos aplicables en diferentes áreas. Esta actividad juega un papel muy importante en el desarrollo de los países, contribuyendo principalmente de tres formas: como actividad económica (fuente de empleo y reducción de la pobreza), como medio de subsistencia (combatir el hambre) y como protector ambiental (seguridad alimentaria, preservación de la diversidad biológica y apoyo al desarrollo sostenible ambiental)¹⁻². En países en desarrollo como Colombia la agricultura es un factor de gran importancia, pues representa alrededor del 7-8 % del Producto Interno Bruto (PIB), es responsable de más del 60% del total de la producción alimentaria y del 70% del empleo agrícola ³.

Colombia cultiva y exporta diversos productos entre los que se destacan el café, el algodón, la caña de azúcar, las frutas y las flores. Las frutas ocupan generalmente el cuarto lugar de los productos agrícolas exportados por el país, siendo las denominadas “frutas de la pasión” unas de las más representativas y entre las que se encuentran el maracuyá, curuba, granadilla y gulupa. Estas frutas pertenecientes a especies del género *Passiflora* y la familia *Passifloraceae*, son muy apetecidas a nivel internacional principalmente por países europeos, ocupando el tercer puesto de las exportaciones de frutas frescas en el país con más de 4800 toneladas al año ⁴⁻⁵. La demanda de estos productos a nivel nacional e internacional ha aumentado considerablemente en los últimos años, por lo que se hace necesario elevar la competitividad de los cultivos, principalmente sobre la base de aumentar la cantidad de áreas cultivadas, mejorar los rendimientos de producción, minimizar las pérdidas en cosecha y postcosecha, y disminuir los costos de producción. En este sentido se ha promovido el asocio de los agricultores, se ha fomentado la utilización de las buenas prácticas agrícolas y de la tecnificación de cultivos. Aunque las medidas adoptadas han elevado la competitividad de los cultivos, no han sido totalmente eficientes para el control de las pérdidas ocasionadas por plagas y enfermedades, por lo que en los últimos años muchas investigaciones se han encaminado hacia la búsqueda de sustancias con potencial aplicabilidad en el tratamiento y control de las plagas que afectan a estos cultivos ⁶⁻⁷.

Los cultivos de frutas provenientes de especies del género *Passiflorae* son atacados por diversos patógenos entre los cuales se destaca el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae*, cuya afectación reduce en forma considerable la calidad, el valor comercial y la viabilidad de los frutos. Este hongo fitopatogéno ocasiona el marchitamiento vascular que xonlleva a la muerte de las plantas infectadas, generando altas pérdidas en cultivos

que suelen ser superiores al 60%. Adicionalmente es un hongo saprófito que puede sobrevivir muchos años en el suelo (alrededor 40 años) en estado latente, por lo que una vez afectado el suelo es difícil su erradicación y generalmente obliga al reemplazo del tipo de cultivo⁸⁻¹³. La estrategia de control de este hongo fitopatógeno se basa en un adecuado manejo integrado del cultivo y dentro del cual se utilizan principalmente fungicidas sistémicos de tipo benzimidazol. Pero, muchos de estos productos químicos además de ser poco selectivos e ineficaces, incrementan los costos de producción, disminuyen la calidad de los productos (los productos son rechazados si presentan trazas de fungicidas no permitidos en mercados internacionales), son tóxicos y causan serios problemas de contaminación ambiental. De este modo se hace necesario el desarrollo de agentes fitosanitarios eficaces y de bajo impacto ambiental que permitan controlar el hongo *F. oxysporum f. sp. passiflorae*¹⁴⁻¹⁶

En búsqueda de nuevos agentes fitosanitarios las plantas representan una alternativa interesante y prometedora debido a que estas producen diversos tipos de compuestos bioactivos que pueden llegar a ser utilizados como métodos de control, o pueden ser la fuente de inspiración para el desarrollo de sustancias más activas. Los estudios fitoquímicos han tomado gran impulso en la búsqueda de sustancias útiles a nivel agrícola, con el fin de encontrar soluciones económicas y de bajo impacto ambiental para el control de plagas y enfermedades¹⁷⁻¹⁸. Por tal motivo varios grupos de investigación se han interesado en estas problemáticas y han creado asociaciones y redes de investigación enfocadas en la solución de problemas fitosanitarios que afectan a diversos cultivos. Tal es el caso de la Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-Rifrutbio, quien en la actualidad se encuentra desarrollando el proyecto titulado: "Ecofisiología, nutrición mineral y manejo integrado de plagas y enfermedades en aguacate, granadilla, curuba, gulupa y tomate de árbol orientados hacia su manejo agronómico, como materia prima para el desarrollo de productos de interés comercial". Uno de los objetivos a desarrollar en esta propuesta está encaminado a contribuir en la búsqueda de agentes fitosanitarios derivados de especies vegetales de la familia Piperaceae para la solución de problemas fitosanitarios que afectan los cultivos de especies frutales tropicales colombianas en particular a las frutas del género *Passiflora* (granadilla, curuba, gulupa y otras).

En el país crecen diferentes familias de plantas entre las que podemos mencionar por su importancia económica, usos tradicionales y composición química, la familia Piperaceae. el género *Piper* es de los más representativos de la familia y se caracteriza por el contenido de diversos metabolitos con actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos¹⁹⁻²⁴

El grupo de investigación "Estudio Químico y de Actividad Biológica de Rutaceas y Myristicaceas Colombianas" de la Universidad Nacional de Colombia desde el año 2005 inició investigaciones de quimioprospección con especies del género *Piper* enfocadas en la búsqueda de agentes fitosanitarios que permitan controlar algunas plagas y enfermedades que afectan a cultivos de importancia económica para el país. Durante los 10 años de estas investigaciones se realizó un screening de actividad antifúngica preliminar contra hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum* sp y *Botrytis cinerea*) con varios extractos de especies del género *Piper*, encontrándose que muchas de las especies

evaluadas presentaron actividad promisorio contra los microorganismos objeto de estudio. Los promisorios resultados de actividad antifúngica impulsaron el desarrollo de estudios fitoquímicos que permitieron el aislamiento de algunos de los compuestos responsables de esta actividad, entre los cuales hay flavonoides, derivados de ácido benzoico y cromenos²⁵⁻²⁶

Algunas de estas sustancias (principalmente flavonoides y amidas) han sido fuente de inspiración para el desarrollo de investigaciones en síntesis de análogos, determinación de relaciones de estructura-actividad y búsqueda de farmacóforos por métodos computacionales, cuyo objetivo ha estado centrado en la potencialización de la actividad antifúngica que han presentado las sustancias naturales. A partir de flavonoides aislados de *P. subtomentosum* y *P. septuplinervium* se realizaron análogos y derivados, logrando establecer algunas relaciones de estructura y actividad contra *S. frugiperda*²⁵ y de la especie *P. scutifolium* se aislaron amidas activas que fueron fuente de inspiración para sintetizar amidas análogas y derivadas. Con el grupo de amidas sintetizadas y naturales se establecieron relaciones de estructura y actividad y se sintetizaron amidas con mejor actividad contra los hongos *Cladosporium cladosporioides* y *C. sphaerospermum*²⁷.

Sin embargo, no hay estudios provenientes de especies de la familia Piperaceae encaminados a buscar sustancias que permitan controlar el hongo *F. oxysporum f. sp. passiflorae*, tampoco de síntesis, estructura-actividad o de estudios computacionales de cromenos como fuente de fitosanitarios. Por esta razón, se realizó un estudio preliminar a 32 extractos de género *Piper* contra *Fusarium oxysporum f. sp. Passiflorae* y se encontró que 12 especies presentan actividad contra este hongo (*P. cf. cumanense*, *P. artanthe* y *P. marginatum* presentaron los mayores halos de inhibición). El estudio fitoquímico de la especie *Piper cf. cumanense* aisló un compuesto cromeno que fue activo contra *Fusarium oxysporum*. También se tiene en cuenta la falta de bibliografía en estudios de estructura-actividad de estos compuestos (cromeno) en la aplicación a problemas en el sector agroindustrial.

La presente tesis doctoral contribuye a la búsqueda de agentes fitosanitarios que permiten controlar el hongo *F. oxysporum f. sp. passiflorae* y está organizada en tres capítulos:

- En el primer capítulo describe la identificación de los compuestos aislados del estudio químico del extracto de inflorescencias de *P. cf. Cumanense*.
- En el capítulo dos, describe el diseño, síntesis de análogos y derivados inspirados en los cromenos.
- En el capítulo tres, se expone la determinación de la actividad biológica contra este hongo fitopatógeno y los efectos tóxicos de los compuestos naturales y sintéticos. Finalmente, se establece el modelo de farmacóforo basado en los compuestos con menor CI_{50} y efectos tóxicos para predecir nuevos compuestos con actividad antifúngica contra este hongo.

1. Estudio fitoquímico de *Piper cf cumanense* Kunth

1.1 Introducción

Los productos naturales han sido utilizados principalmente como fuente de alimentos, medicinas y agentes controladores de plagas desde el principio de la humanidad. La investigación en productos naturales se ha desarrollado buscando aplicaciones en diferentes áreas entre las que se destacan la farmacéutica y agrícola. A nivel farmacéutico, se han hecho enormes contribuciones a la salud humana a través de descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades farmacéuticas, a tal punto que alrededor de la mitad de los productos farmacéuticos usados son derivados de fuentes naturales ²⁸⁻³²

A nivel agrícola, las investigaciones en productos naturales no son tan numerosas, pero se han desarrollado algunos plaguicidas de origen natural basados en principios activos como los piretroides, rotenona y nicotina, entre otros ³³⁻³⁴. Las múltiples aplicaciones de los productos naturales radican en la diversidad de metabolitos secundarios que suelen producir para interactuar con los agentes externos que los rodea. Estos compuestos han sido aprovechados en diferentes investigaciones hasta el punto de lograr el desarrollo de nuevos medicamentos y agroquímicos (algunos inaccesibles por otras vías) ³⁵. En este sentido las plantas representan una fuente inestimable para emprender investigaciones en diferentes campos, si se tiene en cuenta que de las 300.000 especies vegetales que se han reportado sólo alrededor de un 20 – 30 % han sido objeto de estudios fitoquímicos y de propiedades biológicas, lo que pone de manifiesto que aún quedan muchas especies por investigar que pueden ser fuente potencial de nuevas sustancias activas y/o útiles para el beneficio de la humanidad ³⁶⁻⁴¹.

Un campo de investigación que está tomando gran auge es la búsqueda de agentes fitosanitarios que permitan controlar plagas que afectan a plantas utilizadas con fines alimenticios o industriales ⁴²⁻⁴³. Por tal motivo varios grupos de investigación se han interesado en estas problemáticas y han creado asociaciones y redes de investigación enfocadas en la solución de problemas fitosanitarios que afectan a diversos cultivos.

Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad y en donde se encuentra un número importante de especies vegetales, muchas de las cuales no presentan estudios investigativos y otras solo tienen investigaciones parciales, hacen de nuestro país un lugar atractivo para emprender estudios multidisciplinarios dirigidos a la búsqueda de productos con aplicación en el sector agrícola.

En el país crecen diferentes familias de plantas entre las que podemos mencionar por su importancia económica a la familia Piperaceae, dada las aplicaciones que tienen algunas de sus especies a nivel alimenticio, industrial y medicinal ²¹. Las especies más características del género *Piper* son *P. nigrum* y *P. methystium*. De los frutos de *P. nigrum*

se obtiene la pimienta, condimento de gran importancia y demanda, tanto fue su demanda en el siglo XV que promovió la búsqueda nuevas rutas marítimas a Oriente desde Europa, generando el descubrimiento del continente Americano ⁴⁴. La infusión de la raíz de *P. methystium* (Kawa-Kawa) han sido utilizados durante las ceremonias mágico-religiosas de los indígenas en la Oceanía, por sus efectos alucinógenos y relajantes ⁴⁵.

Dentro de los 13 géneros que conforman a la familia Piperacece, el género *Piper* es el más representativo y se caracteriza por poseer especies con una amplia diversidad de metabolitos secundarios entre los que se destacan amidas, flavonoides, lignanos, fenilpropanos, derivados prenilados de ácido benzoico, terpenos y esteroides⁴⁶. Muchas de las sustancias, extractos, fracciones y compuestos obtenidas de especies del género *Piper* han mostrado significativa actividad biológica con posible aplicación en el sector agrícola ⁴⁷⁻⁴⁹. Siendo Colombia uno de los países donde se encuentra un número importante de especies vegetales pertenecientes al género *Piper*, muchas de estas especies no presentan estudios investigativos y otras solo tienen investigaciones parciales, hacen de este género atractivo para emprender estudios multidisciplinarios dirigidos a la búsqueda de productos con aplicación en el sector agrícola. ⁵⁰

En el capítulo 1 de esta investigación se describe el estudio fitoquímico realizado sobre la especie *Piper cumanense*, donde se describe la comparación de los extractos de diferentes órganos de la especie de estudio y del extracto de inflorescencias el aislamiento de compuestos que son identificados por técnicas espectroscópicas y espectrometrías.

1.2 Generalidades del género *Piper*

El género *Piper* comprende alrededor de 2500 especies, con aproximadamente 1500 especies identificadas y aceptadas, son conocidas comúnmente como “cordoncillos” debidos a la forma sus inflorescencias.

El género *Piper* es el género más representativo de la familia Piperaceae, ha sido utilizado desde la antigüedad como fuente de alimentos y medicinas, también estas especies son importantes para el ecosistema ya que sirven de alimentos para aves y murciélagos y atraen a insectos polinizadores ⁵¹. Las especies más conocidas de este género es la *P. nigrum*, fuente de la pimienta negra, *P. aduncum*, utilizada tradicionalmente como cicatrizante y antiséptica y *P. methystium* reconocida mundialmente por los efectos alucinógenos que causa las infusiones preparadas con la raíz de esta planta ^{20, 52}.

1.2.1 Descripción botánica y morfológica del género *Piper*

La familia *Piperaceae* cuenta con más de 3610 especies agrupadas en 13 géneros: *Artanthe*, *Lindenipiper*, *Macropiper*, *Manekia*, *Otonia*, *Peperomia*, *Piper*, *Piperanthera*, *Pothomorphe*, *Sarcorrhachis*, *Trianaeopiper*, *Verhuellia* y *Zippelia* de los cuales los más importantes y extensos son el género *Piper* seguido por el *Peperomia* ⁵³.

En la Tabla 1-1 se muestra la clasificación taxonómica del género *Piper* ⁵⁴

Tabla 1-1 Clasificación taxonómica del género *Piper*.

REINO	Plantae
FILO	Magnoliophita
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Piperales
FAMILIA	Piperaceae
GENERO	<i>Piper</i>

El género *Piper* es uno de los más diversos géneros entre el linaje de las angiospermas, así como de los bosques tropicales húmedos alrededor del mundo. Ecológicamente las especies del género *Piper* son componentes estructurales del sotobosque. Este género comprende, arbustos, hierbas o enredaderas y rara veces árboles. Son conocidos como “cordoncillos”, debido a la presencia de diminutas flores agrupadas en una inflorescencia en forma de espiga o en racimos con androceo formado entre 1-10 estambres y gineceo de 1-4 carpelos. Los tallos se caracterizan por la presencia de nudos engrosados y sus hojas presentan una gran variedad morfológica, pueden ser simétricas o asimétricas, alternas u opuestas, elípticas u ovaladas y sus frutos generalmente están en forma de bayas o drupas pequeñas y constan de una semilla ⁵⁵. En la Figura 1-1. Se ilustran algunas de las características morfológicas más representativas en el género *Piper*.

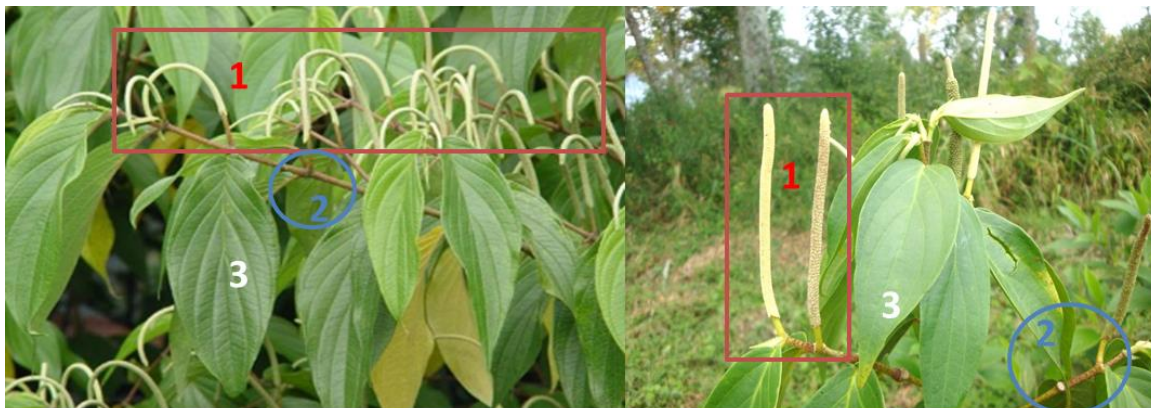


Figura 1-1 Principales características morfológicas de especies del género *Piper*. Se caracterizan principalmente por las inflorescencias (1), nudos en los Tallo (2) y presentan variedad de hoja (3).

1.2.2 Distribución geográfica del género *Piper*

El género *Piper* se caracteriza por poseer una gran difusión de especies ampliamente distribuidas a nivel mundial (alrededor de 2500 especies), principalmente en las regiones tropicales y subtropicales⁵⁵. Colombia es uno de los países con mayor distribución de especies pertenecientes a este género, pues se han encontrado en gran parte del territorio colombiano, principalmente en bosques húmedos y tropicales⁵⁶⁻⁵⁷

1.2.3 Estudios etnobotánicos, fitoquímicos y actividad biológica en el género *Piper*.

Diversas especies del género *Piper* han sido utilizadas en distintas partes del mundo, especialmente en América, Asia y África para el tratamiento de un sinnúmero de afecciones en humanos y para actividades agrícolas. Por ejemplo, las hojas de la especie *P. hostmannianum* var. *berbicense*, son utilizadas en la medicina tradicional latinoamericana como antimalárico. Los frutos en polvo de *P. nigrum* se utilizan en forma de cataplasmas en afecciones pulmonares, también como repelente de mosquitos causantes de enfermedades. Las hojas de *P. aduncum* en forma de decocción y en forma de tónico son usadas para controlar infecciones. En Colombia, en el departamento del Cauca se utilizan las hojas secas y trituradas hasta polvo de la especie *P. tuberculatum* para eliminar los piojos. En el Urabá, los indígenas Katíos usan los tallos de *P. marginatum* como dentífrico eficaz contra enfermedades dentales⁵⁸⁻⁶¹. En zonas cafeteras, se siembra *P. aduncum* en medio de los cultivos de café porque presentan un efecto repelente de plagas⁶²⁻⁶³.

De los estudios fitoquímicos realizados sobre especies del género *Piper*, se han encontrado diversos metabolitos, entre los más representativos están las amidas, flavonoides lignanos, neolignanos, fenoles y derivados prenilados de ácido benzoico⁶⁴.

Los metabolitos presentes en las especies del género *Piper* presentan múltiples actividades biológicas, resaltándose la actividad antifúngica.

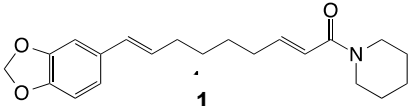
Dada esta riqueza química y sus aplicaciones a nivel etnobotánico, a muchos de los extractos, aceites esenciales y compuestos aislados en este género se les han realizado diversos ensayos de actividad biológica, obteniéndose resultados promisorios y que han permitido incluso confirmar sus usos etnobotánicos ⁶⁵. Por ejemplo, la especie *P. hostmannianum var. berbicense*, que es utilizada como antimalárico, se les ha determinado actividad contra *Plasmodium falciparum* y se han aislado los compuestos responsables de esa actividad ⁶⁶. De la especie *P. tuberculatum* utilizada por su acción insecticida se aislaron los compuestos que presentan esta actividad contra los piojos ⁶⁷. Los aceites esenciales obtenidos de diferentes órganos de las plantas del género *Piper* han presentado diferentes actividades biológicas principalmente insecticida ⁶⁸⁻⁷⁰ y antifúngica ^{19, 23, 71}.

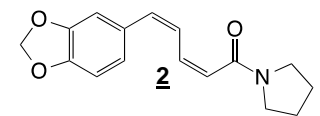
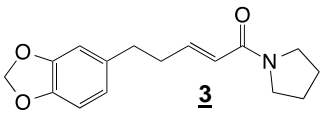
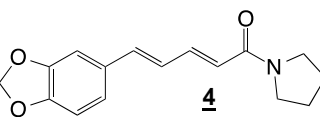
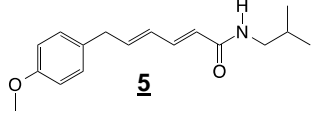
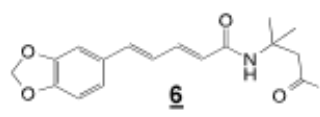
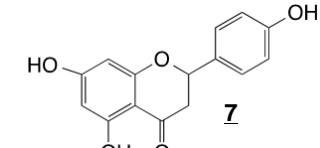
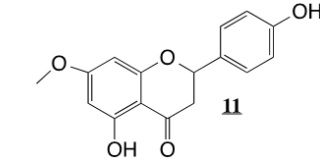
1.2.4 Metabolitos aislados del género *Piper* con actividad antifúngica.

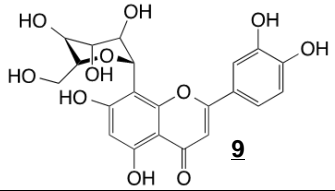
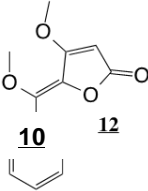
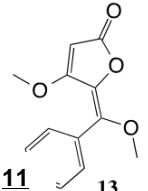
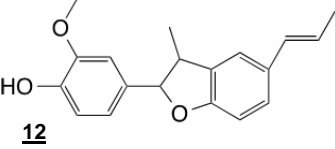
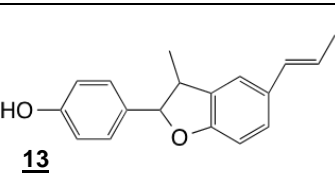
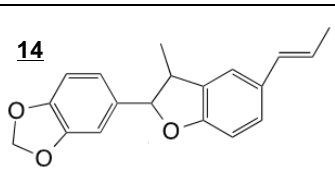
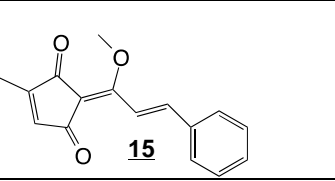
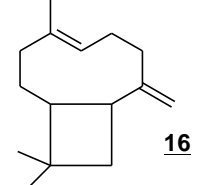
La mayoría de los estudios en búsqueda de antifúngicos provenientes del género *Piper* están enfocados en el control de hongos fitopatógenos, los hongos principalmente utilizados en las investigaciones son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinérea*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cladosporium sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora*, etc. ^{11, 72}.

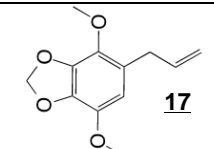
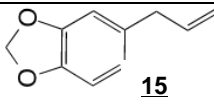
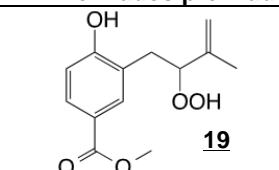
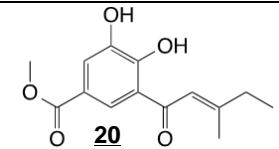
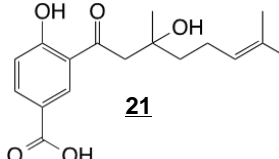
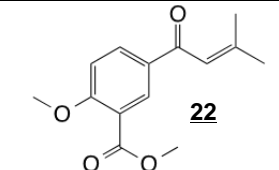
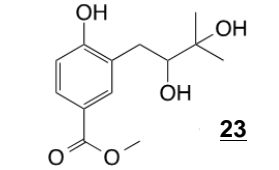
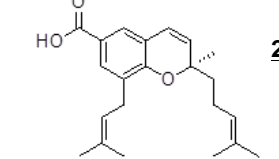
De los estudios químicos realizados sobre especies del género *Piper* han encontrado el aislamiento e identificación diversos metabolitos, entre los más representativos están las amidas, flavonoides, lignanos, neolignanos, derivados de ácidos benzoico y fenilpropanos ⁷³⁻⁷⁴. Los metabolitos presentes en las especies del género *Piper* presentan múltiples actividades biológicas, resaltándose la actividad antifúngica. A continuación, se presentan algunos ejemplos de los compuestos que presentan actividad antifúngica.

Las amidas son los metabolitos más característicos en las especies del género *Piper*, se encuentran generalmente en la cáscara del fruto y son las responsables de la sensación pungente y picante en la pimienta negra.

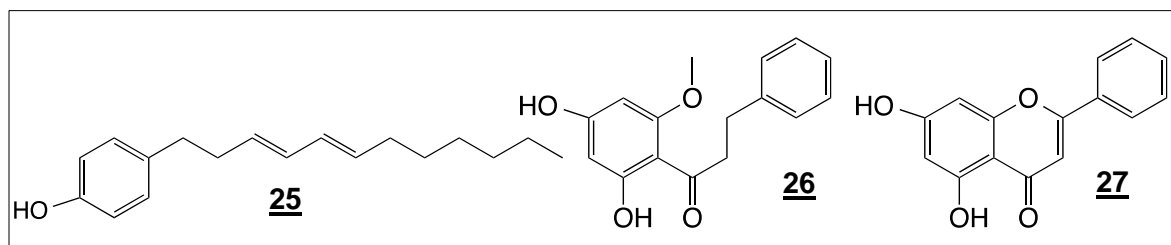
Amidas piperidinica			
Nombre (bibliografía)	Estructura	Fuente	Actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos
Piperonalina 1 ⁷⁵		Extractos etanólico <i>P. longum</i>	<i>Pyricularia</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Botrytis</i> y <i>Phytophthora</i> , con valores de CMI entre 0,5-0,25 µg/mL

Amidas pirrolidinicas			
Nombre (bibliografía)	Estructura	Fuente	Actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos
N-[10-(13,14-metilendioxfenil)-7-(E)-9-(Z)-pentadienoil]-pirrolidina 2 76-77		Extracto etanólicos <i>P. arboreum</i> , <i>P. tuberculatum</i> , <i>P. mollicomum</i> y <i>P. hispidum</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> y <i>C. cladosporioides</i> CMI entre 0,1 -1,0 mg/mL
N-[10-(13,14-metilendioxfenil)-9-(E)-pentadienoil]-pirrolidina 3 77			
N-[10-(13,14-metilendioxfenil)-7-(E)-9-(E)-pentadienoil]-pirrolidina 4 23, 71, 76-78			
Amidas isobutilamidas			
piperovatina 5 ⁷⁹		<i>P. scutifolium</i> Jack. <i>P. hoffmannseggianum</i> Roem. & Schult <i>P. flaviflorum</i> y <i>P. sarmentosum</i>	<i>C. sphaerospermum</i> y <i>C. cladosporioides</i> CMI 1 µg/mL <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i> , Cl ₅₀ 4,7 µg/mL
corcovadina 6 ²⁴			
Flavonoides			
Naringenina 7		<i>P. crassinervium</i>	<i>C. sphaerospermum</i> y <i>C. cladosporioides</i> CMI 1 µg/mL
Sakuranetina 8			

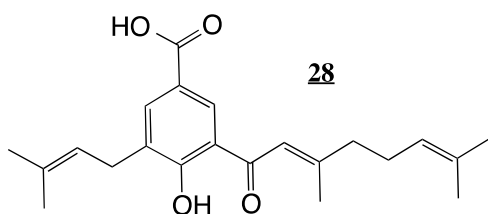
Orientina 9 80			
Piperolidos			
4,6-dimetoxi-5- <i>E</i> -fenilbutenolido 10		<i>P. malacophyllum</i> s	<i>C. sphaerospermum</i> y <i>C. cladosporioides</i> CMI 1 µg/mL
4,6-dimetoxi-5- <i>Z</i> -fenilbutenolido 11 ⁸¹			
Neolignanós			
Eupomatenoia-5 12		<i>P. solmsianum</i> seems	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Microsporium canis</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i> CMI ≤ 9 µg/mL con una potencia tan alta como el fármaco antifúngico estándar
Conocarpan 13			
Eupomatenoide-3 14 82-84			
Coruscanones			
Coruscanones A 15 85		<i>P. coruscans</i>	<i>C. albicans</i> , con CMI de 0,78 µg/mL comparado con el control positivo anfotericina 1µg/mL
Aceites esenciales			
β cariofileno 16 (10,5%)		<i>P. hispidum</i> , <i>P. aleyreanum</i> , y <i>P. anonifolium</i>	<i>C. sphaerospermum</i> y <i>C. cladosporioides</i> (<i>P. hispidum</i> actividad similar con el control positivo < 0,1 µg)

Apio <u>17</u> (22%)			
Safrol <u>18</u> (25%) 86			
β cariofileno <u>16</u> (26%)	<u>16</u>	<i>Piper aduncum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Inhibición del halo de crecimiento en un 95%
Safrol <u>18</u> (28%) 20	<u>18</u>		
Derivados prenilados de ácido benzoico			
benzoato 4-hidroxi-3-(2'-hidroperoxi-3'-metil-3'butenil) de metilo <u>19</u> ⁸⁷		<i>P. aduncum</i> y <i>P. hostmannianum</i>	<i>C. cladosporioides</i> y <i>C. sphaerospermum</i> , Cantidad mínima inhibitoria (5,0 µg)
éster metílico ácido lanceafólico <u>20</u> 88		<i>P. lanceafolium</i>	<i>C. albicans</i> CMI 100 µg/mL
Ácido crassinervico <u>21</u> ,		<i>Piper P. crassinervium</i> , <i>P. aduncum</i> , <i>P. Fuligineum</i> , <i>P. hostmannianum</i> , y <i>P. gaudichaudianum</i>	<i>C. cladosporioides</i> y <i>C. sphaerospermum</i> Cantidad mínima inhibitoria de 0,5, 10, 5,0 y 0,5 µg Comparables con el control positivo de 1 µg
Á aduncumeno <u>22</u>			
Á hostmaniano <u>23</u>			
Á gaudichaudianico <u>24</u> 22, 89			

Estudios realizados en el grupo de investigación “Laboratorio de Productos Naturales Vegetales (LPNV)” de la Universidad Nacional de Colombia, se determinó que el metabolito de tipo alquenilfenol gibbilimbol B **25** aislado de los frutos de *P. eriopodon* presenta actividad antifúngica frente al hongo *F. oxysporum f. sp dianthi*, presentó una cantidad mínima inhibitoria de 5 μg ⁹⁰ y contra *F. oxysporum f. sp lycopersici* fue de 10 μg ⁶. De la especie *P. septuplinervium* se aislaron dos flavonoides Uvangoletina **26** y Crisina **27** que también presentaron actividad contra *F. oxysporum f. sp dianthi* con una cantidad mínima inhibitoria de 2 μg para ambos compuestos, respecto al control positivo Benomil (50%) de 1 μg y contra *B. cinérea* de 100 y > 100 respectivamente⁹¹.



De las inflorescencias de *P. cumanense* se aislaron compuestos tipo derivados de ácido benzoico **28** y **24** (Á gaudichaudianico), también, aislado de la especie *P. kelleyi*^{26, 92}. El compuesto de tipo cromeno, presentó actividad antifúngica frente al hongo *F. oxysporum f.sp dianthi*, presentaron una cantidad mínima inhibitoria de 10 μg y 1 μg respectivamente, el cromeno presenta actividad similar al control comercial Benoagro®. También fueron activos contra el hongo fitopatógeno *Botritis cinérea* que atacan al género *Passiflora*, de 10 μg para ambos. Estudios preliminares presenta actividad contra *F. oxysporum f. sp. passiflorae*, estos estudios se realizaron en el grupo de investigación LPNV.⁹³



1.3 Parte experimental

1.3.1 Procedimientos generales.

1.3.1.1 Cromatografía

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron en cromatografía flash (CF), por aplicación de presión y mediante el uso de vacío para cromatografía líquida al vacío (CLV). La fase estacionaria utilizada para CF fue sílica gel 60 Merck (230 – 400 mesh) y para la CLV fue sílica gel 60H Merck (70 – 230 mesh). Los estudios cromatográficos, el monitoreo de las cromatografías en columna y control de pureza se realizó por cromatografía en capa delgada CCD, en la que se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck 0.20 mm de espesor. Los solventes empleados para las separaciones cromatográficas fueron de grado técnico (destilados y secados antes de su uso) y/o grado analítico. Como reveladores se utilizó una cámara saturada con vapores de I₂, vainilla 0,1 % en solución de etanol/H₃PO₄ 10 % v/v, anisaldehído 1% en etanol/H₂SO₄ 10% v/v y luz UV a λ 254 y 365 nm.

El análisis comparativo de los extractos y compuestos puros se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LCMS). Para la técnica HPLC se realizó en un equipo Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 (HPLC-DAD-ELSD), equipado con un detector de arreglo de diodos DAD 3000 y detector Light scattering, con bomba DGP-3600^a, el seguimiento se realizó a diferentes longitudes de onda: 254, 270 y 365 nm y con el detector Light scattering. Para la técnica LCMS se utilizó un equipo Agilent Technologies, Q-TOF GG520 LC/MS usando ionización por electrospray (ESI) en modo negativo. Los fragmentos significativos se indican como: m/z (intensidad relativa al pico base =100), con masa exacta determinada para el ión molecular (M) o fragmento iónico adecuado.

Para la separación cromatográfica en las dos técnicas se utilizó la columna analítica de fase reversa Symmetry C₁₈ (5 μ m; 3,9 X 150 mm). Como fase móvil fue empleada metanol (MeOH) (A) y una solución de ácido acético en agua al 1% (B). El gradiente utilizado inicio desde tiempo 0 hasta 60 min con 60% de A y 40% de B hasta 100% de A, luego se mantuvo a 100% de A por un tiempo de 70 min, para un tiempo total de corrida de 130 min. El flujo fue de 1,0 mL/min.

Para la determinación de los componentes de la mezcla de esteroides, se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies 7890 A GS System. En la separación cromatografica se utilizó una columna capilar RTX -5 /60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m con una inyección en modo *Split* (20:1), el gas de arrastre utilizado fue helio. La temperatura del horno fue programada como sigue: desde 50 °C hasta 160°C a 4 °C/min, de 160 °C hasta 220 °C a 2.5 °C/min y de 220 °C hasta 280 °C a 8 °C/min, para un tiempo total de recorrida de 75 minutos. La determinación de los constituyentes químicos presentes en la mezcla se

realizó con base en los fragmentos de masas y comparación de los espectros de masas con los obtenidos de la librería NIST 0.8 (usada por el equipo).

1.3.1.2 Técnicas empleadas para la elucidación y caracterización de los compuestos.

Los puntos de fusión se determinaron en un fusiómetro Fischer-Johns, los espectros de infrarrojo (IR) fueron registrados en el espectrómetro Pekin Elmer FTIR Panagon 500 series. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , así como los experimentos COSY, HMQC y HMBC fueron tomados en un espectrómetro Bruker Avance 400, operado a 400 MHz para ^1H y a 100 MHz para ^{13}C empleando cloroformo deuterado (CDCl_3) como solvente, a una temperatura de 25°C . los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz).

Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) fueron realizados en un equipo Agilent Technologies, Q-TOF GG520 LC/MS con inyección directa (compuestos puros disueltos en CHCl_3), usando ionización por electrospray (ESI) en modo positivo o negativo, de acuerdo con el tipo de compuesto. Los fragmentos significativos se indican como: m/z (intensidad relativa al pico base = 100), con masa exacta determinada para el ión molecular o fragmento iónico adecuado.

La medida de rotación óptica específica fueron tomadas en un polarímetro ADP440 (Bellingha Stanley) con lámpara de sodio, en una celda de 1,00 mL de capacidad con un paso óptico de 0,5 cm a una temperatura aproximada de 20°C , utilizando CHCl_3 como solvente.

1.3.1.3 Recolección de la muestra.

La muestra vegetal *Piper cf. cumanense* Kunth fue recolectada en el municipio de Quipile, departamento de Cundinamarca. La determinación taxonómica fue realizada el Herbario Nacional de Colombia donde fue clasificada con el numero COL:518185 por el biólogo Adolfo Jara.

1.3.1.4 Preparación de extractos etanólicos.

Del material vegetal se separaron hojas, inflorescencias, tallos y raíces. Las muestras vegetales secas fueron molidas y se sometieron a extracción con etanol al 96% por maceración a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado mediante destilación a presión reducida y de esta forma se obtuvieron los extractos etanólicos de hojas (450 g), inflorescencias (200 g), tallos (7,3 g) y raíces (5,4 g).

1.3.1.5 Ensayo de bioautografía

Este ensayo se realizó para observar la presencia de actividad antifúngica en los extractos y fracciones del fraccionamiento inicial del extracto de inflorescencias contra *F. oxysporum f. sp. passiflorae*. Para realizar el ensayo, se preparó una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 UFC/mL sobre un caldo nutritivo. El caldo nutritivo se preparó mediante una solución stock que contenía 7 g de KH_2PO_4 , 3 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 g KNO_3 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de NaCl por un litro de agua. La solución fue esterilizada por 20 minutos en una autoclave a 120 °C. La suspensión de esporas se preparó con 10 mL de solución de glucosa al 30 % en agua por cada 6 mL de caldo nutritivo.

Los extractos y las fracciones fueron aplicadas sobre cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 0.20 mm de espesor (marca Merck), y eluidas con una mezcla de CHCl_3 : MeOH (90:10) y Hexano: AcOEt (80:20). Luego se dejaron secar los solventes a temperatura ambiente y se realizó una aspersión directa sobre la placa con la suspensión de esporas previamente preparada. Finalmente se introdujo la placa en una atmósfera húmeda y oscura a 25 °C por 72 h. La actividad antifúngica se determinó por la presencia de zonas de inhibición en la placa, luego de revelar con el reactivo Metil tiazolil tetrazolio MTT.⁷⁹.

Se evaluó la actividad antifúngica preliminar contra *F. oxysporum sp. passiflorae* de los extractos etanólicos por el ensayo de bioautografía. Los cuatro extractos presentaron zonas de inhibición que indican actividad antifúngica, siendo el extracto de inflorescencia el extracto que presentó mayor número de zonas.

El extracto para el estudio fitoquímico fue el extracto de inflorescencias, debido que presenta mayor cantidad de compuestos, que se evidencia en la comparación de los perfiles cromatográficos en CCD, HPLC-DAD-ELSD y LC/MS de los extractos obtenidos. También por los perfiles obtenidos en el ensayo de bioautografía contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae*.

Las 7 fracciones obtenidas en el primer fraccionamiento del extracto de inflorescencias también fueron evaluadas por este método, donde las fracciones 2 a 6 fueron las que presentaron actividad antifúngica contra el hongo de estudio.

1.3.1.6 Fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto de inflorescencias de *P. cf. cumanense*.

El extracto etanólico de inflorescencias (200 g) fue sometido a extracción líquido-sólido con hexano, y del sobrenadante se obtuvo por sucesivas recristalizaciones con el mismo disolvente un sólido cristalino de forma de agujas de color amarillo claro correspondiente al ácido (2'E) cumenico **N1** (5 g).

El residuo de la extracción (170 g) fue fraccionó por CLV eluyendo con mezcla de Hex:AcOEt en polaridad creciente (90:10 a 0:100), obteniéndose 7 fracciones denominadas 1F (2 g), 2F (72 g), 3F (3 g), 4F (5 g), 5F (2 g), 6F (24 g), y 7F (52 g). Estas

fracciones fueron sometidas a un ensayo de actividad antifúngica contra hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae*. por medio de bioautografía directa, dando como resultado que las fracciones activas contra este fitopatógeno eran las fracciones 2F a 6F.

La fracción 2F (30 g) fue fraccionada mediante CF eluyendo con una mezcla de Hex:AcOEt en polaridad creciente (95:5 a 60:40), obteniéndose 5 fracciones (2-1 a 2-5). De la fracción 2-2 (11,8 g) utilizando CF repetitivas eluyendo con Hex-AcOEt (80:20) y CHCl₃-MeOH (90:10) se obtuvo el compuesto ácido (2'*E*) cumenico **N1** (5,5 g). Las fracciones 2-3 y 2-4 se reunieron (5 g) y usando CF sucesivas eluyendo con CHCl₃-acetona (99:1) y luego con Hex-AcOEt (60:40) se obtuvo un sólido cristalino de color amarillo brillante denominado ácido (2'*Z*) cumenico **N2** (87 mg) y un aceite de color amarillo oscuro que corresponde al ácido gaudichaudianico **N3** (126 mg). Finalmente, de la fracción 2-5 se obtuvo un sólido amarillo oscuro que corresponde a óxido de cariofileno **N4** (20 mg) utilizando CF eluyendo con Hex-AcOEt (80:20).

La fracción 3F fue sometida a CF eluyendo con CHCl₃-acetona (90:10) obteniendo 4 fracciones 3-1 a 3-4, la fracción 3-1 correspondió al compuesto ácido (2'*Z*) cumenico **N2** (33 mg) y en la fracción 3-4 se obtuvo un sólido blanco que correspondiente a la mezcla denominada **M1**, compuesta por campesterol **N5**, estigmasterol **N6** y β-sitosterol **N7** (880 mg).

La fracción 4F se purificó mediante sucesivas CF eluyendo con Hex-AcOEt (80:20) dando 8 fracciones, la fracción 4-6 se purificó mediante CF eluyendo con Hex-CHCl₃-MeOH 2:2:1 y se obtuvo sólido de cristales transparentes correspondiente al ácido 4-metoxi-3-(3'-metil-2'-butenil)benzoico **N8** (40 mg).

La fracción 5F se purificó por sucesivas CF eluyendo con Hex-AcOEt 70:30 y Hex-CHCl₃-MeOH 40:40:20 para dar 61 mg del Ácido (2*S*)-2-metil-2-(4'-metil-pent-3'-enil-8-(3''-metil-but-2''-enil))-4-oxo-cromano-6-carboxílico **N9** de aspecto aceitoso color amarillo claro.

La fracción 6F fue sometida mediante sucesivas CF eluyendo con Hex: CHCl₃: AcOEt (20:60:20) y CHCl₃-acetona (90:10) obteniendo un sólido blanco correspondiente al compuesto ácido-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico **N10** (15 mg). Figura 1-2 se presenta el esquema general seguido para la purificación de los compuestos aislados.

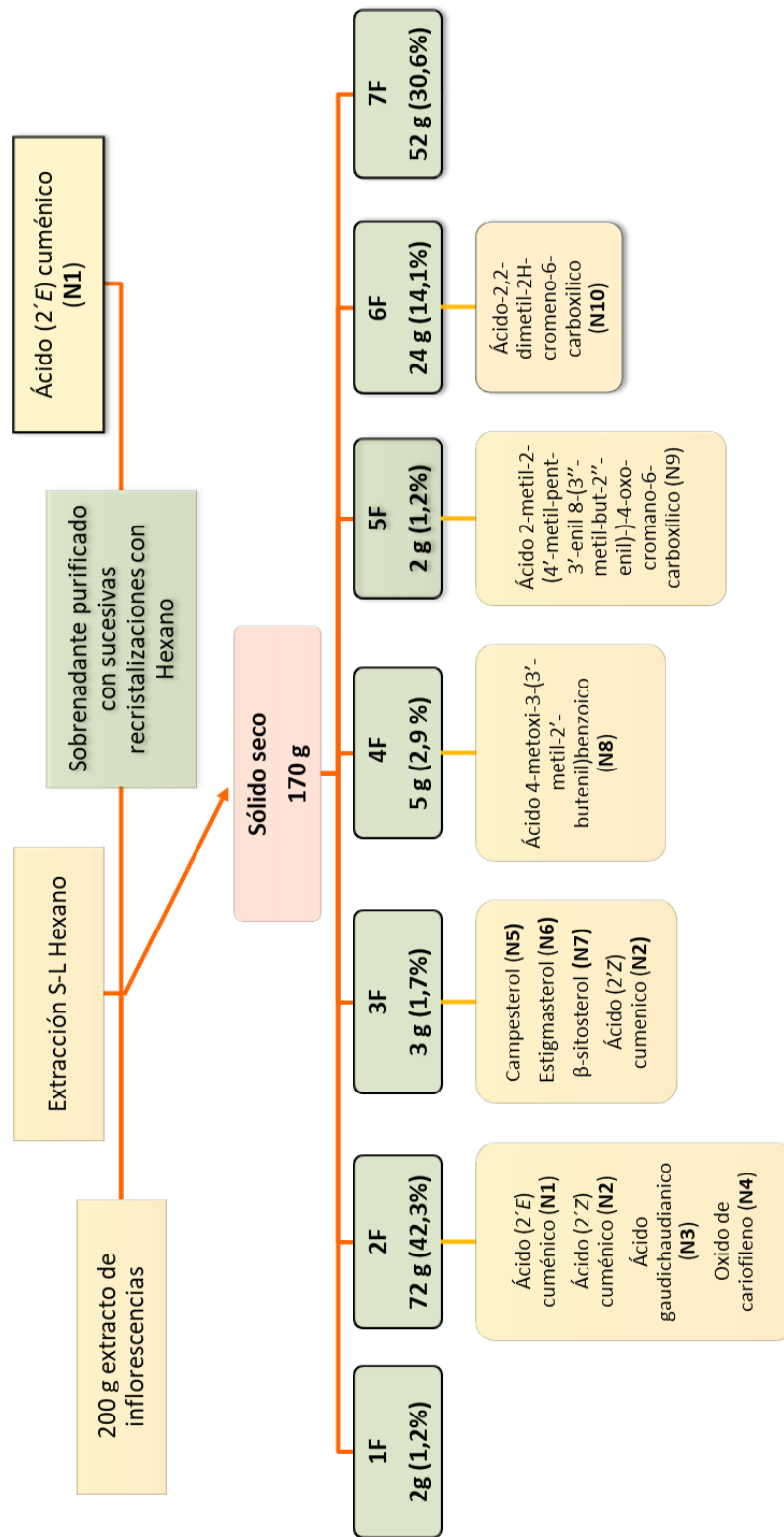


Figura 1-2 Esquema general de fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en las inflorescencias de *Piper cf. cumanense* Kunth

1.4 Resultados y discusión de resultados

1.4.1 Estudio fitoquímico realizado en inflorescencias de *P. cf cumanense* Kunth.

Mediante el estudio fitoquímico se fraccionó y se purificó algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto de inflorescencias de *P. cf cumanense* Kunth, se logró el aislamiento e identificación de tres derivados de ácido benzoico abiertos, ácido (2'*E*) cumenico **N1**, ácido (2'*Z*) cumenico **N2** y ácido 4-metoxi-3-(3'-metil-2'-butenil)benzoico **N8**, 2 cromenos ácido gaudichaudiano **N3** y ácido-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico **N10**, una cromona (ácido (2*S*)-2-metil-2-(4'-metil-pent-3'-enil-8-(3''-metil-but-2''-enil)-)-4-oxo-cromano-6-carboxílico **N9**), un sesquiterpeno (óxido de cariofileno **N4**), una mezcla de esteroides denominada **M1** (campesterol **N5**, estigmasterol **N6** y β -sitosterol **N7**). La mezcla fue analizada por CG-EM, los compuestos fueron elucidados por métodos espectroscópicos y por comparación con los datos descritos en la literatura. En la Figura 1-3 se muestran las estructuras de los compuestos aislados de las inflorescencias de *Piper cf. cumanense* Kunth.

De los metabolitos aislados e identificados, el compuesto tipo cromona **N9** no presenta reportes en la literatura, siendo este el primer reporte sobre la presencia de este compuesto en el género *Piper* y en la familia Piperaceae.

Para compuesto ácido 4-metoxi-3-(3'-metil-2'-butenil)benzoico **N8**, también, es el primer reporte en este género y familia. Se reporta su aislamiento por primera vez en la especie *Wigandia urens* perteneciente a la familia Boraginaceae y fue evaluada su capacidad de acoplarse al receptor CCR5, un receptor importante en la prevención de la entrada del VIH-1 en las células ⁹⁴.

Los compuestos ácido (2'*E*) cumenico **N1**, óxido de cariofileno y mezcla de esteroides **M1** (campesterol **N5**, estigmasterol **N6** y β -sitosterol **N7**, fueron reportados el aislamiento y la determinación de la actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum sp lycopersici* y *Botrytis cinérea*, en el trabajo previo realizado en la maestría sobre esta misma especie ^{93, 95}.

Los compuesto ácido (2'*E*) cumenico **N1** y ácido (2'*Z*) cumenico **N2** también, han sido aislados de la especie *P. gaudichaudianum* Kunth y no poseen ningún reporte de evaluación de actividad biológica ⁹⁶.

El compuesto ácido gaudichaudiano **N3** se reportó el aislamiento en las especies *P. gaudichaudianum* Kunth y *P. chimonantifolium* y la determinación de la actividad antifúngica contra *C. cladosporioides* y *C. sphaerospermum* ^{73, 89}.

El compuesto ácido-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico **N10**, conocido como Ácido anofínico, han sido reportado previamente en la especie *P. aduncum* y se le ha determinado la actividad antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* y *C.*

*sphaerospermum*⁸⁹. También, se ha aislado de otras especies, como en la especie *Euodia lept* (Rutaceae)⁹⁷ y del hongo *Pestalotiopsis* sp.⁹⁸, pero no en esta especie.

La mayoría de los compuestos reportados en este estudio fitoquímico son derivados prenilados de ácido benzoico, esta clase de metabolitos son muy característicos en el género *Piper* y tienen una gran importancia quimiotaxonómica, ya que están ampliamente distribuidos en todo el género, pero no en la familia Piperacea. Por ejemplo, los derivados prenilados de ácido benzoico cíclicos aislados del género *Piper* poseen un patrón de ubicación de los sustituyentes diferente a los compuestos aislados del género *Peperomia*.⁹⁹.

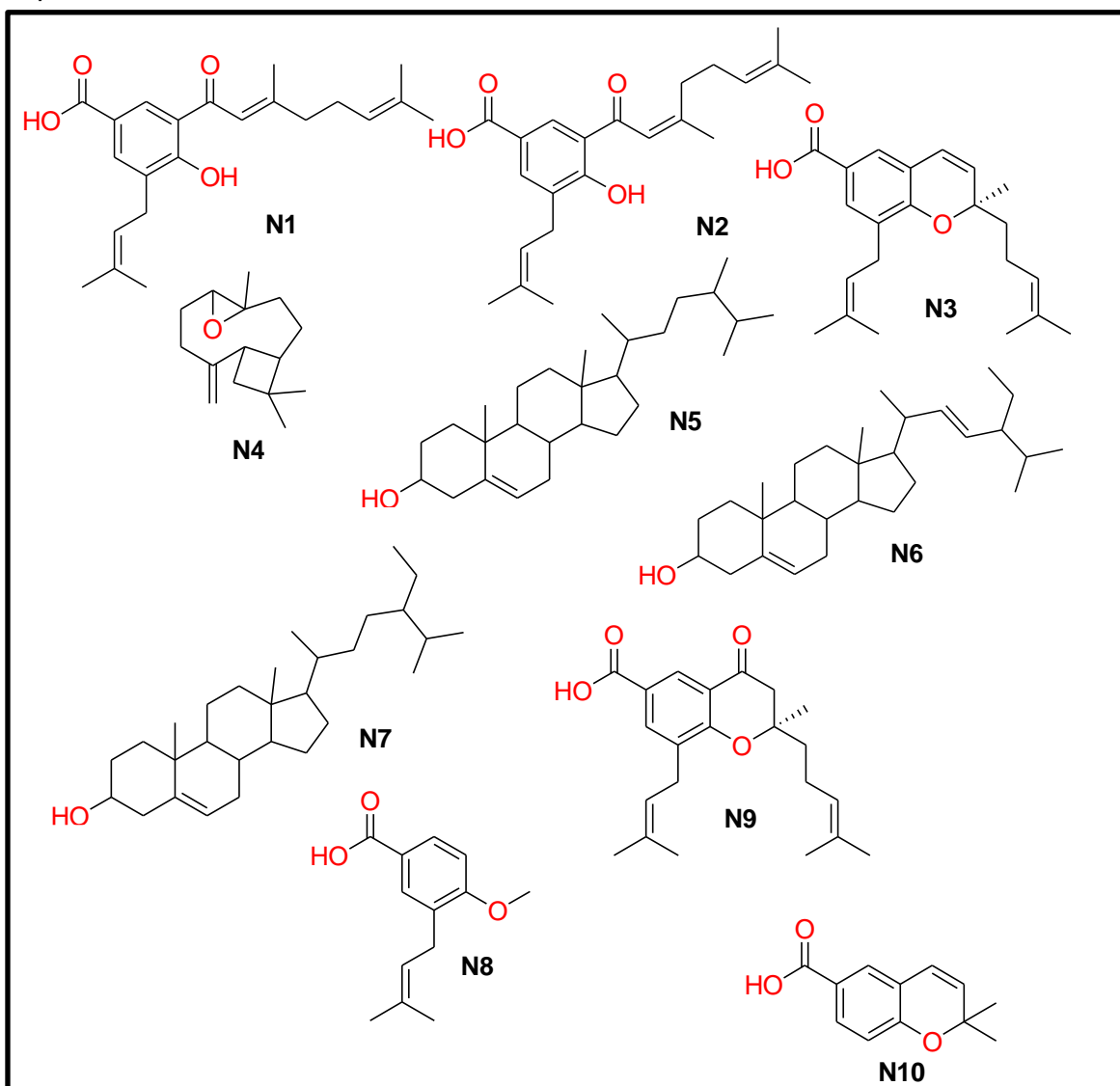


Figura 1-3 compuestos aislados de las inflorescencias de *Piper cf. cumanense* Kunth.

1.4.2 Elucidación estructural de los compuestos N1 y N2

El compuesto **N1** está presente en gran cantidad en el extracto de inflorescencias, aproximadamente en un 5,25 %, incluso alcanza a cristalizar en el extracto seco y se pudo aislar mediante extracción sólido- líquido y sucesivas recristalizaciones con hexano, cristaliza en forma de agujas de color amarillo claro, en cambio su isómero geométrico **N2**, está presente en menor cantidad, cristaliza en forma de cubos con un color amarillo brillante, como se muestra en la Figura 1-4. En el proceso de purificación fueron aislados en la misma fracción, en CCD al revelar con anisaldehído, se ven dos manchas de color azul intenso. Sus puntos de fusión son 113 y 132 °C, respectivamente.

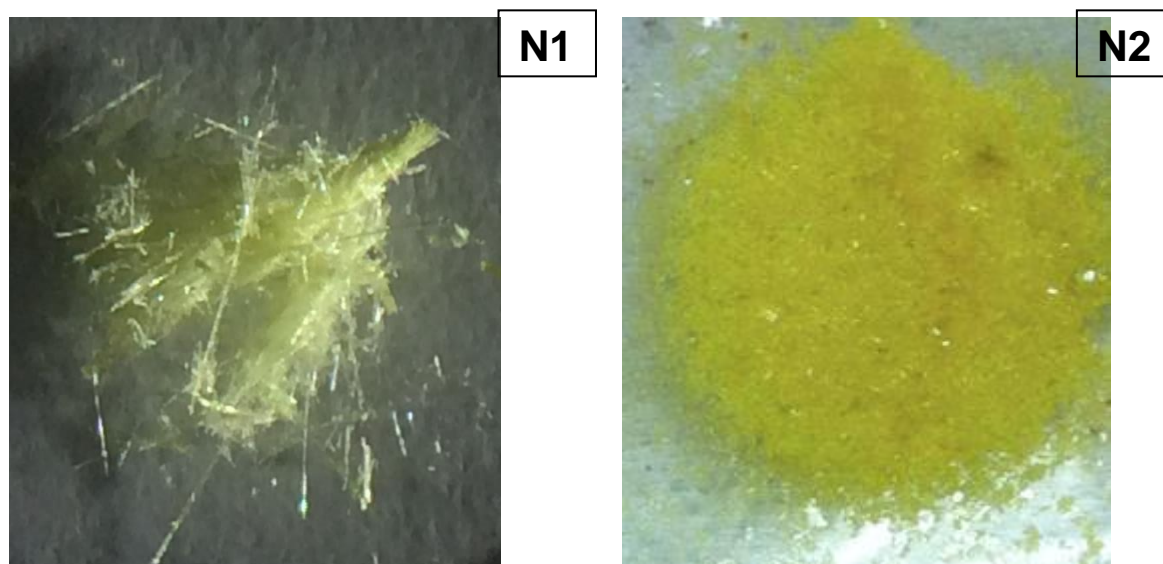


Figura 1-4 fotos de los compuestos **N1** y **N2**

Por el análisis de EMAR la fórmula molecular fue establecida como $C_{22}H_{28}O_4$ (m/z : 355,1916 [M-H] (calcd. para $C_{22}H_{27}O_4$ 355.1909)) para los compuestos **N1** y **N2**, con este análisis se determinó que los compuestos **N1** y **N2** son isómeros. La elucidación del compuesto **N1** fue discutida en Parra 2013, dando como resultado Ácido (2'*E*)-3-(3',7'-dimetil-1'-oxoocta-2',6'-dienil)-4-hidroxi-5-(3''-metilbut-2''-enil)benzoico o (ácido (2'*E*) cumenico **N1**) Y el compuesto **N2** fue elucidado como Ácido (2'*Z*)-3-(3',7'-dimetil-1'-oxoocta-2',6'-dienil)-4-hidroxi-5-(3''-metilbut-2''-enil)benzoico o (ácido (2'*Z*) cumenico **N2**) en el estudio realizado por Gaia 2014.⁹⁶

1.4.3 Elucidación estructural del compuesto N9

El compuesto **N9** fue obtenido como un aceite de color amarillo claro, presenta una coloración negra al revelar con I_2 , un color azul oscuro con p-anisaldehído-ácido sulfúrico.

El espectro de IR se caracteriza por presentar bandas que indican grupo la presencia de un grupo hidroxilo (3394 cm^{-1} , banda de estiramiento O-H y en $1250, 1231\text{ cm}^{-1}$ señales por tensión C-O), y de grupos carbonílicos (señales intensas en 1689 y 1635 cm^{-1} , características de tensión C=O) que por sus frecuencias pueden corresponder posiblemente a carbonilos para cetona y ácido carboxílico respectivamente.¹⁰⁰

El espectro de RMN ^1H (Figura 1-5), presenta señales para un total 27 protones en el rango de δ 1,0 a 9,0. En la región aromática se observa la presencia de dos señales en δ 8,51 ($d, J= 2,2\text{ Hz}, 1\text{H}$) y 8,04 ($d, J= 2,2\text{ Hz}, 1\text{H}$) que por sus desplazamientos, multiplicidades y constantes de acoplamiento corresponden a dos protones aromáticos en posición *meta* lo que sugieren un anillo aromático tetra sustituido.

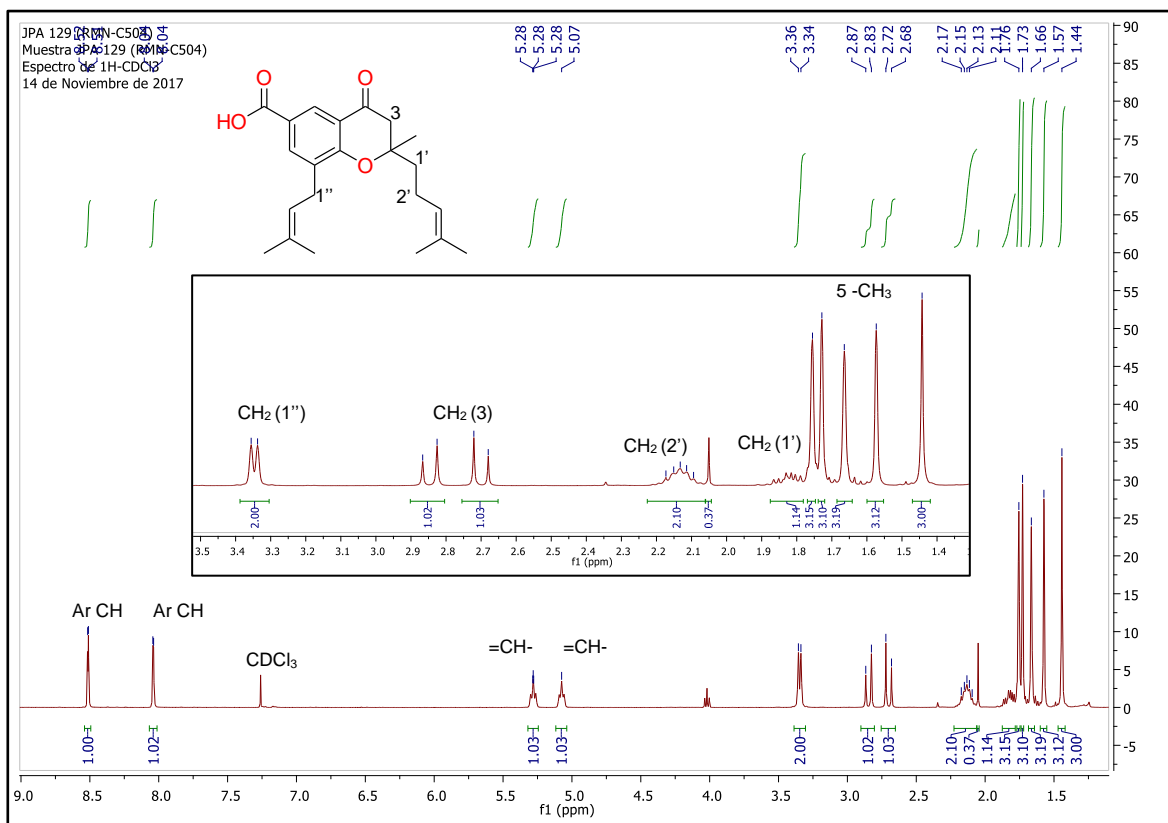


Figura 1-5 Espectro RMN ^1H para el compuesto **N9** (CDCl_3 , 400 MHz).

Adicionalmente, se observa dos señales para protones vinílicos en δ 5,28 ($t, J=7,0\text{ Hz}, 1\text{H}$) y 5,07 ($t, J=7,0\text{ Hz}, 1\text{H}$), que junto con las señales en la región alifática con δ 3,50 ($d, J=7,3\text{ Hz}, 2\text{H}$); 2,23 ($m, 2\text{H}$); 1,81 ($m, 2\text{H}$), 1,76 ($s, 3\text{H}$); 1,73 ($s, 3\text{H}$), 1,57 ($s, 3\text{H}$) y 1,66 ($s, 3\text{H}$), sugieren la presencia varios sustituyentes de tipo prenilo característicos en algunos compuestos aislados en el género *Piper*⁸⁹. En la región alifática también se destacan dos señales con δ 2,70 ($d, J= 16,4\text{ Hz}, 1\text{H}$) y δ 2,85 ($d, J= 16,4\text{ Hz}, 1\text{H}$) que corresponden a dos protones diastereotópicos en disposición geminal y que por su desplazamiento suele corresponder a un grupo metileno en posición α a un grupo carbonilo, característicos de

muchos compuestos aislados en el género *Piper* con cadena prenilada se encuentra oxigenada¹⁰¹⁻¹⁰².

De análisis del experimento espectros APT (Figura 1-6), se observa en total 22 señales de carbonos para el compuesto de las cuales nueve corresponden a carbonos cuaternarios con 192,2 (C), 171,5 (C), 161,7(C), 133,9 (C), 132,7 (C), 131,9 (C), 121,5 (C) 119,9 (C) y 82,2 ppm (C), cuatro señales son tipo metino con 136,7 (CH), 127,8 (CH), 123,2 (CH) y 121,2 ppm (CH), cuatro señales son debidas a carbonos metilenos con 28,5 (CH₂), 47,2 (CH₂), 22,4 (CH₂), 39,6 ppm (CH₂) y cinco corresponden a carbonos metilos con 25,9 (CH₃), 25,8 (CH₃), 24,1 (CH₃), 18,0 (CH₃) y 17,7 ppm (CH₃).

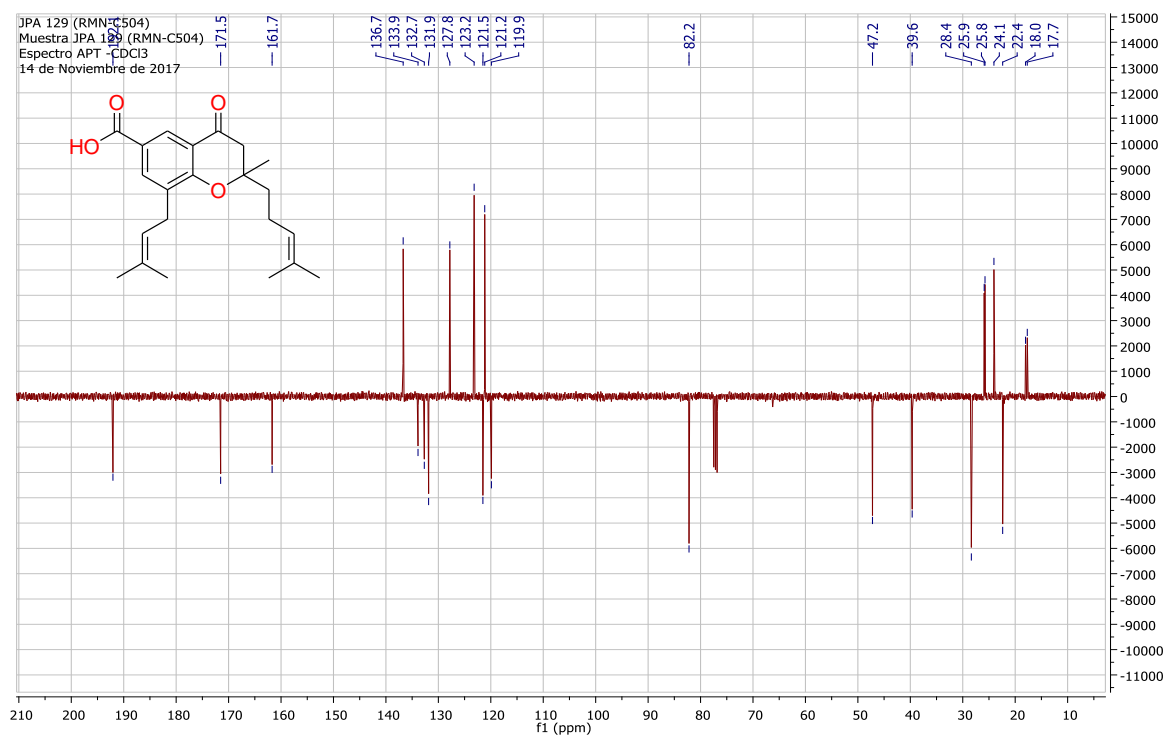


Figura 1-6 Espectro ATP para el compuesto **N9** (CDCl₃, 100 MHz).

Las señales con δ 192,2 (C), 171,5 (C), por su desplazamiento son característicos de carbonos carbonílicos de tipo cetona y de ácido carboxílico, respectivamente⁹⁶, lo cual está de acuerdo a lo observado en el espectro IR. Las señales con δ 161,7 (C), 136,7 (CH), 133,9 (C), 127,8 (CH), 121,5 (C) y 119,9 (C), confirman la presencia de un anillo aromático tetrasustituidos y además y además por la señal con δ 161,7 sugiere la presencia de un sustituyente oxigenado sobre el anillo¹⁰³.

Las señales con δ 17,7 (CH₃), 18,0 (CH₃), 22,4 (CH₂), 25,8 (CH₃), 25,9 (CH₃), 28,5 (CH₂), 39,6 (CH₂), 121,2 (CH), 123,2 (CH), 131,9 (C) y 132,7 (C) confirman lo observado en RMN ¹H de la presencia de dos sustituyentes tipo prenilo en el compuesto **N9**^{99, 104}.

Con el espectro HMQC, se establecieron las conectividades de cada uno de los hidrógenos a sus respectivos carbonos las cuales se ilustran en la Figura 1-7. Por ejemplo, en el espectro se destacan las conectividades del protón δ_H 8,51 (*d*, $J=2,2$ Hz, 1H) con el carbono en δ_C 136,7 (CH), del protón 8,04 (*d*, $J=2,2$ Hz, 1H) con el carbono en δ_C 127,8 (CH). Los protones olefínicos con desplazamientos en δ_H 5,28 (*t*, $J=7,0$ Hz, 1H), 5,07 (*t*, $J=7,0$ Hz, 1H) con los carbonos en δ_C 121,1 (CH) y 123,2 (CH).

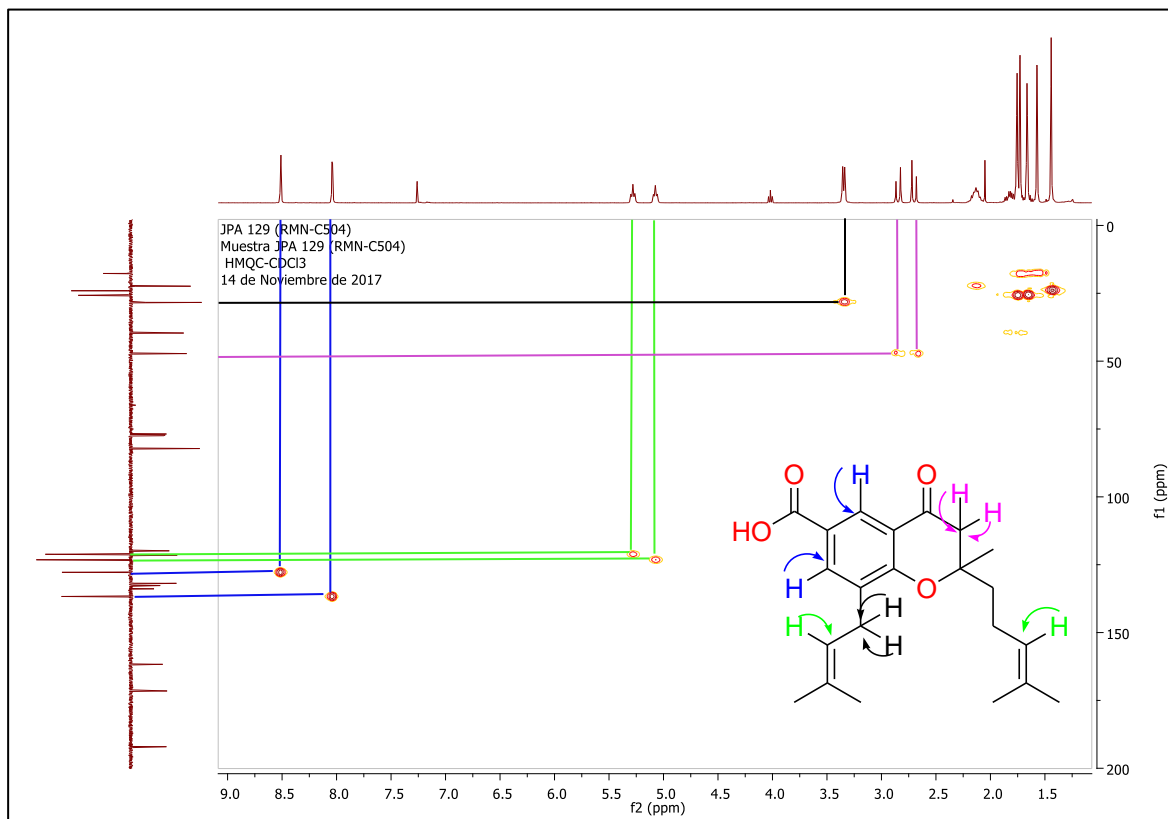


Figura 1-7 Espectro HMQC para el compuesto **N9** (CDCl₃, 400 MHz)

Adicionalmente se observa que las señales con δ_H 2,70 (*d*, $J=7,3$ Hz, 1H) y 2,85 (*d*, $J=7,3$ Hz, 1H) presentan conectividad con el carbono en δ_C 25,9 ppm (CH₂), lo que confirma lo observado en ¹H sobre la presencia de un grupo metileno con protones diastereotópicos.

El espectro COSY ¹H-¹H permitió determinar correlaciones escalares presentes entre los protones, en la Figura 1-8 se presentan las correlaciones existentes entre las señales de hidrogeno, donde la del protón en δ_H 8,51 (*d*, $J=2,2$ Hz, 1H) con la señal del protón δ_H 8,04 (*d*, $J=2,2$ Hz, 1H). La señal del protón vinílico δ_H 5,28 (*t*, $J=7,0$ Hz, 1H) correlacionan con la señal un metileno δ_H 3.35 (*d*, $J=7.3$ Hz, 2H) y el otro protón vinílico 5,07 (*t*, $J=7,0$ Hz, 1H) correlaciona con la señal un metileno δ_H 2.23 - 2.06 (*m*, 2H).

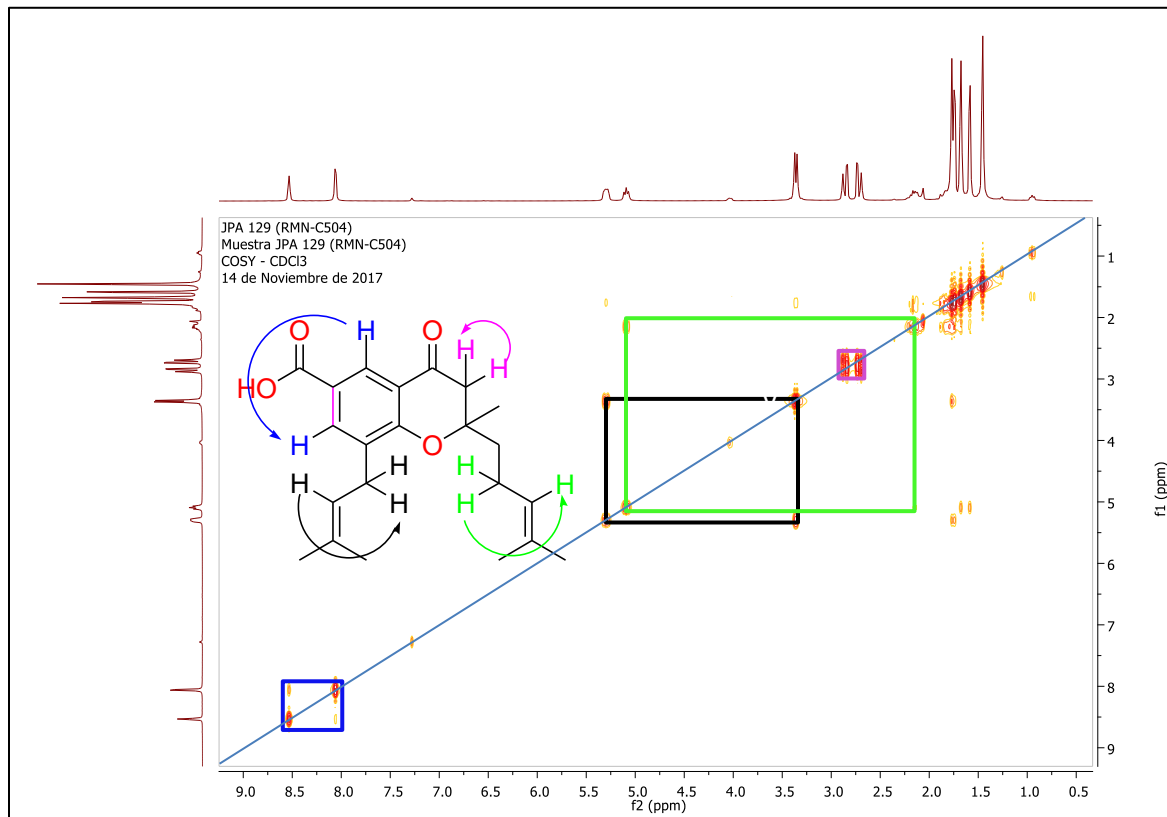


Figura 1-8 Espectro COSY¹H-¹H para el compuesto **N9** (CDCl₃, 400 MHz).

Mediante el experimento de HMBC se realizó la ubicación de los sustituyentes, confirmación de los fragmentos propuestos y la asignación de los carbonos cuaternarios. De esta forma, el grupo carboxílico se ubicó como sustituyente del anillo aromático, de acuerdo a las correlaciones observadas de la señal del carbono carbonílico con 171,5 ppm con las señales de los protones aromáticos en δ 8,04 (H7) y δ 8,51(H5).

La posición del grupo prenilo en el carbono 133,9 ppm (C8) el anillo aromático del núcleo benzopirano, se determinó mediante las correlaciones a tres enlaces entre el protón en δ 8,04 (H7) con el carbono del grupo metileno 28,4 ppm (C1'') y los protones en δ 3,35 (H1'') de este grupo metileno, con el carbono de tipo aromático oxigenado en 161,7 ppm (C8a). El otro segmento del grupo prenilo oxigenado se ubicó sobre el ciclo pirano del núcleo benzopirano, el carbono 82,2 ppm (C2), debido a las correlaciones a tres enlaces de los protones δ 2,23 (H2'') con este carbono cuaternario, también por la correlación a tres enlaces de los protones δ 1,81 (H1'') con el carbono 47,2 ppm (C-3).

Las señales de los protones geminales en δ 2,70 y δ 2,85 (H3) correlacionan a tres enlaces con el carbono en 24,1 ppm (C9) y el carbono del segmento de prenilo en 39,1 ppm (C1''), confirmando la posición de estos sustituyentes. A dos enlaces correlaciona con el carbono carbonilo tipo cetona en 192,0 ppm (C4), este carbono también presenta correlación a tres enlaces por el protón aromático en δ 8,51 (H5). Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC se muestran en la Figura 1-9.

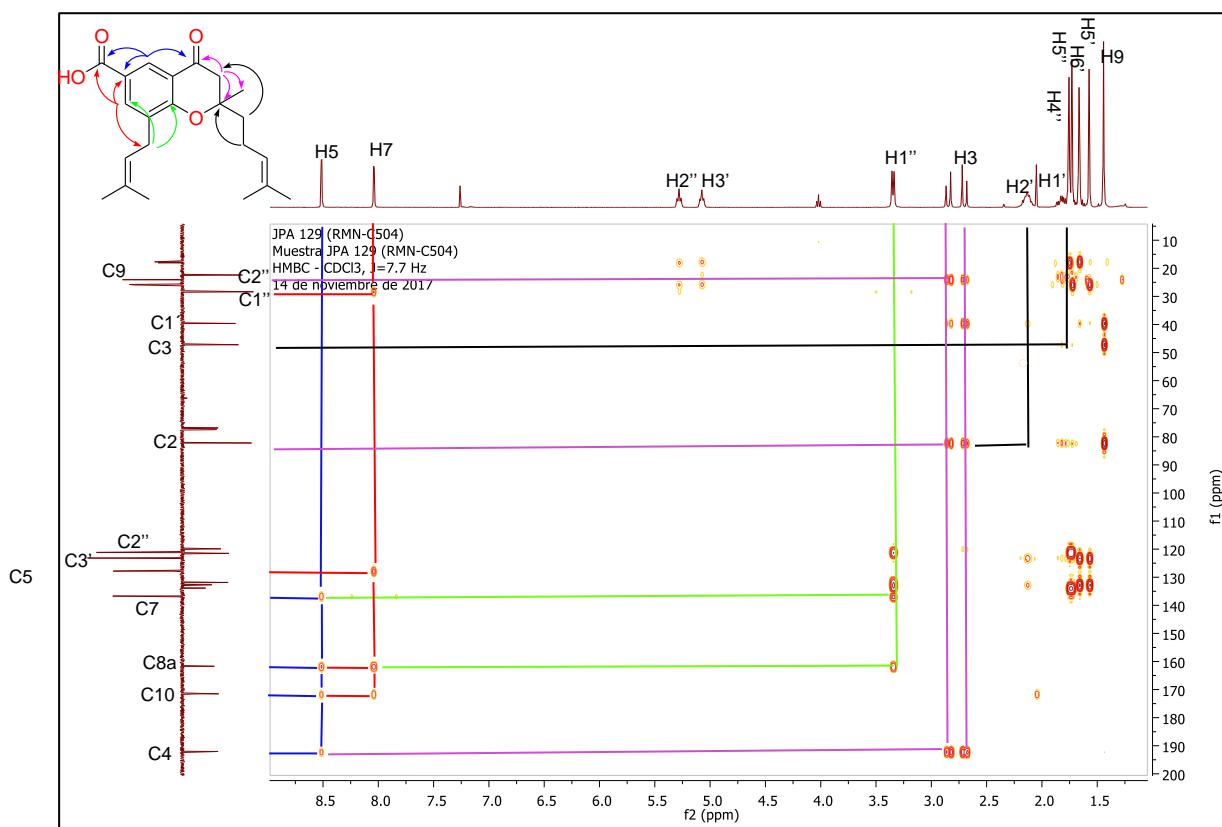


Figura 1-9 Espectro HMBC para el compuesto **N9** (CDCl₃, 400 MHz).

De esta forma se realizó la elucidación del compuesto **N9** y muchos de los desplazamientos de fragmentos característicos de cromonas se corroboraron por comparación con los datos reportados para compuestos con estructura similar aislados en especies del género *Piper* como *P. aduncum* y *P. gaudichaudianum*^{73, 96, 102, 105-106}. Por el análisis de EMAR la fórmula molecular del compuesto **N9** fue establecida como C₂₂H₂₈O₄ (m/z: 357,2058 [M+H]⁺ (calcd. para C₂₂H₂₈O₄ 356.1988) y es consistente con el resultado del análisis espectroscópico realizado.

La rotación óptica determinada fue de $[\alpha]_D^{25} +13.63^\circ$ (c 0.1 CHCl₃), y por comparación con los datos reportados en la literatura para enantiómeros de compuestos similares ¹⁰², sugieren la configuración S en el C2 del compuesto **N9** permitiendo la identificación del compuesto como el Ácido (2S)-2-metil-2-(4'-metil-pent-3'-enil-8-(3''-metil-but-2''-enil))-4-oxo-cromano-6-carboxilico el cual fue denominado ácido oxocumenico (Figura 1-10) y para el que no se han encontrado reportes en la literatura. Los compuestos tipo derivados prenilados de ácido benzoico son característicos en el genero Piper, pero hay pocos reportes de este tipo de compuestos con un grupo carbonilo.

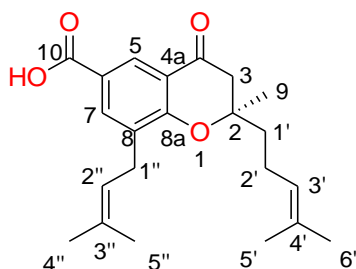


Figura 1-10 Estructura del ácido oxocumenico **N9**

1.4.4 Determinación de la presencia de los compuestos aislados en los extractos provenientes de otros órganos de *Piper cumanense*.

La derreplicación de los compuestos previamente aislados del extracto de inflorescencias de *P. cumanense* en los extractos de inflorescencias, hojas, tallos y raíces, permitió determinar la presencia o ausencia de estos compuestos. Los extractos fueron analizados por los detectores de DAD, detector Light scattering y Q-TOF. Los cromatogramas obtenidos para los extractos y compuestos muestran una similitud entre los tres detectores utilizados. En la Figura 1-11 A y B se muestra como ejemplo, los cromatogramas de extracto de hojas obtenido por los tres detectores.

Al comparar los perfiles cromatográficos de los extractos de inflorescencias, hojas, tallos y raíces de *P. cumanense*, (Anexos 1-7) se observa que son muy similares, siendo el proveniente del extracto de inflorescencia el que presenta más complejidad en relación a la cantidad de picos que se observan, en donde por su identidad sobresalen las señales correspondientes a los constituyentes mayoritarios ¹⁰⁷

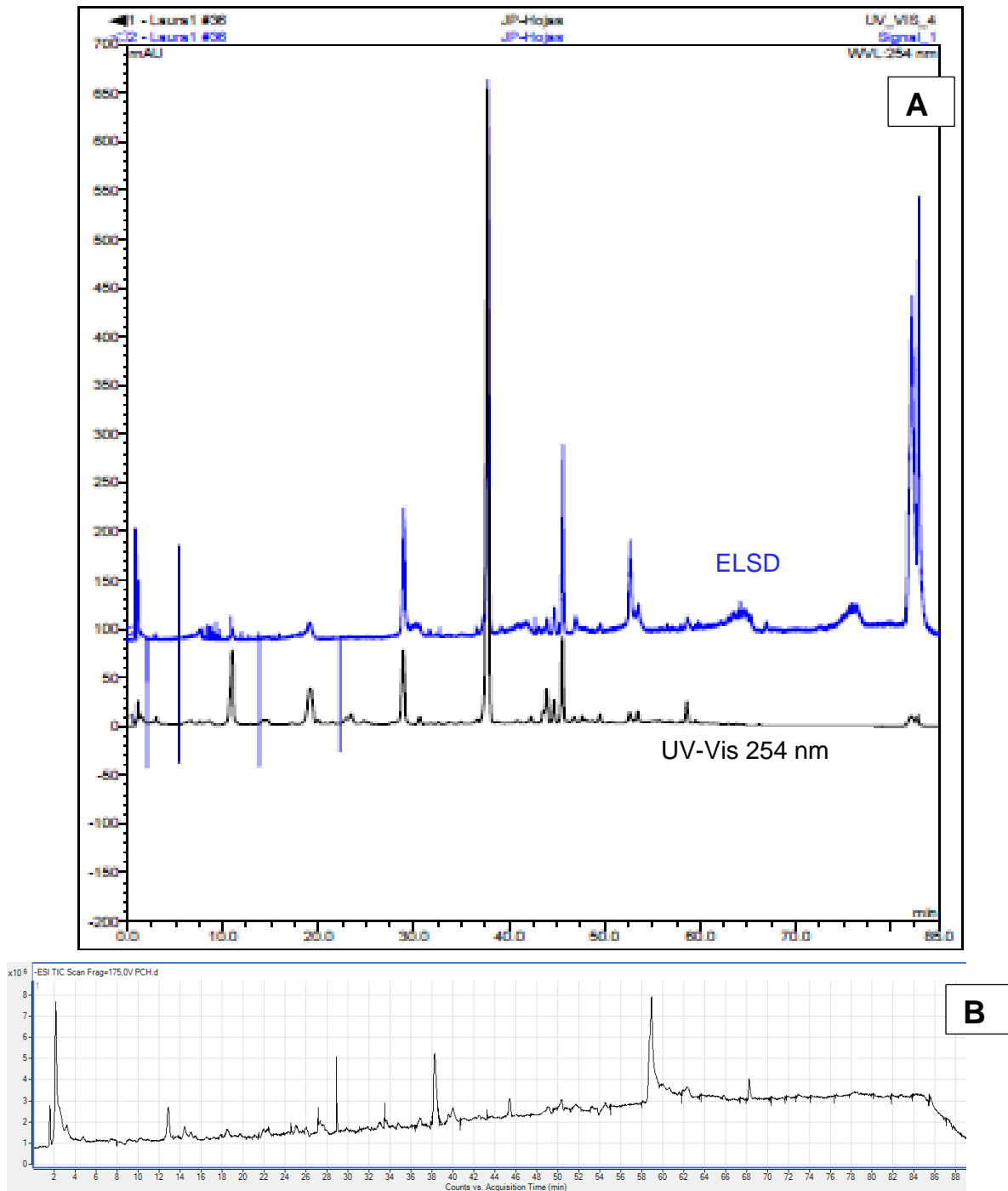


Figura 1-11 (A): Cromatograma del extracto de hojas, obtenido por los detectores DAD y ELSD, (en negro UV 254 nm y en azul Light scattering). (B) Cromatograma del extracto de hojas obtenido por LC-MS.

En la Figura 1-12 se hace la comparación del perfil cromatográfico del extracto de inflorescencias de *P. cumanense* con el perfil de cada uno de los compuestos aislados e identificados en el estudio fitoquímico realizado sobre esta especie y descrito en este

mismo capítulo. De esta forma por comparación de los tiempos de retención, espectros UV y de sus espectros de masas fue posible caracterizar químicamente la mayoría de las señales observadas en el perfil cromatográfico del extracto de inflorescencias de la identidad a los tiempos de retención de los compuestos presentes en el extracto de inflorescencias de *P. cumanense*. (En los Anexos 1-7 se muestran los perfiles y espectros de masa obtenidos para los extractos y compuestos mayoritarios aislados). En el perfil cromatográfico se observa que eluye a 11 min el compuesto, ácido 4-metoxi-3-(3'-metil-2'-butenil)-benzoico **N8**, a 19 min ácido-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico **N11**, a 31 min ácido (2S)-2-metil-2-(4'-metil-pent-3'-enil-8-(3''-metil-but-2''-enil))-4-oxo-cromano-6-carboxílico **N9**, a 37,8 min ácido gaudichaudiano **N3**, a 43,9 min los compuestos ácido benzoico (ácido (2'E) cumenico **N1** y ácido (2'Z) cumenico **N2**, 46 min oxido de cariofileno **N4** y a los 62 min M1 la mezcla de los esteroides.

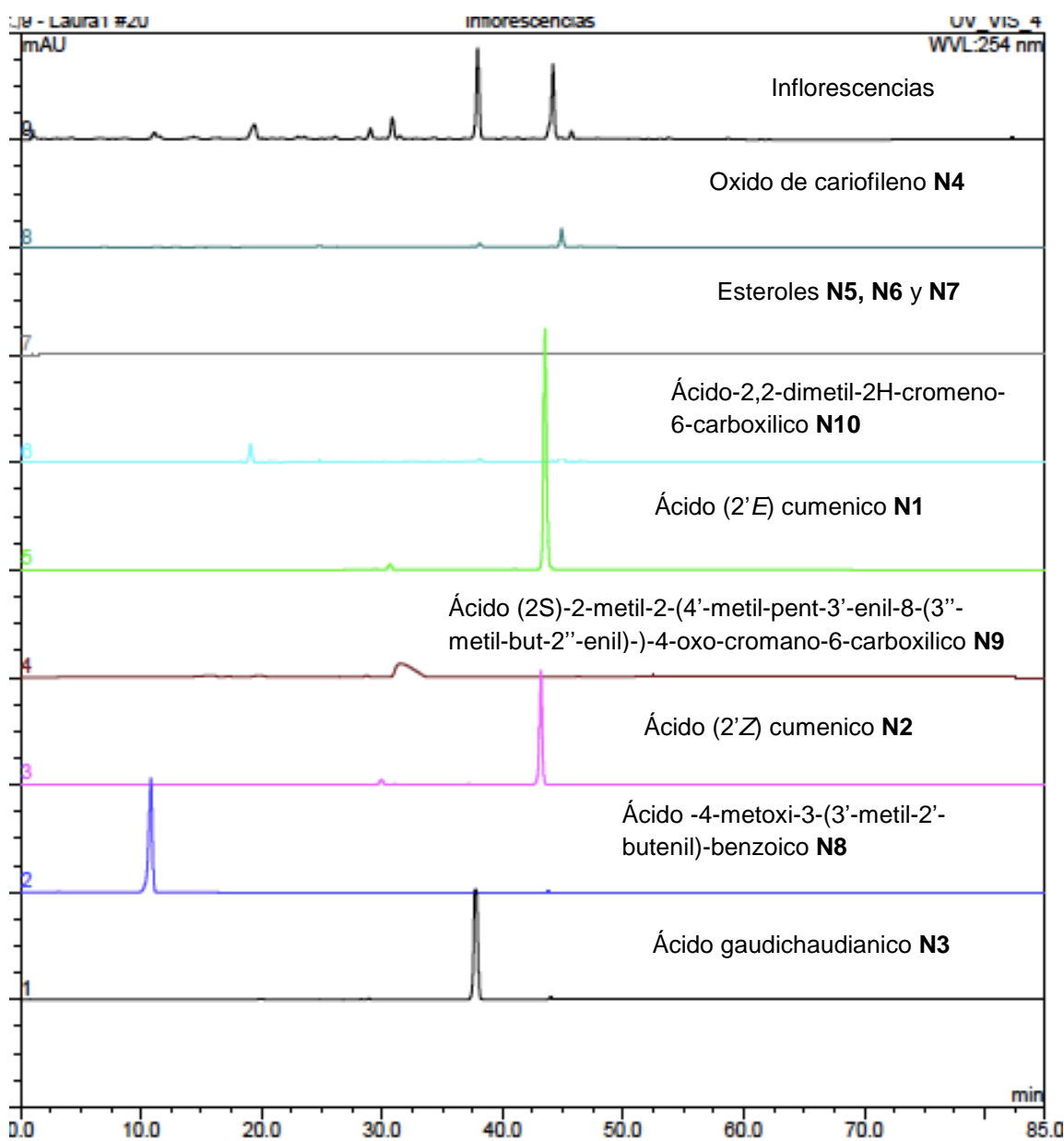


Figura 1-12 Perfiles cromatográficos del extracto de inflorescencias y los compuestos mayoritarios, identificados por comparación de tiempo de retención, espectros UV y de masas.

Una vez caracterizado químicamente el perfil cromatográfico de inflorescencias posteriormente se realizó una comparación con los perfiles cromatográficos provenientes de otros órganos de la especie objeto de estudio. Los resultados de esta comparación se resumen en la tabla 1-2, de donde se deduce que en el extracto de hojas están presentes los compuesto **N3**, **N4**, **M1**, **N8** y **N10**, del extracto de tallos los compuestos **N1**, **N2**, **N3**, **N8** y **N10** y del extracto de raíces los compuestos **N3**, **N8** y **N10**.

En los perfiles de hojas, tallo e inflorescencias se observa la presencia de un compuesto con un tiempo de retención de aproximado de 29 min, este compuesto no se logró identificar, presenta un espectro de UV similar a los compuestos derivados de ácido benzoico **N1** y **N2** y su espectro de masa indica una m/z de 355,1921, la identificación de este compuesto puede ser de interés para futuras investigaciones.

Tabla 1-2 Comparación de la presencia de compuestos aislados en los diferentes extractos de *P. cumanense*, indicando los tiempos de retención por las dos metodologías y los valores de m/z de cada compuesto aislado del extracto de inflorescencias.

Compuesto	HPLC DAD- ELSD	LCMS		Extractos			
	t (min)	t (min)	[M-H] m/z	Inflorescencias	Hojas	Tallos	Raíces
N1	43,9	43,3	355,1995	✓	X	✓	X
N2	43,9	43,2	355,2132	✓	X	✓	X
N3	37,8	38,6	339,2396	✓	✓	✓	✓
N4	46	45,6	203,3598	✓	✓	X	X
M1	62	ND	ND	✓	✓	X	X
N8	11	12,1	219,1078	✓	✓	✓	✓
N9	31	31	355,1901	✓	X	X	X
N10	19	ND	ND	✓	✓	✓	✓

1.5 Conclusiones

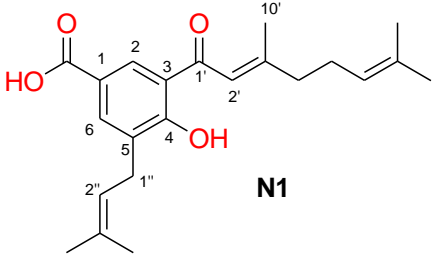
El trabajo fitoquímico desarrollado al extracto de inflorescencias permitió el aislamiento e identificación de cuatro derivados de ácido benzoico, (dos cromenos) tres esteroides y un sesquiterpeno, siendo este el primer reporte de una nueva cromona denominada ácido oxocumenico **N9**, el primer reporte de **N8** reportado en la familia Piperaceae y en el género *Piper* y de la presencia de tres de ellos reportados por primera vez en la especie. El presente trabajo contribuye a las investigaciones en fitoquímica de especies del género *Piper* presente en Colombia, mediante el aislamiento e identificación de metabolitos, mediante diferentes técnicas cromatográficas y espectroscópicas, presentes en el extracto de inflorescencias de *Piper cf. cumanense* Kunth.

Por comparación de los perfiles obtenidos por HPLC y LC de los compuestos puros y los extractos se encontró que el extracto de inflorescencias presenta mayor número de compuestos, seguido del extracto de hojas, madera y de último el de raíz. El extracto de hojas no presenta los compuestos tipo derivados de ácido benzoico **N1**, **N2** y la cromona **N9**, el extracto de raíz no presenta **N1**, **N2**, **N4**, **N9** y **M1**. Por último, el extracto de tallos no presenta **N4**, **N5**, **N6**, **N7** y **N9**.

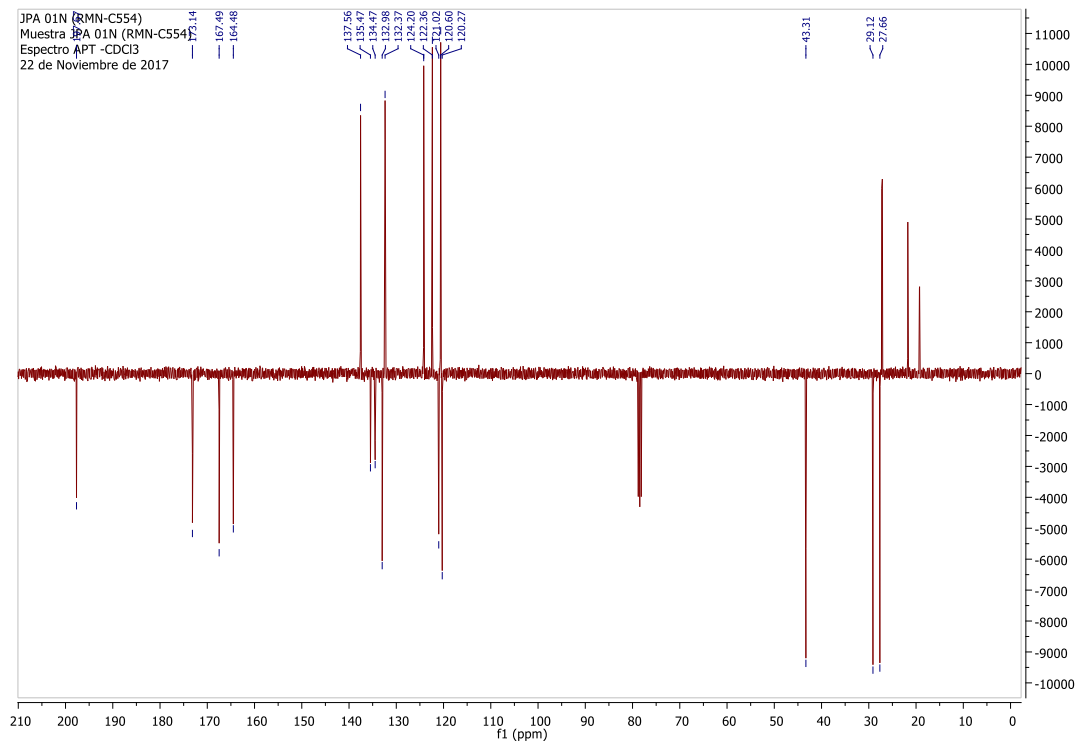
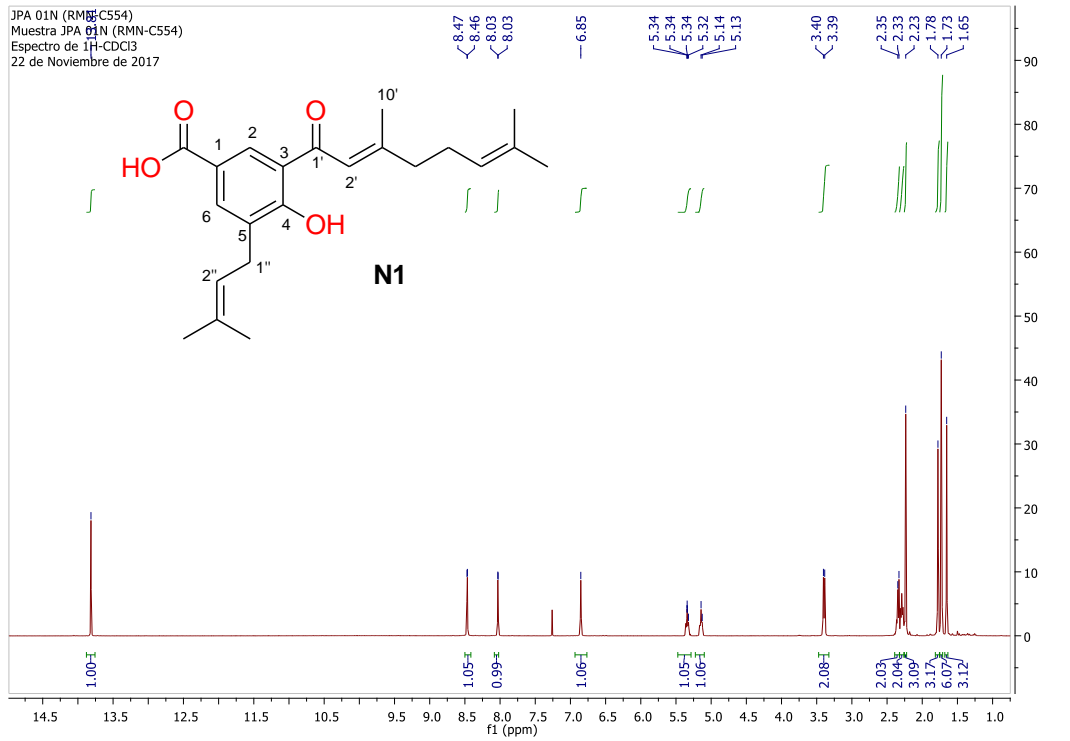
1.6 Anexos fitoquímica

Datos espectroscópicos y constantes física de los compuestos aislados representativos.

1. Datos espectroscópicos y constantes física de los compuestos del compuesto **N1**.

 <p style="text-align: center;">N1</p>	Nombre	Ácido (2' <i>E</i>) cumenico. Ácido (2' <i>E</i>)-3-(3',7'-dimetil-1'-oxoocta-2',6'-dienil)-4-hidroxi-5-(3''-metilbut-2''-enil)benzoico					
	Estado Físico:	Cristales agujas amarillos claro					
	Formula Molecular	C ₂₂ H ₂₈ O ₄					
	Peso	356,45 g/mol					
	Punto de fusión	112-113 °C					
Datos EMAR	HRESIMS (Modo negativo) m/z: 355.1916 [M-H] calcd. para C ₂₂ H ₂₇ O ₄ 355.1909)						
IR: $\nu = 2924, 1689, 1635, 1442, 1280, 1242, 845 \text{ cm}^{-1}$							
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 13.81 (s, 1H), 8.47 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 8.03 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 5.34 (m, 2H), 5.14 (m, 1H), 3.39 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 2.33 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 2.23 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.73 (s, 6H), 1.65 (s, 3H).							
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 196.2, 171.9, 166.0, 163.0, 136.0, 134.0, 133.0, 131.5, 130.9, 122.8, 120.9, 119.5, 119.1, 118.8, 41.8, 27.6, 26.2, 25.8, 25.8, 20.3, 17.8, 17.7.							
Bibliografía: Parra, J. E., et al. (2013). "A new benzoic acid derivative isolated from <i>Piper cf. cumanense</i> Kunth (Piperaceae)." <i>Phytochemistry Letters</i> 6(4): 590-592.							
Posición	RMN ¹H	RMN ¹³C	HMBC	Posición	RMN ¹H	RMN ¹³C	HMBC
1		118.8 (C)		5'	2.29 (m, 2H)	26.2 (CH ₂)	C7'
2	8.47 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H)	130.9 (CH)	C6, C4, C7, C1'	6'	5.14 (m, 1H)	122.8 (CH)	C8', C9'
3		131.5 (C)		7'		133.0 (C)	
4		166.0 (C)		8'	1.73 (s, 3H)	25.8 (CH ₃)	C6'
5		119.5 (C)		9'	1.65 (s, 3H)	17.7 (CH ₃)	C7'
6	8.03 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H)	136.0 (CH)	C1'', C2, C4, C7	10'	2.23 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 3H)	20.3 (CH ₃)	C4', C3', C2'
7		171.9 (C)		1''	3.39 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H)	27.6 (CH ₂)	C2'', C5, C3'', C4
1'		196.2 (C)		2''	5.34 (m, 2H)	120.9 (CH)	C4'', C5''
2'	6.85 (s, 1H)	119.1 (CH)	C4', C10', C3', C1'	3''		134.0 (C)	
3'		163.0 (C)		4''	1.77 (s, 3H)	25.8 (CH ₃)	C3''
4'	2.23 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H)	41.8 (CH ₂)	C3', C6'	5''	1.73 (s, 3H)	17.8 (CH ₃)	
					13.81 (s, 1H)		C1', C3, C4

2. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) y RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) y del compuesto **N1**.

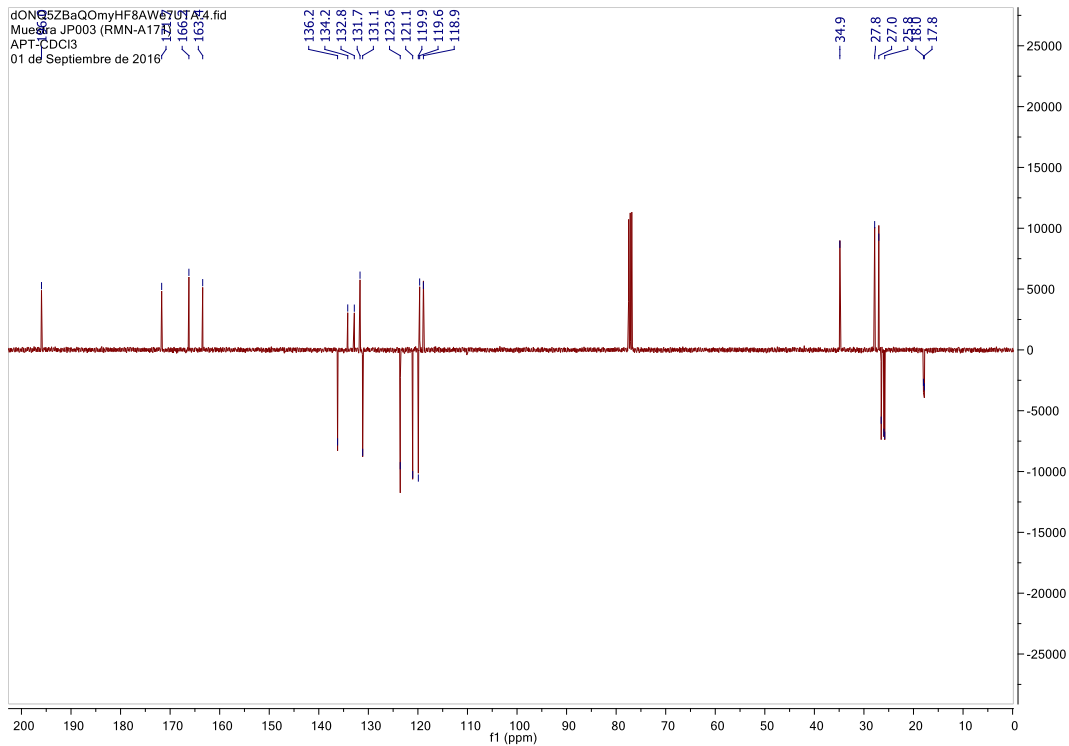
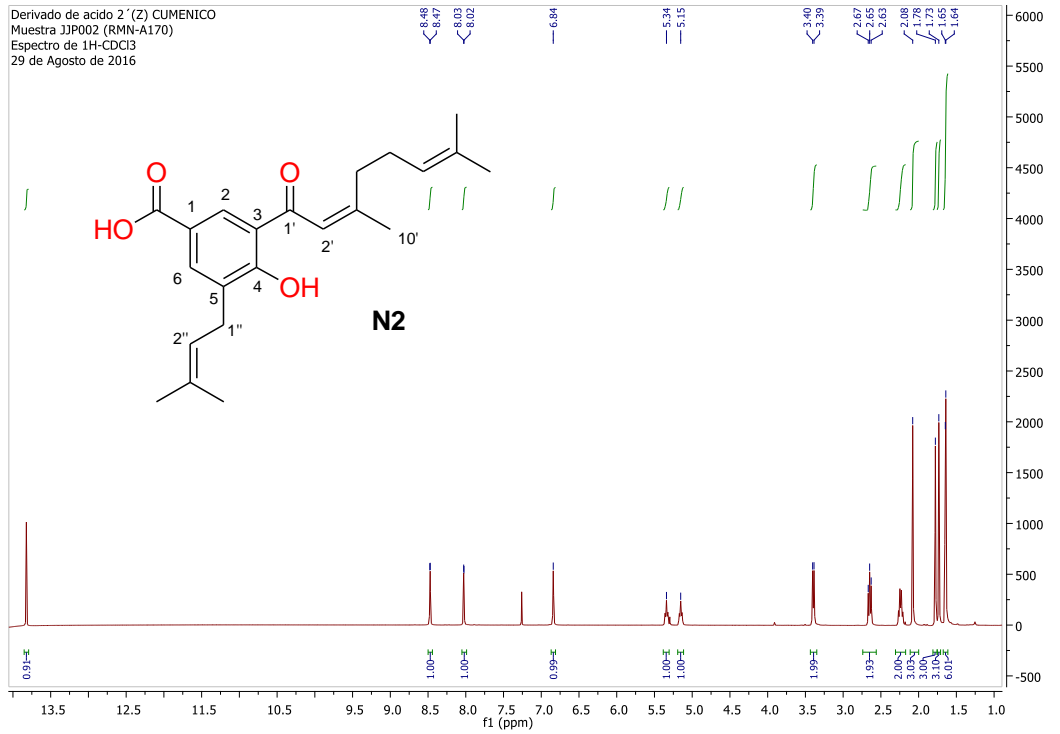


3. Datos espectroscópicos y constantes física de los compuestos del compuesto **N2**.

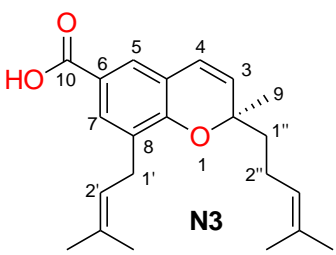
<p style="text-align: center;">N2</p>	Nombre	Acido 2-(Z) cumenico. Ácido-3-(3',7'-dimetil-1'-oxo-octa-2',6'-dienil)-4-hidroxi-5-(3''-metil-2''-but-2''-enil) benzoico
	Estado Físico:	Cristales amarillos
	Formula Molecular	C ₂₂ H ₂₈ O ₄
	Peso	356,45 g/mol
	Punto de fusión	132-133 °C
Datos EMAR	HRESIMS (Modo negativo) m/z: 355.1916 [M-H] (calcd. para C ₂₂ H ₂₇ O ₄ 355.1909)	
IR: $\nu=$ 2924, 1689, 1635, 1442, 1280, 1242 cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 13.81 (s, 1H), 8.47 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 8.03 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 5.34 (m, 2H), 5.14 (m, 1H), 3.39 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 2.33 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 2.23 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.73 (s, 6H), 1.65 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 196.2, 171.9, 166.0, 163.0, 136.0, 134.0, 133.0, 131.5, 130.9, 122.8, 120.9, 119.5, 119.1, 118.8, 41.8, 27.6, 26.2, 25.8, 25.8, 20.3, 17.8, 17.7.		
Bibliografía: Parra, J. E., et al. (2013). "A new benzoic acid derivative isolated from <i>Piper cf. cumanense</i> Kunth (Piperaceae)." <i>Phytochemistry Letters</i> 6(4): 590-592.		

Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC	Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC
1		118.9 (C)		5'	2.24 (q, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H)	27.0 (CH ₂)	C3', C6', C7'
2	8.47 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H)	131.1 (CH)	C6, C4, C7, C1'	6'	5.15 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H)	123.6 (CH)	C8', C9'
3		131.7 (C)		7'		132.8 (C)	
4		166.2 (C)		8'	1.64 (s, 3H)	25.8 (CH ₃)	C6', C7', C9'
5		119.6 (C)		9'	1.64 (s, 3H)	17.8 (CH ₃)	C6', C7', C8'
6	8.03 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 1H)	136.2 (CH)	C1'', C2, C4, C7	10'	2.08 (s, 3H)	26.5 (CH ₃)	C4', C3', C2'
7		171.7 (C)		1''	3.40 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H)	27.8 (CH ₂)	C2'', C5, C3'', C4, C6
1'		196.0 (C)		2''	5.34 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H)	121.1 (CH)	C1'', C4'', C5''
2'	6.84 (s, 1H)	119.9 (CH)	C4', C10', C3', C1'	3''		134.2 (C)	
3'		163.4 (C)		4''	1.78 (s, 3H)	26.0 (CH ₃)	C2'', C3'', C5''
4'	2.68 (m, 2H)	34.9 (CH ₂)	C2', C3', C6', C10'	5''	1.73 (s, 3H)	17.8 (CH ₃)	C2'', C3'', C4''
					13.81 (s, 1H)		C1', C3, C4

4. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) y RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) y del compuesto **N2**.

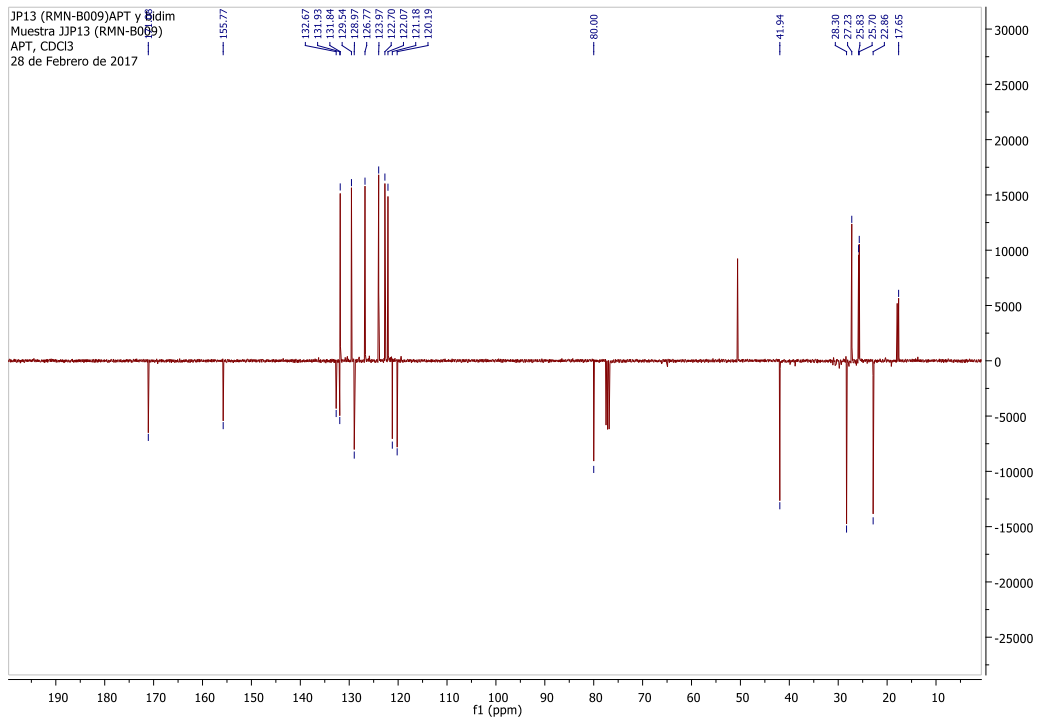
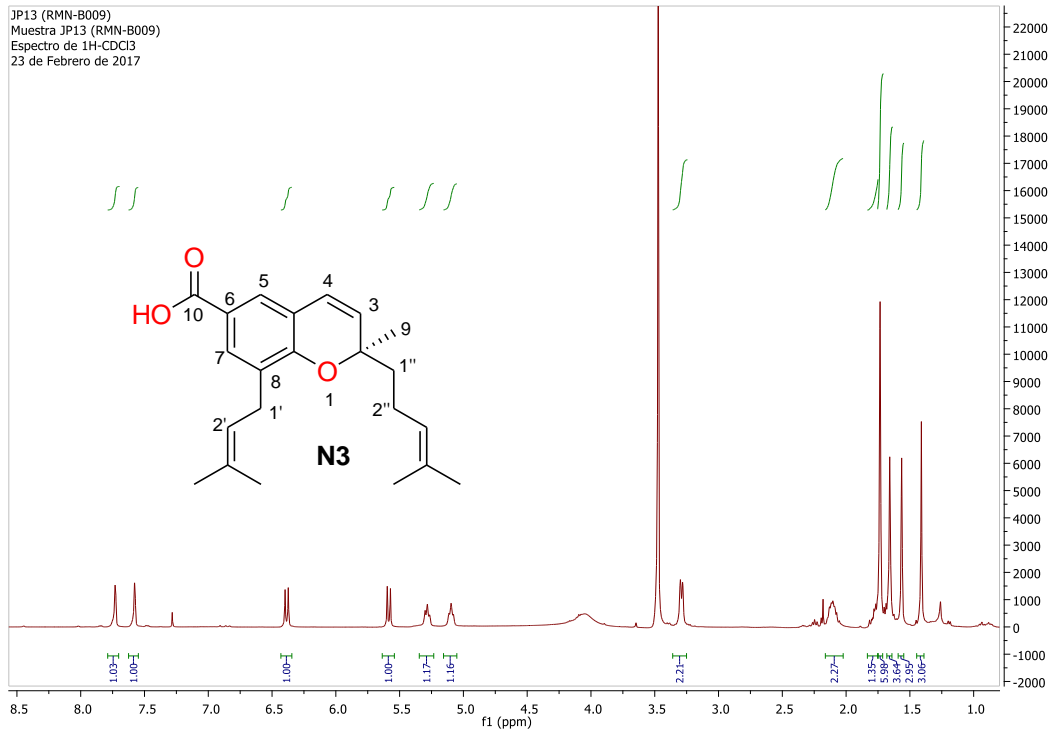


5. Datos espectroscópicos y constantes física de los compuestos del compuesto **N3**.

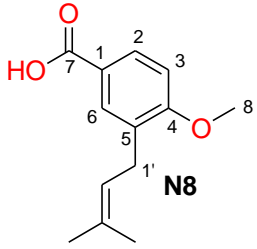
 <p style="text-align: center;">N3</p>	Nombre	Ácido Gaudichaudianico. Ácido (2S)-2-Metil-2-(4'-metil-pent-3-enil)-8-(3''-metil-but-2''-enil)-2H-1-cromano-6-carboxílico
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo claro
	Formula Molecular	C ₂₂ H ₂₈ O ₃
	Peso	340,20 g/mol
	Datos EMAR	HRESIMS (Modo negativo) m/z: 339.1906 [M-H] (calcd. para C ₂₂ H ₂₇ O ₃ 339,1966)
	Rotación óptica	[α] ²⁵ _D : +21.0 (c 0.10, CHCl ₃)
IR: ν= 3460, 1626, 1471, 1435, 1315, 1273, 1242, 1224, 1143, 1070, 929, 883 cm ⁻¹		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (s, 1H), 7.58 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.58 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 5.28 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 5.10 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.31 (t, J = 11.3 Hz, 2H), 2.25 (m, 2H), 1.78 (m, 2H), 1.73 (m, 6H), 1.67 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.41 (s, 3H).		
RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 172.1, 155.8, 132.6, 131.8, 131.8, 129.5, 128.9, 126.7, 123.9, 122.7, 122.0, 121.2, 120.2, 80.0, 41.9, 28.3, 27.2, 25.8, 25.7, 22.8, 17.6.		
Bibliografía: Lago, J. H. G., et al. (2004). "Benzoic Acid Derivatives from <i>Piper</i> Species and Their Fungitoxic Activity against <i>Cladosporium cladosporioides</i> and <i>C. sphaerospermum</i> ." <i>Journal of Natural Products</i> 67(11): 1783-1788.		

Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC	Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC
2		80.0 (C)		1'	1.78 (m, 2H)	41.9 (CH ₂)	C2
3	5.58 (d, J = 10.0 Hz, 1H)	129.5 (CH)	C2, C4a	2'	2.25 - 2.28 (m, 2H)	22.8 (CH ₂)	C2, C1', C3', C4'
4	6.38 (d, J = 10.0 Hz, 1H)	122.7 (CH)	C2, C4a, C5, C8a	3'	5.10 (m, 1H)	123.9 (CH)	C2', C5', C6'
4a		120.2 (C)		4'		131.8 (C)	
5	7.59 (d, J = 2.1 Hz, 1H)	126.7 (CH)	C4, C5, C10, C8a	5'	1.56 (s, 3H)	17.6 (CH ₃)	C3', C4', C6'
6		121.2 (C)		6'	1.67 (s, 3H)	25.7 (CH ₃)	C5', C3', C4'
7	7.73 (s, 1H)	131.8 (CH)	C5, C10, C8a, C1''	1''	3.31 (d, J = 7.3 Hz, 2H)	28.3 (CH ₂)	C7, C8a, C2'', C3''
8		128.9 (C)		2''	5.28 (m, 1H)	122.0 (CH)	C1'', C4'', C5''
8a		155.8 (C)		3''		132.6 (C)	
9	1.41 (s, 3H)	27.2 (CH ₃)	C2, C3, C1'	4''	1.73 s	25.8 (CH ₃)	C2'', C3'', C5''
10		172.1 (C)		5''	1.73 s	17.6 (CH ₃)	C2'', C3'', C4''

6. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) y RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) y del compuesto **N3**.

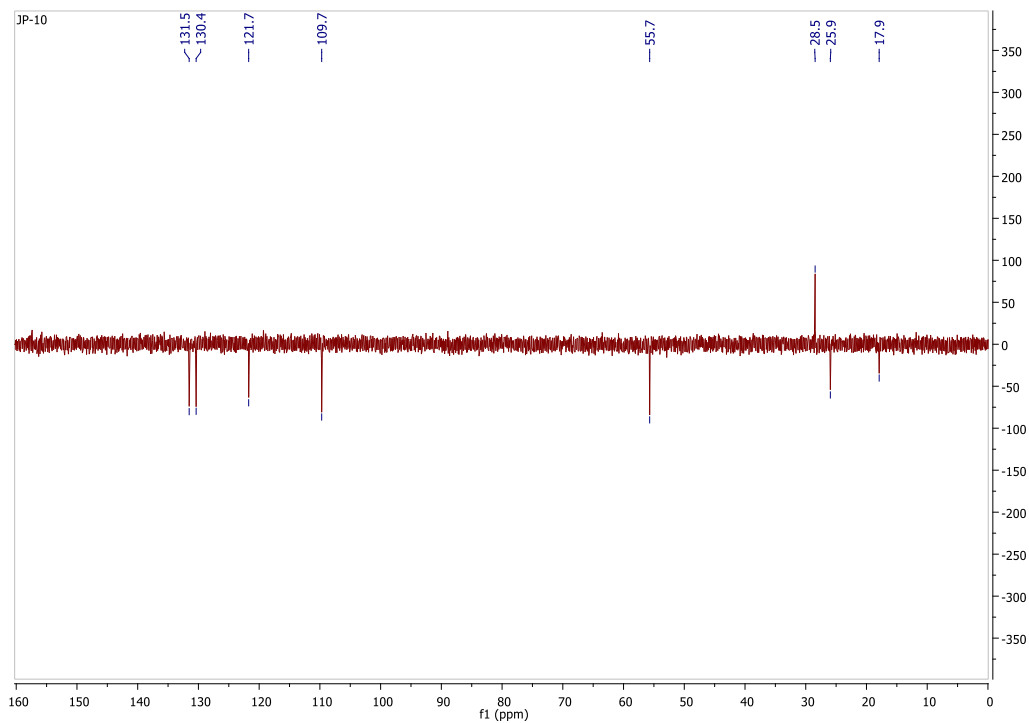
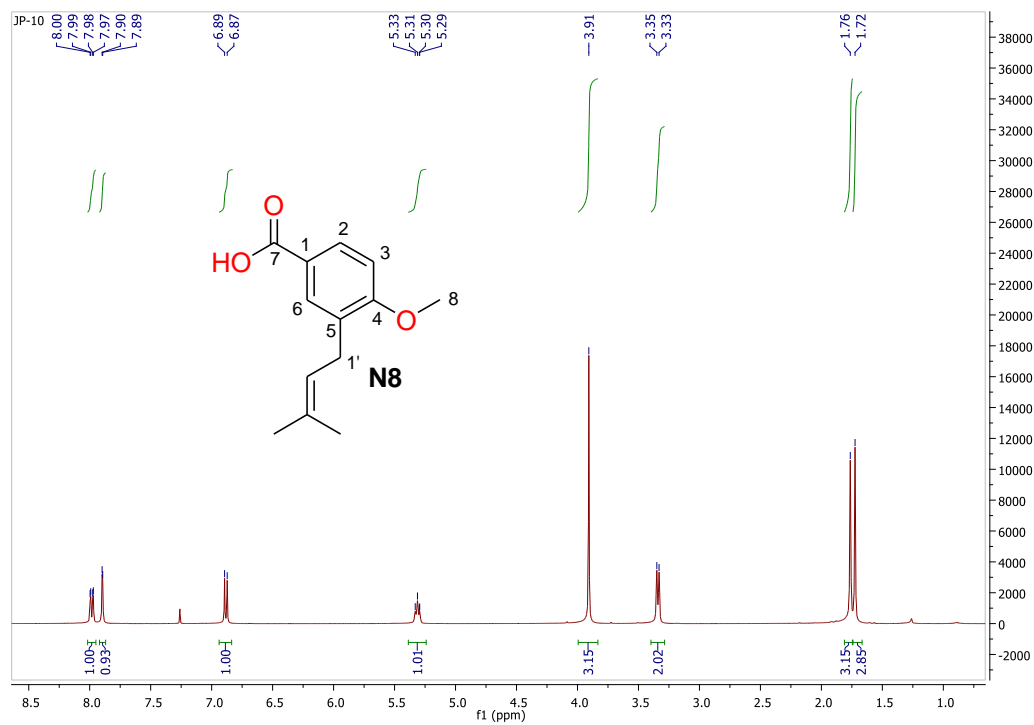


7. Datos espectroscópicos y constantes física de los compuestos del compuesto **N8**.

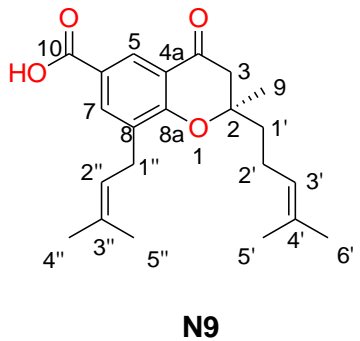
 <p style="text-align: center;">N8</p>	Nombre	Acido 4-metoxi-3-(3'-metil-2'-butenil)benzoico
	Estado Físico:	Cristales transparentes
	Formula Molecular	C ₁₃ H ₁₆ O ₃
	Peso	220,26 g/mol
	Punto de fusión	127-128 °C
	Datos EMAR	HRESIMS (Modo negativo) m/z: 219.1020 (calcd. para C ₁₃ H ₁₅ O ₃ , 219.1021, [M-H] ⁻).
IR: $\nu = 3365, 2942, 2835, 1604, 1023 \text{ cm}^{-1}$		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.98 (dd, $J = 8.5, 2.1 \text{ Hz}$, 1H), 7.90 (d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H), 6.88 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H), 5.31 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.34 (d, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H), 1.76 (s, 3H), 1.72 (s, 3H).		
RMN ¹³C (101 MHz, CDCl ₃): δ 172.5 (C-7), 162.0 (C-4), 133.4 (C-3'), 131.5 (C-2), 130.4 (C-6), 130.3 (C-3), 121.7 (C-2'), 121.4 (C-1), 109.7 (C-5), 55.7 (C-8), 28.5 (C-1'), 25.9 (C-4'), 17.9 (C-5').		
Bibliografía: Cao, S., C. Rossant, S. Ng, A. D. Buss and M. S. Butler (2003). "Phenolic derivatives from <i>Wigandia urens</i> with weak activity against the chemokine receptor CCR5." <i>Phytochemistry</i> 64(5):987-990.		

Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC	Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC
1		121,4 (C)		8	3,91 (s,3H)	55,7 (CH ₃)	C4
2	7,90 (d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H)	131,5 (CH)	C4, C6, C7, C1'	1'	3.34 (d, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H)	28,5 (CH ₂)	C2', C2, C3, C4
3		130,3 (C)		2'	5.31 (t, $J = 7,3 \text{ Hz}$, 2H)	121,6 (CH)	C3, C4', C5'
4		162,0 (C)		3'		133,4 (C)	
5	6,88 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H)	109,7 (CH)	C1, C3, C4	4'	1.76 (s, 3H)	25,9 (CH ₃)	C2', C3', C5'
6	7,98 (dd, $J = 2.1, 8.5 \text{ Hz}$, 1H)	130,4 (CH)	C2, C4, C7	5'	1.72 (s, 3H)	17.9 (CH ₃)	C2', C3', C4'
7		172,5 (C)					

8. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) y RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) y del compuesto **N8**.

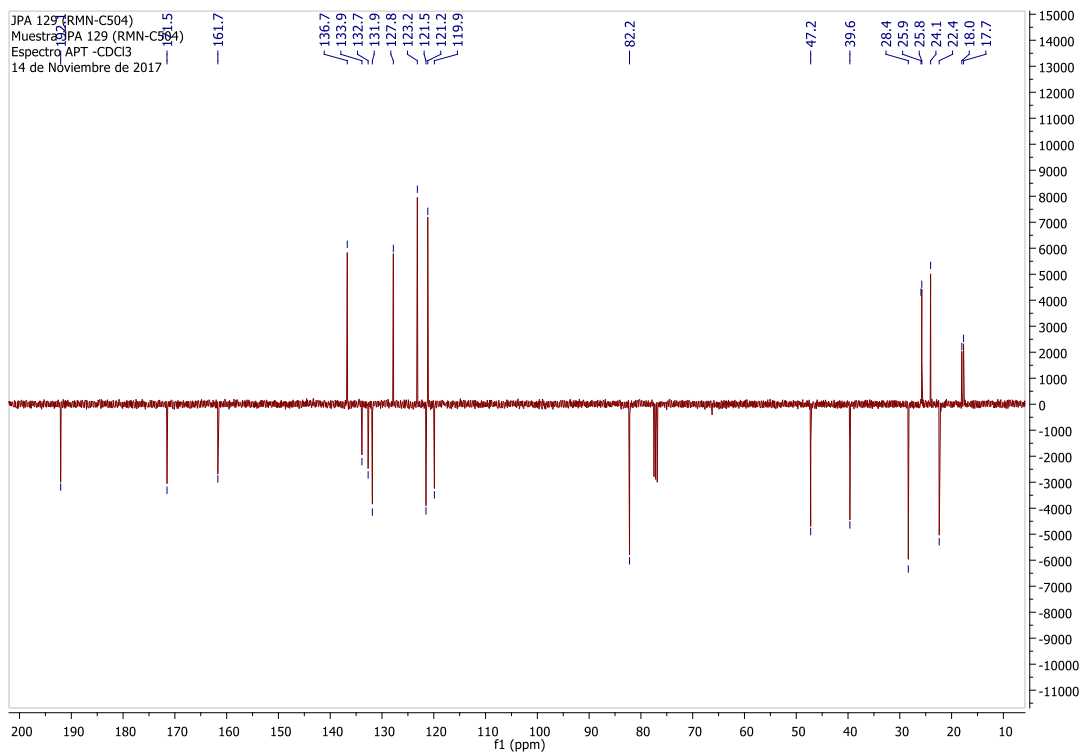
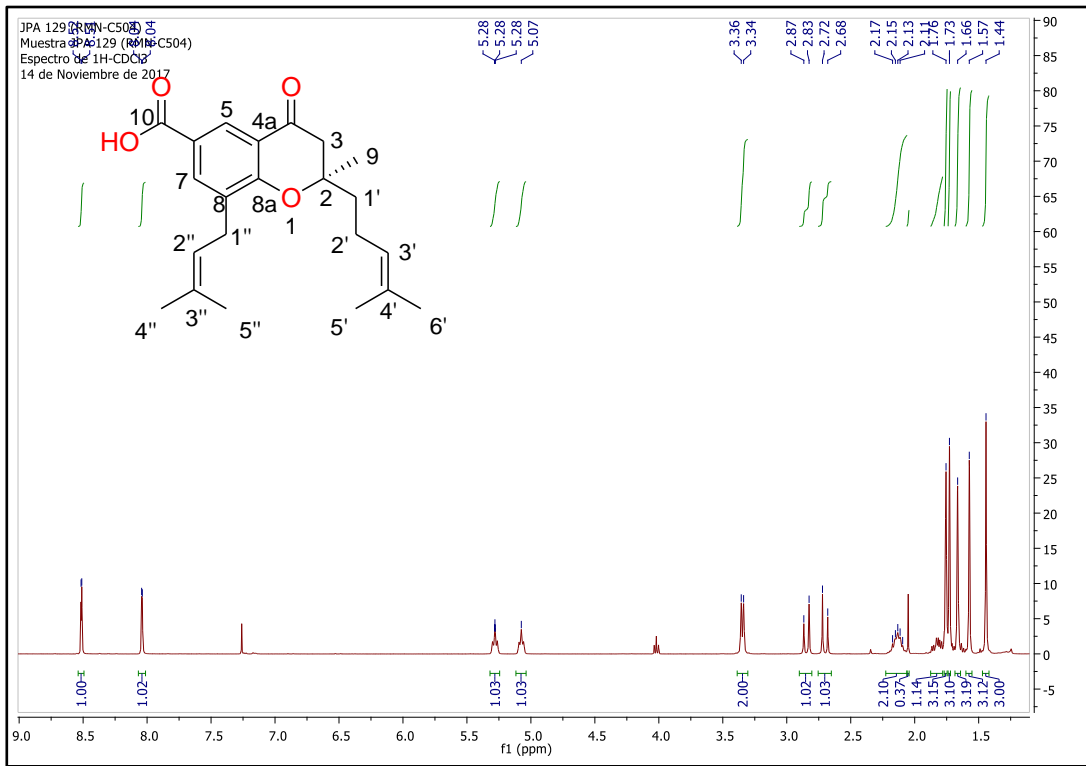


9. Datos espectroscópicos y constantes física de los compuestos del compuesto **N9**

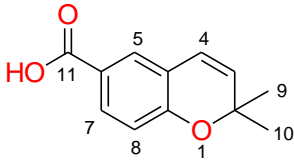
 <p style="text-align: center;">N9</p>	Nombre	Ácido oxocuménico. Ácido (2S)-2-metil-2-(4'-metil-pent-3'-enil-8-(3''-metil-but-2''-enil)-)-4-oxo-cromano-6-carboxílico
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo claro
	Formula Molecular	C ₂₂ H ₂₈ O ₄
	Peso	356,45 g/mol
	Datos EMAR	HRESIMS (Modo positivo) m/z: 357.2058 [M+H] (calcd. para C ₂₂ H ₂₇ O ₄ 357.1909)
	Rotación óptica	[α] ²⁵ _D : +13.63 (c 0.10, CHCl ₃)
Punto de fusión	87 – 89 °C	
IR: ν = 2972, 1698, 1651, 1435, 1315, 1273, 1242, 1224, 1143, 1070, 929, 883 cm ⁻¹		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8.51 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.28 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 5.07 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.35 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 2.85 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 2.70 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 2.23 – 2.06 (m, 2H), 1.76 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.44 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 192.0, 171.5, 161.7, 136.7, 133.9, 132.7, 131.9, 127.8, 123.2, 121.5, 121.2, 119.9, 82.2, 47.2, 39.6, 28.4, 25.9, 25.7, 24.1, 22.4, 18.0, 17.7.		
Bibliografía: Parra, J. E., et al. (2013). "A new benzoic acid derivative isolated from <i>Piper cf. cumanense</i> Kunth (Piperaceae)." <i>Phytochemistry Letters</i> 6(4): 590-592. Lago, J. H. G., et al. (2004). "Benzoic Acid Derivatives from <i>Piper</i> Species and Their Fungitoxic Activity against <i>Cladosporium cladosporioides</i> and <i>C. sphaerospermum</i> ." <i>Journal of Natural Products</i> 67(11): 1783-1788.		

Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC	Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC
2		82.2 (C)		10		171.5 (C)	
3	2.70 (d, J = 16.4 Hz, 1H)	47.2 (CH ₂)	C2, C4, C9, C4a, C1'	1'	1.81 (m, 2H)	39.6 (CH ₂)	C2', C3
3	2.85 (d, J = 16.4 Hz, 1H)	47.2 (CH ₂)	C2, C4, C9, C4a, C1'	2'	2.23 - 2.06 (m, 2H)	22.4 (CH ₂)	C2, C1', C3', C4'
4		192.0 (C)		3'	5.07 (t, J = 7.0 Hz, 1H)	123.2 (CH)	C2', C5', C6'
4a		119.9 (C)		4'		131.9 (C)	
5	8.51 (d, J = 2.2 Hz, 1H)	127.8 (CH)	C4, C7, C10, C8a	5'	1.57 s	17.7 (CH ₃)	C3', C4', C6'
6		121.5 (C)		6'			
7	8.04 (d, J = 2.0 Hz, 1H)	136.7 (CH)	C5, C10, C8a, C1''	1''	3.35 (d, J = 7.3 Hz, 2H)	28.4 (CH ₂)	C7, C8a, C2'', C3''
8		133.9 (C)		2''	5.28 (t, J = 7.4 Hz, 1H)	121.2 (CH)	C1'', C4'', C5''
8a		161.9 (C)		3''		132.7 (C)	
9	1.44 s	24.1 (CH ₃)	C2, C3, C1'	4''	1.76 s	25.9 (CH ₃)	C2'', C3'', C5''
				5''	1.73 s	18.0 (CH ₃)	C2'', C3'', C4''

10. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) y RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) y del compuesto **N9**.

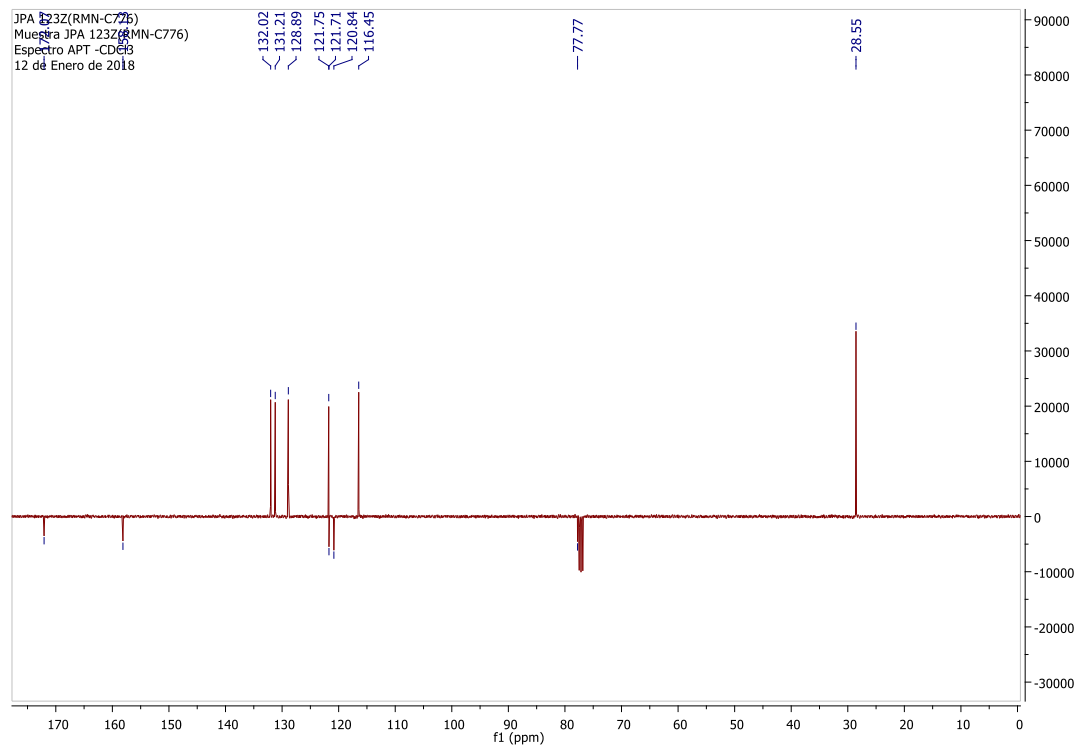
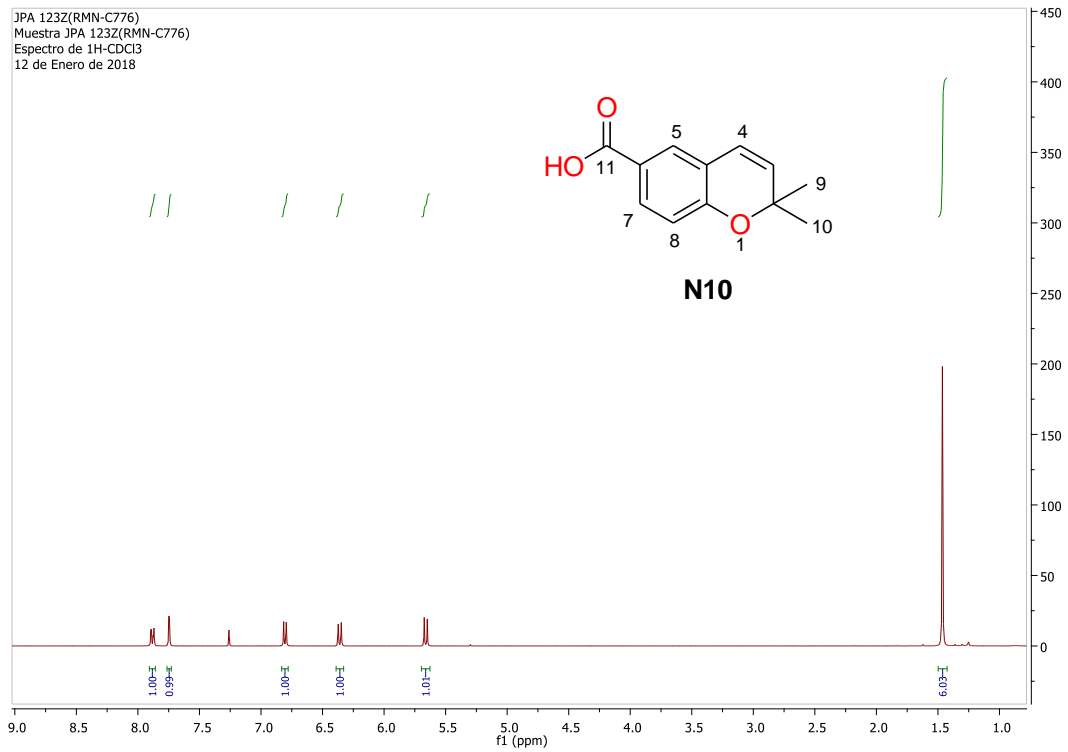


11. Datos espectroscópicos y constantes física de los compuestos del compuesto **N10**

 <p style="text-align: center;">N10</p>	Nombre	Ácido-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico
	Estado Físico:	Sólido
	Formula Molecular	C ₁₂ H ₁₂ O ₃
	Peso	204,07 g/mol
	Punto de fusión	155-157 °C
	Datos EMAR	HRESIMS (Modo negativo) m/z 203,0783 [M-H] (calcd for C ₁₂ H ₁₂ O ₃ , 204.0786).
EM	ES-MS m/z: 205 [M+1] (100)	
IR: ν=3300-2400 (br), 2975, 1674, 1575, 1446, 1412, 1299, 1276, 1200, 1123, 954, 768 cm ⁻¹		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.88 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 1.46 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 172.1, 158.1, 132.0, 131.2, 128.9, 121.8, 121.7, 120.8, 116.5, 77.8, 28.5		
<p>Bibliografía: Lago, J. H. G., Ramos, C. S., Casanova, D. C. C., Morandim, A. D. A., Bergamo, D. C. B., Cavalheiro, A. J., & Kato, M. J. (2004). Benzoic Acid Derivatives from <i>Piper</i> Species and Their Fungitoxic Activity against <i>Cladosporium cladosporioides</i> and <i>C. sphaerospermum</i>. <i>Journal of Natural Products</i>, 67(11), 1783-1788.</p> <p>Smith, L. R., Mahoney, N., & Molyneux, R. J. (2003). Synthesis and Structure-Phytotoxicity Relationships of Acetylenic Phenols and Chromene Metabolites, and Their Analogues, from the Grapevine Pathogen <i>Eutypa lata</i>. <i>Journal of Natural Products</i>, 66(2), 169-176.</p>		

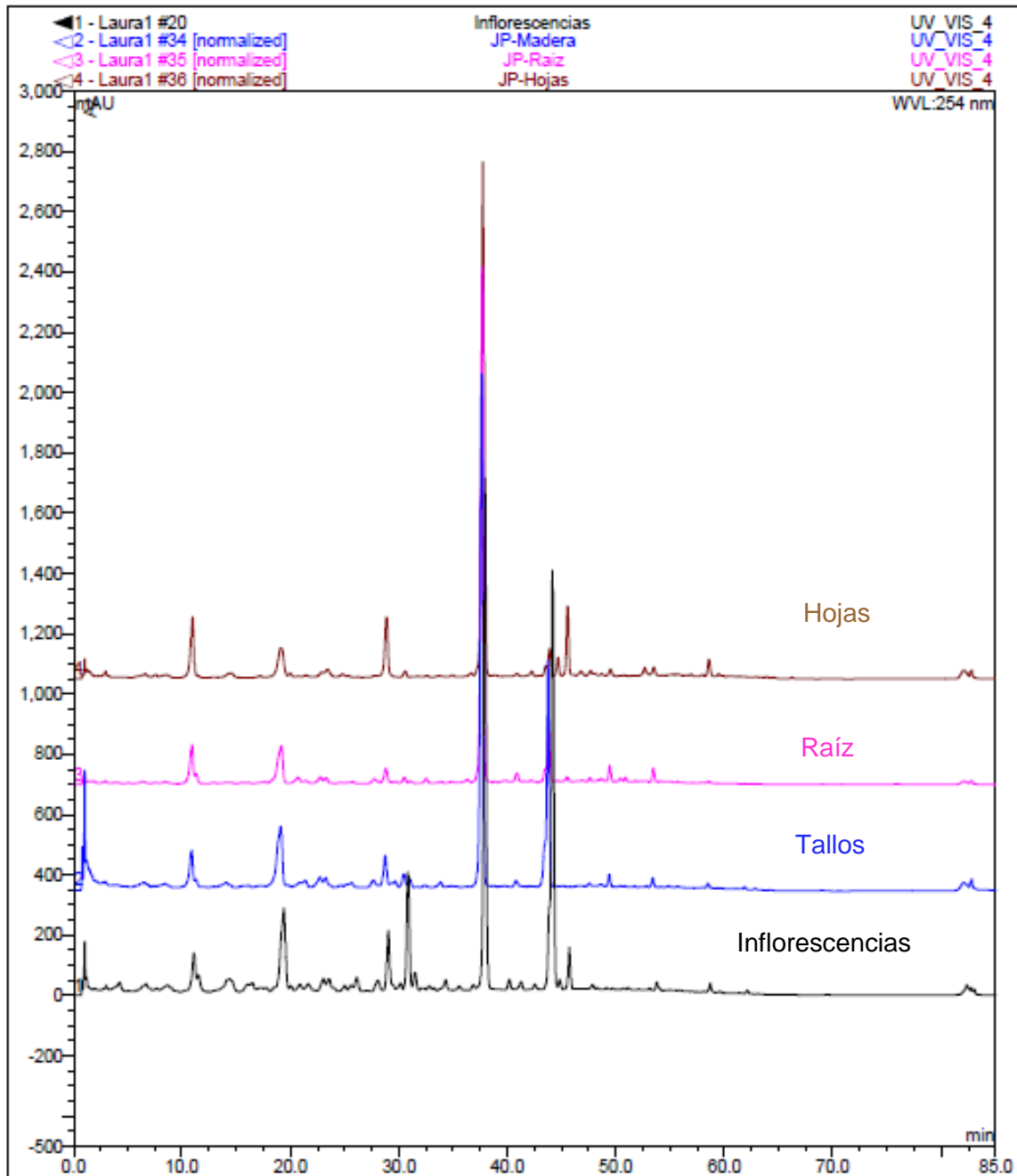
Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC	Posición	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC
2		77.8 (C)		7	7.88 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H)	132.0 (CH)	C5, C11, C8a
3	5.66 (d, J = 9.9 Hz, 1H)	131.2 (CH)	C2, C4, C9, C10	8	6.81 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	116.5 (CH)	C6, C4a
4	6.36 (d, J = 9.9 Hz, 1H)	121.8 (CH)	C2, C4a, C5, C8a	8a		158.1 (C)	
4a		120.8 (C)		9	1.46 (s)	28.5 (CH ₃)	C4, C2, C3, C10
5	7.75 (d, J = 2.1 Hz, 1H)	128.9 (CH)	C4, C11, C8a	10	1.46 (s)	28.5 (CH ₃)	C4, C2, C3, C9
6		121.7 (C)		11		172.1 (C)	

12. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) y RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) y del compuesto **N9**.

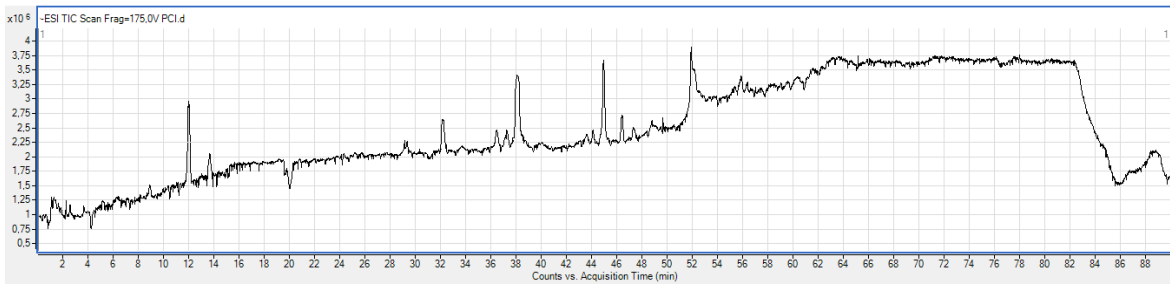


1.7 Anexos de cromatografía

13. Cromatogramas obtenidos por HPLC DAD a 254nm de los extractos etanólicos de los diversos órganos de *P. cumanense*.



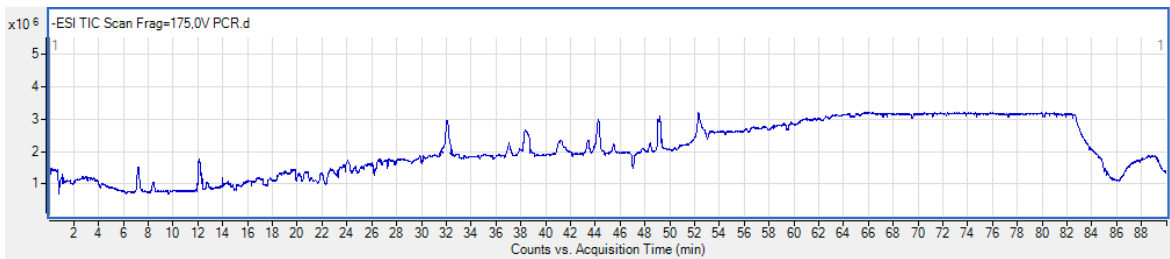
14. Cromatograma obtenido por LC-MS para el extracto de inflorescencias



15. Cromatograma obtenido por LC-MS para el extracto de tallos.

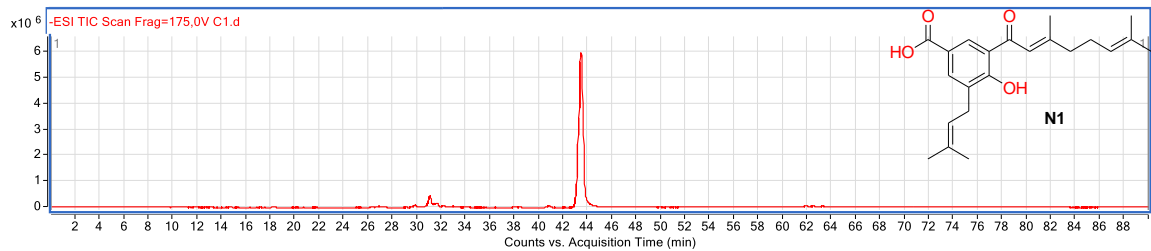


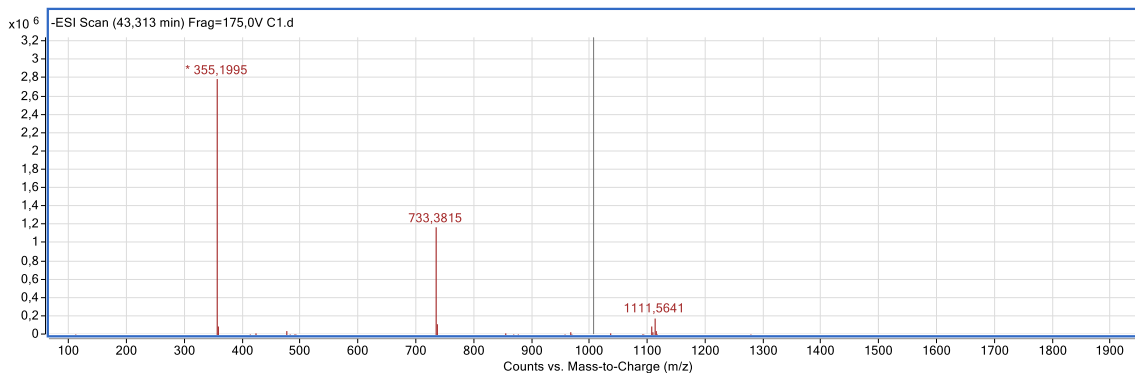
16. Cromatograma obtenido por LC-MS para el extracto de raíces



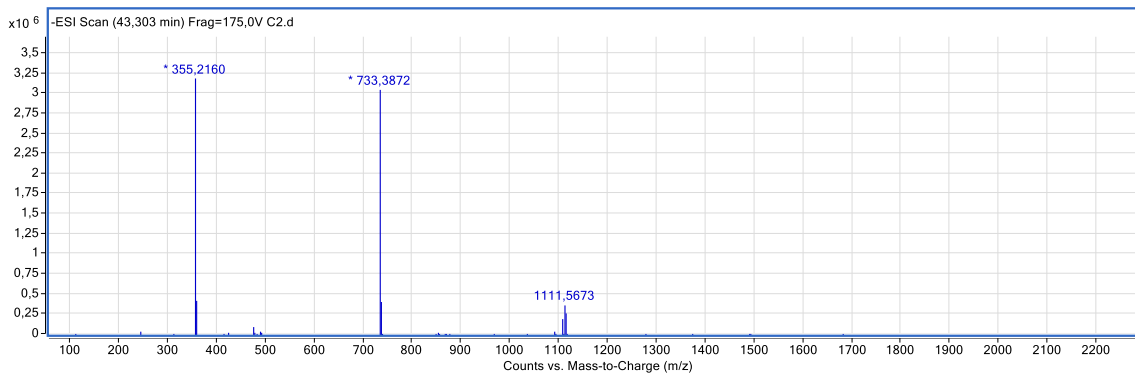
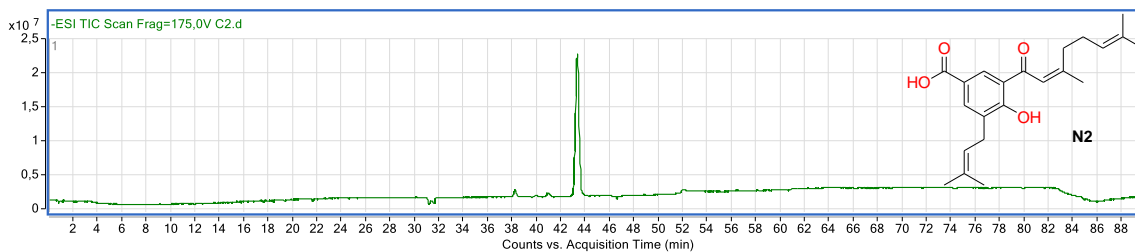
17. Cromatograma obtenido por LC-MS y espectrometría de masa para el compuesto

N1

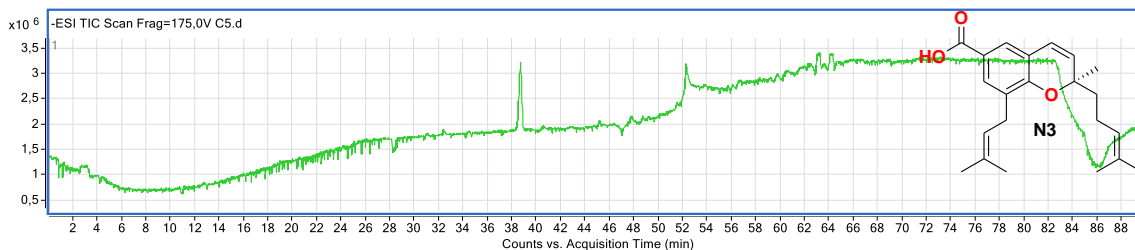


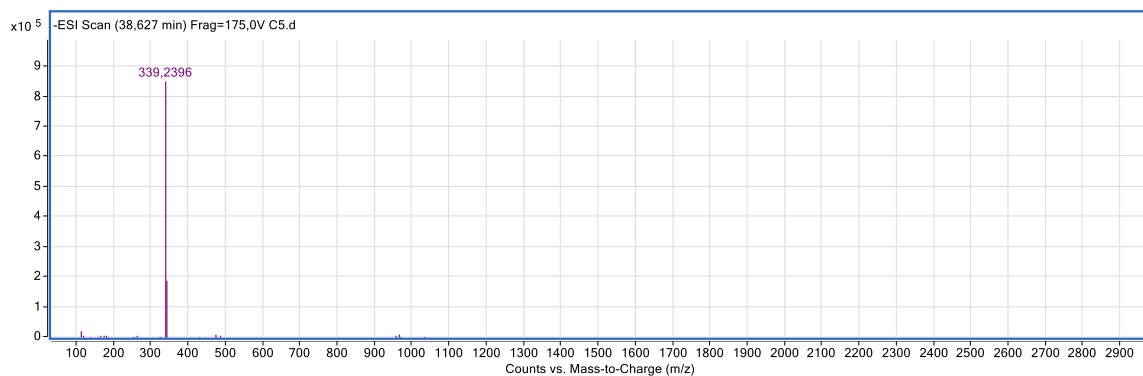


18. Cromatograma obtenido por LC-MS y espectrometría de masa para el compuesto

N2

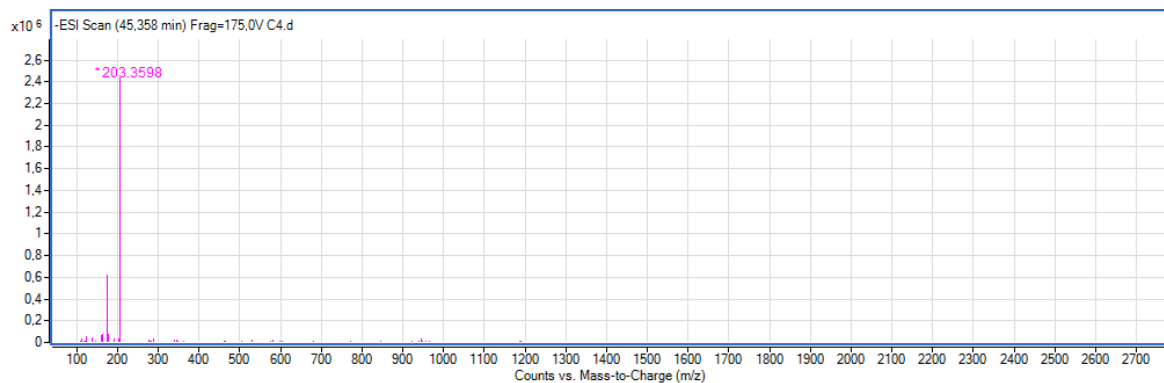
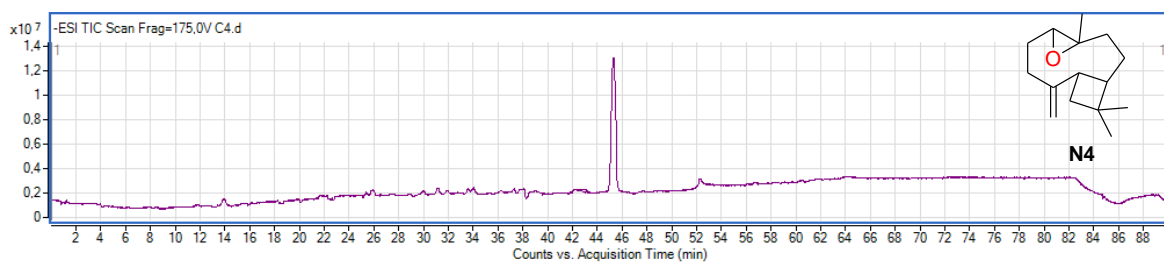
19. Cromatograma obtenido por LC-MS y espectrometría de masa para el compuesto

N3



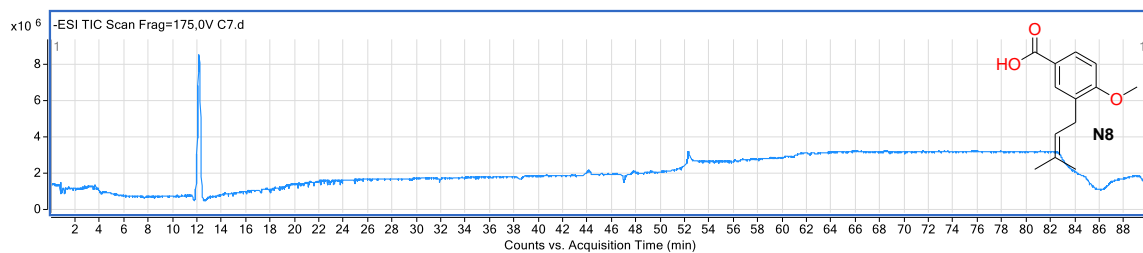
20. Cromatograma obtenido por LC-MS y espectrometría de masa para el compuesto

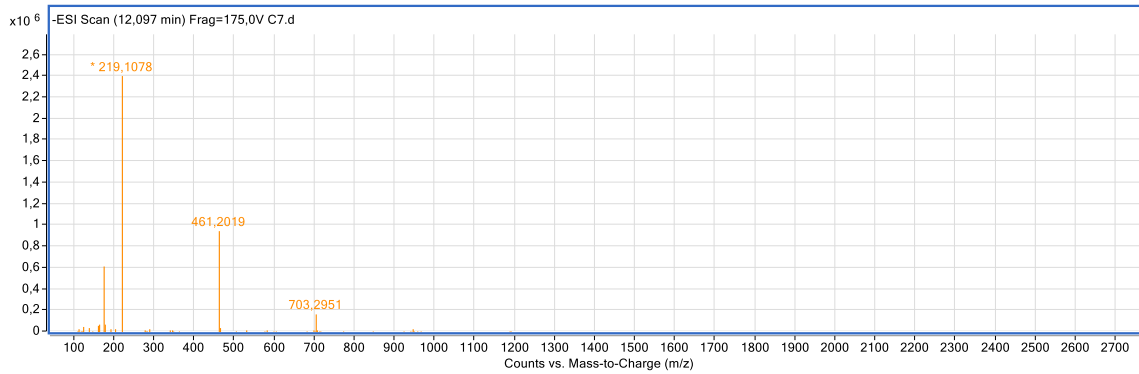
N4



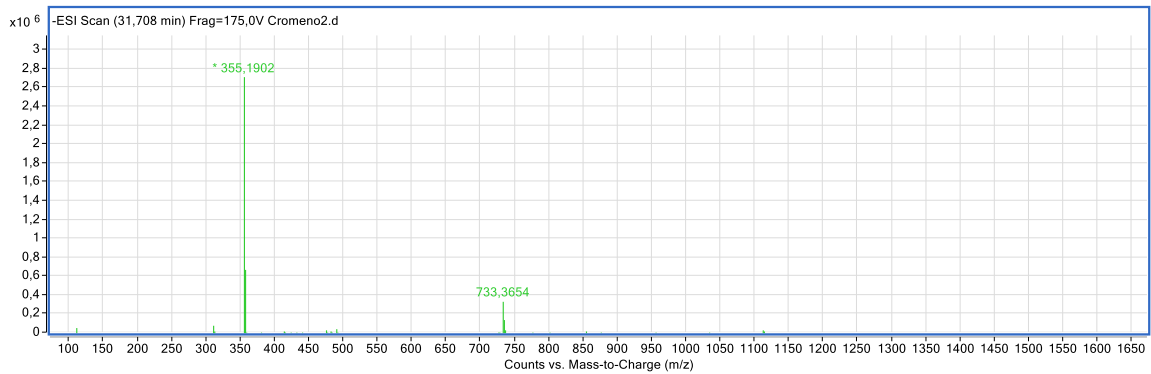
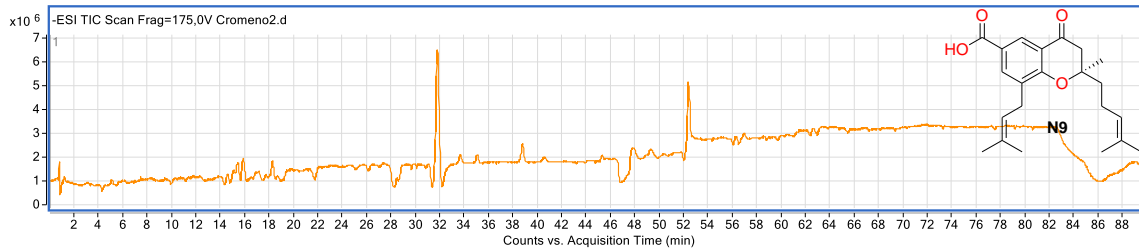
21. Cromatograma obtenido por LC-MS y espectrometría de masa para el compuesto

N8





22. Cromatograma obtenido por LC-MS y espectrometría de masa para el compuesto

N9

Bibliografía

1. Tafur, R.; Fischer, G.; Miranda, D.; Piedrahita, W.; Magnitskiy, S. In *Propuesta frutícola para Colombia y su impacto en la actividad económica nacional, regional y departamental*, Memorias Congreso Colombiano de Horticultura, 1, 17-20 Oct **2006**, Bogotá (Colombia) p. 47-66, 2006.
2. Perfetti, J. J.; Hernández, A.; Leibovich, J.; Balcázar, Á., Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia. **2013**.
3. DANE Comercio internacional de exportaciones. <http://www.dane.gov.co/index.php/comercio-y-servicios/comercio-exterior/exportaciones>. (accessed marzo **2018**).
4. Nakasone, H. Y. P., R. E., *Tropical fruits*. 2 ed.; Cab International: **1998**.
5. Agronet Volúmenes exportados en gulupa entre 2014 y 2015. <http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/VerReporte.aspx>; (accessed diciembre **2018**).
6. Moreno, P. Actividad antifúngica de los extractos vegetales de *Piper eripodon* y *Zanthoxylum monophyllum* y sus metabólicos secundarios mayoritarios sobre dos hongos fitopatógenos de clavel (*Dianthus caryophyllus*). Universidad Nacional de Colombia Colombia, **2011**.
7. Ortiz C.; Emiro; Hoyos C., Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *rev.colomb.cienc.hortic.* **2012**, 6 (2011-2173.), 110-116.
8. Ploetz, R. C., *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI: 2003; p 708.
9. Moya. Determinación de la incidencia e identificación de nematodos fitoparásitos en un cultivo comercial de gulupa *Passiflora edulis* Sims. Universidad de Cundinamarca, Colombia, **2010**.
10. Riascos, D. Caracterización etiológica de la roña de la gulupa *Passiflora edulis* Sims. en la región del Sumapaz. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, **2011**.
11. Dean, R.; Kan, J. A. L. V.; Pretorius, Z. A.; Hammond-Kosack, K. E.; Pietro, A. D.; Spanu, P. D.; Rudd, J. J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; Foster, G. D., The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **2012**, 13 (4), 414-430.
12. Santos, S.; Eder, J., de Oliveirall; Fernando, H.; Onildo, N., de JesusII; Carvalho, C., Molecular fingerprinting of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolates using AFLP markers. *Scientia Agricola* **2013**, 70, 108-115.
13. Rana, A.; Sahgal, M.; N. Johri, B., *Fusarium oxysporum: Genomics, Diversity and Plant-Host Interaction*. **2017**; p 159-199.
14. Ibarz, R.; Garvín, A.; Pagán, J.; Ibarz., A., "Modelización cinética de la degradación fotoquímica de benomilo." *Afinidad* **2015**, 72, 570.
15. Strand, J. F., Some agrometeorological aspects of pest and disease management for the 21st century. *Agricultural and Forest Meteorology* **2000**, 103 (1), 73-82.
16. Faxsa Fosfuro de Aluminio. http://www.faxsa.com.mx/Fosf_MT/KillPhMT.pdf. (accessed marzo **2018**).
17. Nita, M., *Fungicides-Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*. **2013**; Vol. Chapter 9
18. Soković, M.; Glamočlija, J.; Ćirić, A., Fungicides—Showcases of Integrated Plant Disease Management from around the World. *Natural Products from Plants and Fungi as Fungicides* **2013**, 185-232.

19. Li, H. X.; Yang, S. Y.; Kim, Y. H.; Li, W., Isolation of Two New Compounds and Other Constituents from Leaves of *Piper crocatum* and Study of Their Soluble Epoxide Hydrolase Activities. *Molecules* **2019**, *24* (3), 489.
20. Valadares, A.; Alves, C. C.; Alves, J. M.; De Deus, I. P. B.; De Oliveira Filho, J. G.; Dos Santos, T. C. L.; Dias, H. J.; Crotti, A. E. M.; Miranda, M. L. D., Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2018**, *90*, 2691-2699.
21. Suzuki, T.; Yamato, S., Mode of action of piperovatine, an insecticidal piperamide isolated from *Piper piscatorum* (Piperaceae), against voltage-gated sodium channels. *Neurotoxicology* **2018**, *69*, 288-295.
22. Mazzeu, B. F.; Felipe, L. G.; Cotinguiba, F.; Kato, M. J.; Furlan, M., Kavalactones and Benzoic Acid Derivatives from Leaves of *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2018**, *29*, 1286-1290.
23. Da Silva, H. A.; Yamaguchi, L. F.; Young, M. C. M.; Ramos, C. S.; Amorim, A. M. A.; Kato, M. J.; Batista, R., Antifungal piperamides from *Piper mollicomum* Kunth (Piperaceae). *Eclética Química* **2018**, *43* (1), 33-38.
24. Shi, Y.-N.; Liu, F.-F.; Jacob, M. R.; Li, X.-C.; Zhu, H.-T.; Wang, D.; Cheng, R.-R.; Yang, C.-R.; Xu, M.; Zhang, Y.-J., Antifungal amide alkaloids from the aerial parts of *Piper flaviflorum* and *Piper sarmentosum*. *Planta medica* **2017**, *83* (01/02), 143-150.
25. Ávila, M. Estudio fitoquímico de dos especies del género *Piper* (*Piper subtomentosum*, *Piper septuplinervium*) (Piperaceae) y determinación de actividad insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). Universidad Nacional de Colombia. , Bogotá, **2014**.
26. Parra, J. E.; Delgado, W. A.; Cuca, L. E., Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters* **2011**, *4* (3), 280-282.
27. Marques, J. V.; Oliveira, A. d.; Raggi, L.; Young, M. C. M.; Kato, M. J., Antifungal activity of natural and synthetic amides from Piper species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2010**, *21*, 1807-1813.
28. Regnault-Roger CP, B. V., C. , *Biopesticidas de origen vegetal*. 2004.
29. style, M. "The Nobel Prize in Chemistry 2015". http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/ (accessed marzo **2018**).
30. Tiezzi; Laghezza, M., V.; Ovidi, E., Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches AU - Bernardini, S. *Natural Product Research* **2018**, *32* (16), 1926-1950.
31. Davison, E. K.; Brimble, M. A., Natural product derived privileged scaffolds in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2019**, *52*, 1-8.
32. Lorsbach, B. A.; Sparks, T. C.; Cicchillo, R. M.; Garizi, N. V.; Hahn, D. R.; Meyer, K. G., Natural Products: A Strategic Lead Generation Approach in Crop Protection Discovery. *Pest Management Science* **2019**.
33. Amelia-Yap, Z. H.; Low, V. L.; Haziqah-Rashid, A.; Chen, C. D.; Lau, K. W.; Sofian-Azirun, M.; Elia-Amira, N. M. R.; Suana, I. W.; Tan, T. K.; Lim, Y. A. L., Pyrethroids Use: Threats on Metabolic-Mediated Resistance Mechanisms in the Primary Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **2019**.
34. Ihara, M.; Matsuda, K., Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators. *Current Opinion in Insect Science* **2018**, *30*, 86-92.
35. Simonetti, G.; Valletta, A.; Kolesova, O.; Pasqua, G., Plant Products with Antifungal Activity: From Field to Biotechnology Strategies. In *Natural Products as Source of Molecules with Therapeutic Potential*, Springer: **2018**; pp 35-71.
36. Wink, M., Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. In *Annual Plant Reviews: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*, **2010**, (39), 1403-1408.
37. Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J., *Anticancer Agents from Natural Products, Second Edition*. Taylor & Francis: **2011**; p 767.

38. Gyawali, R.; Ibrahim, S. A., Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* **2014**, *46*, 412-429.
39. Farha, M. A.; Brown, E. D., Strategies for target identification of antimicrobial natural products. *Natural product reports* **2016**, *33* (5), 668-680.
40. Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S.; Duke, J. A.; Briemann, H. L., *Natural Products from Plants, Second Edition*. CRC Press: **2016**.
41. Tang, S.; Pan, Y.; Wei, C.; Li, X.; Lü, S., Testing of an integrated regime for effective and sustainable control of invasive Crofton weed (*Ageratina adenophora*) comprising the use of natural inhibitor species, activated charcoal, and fungicide. *Weed Biology and Management* **2019**, *0* (0).
42. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* **2007**, *70* (3), 461-477.
43. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **2016**, *79* (3), 629-661.
44. De la Rúa, A., *El poder curativo de las hierbas*. Círculo de lectores: Bogotá **1999**.
45. Niero, R.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A., Medicinal Plants and Phytomedicines. In *Natural Products as Source of Molecules with Therapeutic Potential: Research & Development, Challenges and Perspectives*, Cechinel Filho, V., Ed. Springer International Publishing: Cham, **2018**; pp 1-33.
46. Chandra, P.; Pandey, R.; Srivastva, M.; Rameshkumar, K. B.; Kumar, B., Quantitative determination of chemical constituents of *Piper* spp. using UPLC–ESI–MS/MS. *Industrial Crops and Products* **2015**, *76*, 967-976.
47. Feng, G.; Chen, M.; Ye, H.-C.; Zhang, Z.-K.; Li, H.; Chen, L.-L.; Chen, X.-L.; Yan, C.; Zhang, J., Herbicidal activities of compounds isolated from the medicinal plant *Piper sarmentosum*. *Industrial Crops and Products* **2019**, *132*, 41-47.
48. Chanprapai, P.; Chavasiri, W., Antimicrobial activity from *Piper sarmentosum* Roxb. against rice pathogenic bacteria and fungi. *Journal of Integrative Agriculture* **2017**, *16* (11), 2513-2524.
49. Andrés, M. F.; Rossa, G. E.; Cassel, E.; Vargas, R. M. F.; Santana, O.; Díaz, C. E.; González-Coloma, A., Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. *Food and Chemical Toxicology* **2017**, *109*, 1086-1092.
50. Herath, H. M. P. D.; Preston, S.; Jabbar, A.; Garcia-Bustos, J.; Addison, R. S.; Hayes, S.; Rali, T.; Wang, T.; Koehler, A. V.; Chang, B. C. H.; Hofmann, A.; Davis, R. A.; Gasser, R. B., Selected α -pyrones from the plants *Cryptocarya novoguineensis* (Lauraceae) and *Piper methysticum* (Piperaceae) with activity against *Haemonchus contortus* in vitro. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2019**, *9*, 72-79.
51. Christ, J. A.; Hollunder, R. K.; Carvalho, M. S.; Ferreira, M. F. d. S.; Garbin, M. L.; Carrijo, T. T., DNA fingerprinting based on SSR amplification profiles for *Piper* species identification (Piperaceae). *Acta Botanica Brasilica* **2018**, *32*, 511-520.
52. Clouatre, D. L., Kava kava: examining new reports of toxicity. *Toxicology Letters* **2004**, *150* (1), 85-96.
53. List, T. P. Piperaceae. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Piperaceae/> (accessed diciembre **2018**).
54. Umar, R. A.; Zahary, M. N.; Rohin, M. A. K.; Ismail, S., Chemical Composition and The Potential Biological Activities Of *Piper Betel*—A Review. *Malaysian Journal of Applied Sciences* **2018**, *3* (1), 1-8.
55. Jaramillo, M. A.; Manos, P. S., Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* **2001**, *88* (4), 706-716.
56. Abril, M. A. Q.; Posada, R. C.; Miranda-Esquivel, D. R., Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography* **2006**, *33* (7), 1266-1278.
57. Dyer, L. A.; Palmer, A. D., *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Springer: **2004**.
58. García, B., *Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica*. Bogotá, **1992**; Vol. Tomo 1.
59. Mesa, A. M.; Peláez Jaramillo, C., Efecto antipalúdico de las especies del género *Piper*. *2018* **2018**, *23* (2).

60. Mgbeahuruike, E. E.; Holm, Y.; Vuorela, H.; Amandikwa, C.; Fyhrquist, P., An ethnobotanical survey and antifungal activity of *Piper guineense* used for the treatment of fungal infections in West-African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* **2019**, *229*, 157-166.
61. Durant-Archibold, A. A.; Santana, A. I.; Gupta, M. P., Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. *Journal of Ethnopharmacology* **2018**, *217*, 63-82.
62. Plazas, E. Estudio fitoquímico y Evaluación de actividad leishmanicida de la especie *Piper hispidum* Kunth. . Universidad Nacional de Colombia., Bogotá, **2008**.
63. Silva, L. S.; Mar, J. M.; Azevedo, S. G.; Rabelo, M. S.; Bezerra, J. A.; Campelo, P. H.; Machado, M. B.; Trovati, G.; dos Santos, A. L.; da Fonseca Filho, H. D.; de Souza, T. P.; Sanches, E. A., Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* essential oils in gelatin nanoparticles: a possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2019**, *99* (2), 685-695.
64. Salazar, D.; Jaramillo, M. A.; Marquis, R. J., Chemical similarity and local community assembly in the species rich tropical genus *Piper*. *Ecology* **2016**, *97* (11), 3176-3183.
65. Del Sol, A. B.; Sánchez, L. R. B.; Naranjo, R. A.; Engondo, F. K., Uso tradicional de las plantas medicinales por la población del municipio de Santa Clara, Cuba. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* **2018**, *6* (5), 374-385.
66. Portet, B.; Fabre, N.; Roumy, V.; Gornitzka, H.; Bourdy, G.; Chevalley, S.; Sauvain, M.; Valentin, A.; Moulis, C., Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry* **2007**, *68* (9), 1312-1320.
67. Scott, I. M.; Puniani, E.; Durst, T.; Phelps, D.; Merali, S.; Assabgui, R. A.; Sánchez-Vindas, P.; Poveda, L.; Philogène, B. J. R.; Arnason, J. T., Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. *Agricultural and Forest Entomology* **2002**, *4* (2), 137-144.
68. Hematpoor, A.; Liew, S. Y.; Azirun, M. S.; Awang, K., Insecticidal activity and the mechanism of action of three phenylpropanoids isolated from the roots of *Piper sarmentosum* Roxb. *Scientific reports* **2017**, *7* (1), 12576.
69. Macedo, A. L.; Duprat, R. C.; Moreira, D. d. L.; Kaplan, M. A. C.; Vasconcelos, T. R. A.; Pinto, L. C.; Montenegro, R. C.; Ratcliffe, N. A.; Mello, C. B.; Valverde, A. L., Isolation of a larvicidal compound from *Piper solmsianum* C. DC.(Piperaceae). *Natural product research* **2018**, *32* (22), 2701-2704.
70. Philip-Attah, T. M., Evaluation of ethanolic extracts of *Piper guineense*, *Dennettia tripetala*, and *Capsicum frutescens* as protectant of smoked fish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidea) against *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae). *The Journal of Basic and Applied Zoology* **2019**, *80* (1), 7.
71. Vasques da Silva, R.; Deboni Navickiene, H. M.; Kato, M. J.; Bolzani, V. d. S.; Méda, C. I.; Young, M. C. M.; Furlan, M., Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **2002**, *59* (5), 521-527.
72. Nascimento, S. A.; Araújo, E. A.; Da Silva, J. M.; Ramos, C. S., Chemical study and antimicrobial activities of *Piper arboreum* (piperaceae). *Journal of the Chilean Chemical Society* **2015**, *60*, 2837-2839.
73. Lago, J. H. G.; Ito, A. T.; Fernandes, C. M.; Young, M. C. M.; Kato, M. J., Secondary metabolites isolated from *Piper chimonantifolium* and their antifungal activity. *Natural Product Research* **2012**, *26* (8), 770-773.
74. Xu, W.-H.; Li, X.-C., Antifungal Compounds from *Piper* Species. *Current Bioactive Compounds* **2011**, *7* (4), 262-267.
75. Lee, S.-E.; Park, B.-S.; Kim, M.-K.; Choi, W.-S.; Kim, H.-T.; Cho, K.-Y.; Lee, S.-G.; Lee, H.-S., Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **2001**, *20* (6), 523-528.
76. Cotinguiba, F.; López, S. N.; Budzinski, I. G. F.; Labate, C. A.; Kato, M. J.; Furlan, M., Proteomic profile of *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Brazilian Journal of Biology* **2018**, *78*, 117-124.

77. Navickiene, H. M. D.; Alécio, A. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. d. S.; Young, M. C. M.; Cavalheiro, A. J.; Furlan, M., Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **2000**, *55* (6), 621-626.
78. Alécio, A. C.; Bolzani, V. d. S.; Young, M. C. M.; Kato, M. J.; Furlan, M., Antifungal Amide from Leaves of *Piper hispidum*. *Journal of Natural Products* **1998**, *61* (5), 637-639.
79. Marques, J. V.; Kitamura, R. O. S.; Lago, J. H. G.; Young, M. C. M.; Guimarães, E. F.; Kato, M. J., Antifungal Amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. *Journal of Natural Products* **2007**, *70* (12), 2036-2039.
80. Danelutte, A. P.; Lago, J. H. G.; Young, M. C. M.; Kato, M. J., Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* **2003**, *64* (2), 555-559.
81. Lago, J. H. G.; Tanizaki, T. M.; Young, M. C. M.; Guimarães, E. F.; Kato, M. J., Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2005**, *16*, 153-156.
82. De Campos, M. P.; Cechinel Filho, V.; Da Silva, R. Z.; Yunes, R. A.; Zacchino, S.; Juarez, S.; Bella Cruz, R. C.; eacute; Bella Cruz, A., Evaluation of Antifungal Activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2005**, *28* (8), 1527-1530.
83. Lee, S.-E.; Park, B.-S.; Kim, M.-K.; Choi, W.-S.; Kim, H.-T.; Cho, K.-Y.; Lee, S.-G.; Lee, H.-S., Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. **2001**; Vol. 20, p 523-528.
84. Ortiz, S.; Lecsö-Bornet, M.; Bonnal, C.; Houze, S.; Michel, S.; Grougnet, R.; Boutefnouchet, S., Bioguided identification of triterpenoids and neolignans as bioactive compounds from anti-infectious medicinal plants of the Taira Atacama's community (Calama, Chile). *Journal of Ethnopharmacology* **2019**, *231*, 217-229.
85. Li, X.-C.; Ferreira, D.; Jacob, M. R.; Zhang, Q.; Khan, S. I.; ElSohly, H. N.; Nagle, D. G.; Smillie, T. J.; Khan, I. A.; Walker, L. A.; Clark, A. M., Antifungal Cyclopentenolones from *Piper coruscans*. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (22), 6872-6873.
86. Da Silva, J. K. R.; Pinto, L. C.; Burbano, R. M. R.; Montenegro, R. C.; Guimarães, E. F.; Andrade, E. H. A.; Maia, J. G. S., Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* **2014**, *58*, 55-60.
87. Lago, J. H. G.; Chen, A.; Young, M. C. M.; Guimarães, E. F.; de Oliveira, A.; Kato, M. J., Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters* **2009**, *2* (3), 96-98.
88. López, A.; Ming, D. S.; Towers, G. H. N., Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper lanceaefolium*. *Journal of Natural Products* **2002**, *65* (1), 62-64.
89. Lago, J. H. G.; Ramos, C. S.; Casanova, D. C. C.; Morandim, A. d. A.; Bergamo, D. C. B.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. d. S.; Furlan, M.; Guimarães, E. F.; Young, M. C. M.; Kato, M. J., Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products* **2004**, *67* (11), 1783-1788.
90. Muñoz, D. Estudio fitoquímico y Evaluación de actividad fungicida e insecticida de la especie *Piper eriopodon* (Piperaceae). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, **2008**.
91. Avila, M.; Patiño, O.; Prieto, J.; Delgado, W.; Cuca, L. E., Flavonoides con actividad antifúngica aislados de *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). *Revista Colombiana de Química*; Vol. 40, Núm. 1 (2011) **2011**.
92. Jeffrey, C. S.; Leonard, M. D.; Glassmire, A. E.; Dodson, C. D.; Richards, L. A.; Kato, M. J.; Dyer, L. A., Antitherbivore Prenylated Benzoic Acid Derivatives from *Piper kelleyi*. *Journal of Natural Products* **2014**, *77* (1), 148-153.
93. Parra, J. E.; Patiño, O. J.; Prieto, J. A.; Delgado, W. A.; Cuca, L. E., A new benzoic acid derivative isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry Letters* **2013**, *6* (4), 590-592.

94. Cao, S.; Rossant, C.; Ng, S.; Buss, A. D.; Butler, M. S., Phenolic derivatives from *Wigandia urens* with weak activity against the chemokine receptor CCR5. *Phytochemistry* **2003**, *64* (5), 987-990.
95. Parra Amin, J. Contribución al estudio fitoquímico de la parte aérea de *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). Universidad Nacional de Colombia Bogotá, **2011**.
96. Gaia, A. M.; Yamaguchi, L. F.; Jeffrey, C. S.; Kato, M. J., Age-dependent changes from allylphenol to prenylated benzoic acid production in *Piper gaudichaudianum* Kunth. *Phytochemistry* **2014**, *106*, 86-93.
97. Zhao, M.-B.; Zhou, S.-X.; Zhang, Q.-Y.; Wei, W.-F.; Li, M.-H.; Xing, J.-Y.; Jiang, Y.; Tu, P.-F., Prenylated benzoic acid derivatives from the stem of *Euodia leptota*. *Natural Product Research* **2017**, *31* (13), 1589-1593.
98. Klaiklay, S.; Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Buatong, J.; Sakayaroj, J., Chlorinated chromone and diphenyl ether derivatives from the mangrove-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA69. *Tetrahedron* **2012**, *68* (10), 2299-2305.
99. Saga Kitamura, R. O.; Romoff, P.; Young, M. C. M.; Kato, M. J.; Lago, J. H. G., Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). *Phytochemistry* **2006**, *67* (21), 2398-2402.
100. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L., *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & sons: **2014**.
101. Dubrovskiy, A. V.; Larock, R. C., Intermolecular C–O addition of carboxylic acids to arynes: synthesis of o-hydroxyaryl ketones, xanthenes, 4-chromanones, and flavones. *Tetrahedron* **2013**, *69* (13), 2789-2798.
102. Valdivia, C.; Marquez, N.; Eriksson, J.; Vilaseca, A.; Muñoz, E.; Sterner, O., Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16* (7), 4120-4126.
103. Crews, P.; Rodriguez, J.; Jaspars, M.; Crews, R. J., *Organic structure analysis*. **1998**.
104. Núñez, V.; Castro, V.; Murillo, R.; Ponce-Soto, L. A.; Merfort, I.; Lomonte, B., Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry* **2005**, *66* (9), 1017-1025.
105. Moreira, D. D. L.; Guimarães, E. F.; Kaplan, M. A. C., A Chromene from *Piper Aduncum*. *Phytochemistry* **1998**, *48* (6), 1075-1077.
106. Batista, J. M.; Batista, A. N. L.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Ambrósio, D. L.; Cicarelli, R. M. B.; Bolzani, V. S.; Kato, M. J.; Nafie, L. A.; López, S. N.; Furlan, M., Absolute configuration and selective Trypanocidal activity of Gaudichaudianic acid Enantiomers. *Journal of Natural Products* **2011**, *74* (5), 1154-1160.
107. Scott, I. M.; Puniani, E.; Jensen, H.; Livesey, J. F.; Poveda, L.; Sánchez-Vindas, P.; Durst, T.; Arnason, J. T., Analysis of Piperaceae Germplasm by HPLC and LCMS: A Method for Isolating and Identifying Unsaturated Amides from *Piper* spp Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (6), 1907-1913.

Capítulo 2 Síntesis de análogos y derivados de cromenos.

Contenido

	Pág.
Lista de Figuras	III
Lista de Tablas	IV
Abreviaturas y acrónimos	V
2. Síntesis de cromenos y análogos.....	53
2.1 Introducción	53
2.2 Generalidades de cromenos	54
2.2.1 Antecedentes	55
2.3 Metodología	57
2.3.1 Procedimientos generales	57
2.3.1.1 Cromatografía	57
2.3.1.2 Técnicas empleadas para la elucidación estructural y caracterización de los compuestos.....	57
2.3.1.3 Disolventes.....	58
2.3.1.4 Procedimiento usual de reacción.....	58
2.3.2 Preparación de compuestos	58
2.3.2.1 Análogos de cromenos.....	58
2.3.2.2 Análogos de derivados	63
2.4 Resultados y discusión	64
2.4.1 Síntesis de análogos de cromenos.....	64
2.4.2 Reacciones utilizadas	65
2.4.2.1 Reacción de acetilación.....	65
2.4.2.2 Reacción de reordenamiento de Fries.....	65
2.4.2.3 Reacción de ciclación.....	67
2.4.2.4 Reacción de reducción	69
2.4.2.5 Reacción de deshidratación	69
2.4.2.6 Reacción de nitración	70
2.4.2.7 Reacción para obtener S6a y S6b	71
2.4.2.8 Reacción de adición para obtener S7	72
2.4.3 Síntesis de derivados	73
2.4.4 Reacciones utilizadas	73
2.4.4.1 Reacción de ciclación del compuesto N1	73
2.4.4.2 Reacción de metilación	75
2.5 Conclusiones	76
2.6 Anexos de síntesis.....	77
2.7 Bibliografía.....	89

Lista de figuras

Figura 2-1 Núcleo básico de los cromenos e isómeros.....	54
Figura 2-2 Esquema de derivados de cromenos con actividad citotóxica.	55
Figura 2-3 Primera reacción de síntesis conocida para 2-H-cromenos.....	55
Figura 2-4 Reacciones para obtener el anillo cromeno.....	57
Figura 2-5 Esquema sintético para obtener los análogos de cromenos.....	59
Figura 2-6 Procedimiento general para obtener S1c-g	59
Figura 2-7 Procedimiento general para obtener S2c-g	60
Figura 2-8 Procedimiento general para obtener S3a-g	60
Figura 2-9 Procedimiento general para obtener S4a-f	61
Figura 2-10 Procedimiento general para obtener S5a-f	61
Figura 2-11 Procedimiento para obtener S2g y S2h	62
Figura 2-12 Procedimiento para obtener (S6a y S6b).....	62
Figura 2-13 Procedimiento para obtener (S7).....	63
Figura 2-14 Procedimiento para obtener (D1).	63
Figura 2-15 Procedimiento para obtener D2	64
Figura 2-16 Análisis retrosintético para la síntesis de análogos de cromenos.	64
Figura 2-17 Esquema de preparación de los compuestos S1c-g	65
Figura 2-18 Esquema de preparación de los compuestos S2c-g	66
Figura 2-19 Mecanismo de reacción para la reacción de reordenamiento de Fries.	67
Figura 2-20 Esquema de preparación de los compuestos S3a-g	68
Figura 2-21 Mecanismo de reacción para la reacción de ciclación.	68
Figura 2-22 Esquema de preparación de los compuestos S4a-f	69
Figura 2-23 Esquema de preparación de los compuestos S5a-f	70
Figura 2-24 Mecanismo de reacción para la reacción de deshidratación.....	70
Figura 2-25 Esquema de preparación de los compuestos S2g y S2h	71
Figura 2-26 Formación del catión nitronio.....	71
Figura 2-27 Preparación de los compuestos S6a y S6b	71
Figura 2-28 Mecanismo de reacción del compuesto S6a	72
Figura 2-29 Mecanismo de reacción para la obtención de S6b	72
Figura 2-30 Preparación del compuesto S7	72
Figura 2-31 Intercambio de halógeno – Metal	73
Figura 2-32 Mecanismo de reacción para la obtención S7	73
Figura 2-33 Esquema general para la obtención de D1	74
Figura 2-34 Mecanismo de reacción para la obtención de D1	75
Figura 2-35 Esquema general para la obtención de D2	75

Lista de tablas

Tabla 2-1 Metodologías para obtener compuestos tipo cromeno.	55
Tabla 2-2 Condiciones de reacción de la ciclación intramolecular del compuesto N1	74

Abreviaturas y acrónimos

AcOEt	Acetato de etilo
APT	Attached Proton Test
CAM	Reactivo Molibdato de Cerio y Amónico
CF	Cromatografía en columna Flash
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
COSY	COrelated SpectroscopY
d	Doblete
dd	Doble doblete
DCM	Diclorometano
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDDA	Ácido N, N'-diacetico-etilendiamino
EI	Ionización por impacto electrónico
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectros de masa de alta resolución
ESI	Ionización por electro spray
Et ₃ N	Trietilamina
EtOH	Etanol
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>m/z</i>	Relación masa / carga
MeOH	Metanol
PTSA	Ácido paratoluensulfónico
QTOF-LCMS	Quadrupole Time of Flight Liquid Chromatography Mass Spectrometry
RMN	Espectroscopia Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrogeno
s	Singlete
<i>sec</i> -BuLi	<i>sec</i> -butil litio
t	Triplete
t.a	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamientos Químicos (RMN)

2. Síntesis de cromenos y análogos

2.1 Introducción

Los metabolitos secundarios son sustancias químicas producidas en las plantas por diferentes vías metabólicas y mediante procesos catalizados por enzimas. No son esenciales para la supervivencia del organismo y son marcadores quimiotaxonómicos ¹⁻². Algunos metabolitos secundarios se producen bajo condiciones especiales y extremas tales como; ataques patógenos, depredadores, cambios ambientales, térmicos o deficiencia de nutrientes. Se producen para proporcionar defensa química de las plantas contra plagas y enfermedades, atraer especies polinizadoras, entre muchas otras funciones. Estos compuestos generalmente son biosintetizados en pocas cantidades y por órganos específicos, lo que dificulta el estudio a mayor escala de los compuestos aislados.

Muchos de los metabolitos secundarios aislados de productos naturales han sido fuente de inspiración para la generación de nuevos medicamentos o compuestos activos. Mediante la síntesis orgánica de análogos y derivados, partiendo de metabolitos secundarios como modelos o plantillas se realiza la búsqueda y desarrollo de compuestos con acción biológica más potente, específica, de mayor estabilidad y de baja toxicidad ³.

Los compuestos tipo cromeno presentan diferentes e importantes actividades biológicas, en la que se destaca la actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos. Por esta razón, es de interés obtener compuestos basados en la estructura básica de los cromenos, mediante la síntesis de análogos, para obtener diversos compuestos y respuestas frente a la actividad antifúngica, y así proponer algunas relaciones estructura-actividad.

En este capítulo se realiza un aporte a las investigaciones sintéticas de cromenos y sus análogos, mediante el desarrollo de una ruta de síntesis para la obtención de diferentes series de compuestos.

2.2 Generalidades de cromenos

Los cromenos son compuestos orgánicos de estructuras cíclicas obtenidos de la fusión de un anillo aromático y una pirona, también se conocen como benzopironas. A continuación, se presentan dos isómeros 2H-cromeno (2H-1-benzopirano) y 4H-cromeno (4H-1-benzopirano) (Figura 2-1).

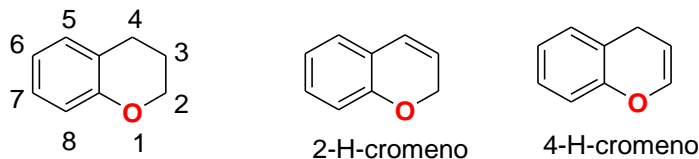


Figura 2-1 Núcleo básico de los cromenos e isómeros

Los cromenos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido aislados de varios géneros pertenecientes a las familias Apiaceae, Asteraceae, Leguminosae, Fabaceae, Rutaceae y Piperaceae, entre otras. En la familia Piperaceae están presentes en especies de los géneros *Piper* y *Peperomia*, con actividades biológicas.⁴⁻⁵

Son compuestos biológicamente interesantes, su estructura está presente en numerosos fármacos, tales como antimicrobianos, antivirales, antitumorales, anti-VIH, antifúngicos, también exhiben actividad en el sistema nervioso central (SNC)⁵⁻⁹.

El patrón de sustitución de los cromenos puede determinar sus diferentes efectos biológicos y/o el aumento o la disminución de la actividad. Un ejemplo es el estudio de diferentes análogos sintetizados de cromenos que mostraron cambios en actividades antioxidantes, antivirales y antibacteriales¹⁰. Por tanto, los cromenos pueden considerarse estructuras privilegiadas, que se definen como "fragmento" molecular que proporciona ligandos para diversos receptores" presentando diferentes actividades biológicas¹¹⁻¹².

Con base en estos modelos naturales, se han preparado compuestos relacionados con el fin de mejorar y potencializar su actividad biológica. Por ejemplo, a partir del núcleo 4-aril-4H-cromeno **29** fue preparada una serie de compuestos derivados que son potentes agentes inductores de apoptosis, tales compuestos poseen actividad de orientación vascular; de igual forma, se encontró que estos compuestos son desestabilizadores de tubulina, también son activos en líneas celulares de cáncer resistentes a los medicamentos¹³. Se pueden usar como agentes únicos o en combinación con otros fármacos contra el cáncer en varios tipos de tumores, por lo que brindan la posibilidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos contra esta enfermedad. Los cromenos sintéticos derivados **30** y **32** mostraron una actividad citotóxica más alta en comparación con otros compuestos ensayados (colchicina como fármaco de referencia). En la Figura 2-2 se muestra el esquema de los compuestos¹⁴.

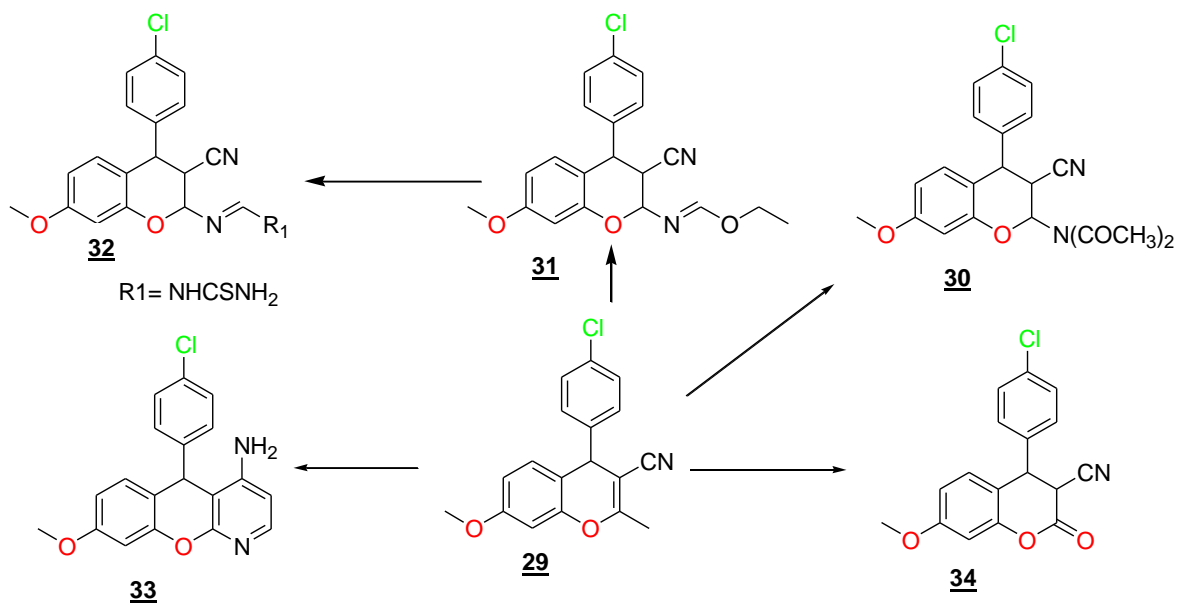


Figura 2-2 Esquema de derivados de cromenos con actividad citotóxica.

Para la síntesis de 2H-cromenos existen diversas metodologías, ya que como fue previamente establecido este núcleo heterocíclico está presente en productos naturales biológicamente activos, por esta razón se ha aumentado el interés en su síntesis ¹⁵.

2.2.1 Antecedentes

La primera reacción de síntesis de los compuestos tipo cromenos **37** fue realizada en el año 1982, partiendo de la sustitución del salicilaldehído **35** con 2-nitroetenilbenceno **36**, en Figura 2-3 se muestra esta reacción ⁵.

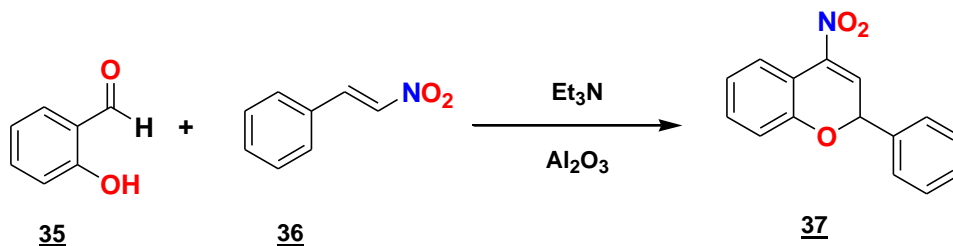


Figura 2-3 Primera reacción de síntesis conocida para 2-H-cromenos

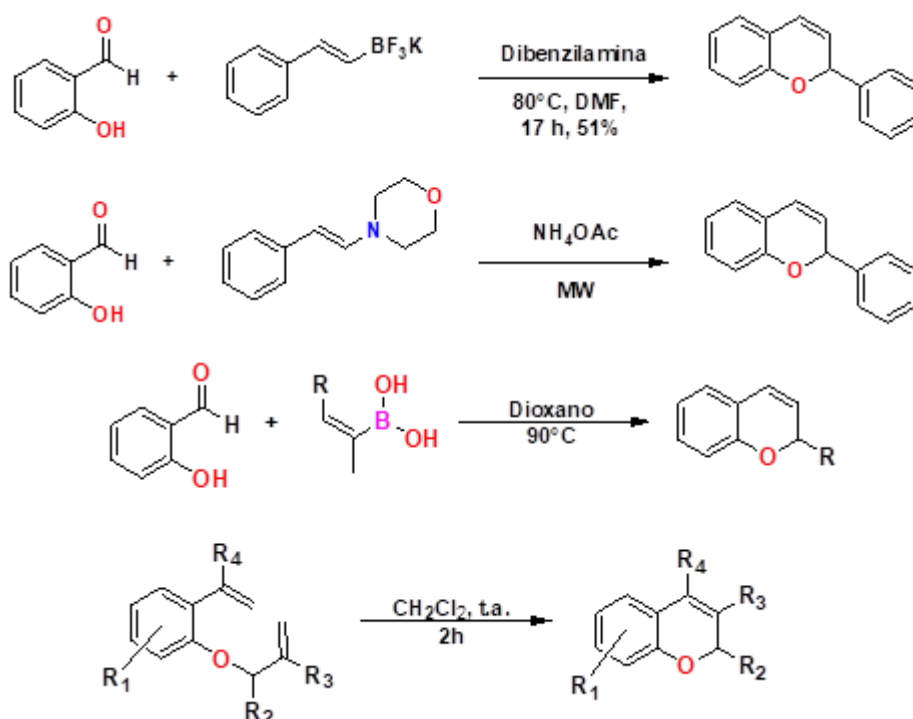
Estos compuestos se han sintetizado utilizando diferentes metodologías, a continuación, en la Tabla 2-1, se indican algunos ejemplos de síntesis de cromenos:

Tabla 2-1 Metodologías para obtener compuestos tipo cromoeno.

Referencia	Metodología
15	Ciclación intramolecular de intermediarios Wittig.
16	Reacción asistida por microondas de salicilaldehído con enaminas
17	Reacción Petasis catalítica de salicilaldehído.

18-19	Cierre de anillo por metátesis de olefinas.
20-21	Reordenamiento Claisen de esteres fenólicos propargilo.
22	Cierre de anillo catalizada por Pd de fenoles con 2-isoprenilo.
23	Cierre de anillo electrocíclico de derivados vinil quinonas.
24	Reacción de anulación de Ylide.
25-26	Reacciones de Green Chemistry en medio acuoso
27	Reacción de salicilaldehidos con dicetona en alcohol catalizada con aminoácidos.

En la Figura 2-4 se indican algunas reacciones mencionadas en la Tabla 2-1. Estas reacciones de síntesis comienzan con un anillo de benceno preformado y el anillo de pirano se construye durante el curso de la síntesis.



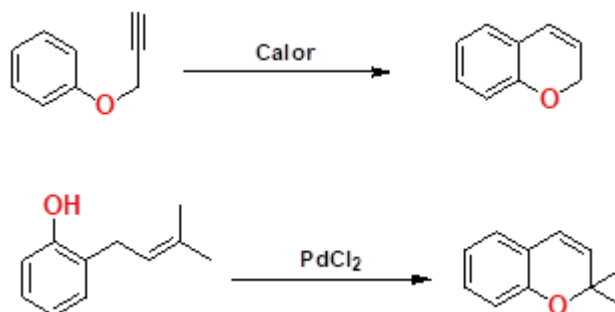


Figura 2-4 Reacciones para obtener el anillo cromeno.

2.3 Metodología

2.3.1 Procedimientos generales

2.3.1.1 Cromatografía

Las separaciones cromatográficas se realizaron por cromatografía Flash (CF) utilizando sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh), el monitoreo de las reacciones y cromatografías en columna se realizó por cromatografía en capa fina usando cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck, usando reveladores como luz UV (254 y 365 nm) aspersión con agentes reveladores, que se muestran a continuación, seguido de calentamiento.

- La solución básica de KMnO₄ se preparó utilizando K₂CO₃ (40 g) con KMnO₄ (6 g) en agua (600 mL) y NaOH al 10% (5 mL).
- La solución de vainillina se preparó en etanol al 95% (250 ml) con vainillina (15 g), ácido sulfúrico concentrado (2,5 mL).
- El ácido fosfomolibdico se preparó usando ácido fosfomolibdico (15 g) en etanol (250 mL).
- La solución de anisaldehído se preparó en etanol al 95% (250 mL) con p-anisaldehído (15 g) y ácido acético (2,5 mL).
- La solución de CAM se preparó en solución de ácido sulfúrico al 10% (400 mL) con molibdato de amonio (10 g) y sulfato de amonio cérico (4 g).

2.3.1.2 Técnicas empleadas para la elucidación estructural y caracterización de los compuestos.

Los espectros de ¹H y ¹³C RMN junto con los experimentos APT, COSY, HMQC y HMBC se registraron en un instrumento BRUKER a Advance III HD Ascend 400 (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C, utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente, los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) referenciado a TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Los espectros infrarrojos (IR) se obtuvieron en un THERMO NICOLET-NEXUS (FT-IR). Los espectros de masas (MS) se

obtuvieron en GC/MS SHIMADZU-QP2105. La ionización se obtuvo por impacto electrónico (EI). Los espectros de masa de alta resolución (EMAR) fueron tomados en un espectrofotómetro de masas AGILENT TECHNOLOGIES, Q-TOF GG520 LC/MS, por ionización por electro spray (ESI).

2.3.1.3 Disolventes

Los disolventes utilizados se purificaron antes de su utilización por destilación, se describe a continuación el método empleado ²⁸.

- El tetrahidrofurano (THF) y el éter dietílico se destilaron de sodio-benzofenona.
- El etanol y el metanol se destilaron con CaO-Magnesio.
- La acetona se purificó por reflujo con KMnO_4 y se mantuvo en tamices moleculares de 4 Å.
- El diclorometano, cloroformo, benceno, tolueno, aminas (triethylamina, piridina) se trataron con hidruro de calcio.
- Tolueno, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) se mantuvieron en tamices moleculares preactivados de 4 Å.

2.3.1.4 Procedimiento usual de reacción.

Todas las reacciones sensibles al aire o al agua se llevaron a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno con disolventes secos y recién destilados utilizando técnicas estándar de jeringa-septa. Todo el material de vidrio correspondiente se secó cuidadosamente al vacío con una pistola de calor sin llama.

Estos procedimientos fueron realizados en el laboratorio de Síntesis Orgánica Bio y Organo-Catálisis LSOBOC de la Universidad de los Andes, Bogotá Colombia.

2.3.2 Preparación de compuestos

2.3.2.1 Análogos de cromenos

Se plantea una posible ruta de síntesis de una serie de análogos de compuestos tipo cromeno, por introducción de varios sustituyentes y por modificación de los grupos funcionales existentes en los precursores y compuestos. Un esquema que resume la propuesta sintética para la síntesis de los citados análogos se muestra en la Figura 2-5. ²⁹
³⁰. Con esta estrategia se logró obtener cromonas, cromanoles y cromenos.

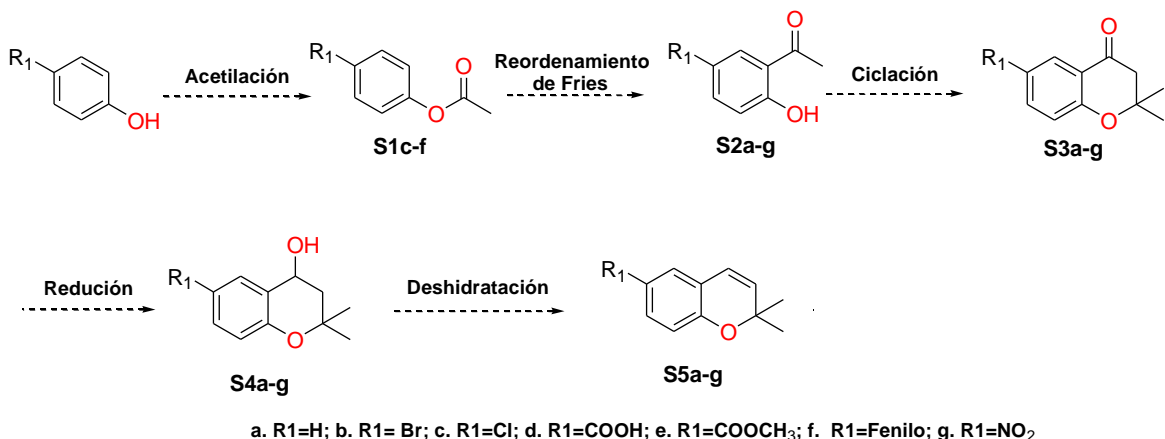


Figura 2-5 Esquema sintético para obtener los análogos de cromenos.

2.3.2.1.1 Procedimiento general para la obtención de S1c-g. Reacción de acetilación.

El respectivo *p*-fenol se disolvió (1,5 mmol) en diclorometano seco (6 mL), en un balón con atmosfera inerte de nitrógeno. Luego se adicióno el cloruro de acetilo (1,5 mmol). Por último, se adicióno la piridina (0,75 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura de 0° a 25 °C hasta conversión completa. Al finalizar la reacción se adicionaron 5 mL de agua, se separó la fase orgánica, se lavó con agua (10 mL) HCl 10% (2x10 mL), NaOH 2 M (2x10mL) y agua (2x10 mL) y se secó con Na₂SO₄ y se eliminó el solvente a presión reducida. Los compuestos y los porcentajes de rendimientos obtenidos fueron: **S1c**= 76%; **S1d**= 68%; **S1e**= 79%; **S1f**= 95% y **S1g**= 65%.³¹.

Acetilación		
	R ₁	Compuesto
	Cl	S1c
	COOH	S1d
	COOCH ₃	S1e
	Fenilo	S1f
	NO ₂	S1g

Figura 2-6 Procedimiento general para obtener S1c-g.

2.3.2.1.2 Procedimiento general para (S2c-g). Reacción reordenamiento de Fries.

Se adicióno **S1a-g** (0,842 mmol) en un balón seco con atmosfera inerte de nitrógeno. Luego se adicióno AlCl₃ (1,685 mmol) se agitó muy bien y se sometió a calentamiento a 140 °C por 4 horas. Se dejó enfriar y se adicióno 5 mL de HCl 10% y se llevó a ebullición 30 min para descomponer el AlCl₃ sobrante. Cuando se observó conversión completa se extrajo con DCM (3x20 mL), se separó y se extrajo con NaOH 5M (3x20 mL) se descartó

la fase orgánica. La fase acuosa se neutralizó con HCl 10% y se extrajo con DCM (3X20 mL). Se secó con Na₂SO₄ y se eliminó el solvente a presión reducida. Los compuestos y los porcentajes de rendimientos obtenidos fueron: **S2c**= 72%; **S2d**= 25%; **S2e**= 38%; **S2f**= 62% y **S2g**= No reaccionó.³¹

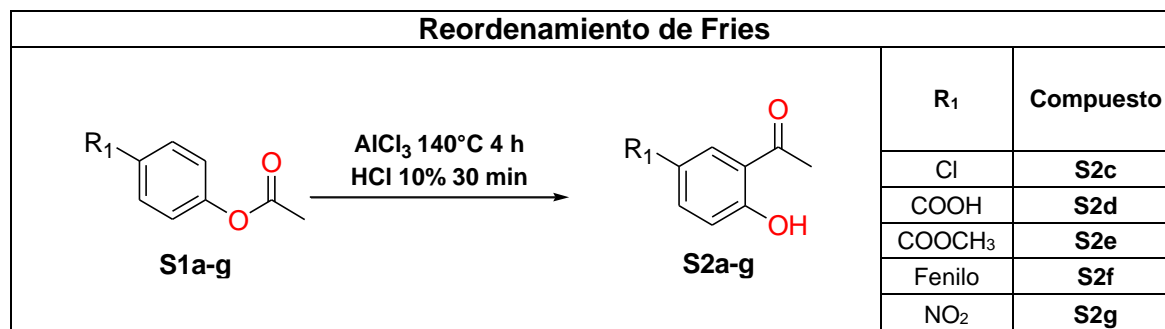


Figura 2-7 Procedimiento general para obtener **S2c-g**.

2.3.2.1.3 Procedimiento general para (**S3a-g**). Reacción de ciclación.

En un balón seco con atmosfera inerte de nitrógeno, se disolvió **S2c-g** (1,0 mmol) en 10 mL de metanol, se adicionó acetona (1,55 mmol) y pirrolidina (1,0 mmol) se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Al finalizar la reacción se adicionó agua al balón y se llevó a pH 1 con HCl 10%, se extrajo con AcOEt (3x 20 mL) luego se adicionó solución saturada de NaCl y se extrajo con 10 mL de AcOEt. Se secó con Na₂SO₄ y se eliminó el solvente a presión reducida. Los compuestos y los porcentajes de rendimientos obtenidos fueron: **S3a**= 72%; **S3b**= 98%; **S3c**= 80%; **S3d**= 70%; **S3e**=82%; **S3f**= 96% y **S3g**=73%.

³²

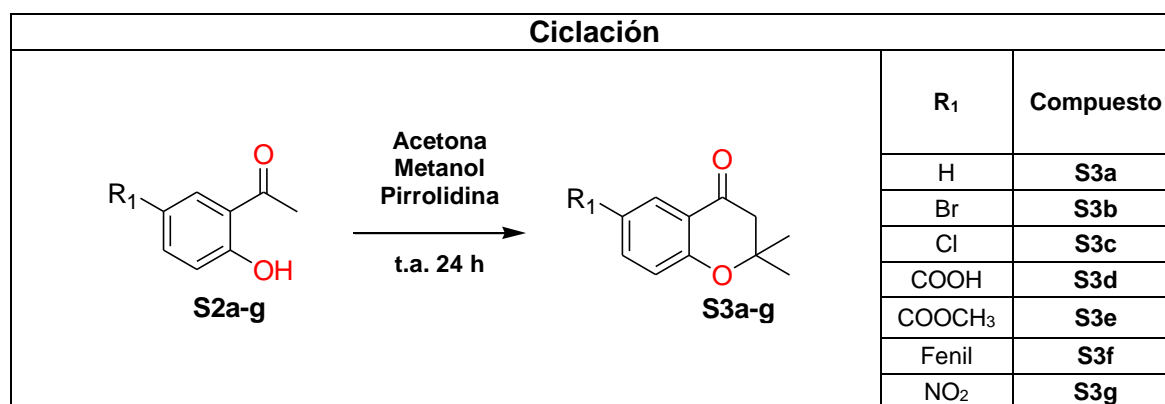


Figura 2-8 Procedimiento general para obtener **S3a-g**.

2.3.2.1.4 Procedimiento general para (**S4a-f**). Reacción de reducción.

En un balón seco con atmosfera inerte de nitrógeno. Se disolvió **S3a-g** (1,0 mmol) en 10 mL de metanol, se adicionó el Boro hidruro de sodio (3,0 mmol). En porciones, 1,0 mmol cada hora, se agitó a temperatura ambiente. Cuando se observó conversión completa, el

solvente fue removido en vacío, se le adicionó 10 mL de agua fría y se extrajo con DCM (3x25 mL), se le adicionó agua fría y se extrajo con DCM. Se secó con Na₂SO₄ y se eliminó el solvente a presión reducida. Los compuestos y los porcentajes de rendimientos obtenidos fueron: **S4a**= 92%; **S4b**= 98%; **S4c**= 89%; **S4d**= 82%; **S4e**=85% y **S4f**= 93%³².

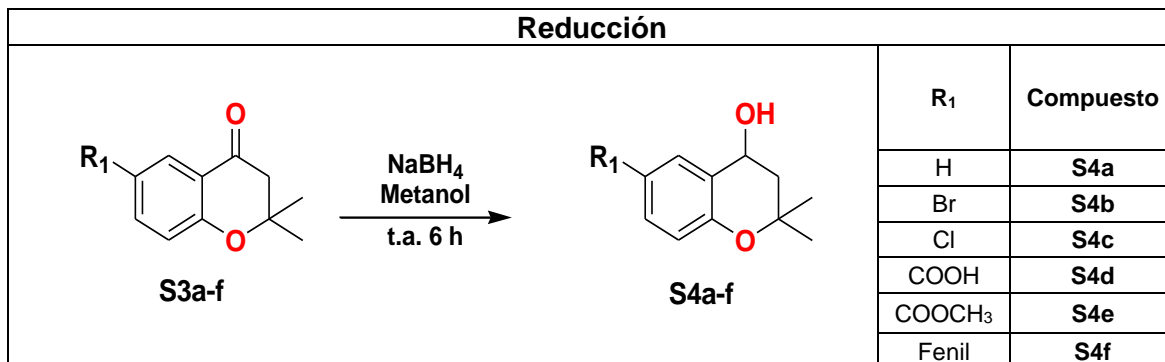


Figura 2-9 Procedimiento general para obtener **S4a-f**.

2.3.2.1.5 Procedimiento general para (**S5a-f**). Reacción de deshidratación

En un balón seco con atmosfera inerte de nitrógeno, se disolvió **S4a-f** (1,0 mmol) en 10 mL de tolueno seco, se adiciono ácido paratoluensulfonico PTSA (0,10 mmol). Se calentó a 100 °C en reflujo y agitación por 6 horas. Cuando se observó conversión completa, se le neutralizó con 10 mL de solución 10% de NaHCO₃ y se extrajo con AcOEt (3x25 mL), se le adicionó NaCl saturado y se extrajo con DMC, se secó con Na₂SO₄ y se evaporó el solvente a presión reducida. Los compuestos y los porcentajes de rendimientos obtenidos fueron: **S5a**= 93%; **S5b**= 96%; **S5c**= 89%; **S5d**= 83%; **S5e**=87% y **S5f**= 91%³¹

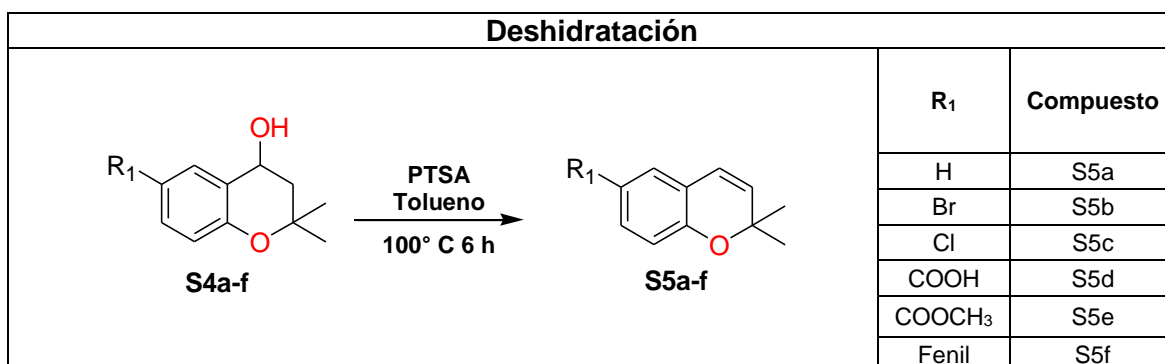


Figura 2-10 Procedimiento general para obtener **S5a-f**.

2.3.2.1.6 Procedimiento para obtener (**S2g** y **S2h**) reacción de nitración.

En un baño de hielo a 0 °C, se colocó un balón con atmosfera inerte, se le adiciono 25 mL de ácido nítrico 16 M (0,4 mol), 5 mL de ácido acético 17 M (85 mmol) y 136,5 mg de 2-hidroxi acetofenona (**S2a**) (1,0 mmol). Se colocó en agitación por 12 horas. Cuando se observó conversión completa se neutralizó el pH con Na₂CO₃ 10% y se extrajo con acetato de etilo (3x25 mL), se le adicionó NaCl saturado y se reextrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ y se eliminó el solvente a presión reducida. Se purificó por cromatografía flash se

utilizó con fase móvil pentano, obteniéndose unos cristales de color blanco en una fracción y cristales amarillos en otra, cuyos datos espectroscópicos para ambos compuestos coinciden con los descritos en la bibliografía para los mismos compuestos. Los compuestos y los porcentajes de rendimientos obtenidos fueron: **S2g**= 45% y **S2h**= 23% ³³.

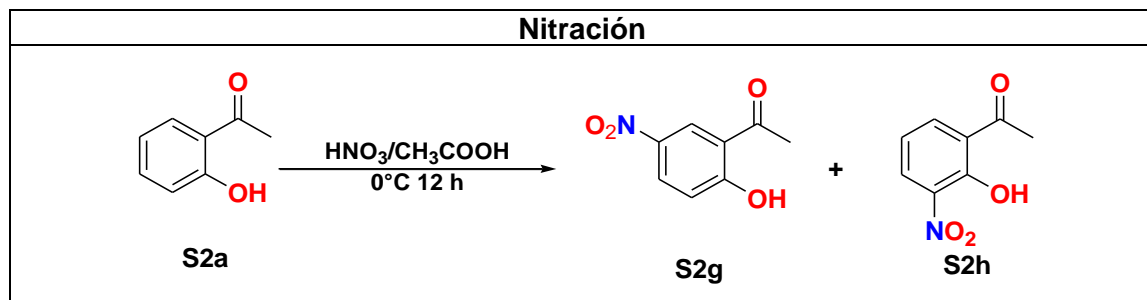


Figura 2-11 Procedimiento para obtener **S2g** y **S2h**.

2.3.2.1.7 Procedimiento para obtener (**S6a** y **S6b**) reacción de adición.

En un baño de hielo seco y etanol a una temperatura de -78°C , se coloca un balón con atmosfera inerte de nitrógeno y se disolvió 176 mg del compuesto 2,2-dimetil benzopirano-4-ona (**S3a**) (1.0 mmol) en THF (5 ml) luego, se le adicionó 0,7 mL de n-BuLi (1,4 M, 1,0 mmol) y se dejó reaccionar por 2 horas manteniendo la temperatura. Posteriormente se adiciono el bromobutano (2.0 mmol) se mantuvo la temperatura por 4 horas y se dejó que subiera a 4°C por 24 horas. Cuando termino la reacción se le adicionó 10 mL de NH_4Cl 10% y se extrajo con AcOEt (3x25 mL), se le adicionó 10 mL de NaCl saturada y se reextrajo con AcOEt, se secó con Na_2SO_4 y se eliminó el solvente a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash se utilizó con fase móvil hexano, obteniéndose dos productos, aceites de color naranja **S6a** y **S6b** con unos porcentajes de rendimiento de 40,7 y 57,1% respectivamente. ³⁴

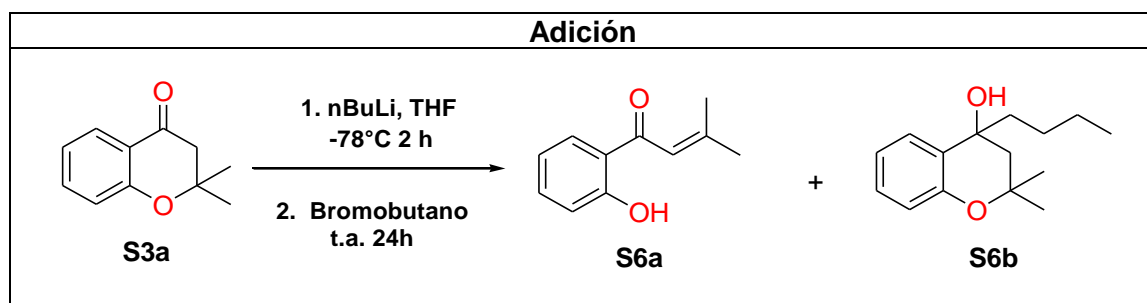


Figura 2-12 Procedimiento para obtener (**S6a** y **S6b**).

2.3.2.1.8 Procedimiento para obtener (**S7**) reacción de adición.

En un baño de hielo seco y etanol a una temperatura de -78°C , se disolvió 238 mg de **S5b** (1,0 mmol) en THF seco (6 mL), en un balón con atmosfera inerte, luego se le adicionó 0,7 mL (1,0 mmol) de sec-BuLi 1,4 M e inmediatamente, se adicionó el aldehído (cital) 151 mg (1,0 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante durante 3 horas a -78°C , posteriormente se le adicionó 5 mL NH_4Cl saturado, se deja en agitación y a temperatura ambiente por 24 horas. Hasta conversión completa, se extrajo con AcOEt (3x25 mL), se le adiciona NaCl saturado y se reextrajo con AcOEt, se secó con Na_2SO_4 y

se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvo un aceite de color amarillo **S7** con un porcentaje de rendimientos de 41 % ³⁴.

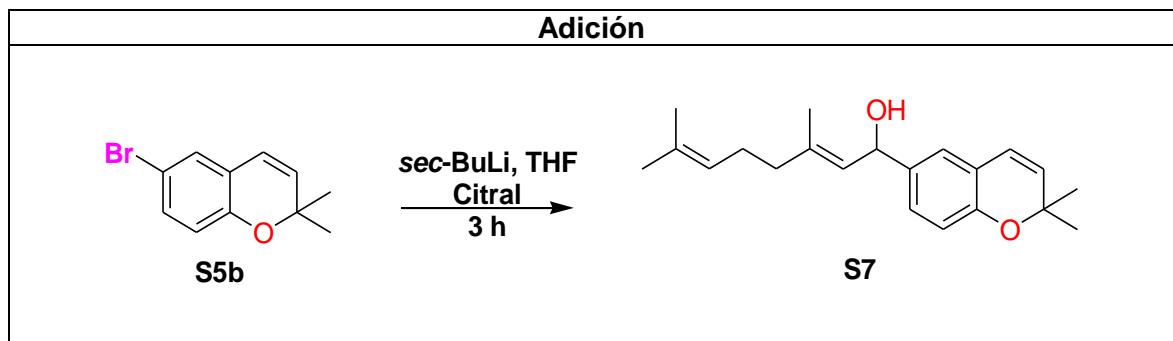


Figura 2-13 Procedimiento para obtener (**S7**).

2.3.2.2 Análogos de derivados

Los compuestos derivados fueron obtenidos de los compuestos mayoritarios aislados de la planta, teniendo en cuenta los grupos funcionales presentes, mediante reacciones químicas conocidas. Se probó la reacción de ciclación para obtener cromenos con cadenas de isoprenos y la O-metilación para general el éster de metilo en el compuesto **N1**.

2.3.2.2.1 Procedimiento para la ciclación de compuesto **N1**.

Se disolvió 356 mg de **N1** (1,0 mmol) en solvente (ver condiciones en la Tabla 2-2) (6 mL), en un balón seco con atmosfera inerte, luego se le adicionó (0,1 mmol) del reactivo (según Tabla 2-2). Se dejó en reflujo y en agitación, (la temperatura del reflujo depende del solvente) por 12 horas. Al terminar la reacción se neutralizo la base con HCl 10% y se extrajo con AcOEt (3x25 mL), se le adiciona NaCl saturado y se extrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ y se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvo un aceite de color amarillo **D1**, el mayor porcentaje de rendimiento fue de 90 % ³⁵.

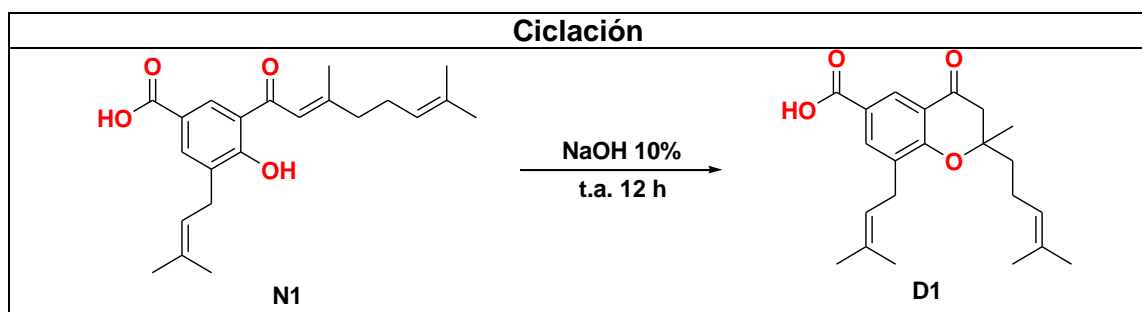


Figura 2-14 Procedimiento para obtener (**D1**).

2.3.2.2.2 Procedimiento para O-metilación de **N1**

Se disolvió el compuesto aislado **N1** (0,56 mmol) en DFM (15 mL), en un balón seco con atmosfera inerte, luego se le adicionó (4,5 mmol) de bicarbonato de sodio, se dejó en agitación por 30 min, posteriormente se le adicionó yoduro de metilo (9 mmol). La mezcla se dejó en agitación y a temperatura ambiente por 24 horas. Se diluyó con AcOEt y se neutralizo con HCl 10% y se extrajo con AcOEt (3x25 mL), se le adiciona NaCl saturado y

se reextrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ y se eliminó el solvente a presión reducida y se obtuvo un aceite de color amarillo, con un porcentaje de rendimiento de **D2**= 72%³⁶.

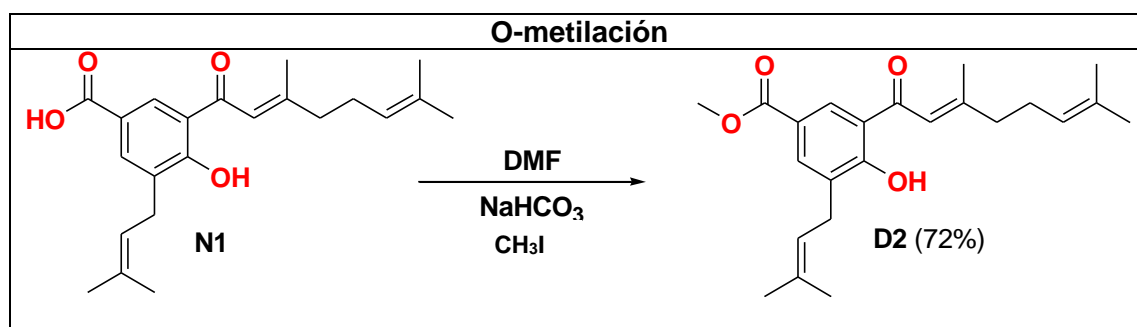


Figura 2-15 Procedimiento para obtener D2.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Síntesis de análogos de cromenos

Compuestos naturales tipo cromeno aislados han presentado actividad antifúngica contra los hongos *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinérea*, estos compuestos son una fuente potencial de agentes antifúngicos^{9-10, 37}, por esta razón, se procedió a la obtención de diversos análogos estructurales por medio de reacciones conocidas, buscando así potenciar sus propiedades antifúngicas y hacer algunos aportes preliminares de relación estructura-actividad.

Para obtener un amplio rango de estructuras análogas tipo cromeno y posteriormente determinar su actividad antifúngica, se planteó un esquema retrosintético. A continuación, en la Figura 2-16 se presenta dicho análisis retrosintético general que permitió establecer la estrategia de síntesis de análogos de cromenos.

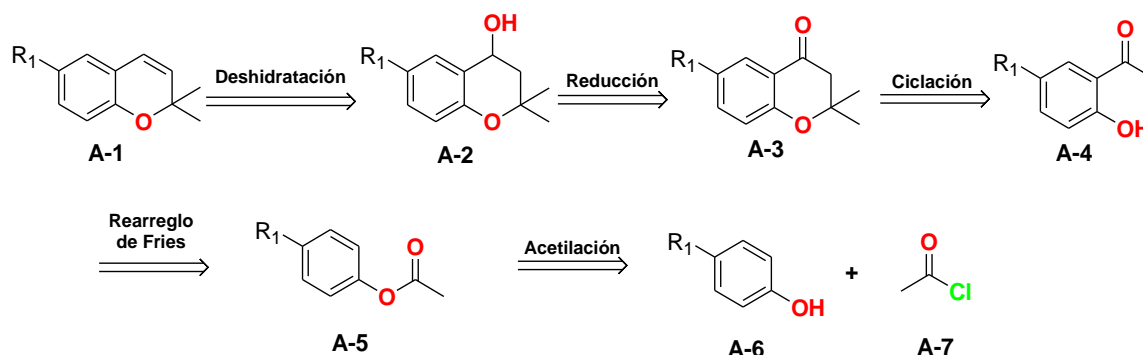


Figura 2-16 Análisis retrosintético para la síntesis de análogos de cromenos.

Por medio de esta estrategia de síntesis se busca obtener inicialmente compuestos con anillos benzopiranos similares a los presentes en los cromenos aislados en las especies del género *Piper* **A-1**. Los compuestos **A-1** se obtienen mediante la deshidratación de los

compuestos cromanoles **A-2**, sintetizados por la reacción de reducción de las cromanonas **A-3**, que son el primer grupo de compuestos que se producen con las características estructurales de los benzopiranos, las cuales se sintetizaron por la reacción de ciclación de compuestos tipo **A-4**. A su vez los compuestos **A-4** se alcanzan mediante la reacción de reordenamiento de Fries de los compuestos **A-5**, sintetizados por la reacción de acetilación de **A-6** y cloruro de acetilo **A-7**.

2.4.2 Reacciones utilizadas.

2.4.2.1 Reacción de acetilación

El primer paso de la ruta sintética es la reacción de acetilación de fenoles *para* sustituidos usando cloruro de acetilo en medio básico, obteniendo 5 compuestos fenilacetato denominados **S1c-g**, la Figura 2-17 muestra el esquema de la reacción y los porcentajes de rendimientos.

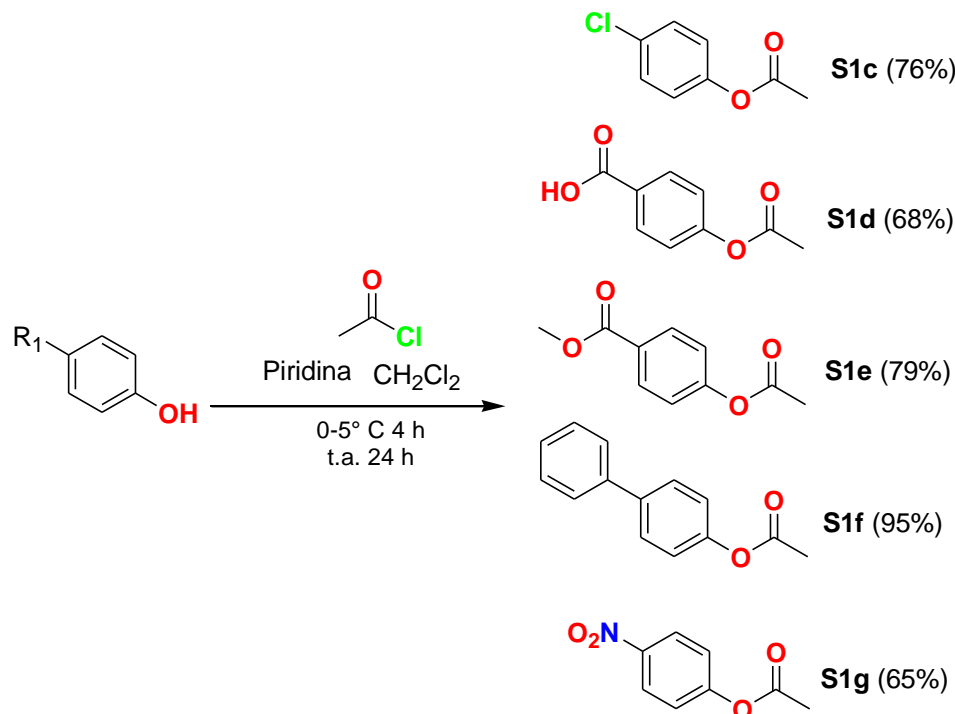


Figura 2-17 Esquema de preparación de los compuestos **S1c-g**.

2.4.2.2 Reacción de reordenamiento de Fries

Los compuestos **S2a-g** fueron preparados mediante la reacción de reordenamiento de Fries entre los compuestos fenil acetatos **S1c-g** con un ácido de Lewis cloruro de aluminio y posterior tratamiento en medio ácido. En la Figura 2-18 se muestra el esquema de preparación de los compuestos **S2c-g**.

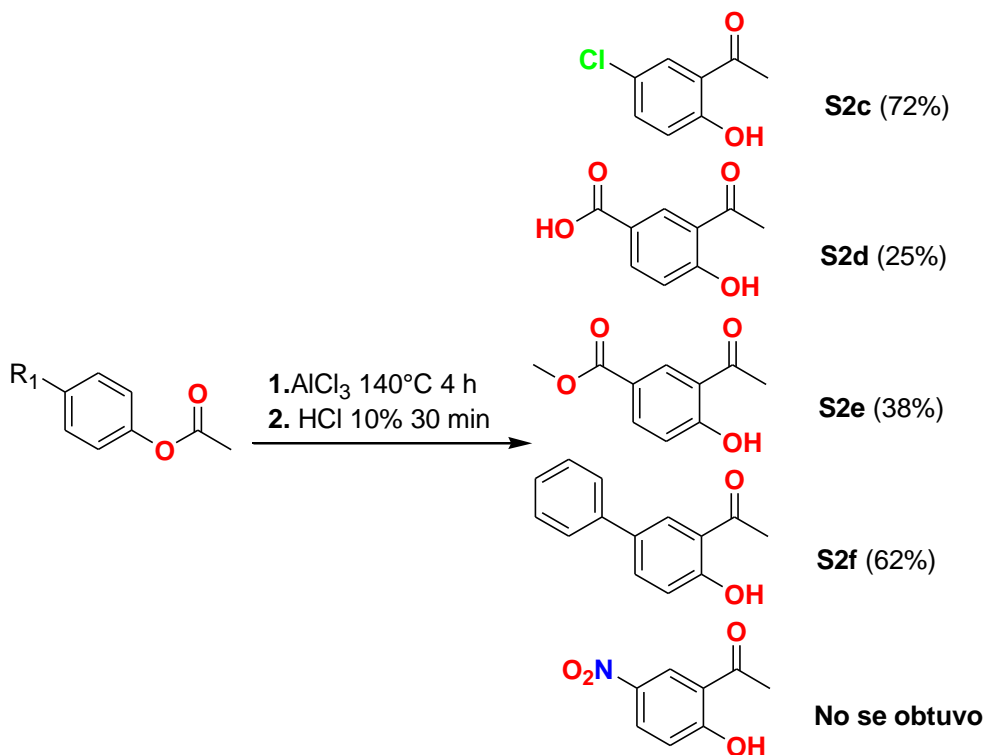


Figura 2-18 Esquema de preparación de los compuestos **S2c-g**.

La reacción de reordenamiento de Fries busca la migración del grupo acilo del éster de fenol al anillo aromático, obteniendo el compuesto hidroxacetofenona, esta reacción es *orto* y *para* selectiva, teniendo en cuenta que los sustratos utilizados tienen la posición *para* ocupada con diferentes grupos, solo es posible obtener los productos *orto*. El reordenamiento de Fries es promovido por el ácido de Lewis AlCl_3 en exceso, formando un complejo con el fenilacetato cuando se coordina al átomo de oxígeno carbonilo del grupo acilo. Esta interacción genera el posterior reordenamiento del cloruro de aluminio con el átomo de oxígeno fenólico, formando un carbocatión libre de acilio que reacciona en una sustitución electrofílica aromática. En la Figura 2-19 se ilustra el mecanismo de reacción para el reordenamiento de Fries ³⁸⁻³⁹.

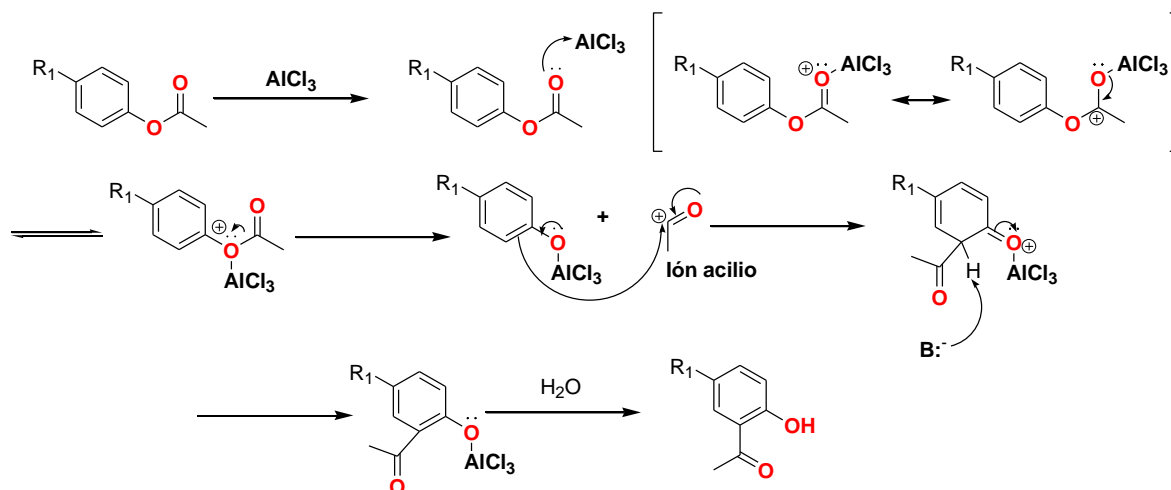


Figura 2-19 Mecanismo de reacción para la reacción de reordenamiento de Fries.

De los cinco compuestos **S1c-g**, el compuesto con el sustituyente NO_2 no reacciona para formar el correspondiente orto hidrox acetofenona (**S1g**) debido posiblemente a que el grupo NO_2 es desactivante fuerte del anillo aromático. Los grupos COOH (**S1d**) y COOCH_3 (**S1e**), también son desactivadores del anillo, pero se logró obtener los productos deseados con un rendimiento bajo que están entre 25% y 38% respectivamente.

2.4.2.3 Reacción de ciclación.

Los compuestos 4-cromanonas de estructuras **S3a-g** fueron obtenidos por la ciclación de **S2c-f** con acetona en metanol como solvente, utilizando pirrolidina como base. La Figura 2-20 muestra la preparación de los compuestos **S3a-g**. Los compuestos **S3a** y **S3b** fueron obtenidos partiendo de hidroxacetofenonas comerciales **S2a** y **S2b**. El compuesto **S3g** fue sintetizado a partir de compuesto **S2g**, que fue obtenido en la reacción de nitración explicada en el numeral 2.4.2.6.

Las 4-cromanonas se obtienen por la condensación aldólica entre la acetona y el grupo carbonilo de la acetofenona de los compuestos **S2a-g**, seguida de una deshidratación dando como intermediario el compuesto 1-(2-Hidroxifenil)-3-metilbut-2-en-1-ona. Este intermediario que presenta una insaturación α - β al grupo carbonilo, se comporta como un aceptor de Michael y sufre una posterior ciclación oxa-Michael intramolecular⁴⁰. En la Figura 2-21 se ilustra el mecanismo de reacción para la reacción de ciclación.

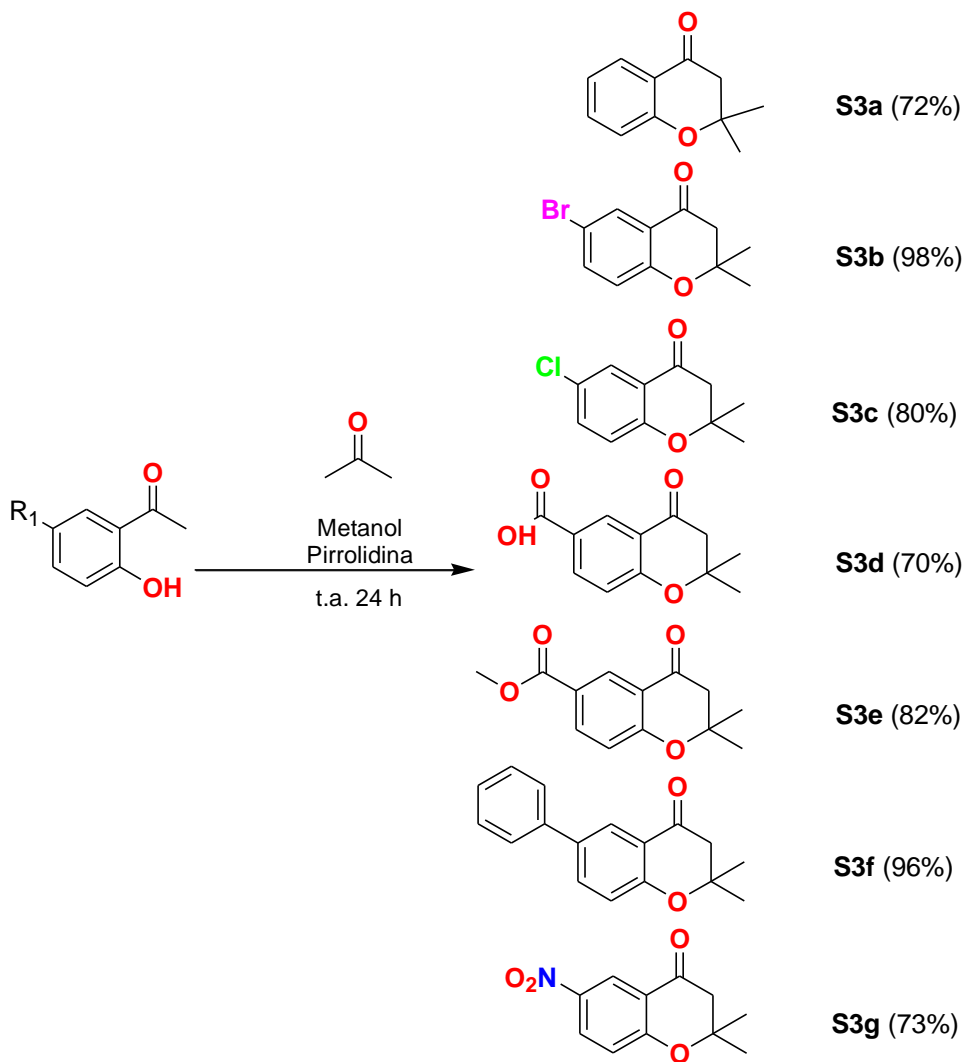
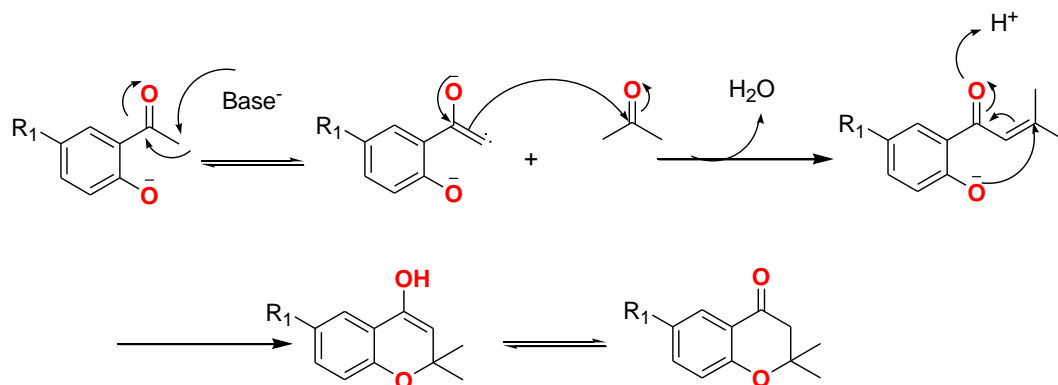
Figura 2-20 Esquema de preparación de los compuestos **S3a-g**.

Figura 2-21 Mecanismo de reacción para la reacción de ciclación.

Las diferentes 4-cromanonas se obtuvieron en un rango de porcentajes de rendimiento de 72 a 98%.

2.4.2.4 Reacción de reducción

Para obtener los compuestos tipo alcohol 4-cromanoles **S4a-f**, se realizó la reacción clásica de reducción con borohidruro de sodio en metanol, partiendo de los compuestos 4-cromanonas **S3a-g**. Los productos de estas reacciones se obtuvieron con porcentajes de rendimientos superiores a 82%. En la Figura 2-22 se muestra los compuestos **S4a-f**.

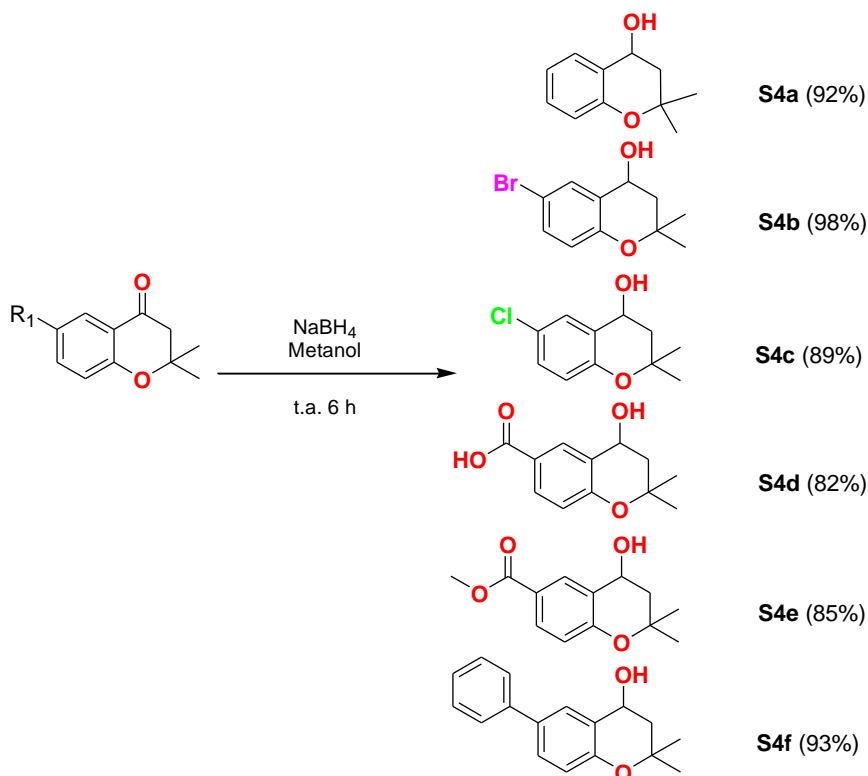


Figura 2-22 Esquema de preparación de los compuestos **S4a-f**.

2.4.2.5 Reacción de deshidratación

En el último paso de la ruta para obtener cromenos **S5a-f**, se tiene que la reacción de deshidratación de las estructuras 4-cromanoles **S4a-f**, dando las estructuras de cromenos **S5a-f**. Esta reacción se realiza utilizando ácido para toluensulfónico con tolueno en reflujo, en la Figura 2-23, se muestran los porcentajes de rendimiento de los productos que están por encima del 83%.

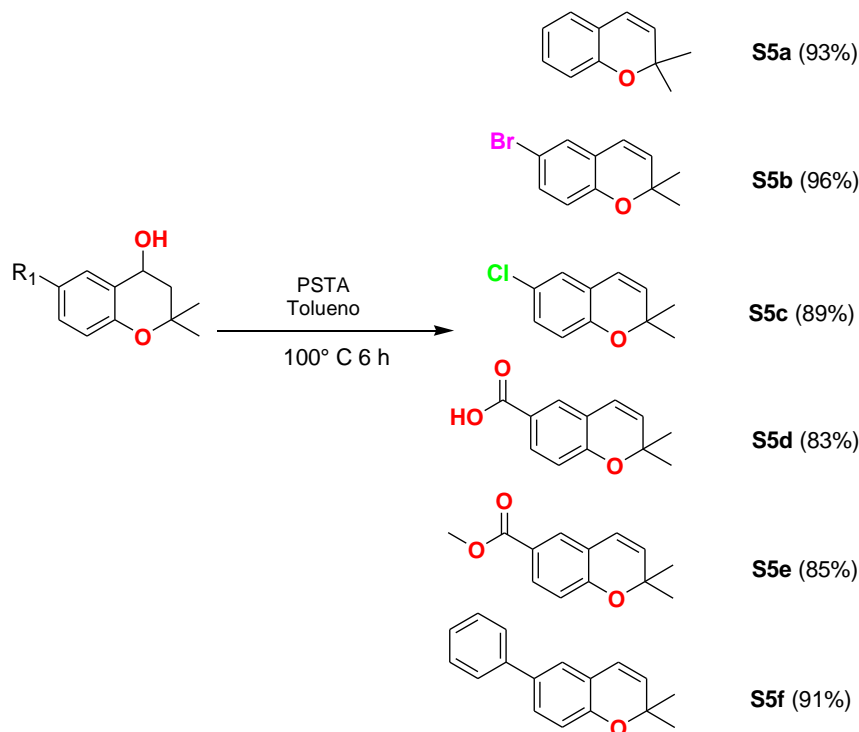


Figura 2-23 Esquema de preparación de los compuestos **S5a-f**.

En este paso el ácido paratoluensulfónico protona al oxígeno del grupo hidroxilo formando el catión intermediario. La molécula se neutraliza con la eliminación de agua, la formación del doble enlace y protonación del ácido paratoluensulfónico. En la Figura 2-24 se ilustra el mecanismo de reacción para la reacción de deshidratación.⁴¹

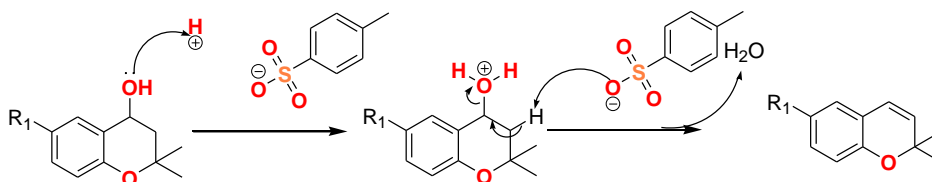


Figura 2-24 Mecanismo de reacción para la reacción de deshidratación.

2.4.2.6 Reacción de nitración

Este procedimiento se realizó debido a que no se obtuvo el compuesto **S2g** por la ruta clásica planteada (reordenamiento de Fries), la estrategia para su obtención fue realizar una reacción de nitración en condiciones suaves utilizando el compuesto salicilaldehído **S2a** con una mezcla de ácido acético y ácido nítrico. En la Figura 2-25 ilustran las condiciones y porcentajes de rendimiento de la reacción para la obtención de **S2g** y **S2h**.

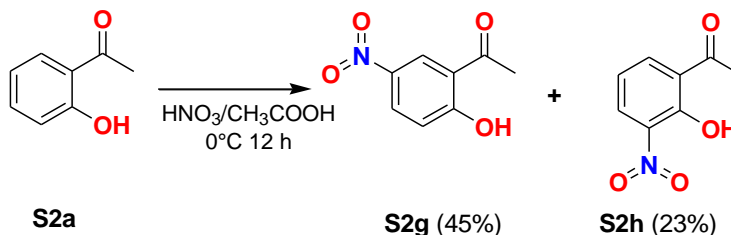


Figura 2-25 Esquema de preparación de los compuestos **S2g** y **S2h**.

En la Figura 2-26 se muestra la formación de catión nitronio, este electrófilo genera una reacción de sustitución nucleofílica aromática⁴². El compuesto *orto* hidroxiacetofenona posee un grupo hidroxilo orientador *orto* y *para*, y el grupo carbonilo de la acetofenona orientador *meta*, estos grupos favorecen la nitración en las posiciones *orto* y *para* respecto al grupo hidroxilo con unos porcentajes de 23 y 45% respectivamente. La separación de los isómeros se realizó por cromatografía en columna con silica gel obteniendo los compuestos **S2h** y **S2g**.

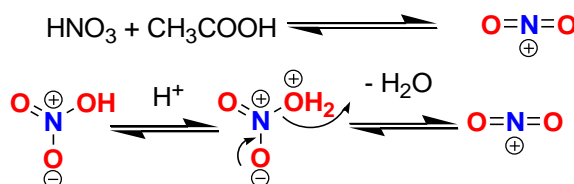


Figura 2-26 Formación del catión nitronio.

2.4.2.7 Reacción para obtener **S6a** y **S6b**

Se adicionó una cadena alquílica al cromoeno, haciendo reaccionar el compuesto **S3a** con un haluro de alquilo y nButilLitio. La reacción de la 4-cromanona **S3a** con el bromobutano no resultó el producto esperado, debido a que el grupo carbonilo de la 4-cromanona es el grupo reactivo del compuesto. Se obtuvieron dos productos denominados **S6a** y **S6b**. En la Figura 2-27 Se ilustra la reacción para obtener **S6a** y **S6b**.

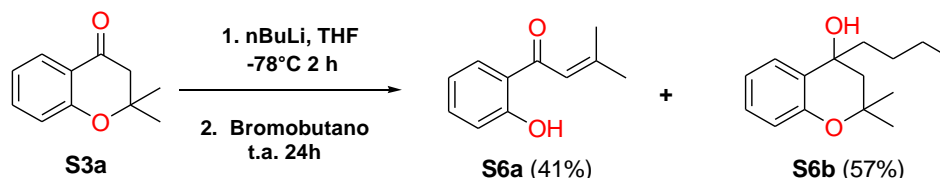


Figura 2-27 Preparación de los compuestos **S6a** y **S6b**.

El compuesto **S6a**, se obtiene por la apertura del anillo pirano mediado por la acción del nBuLi como base, desprotonando el carbono α al grupo carbonilo generando un enolato. Para estabilizar la carga negativa del enolato, esta desplaza el doble enlace al carbono terciario y queda sobre el oxígeno del grupo éter rompiendo el enlace O-C. Finalmente se protona el oxígeno, generando el fenol. El producto final que se obtiene es un aceptor de

Michael por una reacción inversa (retro-Michael) a la explicada en la reacción de ciclación. (Figura 2-28) ⁴⁰.

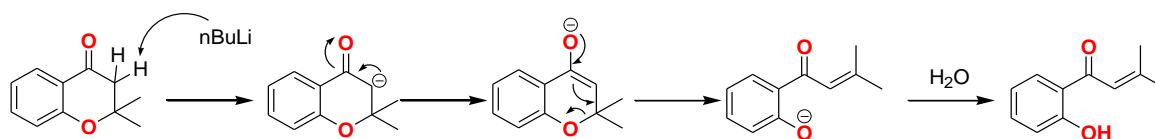


Figura 2-28 Mecanismo de reacción del compuesto **S6a**.

El compuesto **S6b** se obtuvo mediante la adición nucleofílica del anión butilo que proviene de la base nButil-Litio al grupo carbonilo, generando su reducción a alcohol. Con la formación de un nuevo enlace, por la adición del grupo alquil y la reducción del grupo carbonilo, cambia la hibridación del átomo de carbono generando un centro quiral. En la Figura 2-29 se muestra el mecanismo de reacción para la obtención de **S6b**. ⁴³

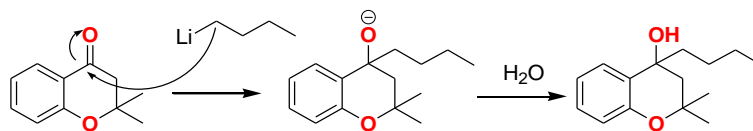


Figura 2-29 Mecanismo de reacción para la obtención de **S6b**.

2.4.2.8 Reacción de adición para obtener **S7**

Para la obtención de compuesto tipo cromeno con cadenas de derivados de isopreno en una posición diferente a los aislados previamente, se probó la estrategia de una adición nucleofílica con un haluro de arilo con un aldehído y con una base organolitica. En la Figura 2-30 se muestra las condiciones de reacción para la preparación del compuesto **S7**.

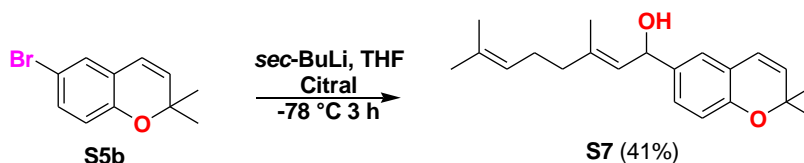


Figura 2-30 Preparación del compuesto **S7**

En el primer paso del mecanismo de reacción en la obtención del compuesto **S7**, es el intercambio halógeno-metal que sufre el compuesto haluro de arilo **S5b** con el sec-BuLi, como se ilustra en la Figura 2-31.

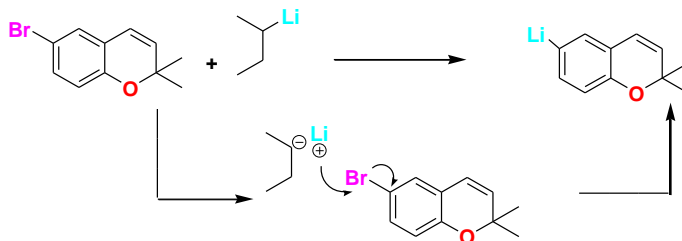
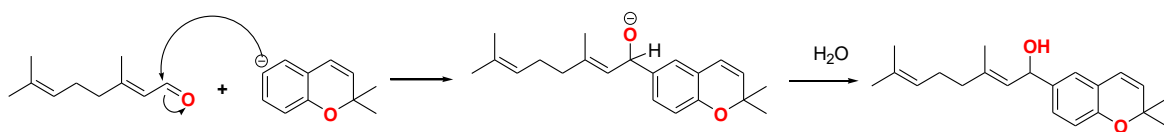


Figura 2-31 Intercambio de halógeno – Metal

Después del intercambio de halógeno por el metal litio, se genera un carbono nucleofílico, que ataca al grupo carbonilo del aldehído, generando un nuevo enlace C-C, reducción del grupo carbonilo a alcohol secundario. En la Figura 2-32 se ilustra el mecanismo de reacción de la adición nucleofílica.⁴³

Figura 2-32 Mecanismo de reacción para la obtención **S7**.

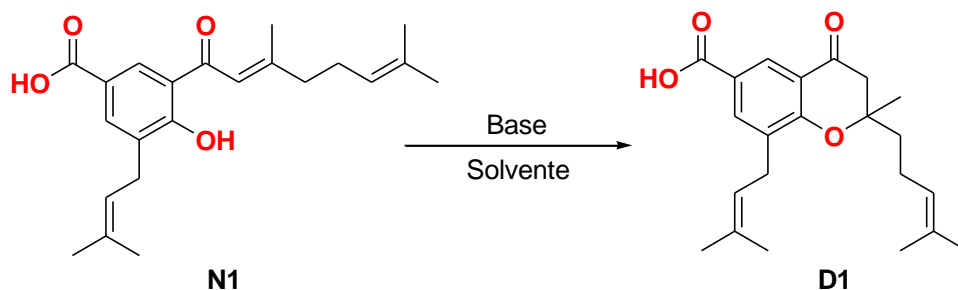
2.4.3 Síntesis de derivados

Los compuestos aislados se pueden modificar estructuralmente mediante reacciones sencillas como ciclaciones y metilaciones para obtener diferentes compuestos, en búsqueda de compuestos con mejor respuesta a la actividad antifúngica. En la literatura describen compuestos metilados con actividad antifúngica,⁴⁴. Aprovechando la suficiente cantidad de los compuestos aislados se realizaron la reacción de ciclación para obtener cromenos y *O*-metilación para obtener los metil ésteres.

2.4.4 Reacciones utilizadas.

2.4.4.1 Reacción de ciclación del compuesto **N1**

En la reacción de ciclación del compuesto **N1** se ensayó con diferentes disolventes y bases descritas en diferentes referencias, para ciclar el compuesto derivado de ácido y obtener compuesto tipo 4-cromanona. La Figura 2-33 se muestra el esquema general para la obtención de **D1**. En la Tabla 2-2 se muestran las bases, solventes y condiciones utilizadas y con sus respectivos rendimientos.

Figura 2-33 Esquema general para la obtención de **D1**Tabla 2-2 Condiciones de reacción de la ciclación intramolecular del compuesto **N1**.

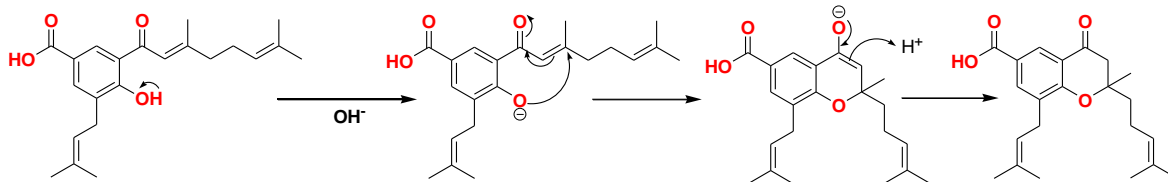
	Reactivo	Solvente	Condiciones	Rendimiento
1	DDQ	Tolueno	reflujo, 12 h	0
2	DDQ	p-xileno	reflujo, 12 h	5%
3	DDQ	Benceno	reflujo, 12 h	0
4	DDQ	Éter	reflujo, 12 h	0
5	DDQ	Diclorometano	reflujo, 12 h	4%
6	NaOH	NaOH 10%	ambiente, 12 h	90%
7	EDDA	Tolueno	reflujo, 12 h	32%
8	EDDA	p-xileno	reflujo, 12 h	62%
9	EDDA	Benceno	reflujo, 12 h	40%
10	EDDA	Éter	reflujo, 12 h	15%
11	EDDA	Diclorometano	ambiente, 12 h	54%
12	EDDA	Dimetilformamida	reflujo, 12 h	72%
13	Piridina	Diclorometano	reflujo, 12 h	0

DDQ: 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

EDDA: Ácido *N, N'*-diacetico-etilendiamino

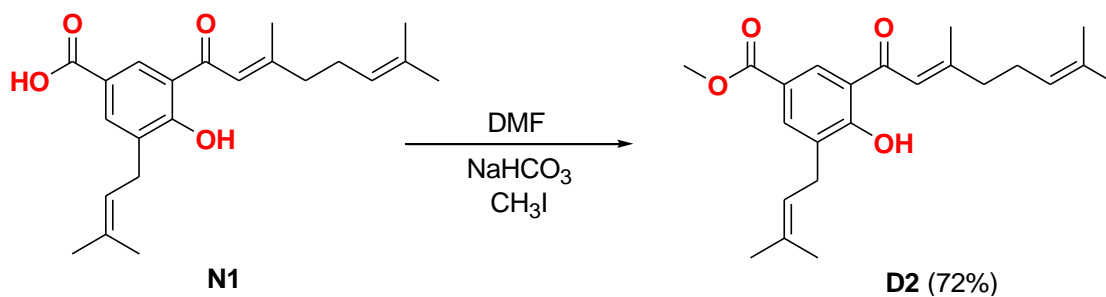
Después de ensayar las diferentes bases descritas en la literatura para la ciclación intramolecular de aceptores Michael, la base NaOH presentó el mejor porcentaje de rendimiento a temperatura ambiente, debido a que es la base más fuerte utilizada, seguida de la base EDDA (*N-N'* diacetico-etilendiamino). Otra ventaja de la ciclación utilizando NaOH es que la reacción se da a temperatura ambiente.

El mecanismo de reacción en la obtención del compuesto tipo 4-cromanona **D1**, es similar a la reacción de ciclación del numeral 2.4.2.3. La base utilizada desprotona el grupo hidroxilo fenólico y se comporta como un aceptor de Michael y sufre una posterior ciclación intramolecular debido a la reacción de oxa-Michael, que ocurre con el grupo hidróxido fenólico y el doble enlace α - β al grupo carbonilo.⁴⁰, en la Figura 2-34 se muestra el mecanismo de reacción para la formación **D1**.


 Figura 2-34 Mecanismo de reacción para la obtención de **D1**

2.4.4.2 Reacción de metilación

En la reacción de metilación se utilizó yoduro de metilo y el compuesto natural **N1** para obtener el producto O-metilado. En la Figura 2-35 se muestra el procedimiento para obtener el compuesto metilado.


 Figura 2-35 Esquema general para la obtención de **D2**

El primer paso en el mecanismo de reacción que se plantea para estas reacciones es la deprotonación ácido del grupo carboxílico por la base bicarbonato de sodio, generando ion carboxilato que realiza una sustitución nucleofílica S_N2 con el yoduro de metilo obteniendo el compuesto O-metilado y yoduro de sodio.

2.5 Conclusiones

El presente estudio realiza un aporte a las investigaciones sintéticas de análogos cromenos, obteniendo series de cromenos con diferentes sustituyentes en las posiciones 3, 4, 6 y 8, utilizando una ruta de 5 etapas.

Se desarrolló una ruta de síntesis para análogos de cromenos a partir de fenoles *para* sustituidos. Los compuestos sintetizados a partir de fenoles con grupo desactivador presentaron los menores porcentajes de rendimientos globales.

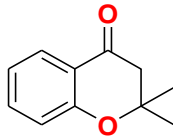
La etapa 2 reordenamiento de Fries fue la etapa decisiva para la obtención de los compuestos finales, en esta etapa no se obtuvo el compuesto **S2g** (sustituyente NO₂) y presentó los menores porcentajes de rendimiento con los otros compuestos respecto a las otras etapas realizadas que presentaron porcentajes de rendimiento mayores a 80%.

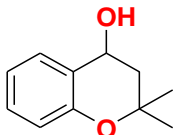
Mediante la ruta planteada se obtuvieron diversos análogos de cromenos similares a los aislados de la especie *Piper cumanense*, estos compuestos son de tipo cromanonas, cromenoles y cromenos y presentan diferentes grupos sustituyentes y cadenas de isoprenos,

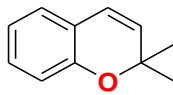
Con la ruta sintética planteada se logró obtener la síntesis del compuesto **N10 = S5d**, en 5 etapas con un porcentaje de rendimiento global de 65 %.

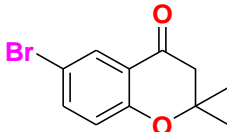
2.6 Anexos de síntesis

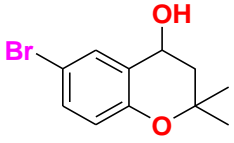
Datos espectroscópicos y constantes físicas de compuestos sintetizados.

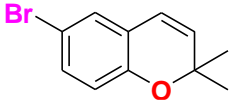
	Nombre	(S3a) 2,2-dimetil-4-cromanona
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₂ O ₂
	Peso	176,211g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.86 (dd, <i>J</i> = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.54 – 7.39 (m, 1H), 6.97 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 6.92 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 2.72 (s, 2H), 1.46 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 192.6, 156.0, 136.2, 126.5, 120.7, 120.2, 118.3, 79.2, 48.9, 26.6		

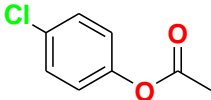
	Nombre	(S4a) 2,2-dimetil-4-cromanol
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₄ O ₂
	Peso	178,23 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.86 (dd, <i>J</i> = 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.54 – 7.41 (m, 1H), 6.97 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 6.92 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 4.76 (dd, <i>J</i> = 9.0, 6.2 Hz, 1H), 2.93 (s, 1H), 2.89 (s, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.31 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 155.8, 132.2, 130.5, 126.5, 119.2, 112.4, 77.9, 68.6, 40.2, 27.3, 25.8.		

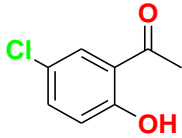
	Nombre	(S5c) 2,2-dimetil-2H-cromeno
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₂ O
	Peso	160,21 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.13 (td, <i>J</i> = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.00 (dd, <i>J</i> = 7.4, 1.6 Hz, 1H), 6.87 (td, <i>J</i> = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.35 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H), 5.63 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H), 1.47 (s, 6H)		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 152.9, 130.7, 129.0, 126.3, 122.3, 121.3, 120.7, 116.3, 28.0.		

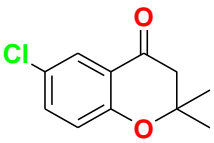
	Nombre	(S3b) 6-Bromo-2,2-dimetil-4-cromanona
	Estado Físico:	Aceite de color rojo oscuro
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₁ BrO ₂
	Peso	255,11 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.90 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 7.49 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 6.79 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 2.68 (s, 2H), 1.42 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 191.4, 158.9, 138.8, 129.0, 121.5, 120.6, 113.4, 79.8, 48.6, 26.6.		

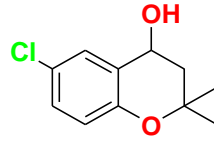
	Nombre	S4b. 6-Bromo-2,2-dimetil-4-cromanol
	Estado Físico:	Aceite de color rojo oscuro
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₃ BrO ₂
	Peso	257,12 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.60 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.69 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.88 – 4.78 (m, 1H), 2.97 (s, 1H), 2.89 (s, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.31 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 152.5, 132.2, 130.5, 126.5, 119.2, 112.4, 75.9, 63.5, 42.5, 29.1, 25.8.		

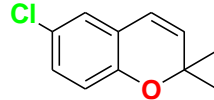
	Nombre	(S5a) 6-Bromo-2,2-dimetil-2H-cromeno
	Estado Físico:	Aceite de color rojo
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₁ BrO ₂
	Peso	239,10 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.18 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.24 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 5.63 (dd, J = 9.8, 4.2 Hz, 1H), 1.42 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 152.1, 132.0, 131.6, 128.8, 123.2, 121.4, 118.1, 112.7, 76.6, 28.0		

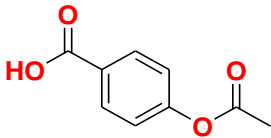
	Nombre	(S1c) acetato de 4-clorofenilo
	Estado Físico:	Aceite transparente
	Formula Molecular	C ₈ H ₇ ClO ₂
	Peso	170,01 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.34 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 169.3, 149.3, 131.3, 129.6, 123.1, 21.2.		

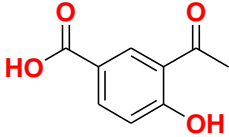
	Nombre	(S2c) 5-Cloro-2-hidroxiacetofenona
	Estado Físico:	Sólido de color blanco
	Punto de fusión	53-55 °C
	Formula Molecular	C ₈ H ₇ ClO ₂
	Peso	170,01 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 12.14 (s, 1H), 7.69 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 2.63 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 203.5, 160.8, 130.5, 129.8, 123.5, 120.2, 120.0, 27.9.		

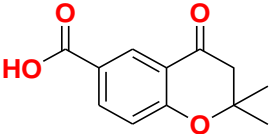
	Nombre	(S3c) 6-Cloro-2,2-dimetil-4-cromanona
	Estado Físico:	Sólido de color amarillo
	Punto de fusión	98-101 °C
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₁ ClO ₂
	Peso	210,04 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.81 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 7.40 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 6.89 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 2.72 (s, 2H), 1.46 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 191.4, 158.4, 135.9, 126.2, 125.9, 120.9, 120.1, 79.7, 48.6, 26.5.		

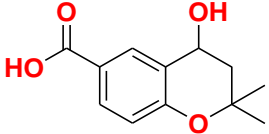
	Nombre	(S4c) 6-Cloro-2,2-dimetil-4-cromanol
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₂
	Peso	212,06 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.43 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.12 (dd, <i>J</i> = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 6.72 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 4.80 (dd, <i>J</i> = 9.0, 6.2 Hz, 1H), 2.16 (dd, <i>J</i> = 13.4, 6.2 Hz, 1H), 1.83 (dd, <i>J</i> = 13.4, 9.1 Hz, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.30 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 155.0, 132.5, 130.6, 128.7, 120.2, 116.4, 77.0, 69.5, 40.5, 27.3, 26.8.		

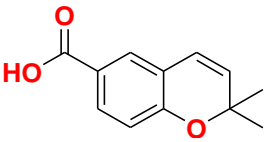
	Nombre	(S5c) 6-Cloro-2,2-dimetil-2H-cromeno
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₁ ClO
	Peso	194,05 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.04 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 6.95 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H), 6.70 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.25 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H), 5.65 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H), 1.42 (s, 6H)		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 151.6, 132.1, 128.7, 126.0, 125.4, 122.7, 121.6, 117.7, 76.6, 28.0.		

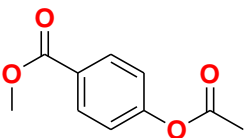
	Nombre	(S1d) Acido-4-acetiloxi benzoico
	Estado Físico:	Sólido de color blanco
	Punto de fusión	189-191 °C
	Formula Molecular	C ₉ H ₈ O ₄
	Peso	180,04 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.06 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.21 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H)		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 169.1, 168.2, 154.4, 131.2, 127.8, 121.7, 21.2.		

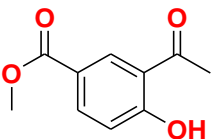
	Nombre	(S2d) Acido-3-acetil-4-hidroxi benzoico
	Estado Físico:	Sólido de color blanco
	Punto de fusión	227-230 °C
	Formula Molecular	C ₉ H ₈ O ₄
	Peso	180,04 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, Acetona 6d): δ 12.18 (s, 1H), 8.69 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H), 7.62 (dd, <i>J</i> = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.15 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 2.63 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, Acetona 6d): ppm 204.7, 166.1, 160.1, 137.3, 133.4, 121.2, 119.3, 118.8, 26.9.		

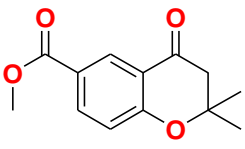
	Nombre	(S3d) Acido-2,2-dimetil-4-oxo croman-6-carboxilico
	Estado Físico:	Sólido
	Punto de fusión	183-184 °C
	Formula Molecular	C ₁₂ H ₁₂ O ₄
	Peso	220,07 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.65 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 8.18 (dd, <i>J</i> = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 7.00 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 2.78 (s, 2H), 1.49 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 191.6, 171.1, 164.0, 137.4, 130.2, 122.2, 119.9, 119.0, 80.6, 48.7, 26.8		

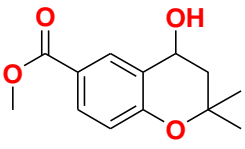
	Nombre	(S4d) Acido-4-hidroxi-2,2-dimetil-croman-6-carboxilico
	Estado Físico:	Sólido
	Punto de fusión	
	Formula Molecular	C ₁₂ H ₁₄ O ₄
	Peso	222,08 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.14 (s, 2H), 7.75 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 6.72 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 4.79 (dd, <i>J</i> = 9.5, 6.3 Hz, 3H), 2.14 (dd, <i>J</i> = 13.3, 6.0 Hz, 2H), 1.79 (dd, <i>J</i> = 13.3, 9.7 Hz, 2H), 1.39 (s, 6H), 1.26 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 170.1, 158.9, 131.7, 131.6, 126.1, 123.6, 118.0, 77.7, 63.5, 42.9, 29.5, 25.9.		

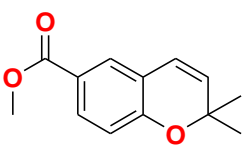
	Nombre	(S5d) Acido -2,2-dimetil-2H-cromen-6-carboxílico
	Estado Físico:	Sólido
	Punto de fusión	155-157 °C
	Formula Molecular	C ₁₂ H ₁₂ O ₃
	Peso	204,07 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.88 (dd, <i>J</i> = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.75 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 6.36 (d, <i>J</i> = 9.9 Hz, 1H), 5.66 (d, <i>J</i> = 9.9 Hz, 1H), 1.46 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 172.2, 158.1, 132.0, 131.2, 128.9, 121.7, 121.7, 120.8, 116.4, 77.8, 28.5.		

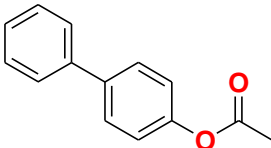
	Nombre	(S1e) 4-Acetoxi benzoato de metilo
	Estado Físico:	Sólido de color blanco
	Punto de fusión	79-81 °C
	Formula Molecular	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
	Peso	194,05 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.06 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.16 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.30 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 168.9, 166.4, 154.4, 131.2, 127.8, 121.7, 52.3, 21.2.		

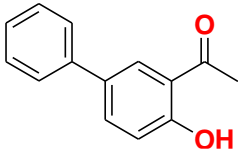
	Nombre	(S2e) 3-acetil-4-hidroxi-benzoato de metilo
	Estado Físico:	Sólido de color blanco
	Punto de fusión	99-102 °C
	Formula Molecular	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
	Peso	194,05 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 12.69 (s, 1H), 8.50 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 8.14 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 7.02 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 2.72 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 204.7, 166.1, 165.9, 137.3, 133.4, 121.2, 119.3, 118.8, 52.3, 26.9.		

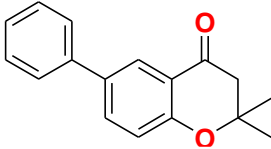
	Nombre	(S3e) 2,2-dimetil-4-oxocroman-6-carboxilato de metilo
	Estado Físico:	Sólido de color blanco
	Punto de fusión	101-102 °C
	Formula Molecular	C ₁₃ H ₁₄ O ₄
	Peso	234,08 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.54 (s, 1H), 8.11 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.74 (s, 2H), 1.47 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 191.6, 166.2, 163.3, 137.0, 129.1, 123.1, 119.8, 118.8, 80.3, 52.2, 48.8, 26.7.		

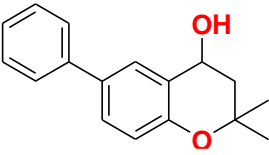
	Nombre	(S4e) 2,2-dimetil-4-Hidroxi-croman-6-carboxilato de metilo
	Estado Físico:	Aceite amarillo
	Formula Molecular	C ₁₃ H ₁₆ O ₄
	Peso	236,10 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.15 (dd, J = 2.1, 0.7 Hz, 1H), 7.79 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.83 (dd, J = 9.1, 6.1 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.15 (dd, J = 13.5, 6.1 Hz, 1H), 1.86 (dd, J = 13.5, 9.2 Hz, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.29 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 167.1, 157.5, 131.0, 130.2, 124.3, 122.3, 117.4, 76.6, 63.4, 52.0, 42.4 29.0, 26.2.		

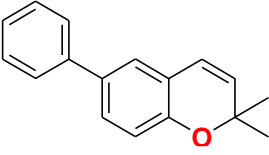
	Nombre	(S5e) 2,2-Dimetil-2H-chromene-6-carboxilato de metilo
	Estado Físico:	Aceite amarillo
	Formula Molecular	C ₁₃ H ₁₄ O ₃
	Peso	218,09 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.80 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.34 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 5.64 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.44 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 167.0, 157.3, 131.2, 131.2, 128.2, 122.6, 121.8, 120.8, 116.3, 52.0, 29.8, 28.5.		

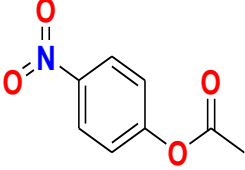
	Nombre	(S1f) 4-acetoxibifenil
	Estado Físico:	Cristales de color blanco
	Punto de fusión	88,6 -90 °C
	Formula Molecular	C ₁₄ H ₁₂ O ₂
	Peso	212,08 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.58 (dd, <i>J</i> = 10.5, 8.0 Hz, 4H), 7.44 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.35 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.17 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 169.7, 150.2, 140.5, 139.2, 128.9, 128.3, 127.5, 127.3, 122.0, 21.3.		

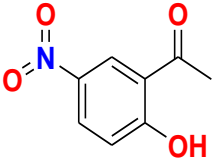
	Nombre	(S2f) 2-hidroxi-5-fenilacetofenona
	Estado Físico:	Sólido de color café oscuro
	Punto de fusión	54-56 °C
	Formula Molecular	C ₁₄ H ₁₂ O ₂
	Peso	212,08 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 12.28 (s, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H), 7.92 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 7.72 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.54 (dd, <i>J</i> = 7.2, 1.3 Hz, 2H), 7.49 – 7.43 (m, 2H), 7.39 – 7.34 (m, 1H), 7.07 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 2.70 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 204.7, 161.9, 140.1, 135.5, 132.5, 129.2, 129.1, 127.4, 126.8, 119.9, 119.0, 26.9		

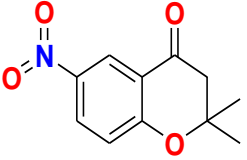
	Nombre	(S3f) 2,2-Dimetil-6-fenil-croman-4-ona
	Estado Físico:	Sólido de color anaranjado
	Punto de fusión	67-68 °C
	Formula Molecular	C ₁₇ H ₁₆ O ₂
	Peso	252,30 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.11 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.73 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 7.58 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.43 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.33 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.01 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 2.76 (s, 2H), 1.49 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 192.7, 159.5, 139.8, 134.9, 133.94, 129.0, 127.3, 126.8, 124.7, 120.3, 119.0, 79.5, 49.0, 26.8.		

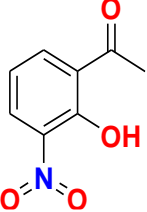
	Nombre	(S4f) 2,2-Dimetil-6-fenil-croman-4-ol
	Estado Físico:	Cristales de color blanco
	Punto de fusión	85-88 °C
	Formula Molecular	C ₁₇ H ₁₈ O ₂
	Peso	254,32 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.72 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.57 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.1 Hz, 2H), 7.46 – 7.38 (m, 3H), 7.30 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 6.87 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 4.90 (dd, <i>J</i> = 8.8, 6.2 Hz, 1H), 2.21 (dd, <i>J</i> = 13.4, 6.1 Hz, 1H), 1.89 (dd, <i>J</i> = 13.4, 9.0 Hz, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.34 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 152.9, 140.9, 133.5, 128.8, 128.1, 126.8, 126.3, 124.7, 117.7, 75.7, 63.9, 42.9, 29.1, 26.0.		

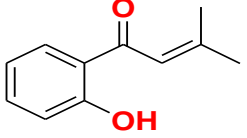
	Nombre	(S5f) 2,2-Dimetil-6-fenil-2H-cromeno
	Estado Físico:	Cristales de color blanco
	Punto de fusión	53-55 °C
	Formula Molecular	C ₁₇ H ₁₆ O
	Peso	236,12 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 7.56 (dd, <i>J</i> = 8.3, 1.2 Hz, 2H), 7.42 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.36 (dd, <i>J</i> = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 7.31 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.23 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 6.86 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 6.40 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H), 5.67 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H), 1.48 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 152.7, 141.0, 134.0, 131.2, 128.8, 127.9, 126.8, 125.1, 122.4, 121.5, 116.7, 76.6, 28.2.		

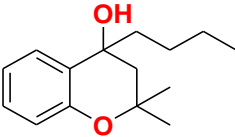
	Nombre	(S1g) acetate 4-nitrofenol
	Estado Físico:	Cristales de color amarillo
	Punto de fusión	77-79 °C
	Formula Molecular	C ₈ H ₇ NO ₄
	Peso	181,06 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.16 (d, <i>J</i> = 8.4, 2,1 Hz, 2H), 7.44 (d, <i>J</i> = 8.4, 2,1 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H)		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 169.7, 157.9, 145.4, 122.7, 121.5, 20.1		

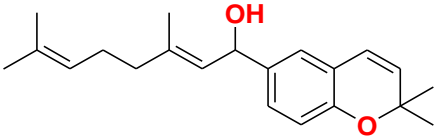
	Nombre	(S2g) 1-(2-Hidroxi-5-nitro-fenil)-etanona
	Estado Físico:	Cristales de color amarillo
	Punto de fusión	102-103 °C
	Formula Molecular	C ₈ H ₇ NO ₄
	Peso	181,06 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 12.88 (s, 1H), 8.72 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 8.36 (dd, <i>J</i> = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 7.10 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 2.77 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 205.5, 168.6, 141.0, 132.5, 128.6, 121.0, 119.9, 28.2.		

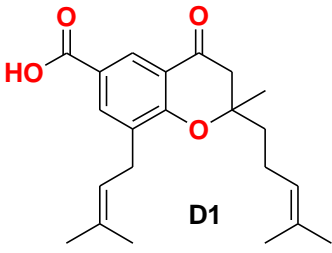
	Nombre	(S3g) 2,2-dimetil-6-nitro-croman-4-ona
	Estado Físico:	Cristales de color amarillo
	Punto de fusión	373-374 °C
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₁ NO ₄
	Peso	221,20 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.76 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H), 8.33 (dd, <i>J</i> = 9.1, 2.9 Hz, 1H), 7.10 – 7.06 (m, 1H), 2.82 (s, 2H), 1.52 (s, 6H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 191.9, 155.8, 140.5, 119.5, 117.3, 116.4, 108.4, 80.3, 48.8, 26.6		

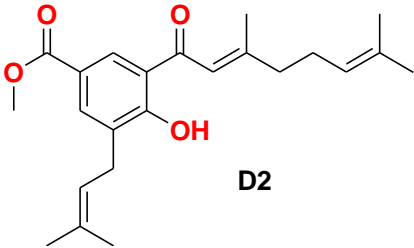
	Nombre	(S2h) 2-hidroxi-3-nitroacetofenona
	Estado Físico:	Cristales de color amarillo
	Punto de fusión	89-90 °C
	Formula Molecular	C ₈ H ₇ NO ₄
	Peso	181,14 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 13.19 (s, 1H), 8.19 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 8.08 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.06 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 2.74 (s, 3H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 204.6, 157.7, 139.3, 137.9, 133.1, 124.7, 119.8, 29.5.		

	Nombre	(S6a) 1-(2-Hidroxi-fenil)-3-metil-2-buten-1-ona
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo
	Formula Molecular	C ₁₁ H ₁₂ O ₂
	Peso	176,26 g/mol
	RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 12.83 (s, 1H), 7.80 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.46 (ddd, <i>J</i> = 8.6, 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.00 (dd, <i>J</i> = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 6.89 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 6.84 – 6.78 (m, 1H), 2.24 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 3H), 2.07 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 3H).	
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 196.3, 163.2, 157.9, 135.8, 129.8, 120.6, 120.1, 118.6, 118.4, 28.2, 21.4.		

	Nombre	(S6b) 4-Butil-2,2-dimetil-croman-4-ol
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo
	Formula Molecular	C ₁₅ H ₁₂ O ₂
	Peso	234,16 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.44 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.20 (ddd, J = 8.2, 7.2, 1.7 Hz, 1H), 7.02 – 6.93 (m, 1H), 6.85 (dd, J = 8.2, 1.2 Hz, 1H), 2.10 (s, 1H), 2.01 (s, 1H), 1.96 (s, 1H), 1.82 (s, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.34 (d, J = 0.7 Hz, 4H), 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H)		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 153.1, 129.0, 127.5, 126.2, 120.8, 118.1, 74.1, 69.2, 45.7, 43.7, 30.3, 26.5, 25.2, 23.1, 14.1.		

	Nombre	(S7) 1-(2,2-Dimetil-2H-cromen-6-il)-3,7-dimetil-octa-2,6-dien-1-ol
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo
	Formula Molecular	C ₂₁ H ₁₈ O ₂
	Peso	312,44 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.13 (td, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.00 (dd, J = 7.4, 1.6 Hz, 1H), 6.87 (td, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 5.63 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 5.29 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 5.24 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 4,86 (dd, J = 8.8, 6.2 Hz, 1H), 2.25 (m, 2H), 2.17 (t, J = 7.4, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.53 (s,6H), 1.47 (s, 6H)		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): ppm 152.9, 138.4, 131.7, 130.7, 129.0, 128.1, 126.3, 124.2, 122.3, 121.3, 120.7, 116.3, 72.0, 38.3, 28.0, 26.5, 21.8, 18.1.		

	Nombre	(D1) Ácido-2-Metil-8-(3-metil-but-2-enil)-2-(4-metil-pent-3-enil)-4-oxo-cromano-6-carboxílico
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo claro
	Formula Molecular	C ₂₂ H ₂₈ O ₄
	Peso	356,45 g/mol
	Punto de fusión	87 – 89 °C
IR: ν = 2924, 1689, 1635, 1442, 1280, 1242.		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8.51 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.28 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 5.07 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.35 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 2.85 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 2.70 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 2.23 – 2.06 (m, 2H), 1.76 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.44 (s, 3H).		
RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): ppm 192.0, 171.5, 161.7, 136.7, 133.9, 132.7, 131.9, 127.8, 123.2, 121.5, 121.2, 119.9, 82.2, 47.2, 39.6, 28.4, 25.9, 25.7, 24.1, 22.4, 18.0, 17.7.		

 <p style="text-align: center;">D2</p>	Nombre	3-(3',7'-dimetil-1'-oxo-octa-2',6'-dienil)-4-hidroxi-5-(3''-metil-2''-but-2''-enil) carboxilato de metilo
	Estado Físico:	Aceite de color amarillo claro
	Formula Molecular	C ₂₃ H ₃₀ O ₄
	Peso	370,21 g/mol
		Nuevo ¡!!!!
<p>RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 13.69 (s, 1H), 8.37 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 7.96 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.37 – 5.27 (m, 1H), 5.13 (t, <i>J</i> = 6.6, 4.8, Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.37 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 2.32 (s, 4H), 2.22 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.72 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 6H), 1.63 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 3H)</p>		
<p>RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): ppm 196.2, 171.9, 166.0 (C-4), 163.0 (C-3'), 136.0 (C-6), 134.0 (C-3''), 133.0 (C-7'), 131.5 (C-3), 130.9 (C-2), 122.8 (C-6'), 120.9 (C-2''), 119.5 (C-5), 119.1 (2'), 118.8, 52.0, 41.8 (C-4'), 27.6 (C-1''), 26.2 (C-5'), 25.8 (C-8'), 25.8 (C-4''), 20.3 (C-10'), 17.8 (C-5'') 17.7 (C-9').</p>		

2.7 Bibliografía

1. Demain, A. L.; Fang, A., The natural functions of secondary metabolites. In *History of modern biotechnology I*, Springer: **2000**; pp 1-39.
2. Alves, M. F.; Scotti, L.; Da Costa, F. B.; Scotti, M. T., Chemotaxonomic Study of Sesquiterpene Lactones of Asteraceae: Classical and Modern Methods. In *Sesquiterpene Lactones*, Springer: **2018**; pp 31-45.
3. Hill, S.; Hammer, P. E.; Ligon, J., The role of antifungal metabolites in biological control of plant disease. *Technology Transfer of Plant Biotechnology* **2018**.
4. Kaye, P. T.; Musa, M. A., Application of Baylis–Hillman Methodology in the Synthesis of Coumarin Derivatives. *Synthetic Communications* **2003**, *33* (10), 1755-1770.
5. Pratap, R.; Ram, V. J., Natural and Synthetic Chromenes, Fused Chromenes, and Versatility of Dihydrobenzo[h]chromenes in Organic Synthesis. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (20), 10476-10526.
6. Khafagy, M. M.; Abd El-Wahab, A. H. F.; Eid, F. A.; El-Agrody, A. M., Synthesis of halogen derivatives of benzo[h]chromene and benzo[a]anthracene with promising antimicrobial activities. *II Farmaco* **2002**, *57* (9), 715-722.
7. Orjala, J.; Erdelmeier, C. A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O., Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* **1993**, *34* (3), 813-818.
8. Saga Kitamura, R. O.; Romoff, P.; Young, M. C. M.; Kato, M. J.; Lago, J. H. G., Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). *Phytochemistry* **2006**, *67* (21), 2398-2402.
9. Abrunhosa, L.; Costa, M.; Areias, F.; Venâncio, A.; Proença, F., Antifungal activity of a novel chromene dimer. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2007**, *34* (12), 787-792.
10. A. Tawfik, H.; Ewies, E.; El-Hamouly, W., ChemInform Abstract: Synthesis of Chromones and Their Applications During the Last Ten Years. **2015**, *46*, 336-348.
11. Cottiglia, F.; Dhanapal, B.; Sticher, O.; Heilmann, J., New Chromanone Acids with Antibacterial Activity from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of Natural Products* **2004**, *67* (4), 537-541.
12. Lozinskii, O. A.; Shokol, T. V.; Khilya, V. P., Synthesis and biological activity of chromones annelated at the C(7)–C(8) bond with heterocycles (review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **2011**, *47* (9), 1055-1077.
13. Seca, A.; Pinto, D., Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International journal of molecular sciences* **2018**, *19* (1), 263.
14. Kandeel, M. M.; Kamal, A. M.; Abdelall, E. K.; Elshemy, H. A., Synthesis of novel chromenes as cytotoxic agents. *Journal of Chemical Research* **2013**, *37* (2), 110.
15. Liu, F.; Evans, T.; Das, B. C., Synthesis of 2-substituted 2H-chromenes using potassium vinyltrifluoroborates. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49* (10), 1578-1581.
16. Varma, R. S.; Dahiya, R., An Expedient and Solvent-Free Synthesis of 2-Amino-Substituted Isoflav-3-enes Using Microwave Irradiation. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (22), 8038-8041.
17. Wang, Q.; Finn, M. G., 2H-Chromenes from Salicylaldehydes by a Catalytic Pétasis Reaction. *Organic Letters* **2000**, *2* (25), 4063-4065.
18. Chang, S.; Grubbs, R. H., A Highly Efficient and Practical Synthesis of Chromene Derivatives Using Ring-Closing Olefin Metathesis. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (3), 864-866.
19. Doodeman, R.; Rutjes, F. P.; Hiemstra, H., Synthesis of 2-substituted chromenes via ring-closing metathesis and stable 1-benzopyrylium ions. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (31), 5979-5983.
20. Wipf, P.; Weiner, W. S., Enantioselective Synthesis and Photocyclization Studies of (+)-2-Cyclopropyl-7,8-dimethoxy-2H-chromene-5-carboxylic Acid Methyl Ester, an Advanced Intermediate of a Dihydrofolate Reductase Inhibitor. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64* (14), 5321-5324.
21. Majumdar, N.; Korthals, K. A.; Wulff, W. D., Simultaneous synthesis of both rings of chromenes via a benzannulation/o-quinone methide formation/electrocyclization cascade. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *134* (2), 1357-1362.

22. Iyer, M.; Trivedi, G., Synthesis of 2, 2-dimethyl-2H-chromenes via a palladium (II) catalysed reaction. *Synthetic Communications* **1990**, *20* (9), 1347-1351.
23. Parker, K. A.; Mindt, T. L., Electrocyclic ring closure of the enols of vinyl quinones. A 2H-chromene synthesis. *Organic Letters* **2001**, *3* (24), 3875-3878.
24. Ye, L.-W.; Sun, X.-L.; Zhu, C.-Y.; Tang, Y., Unexpected Tandem Ylide Annulation Reaction for Controllable Synthesis of 2 H-Chromenes and 4 H-Chromenes. *Organic Letters* **2006**, *8* (17), 3853-3856.
25. Ballini, R.; Bosica, G.; Conforti, M. L.; Maggi, R.; Mazzacani, A.; Righi, P.; Sartori, G., Three-component process for the synthesis of 2-amino-2-chromenes in aqueous media. *Tetrahedron* **2001**, *57* (7), 1395-1398.
26. Kidwai, M.; Saxena, S.; Khan, M. K. R.; Thukral, S. S., Aqua mediated synthesis of substituted 2-amino-4H-chromenes and in vitro study as antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15* (19), 4295-4298.
27. Chandrasekhara Rao, L.; Meshram, H. M.; Satish Kumar, N.; Nageswara Rao, N.; Jagadeesh Babu, N., L-Proline catalyzed efficient and convenient synthesis of substituted 2H-chromenes by three-component reaction. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55* (6), 1127-1131.
28. Williams, D. B. G.; Lawton, M., Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75* (24), 8351-8354.
29. Bano, M.; Ahmed, S., Synthesis of 6-chloro-4-(furan-2-ylmethyleneamino)-2, 2-dimethyl-2H-chromen-3-ol for antihypertensive activity. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **2012**, *3* (4), 569-77.
30. Odejinmi, S. I.; Wiemer, D. F., Application of benzyl protecting groups in the synthesis of prenylated aromatic compounds. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46* (22), 3871-3874.
31. Bano, M.; Barot, K. P.; Jain, S. V.; Ghate, M. D., Identification of 3-hydroxy-4 [3, 4-dihydro-3-oxo-2H-1, 4-benzoxazin-4-yl]-2, 2-dimethyldihydro-2H-benzopyran derivatives as potassium channel activators and anti-inflammatory agents. *Medicinal Chemistry Research* **2015**, *24* (7), 3008-3020.
32. Sebillé, S.; de Tullio, P.; Becker, B.; Antoine, M.-H.; Boverie, S.; Pirotte, B.; Lebrun, P., 4,6-Disubstituted 2,2-Dimethylchromans Structurally Related to the KATP Channel Opener Cromakalim: Design, Synthesis, and Effect on Insulin Release and Vascular Tone. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48* (2), 614-621.
33. Szell, T.; Brand, A.; Ratanathanawongs, S., Two new thia chalcones. *Journal of Chemical & Engineering Data* **1981**, *26* (2), 230-230.
34. Hoarau, C.; Pettus, T. R. R., Strategies for the Preparation of Differentially Protected ortho-Prenylated Phenols. *Synthesis letter* **2003**, (1), 127-137.
35. Walunj, R. M.; Natu, A. D.; Paradkar, M. V.; Rojatar, S. R., Efficient total synthesis of naturally occurring anti-TMV compound gramniphénol G. *Synthetic Communications* **2016**, *46* (17), 1425-1431.
36. Morelli, C. F.; Biagiotti, M.; Pappalardo, V. M.; Rabuffetti, M.; Speranza, G., Chemistry of α -mangostin. Studies on the semisynthesis of minor xanthenes from *Garcinia mangostana*. *Natural Product Research* **2015**, *29* (8), 750-755.
37. Parra, J. E.; Patiño, O. J.; Prieto, J. A.; Delgado, W. A.; Cuca, L. E., A new benzoic acid derivative isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry Letters* **2013**, *6* (4), 590-592.
38. Kalmus, C. E.; Hercules, D. M., Mechanistic study of the photo-Fries rearrangement of phenyl acetate. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96* (2), 449-456.
39. Hejchman, E.; Kruszewska, H.; Maciejewska, D.; Sowirka-Taciak, B.; Tomczyk, M.; Sztokfisz-Ignasiak, A.; Jankowski, J.; Młynarczyk-Biały, I., Design, synthesis, and biological activity of Schiff bases bearing salicyl and 7-hydroxycoumarinyl moieties. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2019**, *150* (2), 255-266.
40. Iguchi, D.; Erra-Balsells, R.; Bonesi, S. M., Expedient photochemical reaction toward the preparation of substituted chroman-4-ones. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55* (33), 4653-4656.

41. Qiu, Y.-F.; Ye, Y.-Y.; Song, X.-R.; Zhu, X.-Y.; Yang, F.; Song, B.; Wang, J.; Hua, H.-L.; He, Y.-T.; Han, Y.-P.; Liu, X.-Y.; Liang, Y.-M., Convenient and Highly Efficient Routes to 2 H-Chromene and 4-Chromanone Derivatives: Iodine-Promoted and p-Toluenesulfonic Acid Catalyzed Cascade Cyclizations of Propynols. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21* (8), 3480-3487.
42. Klumpp, D. A., Electrophilic Aromatic Substitution: Mechanism. *Arene Chemistry: Reaction Mechanisms and Methods for Aromatic Compounds* **2015**, 3-31.
43. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P., Organic chemistry, First. Oxford University Press, New York. **2001**, 547-579.
44. Roussis, V.; Ampofo, S. e. A.; Wiemer, D. F., A prenylated benzoic acid derivative from the leaves of *Piper taboganum*. *Phytochemistry* **1990**, *29* (6), 1787-1788.

Capítulo 3. Estudio de actividad antifúngica y modelado de farmacóforo a partir de los compuestos aislados y sintetizados

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	III
Lista de tablas	V
3. Estudio de actividad antifúngica y modelado de farmacóforo a partir de los compuestos aislados y sintetizados	
Abreviaturas y acrónimos.....	VI
3.1 Introducción.....	91
3.2 Generalidades de <i>Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae</i>	92
3.1 Modelado del farmacóforo.....	95
3.1.1 Estudio computacional.....	95
3.1.2 Farmacóforo	95
3.2 Metodología	96
3.2.1 Procedimientos generales de Actividad antifúngica.	96
3.2.1.1 Cepa utilizada.....	96
3.2.1.2 Ensayo de inhibición de crecimiento del micelio	96
3.2.1.3 Actividad fungicida o fungistática	97
3.2.1.4 Ensayo de inhibición de germinación y crecimiento (fitotoxicidad)	97
3.2.2 Procedimientos generales del estudio computacional.....	98
3.2.1.1 Modelado molecular.	98
3.2.1.2 Representación de los farmacóforos y creación de base de datos.	98
3.3 Resultados y discusión.....	98
Actividad antifúngica.....	98
3.3.1 Ensayo de inhibición de crecimiento del micelio.	98
3.3.2 Actividad fungicida o fungistática	103
3.3.3 Ensayo de inhibición de germinación y crecimiento (fitotoxicidad)	104
Resultados y discusión del estudio de computacional.....	107
3.3.3.1 Modelado molecular de los compuestos.	107
3.3.3.2 Representación de los farmacóforos y creación de base de datos.	108
3.3.3.3 Obtención de la base de datos de farmacóforos similares	110
3.3.3.4 Tamizaje en la selección de los farmacóforos.....	112
3.4 Conclusiones.....	117
3.5 Anexos actividad antifúngica	118
3.6 Bibliografía	119
Recomendaciones	124

Lista de figuras

Figura 3-1 Flor de la gulupa, <i>Passiflora edulis Sims var. Edulis</i>	94
Figura 3-2 Principales países destino de las exportaciones de gulupa.	94
Figura 3-3 Resultados de porcentaje de inhibición de los compuestos evaluados contra <i>F. oxysporum sp passiflorae</i>	99
Figura 3-4 Estructuras de los compuestos que presentaron actividad antifúngica	100
Figura 3-5 Relación preliminar estructura-actividad antifúngica de cromenos	103
Figura 3-6 Ensayo fungicida y fungistática para los compuestos 1*= S1d , 2*= S1e , 3*= S1f , 4*= S1g , 5*= S2g , 6*= N10 , 7*= S2h , 8*= S4b y 9*= S4c . *= ubicación en las cajas Petri utilizadas en el ensayo, 10= control negativo.	104
Figura 3-7 Efecto de los compuestos activos frente la germinación de semillas de <i>L. perenne</i> y <i>L. sativa</i>	104
Figura 3-8 Efecto fitotóxico de los compuestos más activos contra <i>F. oxysporum.sp.passiflorae</i>	106
Figura 3-9 Representación de los modelos farmacofóricos.	109

Lista de tablas

Tabla 3-1 Valores de CI_{50} expresados en $\mu\text{g/mL}$ y μM contra <i>F. oxysporum sp passiflorae</i> para los compuestos con mayor actividad antifúngica.	101
Tabla 3-2 Efecto fitotóxico de las sustancias evaluadas	105
Tabla 3-3 Estructuras en 2D y en 3D.....	108
Tabla 3-4 Características de los farmacóforos.....	109
Tabla 3-5 Compuestos seleccionados para cada farmacóforo, según los reportes de actividad antifúngica, menor valor de RMSD y similitud estructural.	110
Tabla 3-6 Resultados del tamizaje de los cinco farmacoforo, donde se muestra la estructura en 3D y su estructura obtenida por ZincPharmer mostrando las características de farmacoforo.	112

Abreviaturas y acrónimos

AcOEt	Acetato de etilo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CMI	Cantidad mínima inhibitoria
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
MMFF	Merck Molecular Force Field
MTT	Metil tiazolil tetrazolio
PDA	Agar de Papa – Dextrosa
PM3	Parameterized Model number 3
RMSD	Root Mean Square Deviation
TLC	Cromatografía en capa delgada
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

3. Estudio de actividad antifúngica y modelado de farmacóforo a partir de los compuestos aislados y sintetizados

3.1 Introducción

Colombia es un país en donde la agricultura desempeña un papel importante a nivel económico, social y alimenticio. Las frutas tropicales son unos de los productos de mayor exportación y cuya demanda va en aumento considerable, pero uno de los problemas serios que se presentan en estos cultivos es derivado del hongo *F. oxysporum*, el cual reduce la calidad y la viabilidad del producto disponible para comercializar ¹.

El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae* genera grandes pérdidas económicas en los cultivos de frutas de especies de la familia Passifloraceae como maracuyá, curuba, granadilla y gulupa, que en los últimos años ha aumentado su comercialización en países europeos, siendo la gulupa la fruta tropical que llama la atención. El hongo *F. oxysporum f. sp. passiflorae* genera en los cultivos de pasifloras marchitamiento vascular que conlleva a la muerte de las plantas, generando pérdidas superiores del 60%, manchas en los frutos, causando el rechazo para su exportación, afecta el normal crecimiento de la planta generando manchas y deformaciones en las hojas, entre otros síntomas. Este hongo es capaz de persistir en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes por largos periodos de tiempo, como no se evidencia la presencia del patógeno, muchas veces se siembra en suelos infectados, conllevando a que se dé el ataque del patógeno.²⁻³ Para controlar esta enfermedad generalmente se utiliza controles químicos, que son tóxicos, poco selectivos y han generado organismos resistentes, aumentan los gastos de producción y disminuyen la calidad de los frutos (la presencia de trazas de fungicidas en los frutos es causa de rechazo en los mercados internacionales).⁴⁻⁷.

Haciendo necesaria la búsqueda de nuevos agentes fitosanitarios que sean efectivos y de bajo impacto ambiental, inspirados en los productos naturales, síntesis de análogos y con ayuda de modelos computacionales se puede descubrir compuestos activos contra este hongo. Gracias a los avances en el campo de química computacional y haciendo uso de modelos computacionales, se puede realizar búsquedas, diseño y optimización de nuevas moléculas que presenten mejores y/o

nuevas actividades biológicas, estos métodos nos permiten tener resultados en menor tiempo y costos en investigaciones preliminares. un método utilizado comúnmente, es el modelo basado en búsqueda de farmacóforo, que se basa en resultados experimentales de la relación de estructura-actividad de compuestos activos, con las estructuras de estos compuestos se genera un farmacóforo con los rasgos esenciales atribuibles a esa actividad y se buscan en bases de datos estructuras con similares rasgos que posiblemente posean esa actividad, en este caso se pueden predecir nuevas estructuras de compuestos que nos permitan obtener agentes fitosanitarios para el control de *F. oxysporum f. sp. passiflorae*, hongo fitopatógeno ⁸⁻⁹.

En este capítulo se describe la actividad antifúngica de los compuestos aislados y sintetizados contra *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae*, hongo fitopatógeno que ataca a los cultivos de Pasifloras y se evaluó también los efectos fitotóxicos de los compuestos evaluados.

Finalmente, con los datos obtenidos de la actividad antifúngica y efectos tóxicos, se planteó un estudio computacional basado en farmacóforos, usando las estructuras de los compuestos (naturales y sintéticos) que presentaron mejor actividad contra este hongo y menor efecto tóxico, para así predecir estructuras con una posible mejor actividad antifúngica.

3.2 Generalidades de *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae*

Las diversas plagas y enfermedades que afectan diferentes cultivos económicamente importantes son en gran parte responsables de los bajos rendimientos en los cultivos, causan pérdidas significativas a los agricultores y amenazan la seguridad alimentaria. Globalmente, estas pérdidas pueden aumentar hasta 50% de los cultivos anuales o incluso más en los países en desarrollo. Muchos patógenos afectan estos cultivos generando pérdidas económicas ¹. En el "top 10" de patógenos fúngicos basado en la importancia científica y económica, *Botrytis cinerea* ocupa el segundo lugar y *Fusarium oxysporum* en el quinto lugar ¹⁰.

Los hongos del género *Fusarium* presentan una distribución mundial y abundante en las zonas tropicales y templadas del mundo. Gran parte de las especies de este género son hongos fitopatógenos que causan daño a diversas hortalizas, plantas ornamentales y plantaciones de cultivos ocasionando distintos tipos de enfermedades, como pudrición de raíces y base del tallo, pudrición de frutos, muerte descendente, manchas en las hojas y marchitamiento vascular. La mayoría de los hongos del género *Fusarium* causantes de marchitamiento pertenecen a *F. oxysporum* ^{3, 11}. Este patógeno ha aumentado su importancia, debido a que desarrolla tolerancia a tratamientos químicos ¹²⁻¹³ y las cepas presentan un amplio

rango de especialidades ^{2, 14-15}, pueden parasitar más de 400 especies de plantas, gracias a las formas especializadas, que atacan especies específicas; se denomina forma especial (f. sp.) según el hospedero que afecte. Por ejemplo: el clavel atacado por *F. oxysporum f. sp. dianthi*, tomate por *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, gulupa, macacuya, curuba, y otras pasifloras por *F. oxysporum f. sp. passiflorae* ^{6, 16}.

La enfermedad producida por *F. oxysporum f. sp. passiflorae* se caracteriza por la aparición de los síntomas de marchitamiento que incluye amarillamiento parcial de las hojas y doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma. En estados iniciales de la enfermedad en las hojas puede observarse la mitad clorótica y la mitad de un color verde normal. Se observa además un enanismo de los brotes y disminución del crecimiento de la planta. Los síntomas de la enfermedad avanzan afectando la planta hacia arriba hasta causar un marchitamiento generalizado y la muerte ¹⁶. Un aspecto muy importante para el diagnóstico de la enfermedad que la diferencia fácilmente de otras enfermedades vasculares es una coloración blanquecina, amarillenta o marrón en los haces vasculares y deshilachamiento de los tejidos sin afectar la médula ^{5, 17}.

Los controles químicos son los más utilizados, para controlar *F. oxysporum f. sp. passiflorae* principalmente los fungicidas sistémicos pertenecientes al grupo de los benzimidazoles ¹⁸. Estos productos tienen como desventajas principales la elevada toxicidad para humanos y animales, y los residuos contaminantes que depositan en el medio ambiente, generando serios problemas de contaminación ambiental ^{19 20-22}. La efectividad de estas sustancias ha disminuido notablemente debido a la aparición de cepas resistentes ²³.

El hongo *F. oxysporum f. sp. passiflorae* produce la enfermedad conocida marchitamiento vascular o fusariosis a las plantas del género Passifloras. Este género pertenece a la familia Passifloraceae constituida por 36 géneros, siendo el más representativo el género Passiflora. Colombia exporta diversos productos agrícolas donde las frutas frescas están en auge, las Passifloras ocupan el tercer puesto en exportaciones de frutas frescas en el país con más de 2800 ton en el año 2012 ²⁴. Son conocida por su vistosidad de sus flores, que las ha hecho reconocidas con el nombre de “frutas de la pasión” ²⁵, este nombre se debe a la descripción de los monjes Jesuitas que vieron en estas flores los signos de la “Pasión de Cristo” un ejemplo de sus flores se ve en la figura 3.1.



Figura 3-1 Flor de la gulupa, *Passiflora edulis Sims var. Edulis*

La gulupa conocida como la fruta de la pasión es la más apetecidas, siendo los Países Bajos donde se concentra más del 60% de las exportaciones de esta fruta, como se muestra en la Figura 3-2 ²⁶⁻²⁷. El volumen de exportación creció considerablemente pasando de 500 a casi 2800 toneladas solo en el periodo de 2007 al 2012, representando un aumento de US\$ 3,960 millones de dólares en el 2007 a US\$ 20,450 millones en el 2012 solo en exportaciones de gulupa ²⁴.

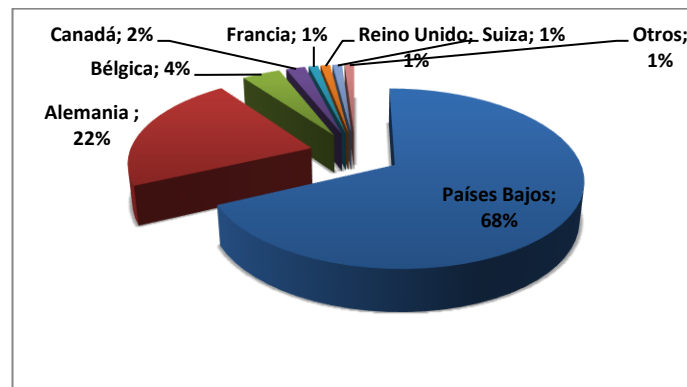


Figura 3-2 Principales países destino de las exportaciones de gulupa.

Sin embargo, las exportaciones se han visto limitadas por diversos problemas, principalmente por el ataque de la enfermedad marchitamiento vascular o fusariosis generando que el volumen de exportación, que manifestaba una tendencia al aumento presentó descensos, debido a las altas pérdidas de cosecha, no inferiores al 40%, causadas por el hongo *F. oxysporum f. sp. passiflorae* el cual se ve incrementado cuando el manejo en cosecha y postcosecha no es adecuado ²⁸⁻³⁰.

3.1 Modelado del farmacóforo

3.1.1 Estudio computacional

En la actualidad los métodos computacionales aplicados al descubrimiento de nuevos fármacos en aplicaciones de la química farmacéutica han permitido ahorrar recursos destinados para tal fin. La aplicación de estos métodos depende de la información que se tenga, por ejemplo, para búsquedas de nuevos compuestos activos, se pueden tener dos casos: diseño basado acoplamiento molecular, teniendo la enzima (blanco biológico) y sobre esta busca ligandos que generen una respuesta biológica deseada (Docking) ³¹ o tener ligandos que posean actividad biológica y buscar compuestos con las mismas propiedades biológicas³², estos estudios deben estar respaldados por modelos experimentales que suministren la información para verificar la eficiencia del modelo computacional, estos son los métodos computacionales más utilizados ³³.

3.1.2 Farmacóforo

La primera definición de farmacóforo fue realizada en el año 1990 por Paul Ehrlich como “una unidad central molecular que transporta los rasgos esenciales responsables para la actividad biológica de un fármaco” ³⁴. Actualmente la definición según IUPAC de un farmacóforo es: “un conjunto de rasgos estéricos y electrónicos que es necesario para asegurar las óptimas interacciones supramoleculares con un blanco biológico específico y para desencadenar o bloquear su respuesta biológica” ³⁵⁻³⁶.

Un modelo de farmacóforo se utiliza para definir los rasgos esenciales de una o más compuestos con la misma actividad biológica. Luego en una base de datos con diversos compuestos se buscan moléculas que posean similares características (hidrofóbica, aceptor de hidrógenos, aromática, donador de hidrógenos, polar negativa, polar positivas) localizados a una distancia similar. De esta manera es posible identificar, por medio de un cribado de bases de datos o librerías de moléculas, nuevos compuestos que se unirán al mismo receptor, por ende, se supone que estos nuevos compuestos predichos tendrán una actividad biológica similar ³⁷⁻³⁸.

Una aplicación de un modelo farmacóforo fue utilizado en el descubrimiento de nuevos compuestos antifúngicos, contra *Candida albicans*, En el estudio buscaban la inhibición de la enzima oxidoescualeno ciclasa importante para la formación del lanosterol intermedio de la biosíntesis del ergosterol. Los investigadores realizaron un cribado virtual por acoplamiento molecular (*molecular docking*) usando la base de datos DrugBank que contiene 3358 compuestos. Dado que los inhibidores de la

enzima mostraron un modo de unión de conformación similar en el sitio activo, se construyó un modelo de farmacóforo basado esta postura, obteniéndose 143 compuestos con las características farmacofóricas, luego con estas estructuras realizaron un tamizaje y postularon 5 candidatos, los cuales fueron probados experimentalmente y obteniendo compuestos con mayor actividad ³².

3.2 Metodología

3.2.1 Estudio de la actividad antifúngica.

3.2.1.1 Cepa utilizada

Para la actividad antifúngica se utilizó el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae* preservado en el laboratorio de Productos naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia. La cepa fue mantenida en un medio de agar de papa – dextrosa (PDA) en incubadora a 25 °C.

3.2.1.2 Ensayo de inhibición de crecimiento del micelio

La actividad antifúngica de los compuestos aislados y compuestos sintetizados se determinó usando el ensayo de inhibición de crecimiento del micelio de *F. oxysporum f. sp. passiflorae*. Para realizar el ensayo, se hicieron diluciones en serie de los compuestos puros con concentraciones finales de 500; 100; 50; y 10 µg/mL en etanol y con medio de cultivo PDA. Luego, las soluciones se distribuyeron en cuatro pozos (500 µL x pozo) en una placa de 12 pozos (4 pozos /concentración) (se colocaron en cada placa 4 controles negativos) y se dejaron solidificar. La concentración final de etanol en el medio fue del 2%. El control positivo utilizado fue Benomyl® ³⁹ y el control negativo fue el solvente (Etanol).

A continuación, se realizó la inoculación del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae* sobre cada pozo mediante la transferencia de esporas por contacto con un asa con punta de una caja que contenía el hongo con 3 días de crecimiento. Se incubó en oscuridad a 28 ° C durante 48 horas. Pasado ese tiempo se midieron los diámetros de crecimiento del micelio con cada tratamiento y de los controles negativos. El diámetro de la colonia formada se midió a partir de imágenes escaneadas de cada caja con un programa de procesamiento de imágenes (Imagen J). El parámetro utilizado para determinar la actividad de los compuestos aislados es el porcentaje de inhibición del crecimiento, que se calcula comparando el diámetro de las colonias tratadas con las de control. Los resultados se calculan como CI₅₀, que corresponde a la concentración efectiva de un agonista que inhibe la mitad del crecimiento del patógeno, calculado con Statgraphics Software. La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se le determino a los compuestos que presentaron un porcentaje de inhibición mayor a 50 % a la máxima concentración evaluada. Algunos

compuestos que presentaron porcentajes de inhibición mayores a 60 % a la mínima concentración evaluada, fueron diluidos y ensayados de nuevo⁴⁰.

3.2.1.3 Actividad fungicida o fungistática

La actividad fungicida o fungistática se determinó después del ensayo de inhibición de crecimiento del micelio, con los compuestos que presentaron un porcentaje de inhibición del 100%. El ensayo se realizó transfiriendo un trozo del medio, obtenido del pozo donde se inoculó previamente el hongo con el compuesto a una caja de Petri con medio PDA estéril y se incubó en oscuridad a 28° C durante 48 y 72 horas, para observar los efectos fungicidas o fungistáticos⁴¹. Si el hongo vuelve a generar colonia se considera que el compuesto ensayado posee una actividad fungistática o, por lo contrario, no se observa ningún crecimiento de colonia, el compuesto es considerado fungicida.

3.2.1.4 Ensayo de inhibición de germinación y crecimiento (fitotoxicidad)

Para el estudio de fitotoxicidad se utilizaron semillas de las especies vegetales *Lactuca sativa* (lechuga Teresa® (Fito, España) y *Lolium perenne* (Un tipo de césped). Ambas semillas fueron seleccionadas por su capacidad germinativa y su rápido crecimiento de 24 y 72 horas respectivamente. Se estudió el posible efecto alelopático o fitotóxico de los compuestos naturales y sintetizados que presentan actividad antifúngica sobre la germinación de las semillas y la longitud radicular y foliar de *L. perenne*, y sobre la germinación y longitud radicular de *L. sativa*.

Este ensayo se realizó en cajas de 12 pozos. Se colocó discos de papel filtro Whatman nº 1, de 2,0 cm de diámetro en el fondo de cada pozo, previamente tratados con 10 µL de una solución de 5 mg/mL del compuesto en acetona como disolvente, para obtener una cantidad final del compuesto en el papel filtro de 50 µg/cm². En cada pozo se introdujeron 10 semillas y se humedecieron con 500 µL de agua. Las cajas se sellaron con parafilm y se colocaron en una cámara de cultivo a 25 °C, Humedad relativa >70% y periodos de luz 16 h y oscuridad 8 h, durante 7 días. Se realizaron 4 réplicas por muestra. Como control de crecimiento para el ensayo se dispusieron 100 semillas en una caja de 12 pozos sin ningún tratamiento⁴².

Cada 24 horas se cuentan la cantidad de semillas germinadas hasta completar los 7 días, empezando a las 72 horas para *L. perenne* y a las 24 horas para *L. sativa*. En el día 7, además de contar la germinación, a 25 plantas seleccionadas al azar de cada experimento, se les midió la longitud radicular (*L. sativa* y *L. perenne*) y foliar (*L. perenne*) que fueron procesadas en una hoja de papel para posterior digitalización y medición con un programa de procesamiento de imágenes (Imagen J)⁴³.

3.2.2 Estudio computacional.

3.2.1.1 Modelado molecular.

Los compuestos utilizados para la determinación del modelo farmacóforo fueron los compuestos que presentaron mejores valores de CI_{50} y menor efecto fitotóxico: **S3b**, **S4b**, **N10** y **S1f**. Debido a que el compuesto **S4b** es una mezcla racémica, se utilizaron las estructuras **S4bR** y **S4bS** para los isómeros R y S respectivamente. La optimización geométrica de estos ligandos se realizó mediante mecánica molecular utilizando el campo de fuerza MMFF y el semiempírico PM3, obteniendo la estructura en un mínimo de energía. Los cálculos fueron realizados con el programa Gaussian16⁴⁴, la geometría resultante se guardó en formato pdb.

3.2.1.2 Representación de los farmacóforos y creación de base de datos.

Las cinco estructuras optimizadas fueron visualizadas y alineadas en el programa Maestro⁴⁵ y se guardaron en formato .sdf. En el software de modelado del farmacóforo ZINCPharmer⁴⁶ se obtuvieron las representaciones y las características de cada farmacóforo directamente desde su estructura. Para cada modelo de farmacóforo se realizó un cribado virtual en la base de datos *ZINC Purchasable* utilizando los siguientes filtros: máximas conformaciones de Hits =1, Máximo Total Hits = 100; Máximo RMSD = 1, peso molecular entre 100 y 600 g/mol y de 1 a 4 enlaces rotables. Obteniendo una base de datos con 500 candidatos (*Hits*) con similares características de farmacóforo (100 Hits por cada estructura). Donde a menor valor de RMSD posee mayor similitud a las características de farmacóforo⁴⁷⁻⁴⁸. De cada grupo, se seleccionan las primeras 15 estructuras de menor valor de RMSD y se realizó una búsqueda de reportes de actividad antifúngica en las bases de datos ChEMBL y SciFinder, seleccionando 4 estructuras por grupo, que podrían presentar igual o mayor actividad antifúngica contra *F. oxysporum sp passiflorae*.

3.3 Resultados y discusión

Estudio de actividad antifúngica

3.3.1 Ensayo de inhibición de crecimiento del micelio.

La evaluación de la actividad antifúngica contra *F. oxysporum sp passiflorae* se realizó por el ensayo de inhibición de crecimiento del micelio para determinar el porcentaje de inhibición causado por una mezcla de esteroides y 7 compuestos obtenidos del estudio fitoquímico del extracto de inflorescencias, 42 compuestos sintéticos y Benomil® se usó como control positivo, evaluados a una concentración

de 500 g/mL (máxima concentración evaluada). En la gráfica 3-3 se presenta los porcentajes de inhibición obtenidos para 49 compuestos evaluados

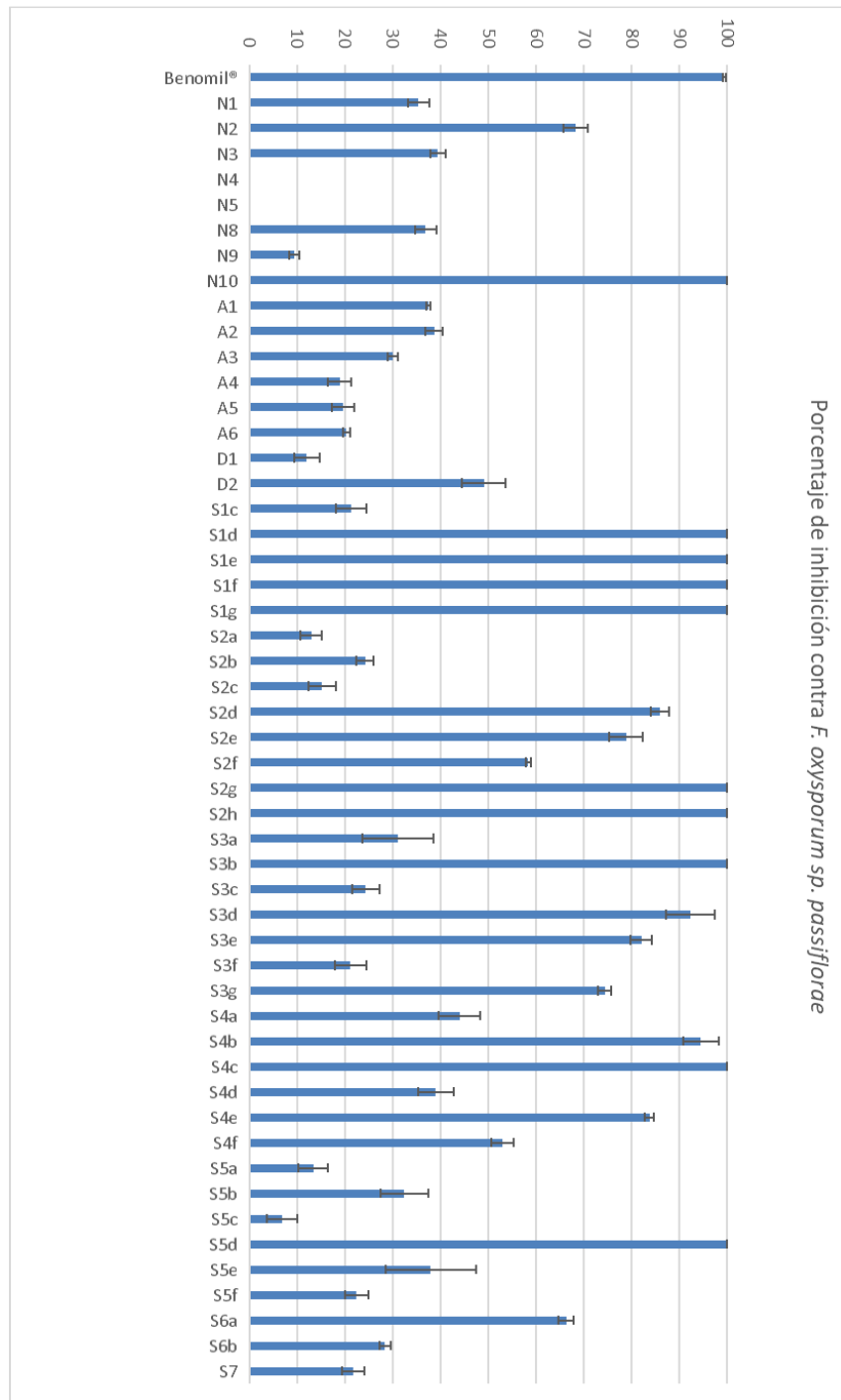


Figura 3-3 Resultados de porcentaje de inhibición de los compuestos evaluados contra *F. oxysporum sp. passiflorae*.

En la Figura 3-3 se observa que 17 de los 49 compuestos evaluados sobre *F. oxysporum sp. passiflorae*. presentaron un porcentaje de inhibición de crecimiento micelial superiores al 60% de los compuestos naturales y sintéticos, encontrándose que dos de los compuestos activos corresponden a metabolitos aislados del extracto de inflorescencias de *P. cumanense* (Ácido-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico (**N-10**) ($100 \pm 0,0$ %) y Ácido (2'Z) cuménico (**N2**) ($68,3 \pm 2,6$ %) y que los otros quince corresponden a compuestos sintéticos. En la Figura 3-4 se ilustran las estructuras de los compuestos que presentaron promisoría actividad antifúngica sobre el hongo de interés. Los compuestos **S1d**, **S1e**, **S1f**, **S1g**, **S2g**, **S2h**, **S3b**, y **S4c** presentaron 100 % de inhibición y los compuestos **S3g**, **S2e**, **S3e**, **S4e**, **S2d**, **S3d** y **S4b** con % desde $74,4 \pm 1,4$ hasta $94,5 \pm 3,7$ a la máxima concentración evaluada de 500 $\mu\text{g/mL}$.

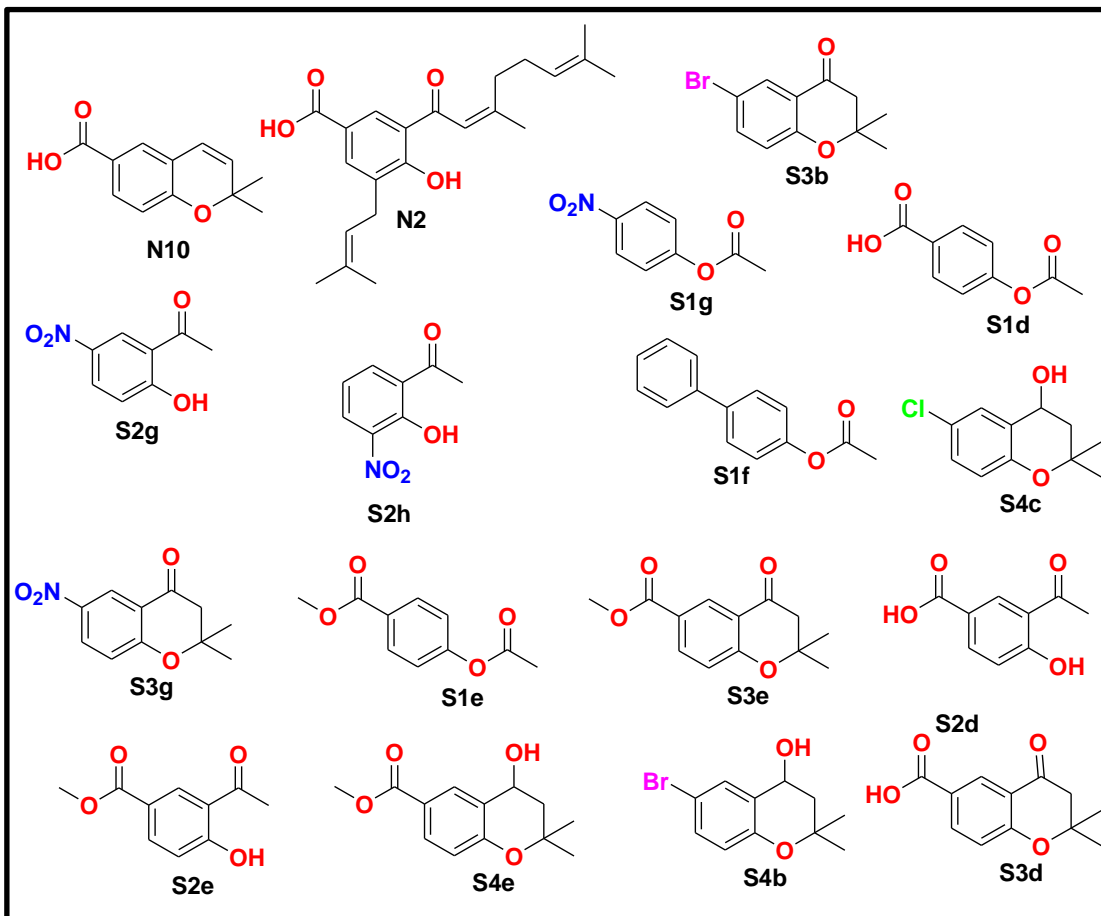


Figura 3-4 Estructuras de los compuestos que presentaron actividad antifúngica

A los compuestos promisorios se les determinó la CI_{50} expresada en $\mu\text{g/mL}$ y μM , resultados que se resumen en la Tabla 3-2, organizados de mayor a menor actividad antifúngica.

Tabla 3-1 Valores de CI_{50} expresados en $\mu\text{g/mL}$ y μM contra *F. oxysporum sp passiflorae* para los compuestos con mayor actividad antifúngica.

Compuesto	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ (LC* 95%)	CI_{50} μM (LC* 95%)
S2g	1,4 (0,4-2,7)	7,6 (1,3 - 9,4)
S2h	1,8 (1,0-2,1)	9,8 (3,4 - 11,2)
S3b	6,0 (2,6-16,2)	23,3 (9,1 - 35,8)
S4b	6,4 (4,3-9,5)	24,9 (14,9 - 36,8)
N10	7,2 (1,6-9,7)	35,3 (7,7 - 48,4)
N2	18,7 (10,0-34,9)	52,5 (28,1 - 68,2)
S1f	20,3 (14,9-27,7)	95,7 (51,3 - 98,4)
S1g	18,2 (15,3-25,6)	100,5 (52,7 - 108,3)
S4c	70,5 (51,7-96,1)	332,5 (178,1 - 353,3)
S3g	84,5 (58,3-122,5)	382,0 (200,7 - 422,0)
S1e	79,1 (54,5-91,5)	407,3 (387,6 - 515,1)
S3e	112,7 (80,4-157,9)	481,4 (277,0 - 574,6)
S3d	121,0 (79,1-184,5)	549,8 (272,5 - 838,2)
S2e	114,2 (82,2-158,7)	588,5 (523,1 - 646,6)
S4e	159,8 (89,9-199,8)	676,8 (309,7 - 688,0)
S2d	134,6 (113,3-185,4)	747,1 (390,3 - 786,7)
S1d	139,3 (78,4-247,5)	773,2 (270,1 - 852,5)
Benomil®	4,7 (1,8-10,0)	16,3 (6,2 - 34,4)

* Entre paréntesis se encuentra el rango de Límite de Confianza del 95%

El compuesto **N10**, Ácido-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico, fue el compuesto de origen natural que presentó la mayor actividad antifúngica, presentó 100 % de inhibición y la menor CI_{50} (7,2 $\mu\text{g/mL}$) contra *F. oxysporum sp passiflorae*. El compuesto **N10** presenta estudios previos donde se ha determinado la actividad antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* y *C. sphaerospermum* por el método de bioautografía directa, con un valor MIQ = 5,0 μg (cantidad mínima inhibitoria) presentando una actividad superior al control, los valores de MIQ se encuentran en el mismo orden de magnitud. (control positivo Nistatina y Miconazol)⁴⁹⁻⁵¹. El compuesto **N2** ácido (2'Z) cuménico, presenta una CI_{50} de 18,7 $\mu\text{g/mL}$, pero no hay reportes de estudios de actividad biológica para este compuesto. Este sería el primer reporte de actividad antifúngica contra *F. oxysporum sp passiflorae* para los compuestos naturales **N10** y **N2**.

De los compuestos sintetizados **S2g**, **S2h**, **S3b**, **S4b** y **S1f** presentan mejores valores de actividad comparable a la del control positivo ⁵². La concentración inhibitoria CI_{50} de los compuestos sintéticos presenta valores entre 1,4 y 139 $\mu\text{g/mL}$ y 7,6 y 773,2 μM .

Las acetofenonas **S2g** y **S2h**, la cromona **S3b** y cromanol **S4b** no presentan reportes sobre actividad biológica. Por el contrario, el compuesto **S1f**, presenta un reporte del año 1968, donde se determinó su actividad antifúngica contra *Cladosporium carpohillum*, *Fusarium oxysporum f. niveum*, *Piricularia*, *Diaporthe citri* y *Gloesporium laeticolor*, presentando efecto fungistático⁵³.

Como se ve en los antecedentes de los compuestos que presentaron mejor actividad antifúngica, no hay reportes contra el hongo fitopágeno *F. oxysporum.sp.passiflorae*, siendo este estudio el primer reporte de actividad antifúngica sobre este hongo para todas las sustancias ensayadas.

3.3.2 Relación preliminar de la estructura-actividad

Al comparar las diferentes estructuras de los análogos de crómenos y los resultados de la actividad antifúngica se busca establecer algunas relaciones estructura-actividad. Para realizar la comparación, se establece como núcleo básico el anillo benzopirano característicos los compuestos tipo derivados de ácido benzoico ciclicos (cromeno). Estos compuestos se caracterizan por poseer un grupo 2,2-dimetil en la posición 2, en la posición 4 un alqueno y en la posición 6 un grupo ácido carboxílico.

Después del análisis de los resultados se sugiere que posiblemente:

La presencia del grupo 2,2-dimetil en la posición (**R1**) es importante para que haya actividad, por ejemplo, en los compuestos A1–A6 no poseen este grupo y al determinar su actividad antifúngica presentaron porcentajes de inhibición menores de 25%.

Los sustituyentes de tipo carbonilo, alcohol o alqueno en (**R2**) presentan un comportamiento influenciado según el sustituyente ubicado en la posición (**R3**). Por ejemplo, la cromona (**S3a**) tiene **R3**= H no presenta actividad antifúngica. Mientras que otra cromona bromada en **R3** (**S3b**) presenta una CI_{50} de 6 (5-16 $\mu\text{g/mL}$).

Los análogos que presentan en (**R3**) un grupo ácido carboxílico o bromo presentan actividad antifúngica. Esta mejora si en **R2** es un alqueno para **R3** = ácido carboxílico y carbonilo o alcohol para **R3**= bromo. Los demás sustituyentes utilizados en **R3** presentan porcentajes de inhibición menores de 40%.

En la Figura 3,5 se resume las posible relaciones estructura-actividad de los compuestos análogos de derivados de ácido benzoico contra *F. oxysporum.sp.passiflorae*.

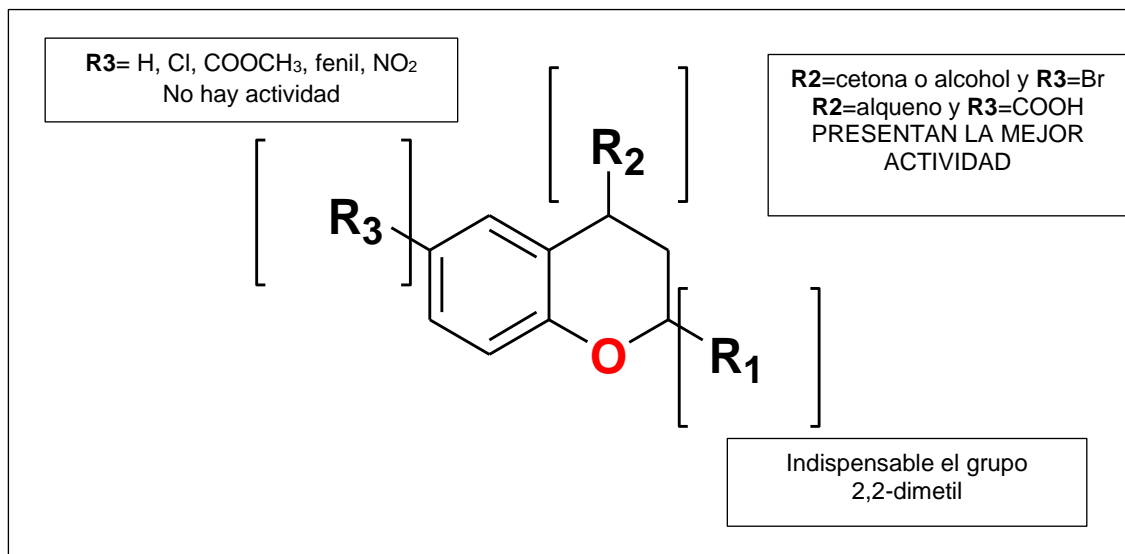


Figura 3-5 Relación preliminar estructura-actividad antifúngica de cromenos

La determinación de la actividad antifúngica de estas sustancias naturales y sintéticas contribuyen al conocimiento a las propiedades biológicas de las muestras evaluadas y los compuestos activos son promisorios para continuar con ensayos de actividad antifúngica más específicos y de otros tipos, como ensayos de fitotoxicidad, en campo, que permitan obtener resultados más completos. También evidencia el potencial como futuros agentes fitosanitarios y/o que sirvan como compuestos plantillas para la búsqueda de pesticidas ambientalmente amigables y efectivos para combatir las enfermedades que causa *F. oxysporum.sp.passiflorae*.

3.3.3 Actividad fungicida o fungistática

Este ensayo determinó la actividad fungicida o fungistática de los compuestos que presentaron 100 % de inhibición a una concentración de 500 µg/mL, se probaron los compuestos, **S1d, S1e, S1f, S1g, S2g, N10, S2h, S4b y S4c**. Pasadas 72 horas se leyeron los resultados del ensayo. Los resultados mostraron que el compuesto **N10** no presentó crecimiento de colonias, indicando que el compuesto **N10** posee una actividad fungicida, mientras los demás compuestos presentan una actividad fungistática⁵⁴. En la Figura 3-6 se observan las cajas de Petri utilizadas en el ensayo para los compuestos. En cada caja se evaluó 2 compuestos (uno arriba el otro abajo con una réplica a la derecha enumeradas del 1 hay 9 para los compuestos **S1d, S1e, S1f, S1g, S2g, N10, S2h, S4b y S4c**, respectivamente) el control negativo quedo ubicado en la última caja abajo con el número 10. Se observa en las cajas Petri que hay nuevamente crecimiento de micelio tratamientos **S1d, S1e, S1f, S1g, S2g, S2h, S4b, S4c** y en el control negativo.

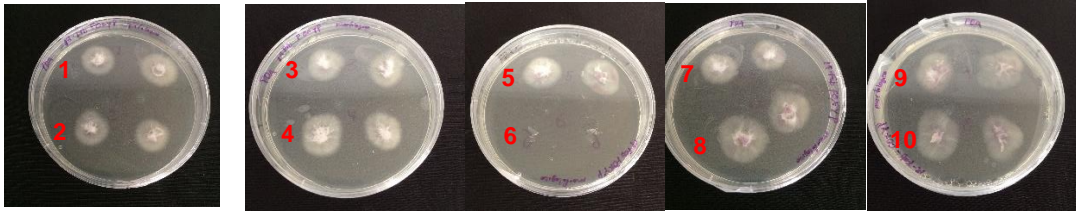


Figura 3-6 Ensayo fungicida y fungistática para los compuestos 1*=**S1d**, 2*=**S1e**, 3*=**S1f**, 4*=**S1g**, 5*=**S2g**, 6*=**N10**, 7*=**S2h**, 8*=**S4b** y 9*=**S4c**. *= ubicación en las cajas Petri utilizadas en el ensayo, 10= control negativo.

3.3.4 Ensayo de fitotoxicidad.

Se estudió el posible efecto alelopático o fitotóxico de los compuestos que presentaron actividad antifúngica contra *F. oxysporum.sp.passiflorae* sobre la germinación de las semillas y la longitud radicular y foliar de *Lolium perenne*, y sobre la germinación y longitud radicular de *Lactuca sativa*. En la Figura 3-4 se muestran los resultados del efecto que generan los compuestos sobre germinación de las semillas de *L. perenne* y *L. sativa*. Donde, en el control negativo se obtuvo un $99,4 \pm 1,6\%$ de germinación, los valores negativos significan que produce un efecto negativo de germinación.

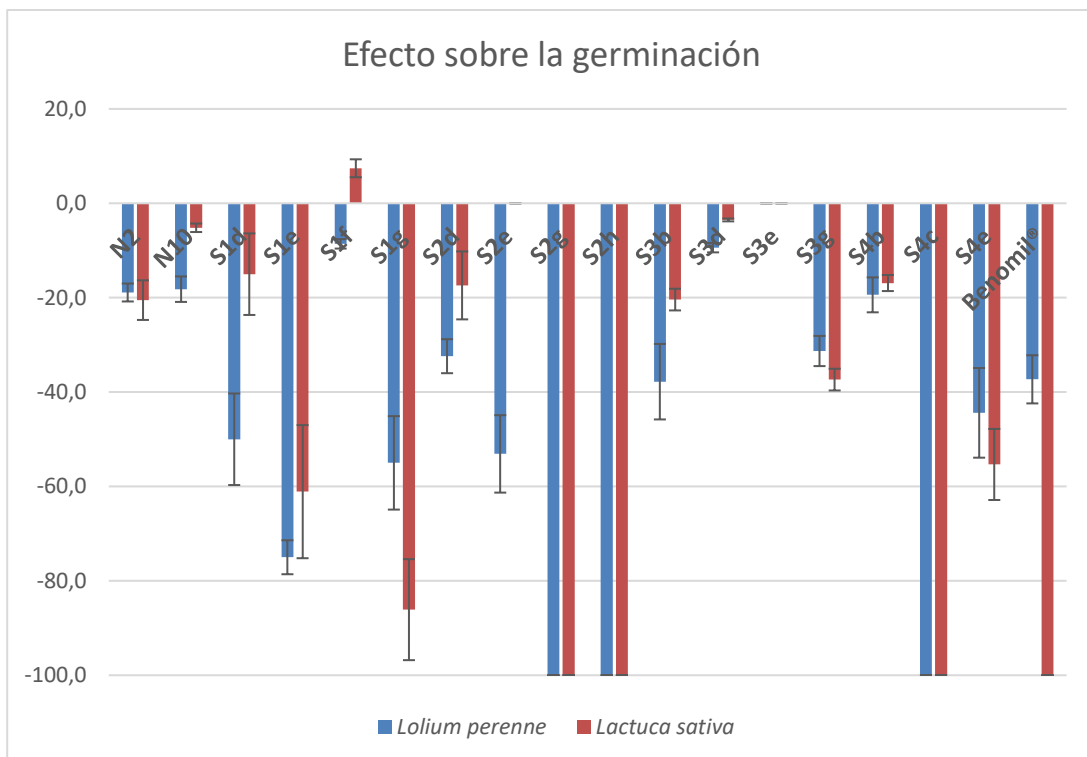


Figura 3-7 Efecto de los compuestos activos frente la germinación de semillas de *L. perenne* y *L. sativa*

El efecto que también se observó fue el que crecimiento radicular y/o foliar de las semillas de *L. perenne* y *L. sativa*, el valor del control negativo es 0, con el que se hace la comparación de las sustancias, donde, los valores negativos significan que produce un efecto negativo de germinación y crecimiento respecto al control negativo y los valores positivos, un efecto que favorece la germinación y/o crecimiento. En el Anexo 3-2 se muestra el resultado del efecto en la germinación de semillas de *L. perenne* y *L. sativa* a las 168 h ⁴³.

Tabla 3-2 Efecto fitotóxico de las sustancias evaluadas

Compuesto (50 µg/cm ²)	<i>Lolium perenne</i>		<i>Lactuca sativa</i>
	Crecimiento (%C)		Crecimiento (%C)
	Radicular	Foliar	Radicular
Benomil®	-82,1 ± 5,7	-90,9 ± 8,8	0,0 ± 0,0
N2	-38,2 ± 6,9	-31,7 ± 5,2	-44,9 ± 0,3
N10	24,4 ± 2,1	6,5 ± 0,9	-3,8 ± 1,7
S1d	-26,7 ± 6,0	-18,2 ± 2,7	-27,0 ± 7,0
S1e	-50,0 ± 9,0	-45,5 ± 7,4	-65,4 ± 9,7
S1f	22,4 ± 4,0	-8,5 ± 0,9	9,0 ± 1,3
S1g	-20,0 ± 1,3	-51,2 ± 1,9	-73,6 ± 8,2
S2d	-25,7 ± 3,2	-26,7 ± 3,9	4,0 ± 2,5
S2e	-100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-37,4 ± 2,3
S2g	-100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
S2h	-100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
S3b	-18,9 ± 1,9	-38,2 ± 6,9	-9,7 ± 1,7
S3d	-22,6 ± 2,8	-11,3 ± 1,5	4,8 ± 0,3
S3e	-18,4 ± 2,1	-30,9 ± 3,6	4,9 ± 0,3
S3g	-42,2 ± 7,9	-37,4 ± 8,2	-40,0 ± 9,3
S4b	-21,9 ± 4,1	-36,1 ± 5,4	-23,4 ± 0,6
S4c	-100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
S4e	-16,2 ± 1,8	-28,6 ± 3,3	-31,5 ± 13,5

El efecto fitotóxico de las sustancias evaluadas presenta unos efectos muy variados en germinación y crecimiento, por esta razón se analizaron los efectos de las sustancias que presentaron los mejores valores de CI₅₀ en el ensayo de inhibición de crecimiento de micelio. En la Figura 3-11 se muestra los efectos generados por las sustancias más activas en la germinación y crecimiento de semillas de *L. perenne* y *L. sativa*.

Los compuestos **S2g** y **S2h** presentan los mejores valores de actividad antifúngica, pero sus efectos sobre las germinación y crecimiento son altos, ya que inhibe la germinación en un 100 % de las semillas de *L. perenne* y *L. sativa*, por ende, no hay

crecimiento de radicular y foliar. Estos compuestos poseen un grupo nitro, que posiblemente es el responsable de su elevada toxicidad en este ensayo, hay antecedentes que los compuestos aromáticos con grupo nitro son tóxicos, por ejemplo, en el medio ambiente, exhiben una toxicidad excesiva para el pez cebrá y pueden clasificarse como compuestos reactivos⁵⁵, generan afectaciones en la salud humana, generando hepatotoxicidad, efectos hematológicos, actividad mutagénica y genotóxica, entre otros trastornos⁵⁶⁻⁵⁸. El compuesto **S1g** también presenta un efecto alto, inhibe en un 86,1 % la germinación y crecimiento de *L. sativa* y de un poco menor la germinación y crecimiento de *L. perenne*, el compuesto **S1g** presenta un grupo nitro, el cual sería responsable de dichos efectos.

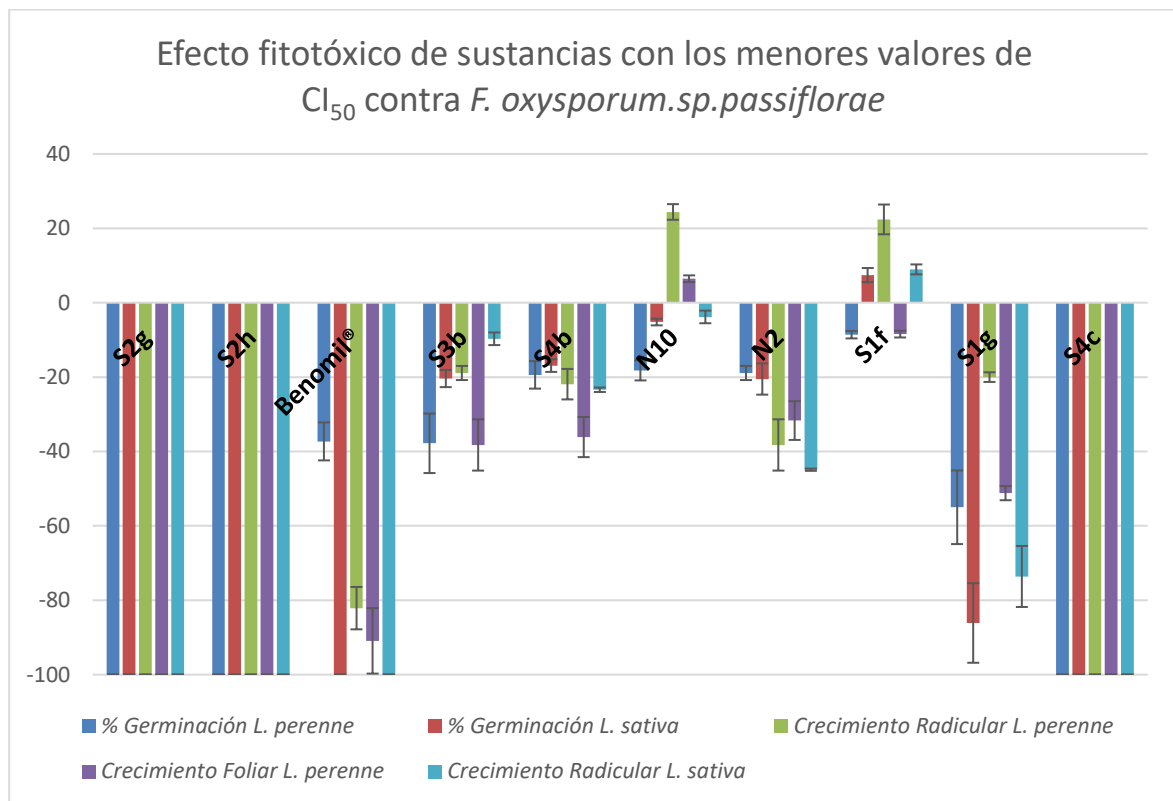


Figura 3-8 Efecto fitotóxico de los compuestos más activos contra *F. oxysporum.sp.passiflorae*.

El compuesto **S4c**, un cromanol clorado al igual que los compuestos nitro, presenta efectos altos, fue capaz de inhibir en un 100 % la germinación de las semillas de las dos especies. Los compuestos clorados generalmente son utilizados como pesticidas sintéticos y presentan problemas asociados a estos, como es su alta toxicidad⁵⁹⁻⁶⁰.

Los compuestos **S2g**, **S2h** y **S4c** presentan efectos más tóxicos, que los que presenta el control positivo Benomil® utilizado generalmente en los cultivos de gulupa. El fungicida Benomil® presenta efectos sobre la germinación y crecimiento altos, inhibe la germinación del *L. perenne* alrededor del 40 y 100 % para *L. sativa* y

afecta considerablemente el crecimiento de radicular y foliar en *L. perenne*. Adicionalmente a este estudio el fungicida Benomil® presenta otros estudios toxicológicos en mamíferos de laboratorio indican que el Benomil® causa toxicidad hepática, efectos reproductivos y anomalías cromosómicas^{39, 61-63}.

El efecto sobre la germinación del compuesto **S3b** es $37,8 \pm 8,0$ % para *L. perenne* similar al control positivo, pero para *L. sativa* es de $-20,4 \pm 2,3$ mucho menor que este control, los efectos sobre el crecimiento radicular y foliar reducen la longitud de crecimiento respecto al control, pero no es significativo.

Los compuestos **N10** y **S1f** presentan los efectos menos significativos respecto al control, presentan porcentajes de inhibición bajos, permitiendo la germinación de alrededor del 85 % de las semillas y sus efectos en el crecimiento radicular y foliar son de valores positivos, favoreciendo el crecimiento de la radícula de *L. perenne*.

La determinación de la fitotoxicidad de estas sustancias nos muestra que las acetofenonas **S2g** y **S2h** que poseen grupos nitro en el anillo aromático y el compuesto benzopirano clorado **S4c** presentan la mayor toxicidad, seguido del control positivo. Los compuestos naturales presentan los menores efectos tóxicos respecto a los sintéticos.

Después de analizar los datos se seleccionaron los compuestos que poseen la mejor actividad, los mejores CI_{50} y los menores efectos tóxicos, los compuestos seleccionados son **S3b**, **S4b**, **N10** y **S1f**, con estos compuestos se realizó el estudio computacional.

Estudio de computacional

El estudio computacional se realizó basado en ligando, realizó un estudio basado en farmacóforos, utilizando los compuestos **S3b**, **S4b** = (**S4bR**, **S4bS**), **N10** y **S1f** para predecir compuestos que puedan presentar mayor actividad antifúngica.

3.3.4.1 Modelado molecular de los compuestos.

Las estructuras de los compuestos seleccionados por la parte experimental se optimizaron con el software Gaussian 16 y visualizadas en el programa Free Maestro. En la Tabla 3-3 se muestran las estructuras en 2D y 3D.

Tabla 3-3 Estructuras en 2D y en 3D.

Ligando	MarvinSketon	Free Maestro
S3b		
S4bR		
S4bS		
N10		
S1f		

3.3.4.2 Representación de los farmacóforos y creación de base de datos.

Las estructuras fueron enviadas a la plataforma Zincpharmer online en formato. json, donde fueron representadas los farmacóforos para cada una de las estructuras. En la Figura 3-9 se muestran las representaciones de los modelos farmacofóricos.

En la Tabla 3-4 se indican las características farmacofóricas en diferentes colores mostradas en la Figura 3-9. Los cinco farmacóforos presentan en común la característica hidrofóbica, en color verde, debido que presentan el grupo 2,2-dimetil y en **S1f** un metil; en color amarillo la característica de aceptor de hidrógenos, por la presencia del átomo de oxígeno formando enlace éter entre la zona hidrofóbica y la

zona aromática, la zona aromática en color morado. Para los farmacóforos de **S4bR** y **S4bS** por poseer el grupo hidroxilo presentan la característica de donador de hidrogeno y en **S5d** se evidencia la presencia dos zonas de carácter aniónico y aceptor de hidrogeno debido al grupo carboxílico presente en su estructura ⁶⁴.

Tabla 3-4 Características de los farmacóforos

Color	Clase de farmacóforo
Verde	Hidrofóbico
Morado	Aromático
Amarillo	Aceptor de hidrogeno
Blanco	Donador de hidrogeno
Rojo	Anión

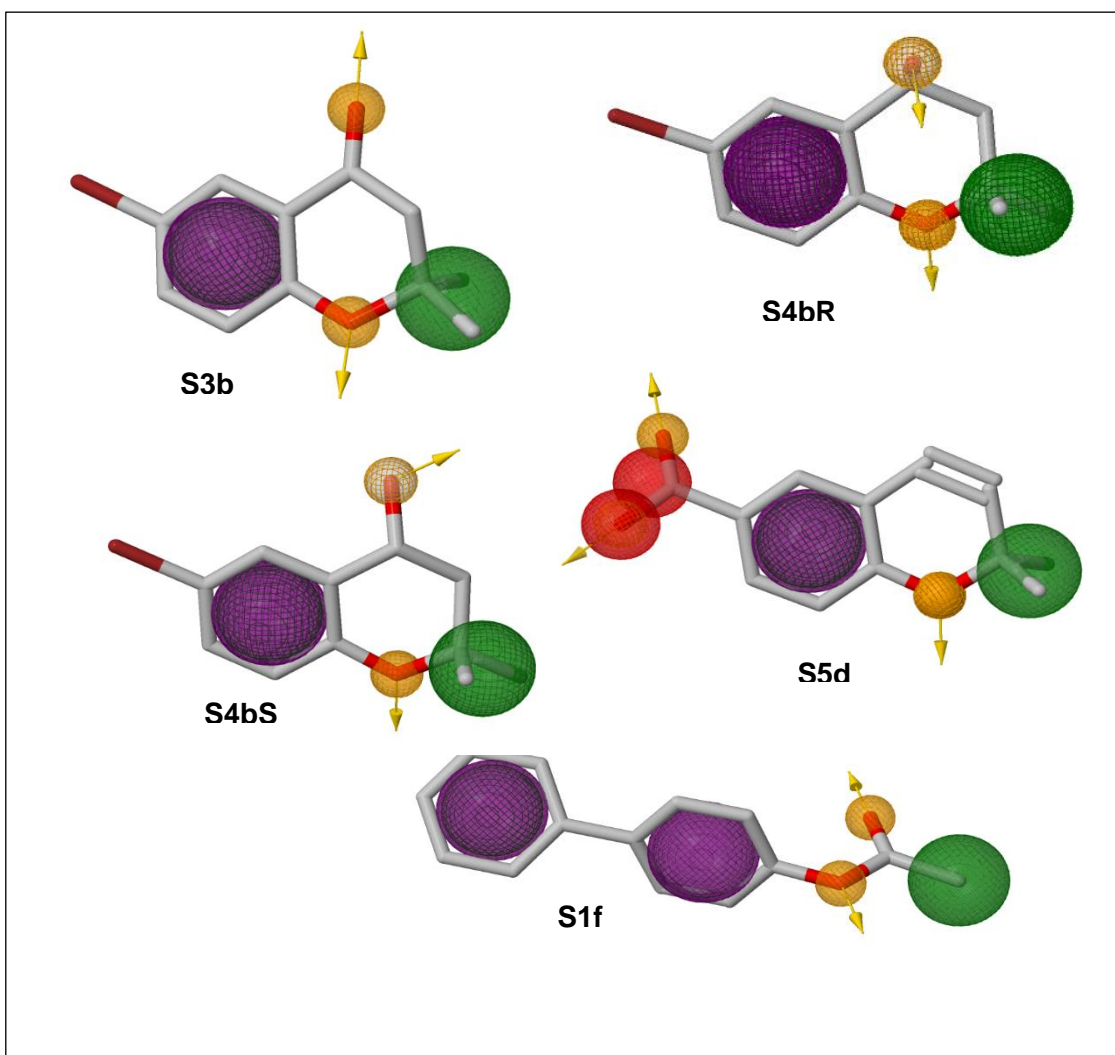


Figura 3-9 Representación de los modelos farmacofóricos.

3.3.4.3 Obtención de la base de datos de farmacóforos similares

Ya establecidas las características de cada uno los farmacóforos se realizó un cribado virtual en la base de datos de ZINCPharmer, obteniendo 100 estructuras de compuestos con características farmacofóricas similares para cada farmacóforo, en total 500 Hits, estos fueron clasificados de menor a mayor RMSD (desviación cuadrática media) y se seleccionaron los 15 primeros compuestos (Hits), en la Tabla 3-5 se muestran los resultados de este tamizaje.

Tabla 3-5 Compuestos seleccionados para cada farmacóforo, según los reportes de actividad antifúngica, menor valor de RMSD y similitud estructural.

S1f		Reportes		Actividad biológica	Bibliografía
Código Zinc	RMSD	ChEmBL	SciFinder		
ZINC02562325	0,132	X	X		
ZINC04666346	0,168	X	X		
ZINC26892884	0,182	X	SI	Antifúngica <i>Botritis cinerea</i>	65
ZINC00809956	0,216	X	X		
ZINC01690479	0,248	X	X		
ZINC00080897	0,344	X	X		
ZINC01621393	0,353	X	SI	Antifúngica <i>Aspergillus niger</i>	53
ZINC01586635	0,354	X	SI	Antifúngica <i>Aspergillus niger</i>	53
ZINC03071609	0,358	X	X		
ZINC80412701	0,368	X	X		
ZINC79415000	0,378	X	SI	Antifúngica <i>Candida albicans</i>	66
ZINC35323903	0,39	X	X		
ZINC07062497	0,416	X	X		
ZINC12534192	0,417	X	X		
ZINC32426977	0,419	X	X		

S3b		Reportes		Actividad biológica	Bibliografía
Código Zinc	RMSD	ChEmBL	SciFinder		
ZINC09318839	0,364	X	X		
ZINC72334235	0,369	X	X		
ZINC19589703	0,376	X	X		
ZINC12904132	0,379	X	SI		
ZINC40584467	0,387	X	SI	Antifúngica <i>F. oxysporum, Rhizoctonia solani</i>	67
ZINC85789010	0,403	X	X		
ZINC33385068	0,403	X	SI	Antifúngica <i>Candida albicans</i>	68
ZINC72204263	0,405	X	SI		
ZINC74192554	0,406	X	X		
ZINC54397724	0,406	X	X		
ZINC00114133	0,408	SI	SI	Antifúngica <i>Candida albicans; F oxysporum</i>	69-70
ZINC84598464	0,413	X	SI		
ZINC06650995	0,414	X	X		

Continuación Tabla 3-5

ZINC59488098	0,416	X	X	
ZINC40803023	0,416	X	X	
S4bR		Reportes		Observaciones
Código Zinc	RMSD	ChEmBL	SciFinder	
ZINC00161264	0,054	X	X	Menor valor de RMSD
ZINC38867734	0,064	X	X	
ZINC90075521	0,171	X	X	
ZINC89857752	0,171	X	X	Similitud estructural
ZINC93082412	0,171	X	X	
ZINC89620228	0,171	X	X	Similitud estructural
ZINC90116676	0,171	X	X	
ZINC90526602	0,171	X	X	
ZINC90075522	0,172	X	X	Presente en el grupo de S4bS
ZINC90649854	0,172	X	X	
ZINC90453000	0,172	X	X	
ZINC89682845	0,172	X	X	
ZINC90018957	0,172	X	X	
ZINC89621750	0,172	X	X	
ZINC90116675	0,172	X	X	
S4bS		Reportes		Observaciones
Código Zinc	RMSD	ChEmBL	SciFinder	
ZINC90649843	0,216	X	X	Menor valor de RMSD
ZINC95422408	0,216	X	X	
ZINC90074692	0,22	X	X	Presente en el grupo de S4bR
ZINC90649852	0,221	X	X	
ZINC63883109	0,235	X	X	
ZINC03124403	0,282	X	X	Similitud estructural
ZINC75629529	0,283	X	X	
ZINC00402546	0,289	X	X	
ZINC20355743	0,289	X	X	
ZINC89620228	0,315	X	X	Presente en el grupo de S4bR
ZINC90075522	0,318	X	X	
ZINC05918518	0,322	X	X	
ZINC00203125	0,325	X	X	
ZINC00374743	0,348	X	X	
ZINC93396767	0,356	X	X	
S5d		Reportes		Observaciones
Código Zinc	RMSD	ChEmBL	SciFinder	
ZINC87333928	0,058	X	X	Menor valor de RMSD
ZINC38530036	0,147	X	X	
ZINC39951884	0,161	X	X	Similitud estructural
ZINC47203227	0,199	X	X	
ZINC19256081	0,205	X	X	Similitud estructural
ZINC70582532	0,218	X	X	Similitud estructural
ZINC94348625	0,219	X	X	
ZINC71261593	0,238	X	x	
ZINC39951906	0,24	X	X	

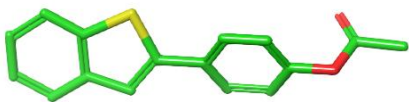
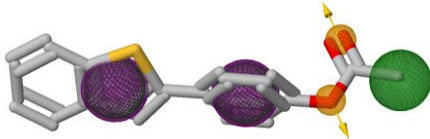
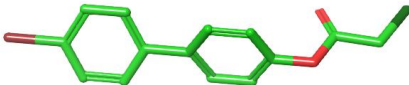
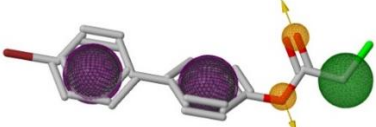
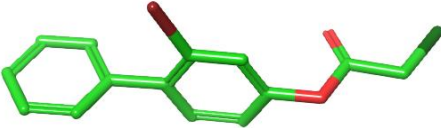
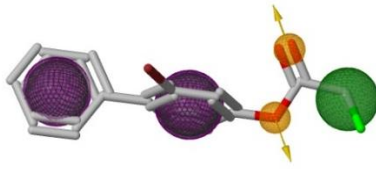
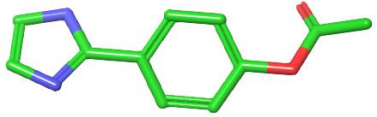
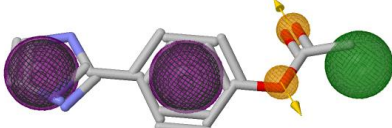
Continuación Tabla 3-5

ZINC67244887	0,247	X	X
ZINC67244890	0,247	X	X
ZINC61848611	0,268	X	X
ZINC94348714	0,269	X	X
ZINC86792529	0,27	X	X
ZINC94214002	0,271	X	X


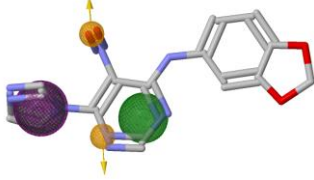
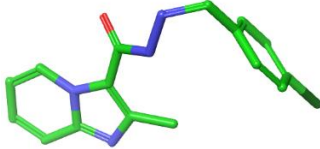
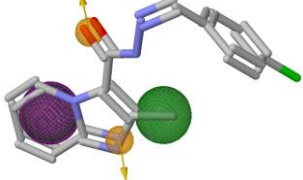

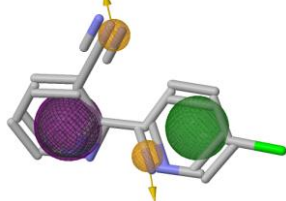
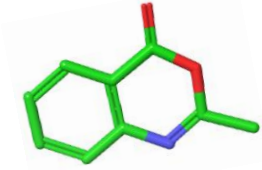
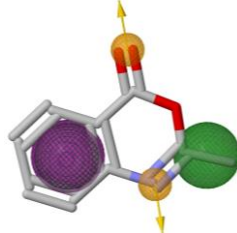
3.3.4.4 Tamizaje en la selección de los farmacóforos.

Después de obtener 15 estructuras seleccionados por cada farmacóforo, se analizaron la similitud estructural y reportes bibliográficos para seleccionar cuatro estructuras de compuestos que probablemente presenten actividad antifúngica contra *F. oxysporum.sp.passiflorae*. En la Tabla 3-6 se muestran las estructuras de estos compuestos, candidatos a futuros ensayos para verificar la actividad biológica antifúngica.

Tabla 3-6 Resultados del tamizaje de los cinco farmacóforo, donde se muestra la estructura en 3D y su estructura obtenida por ZincPharmer mosrando las características de farmacorofo.

S1f	Free Maestro	ZincPharmer
	2-(4-Acetoxifenil) benzotiofeno	
1		
	Ácido 2-cloroacetico-[4-(4-bromofenil) fenil]-ester	
2		
	Ácido 2-cloroacetico -[4-(3-bromo-4-fenil) fenil]-ester	
3		
	Ácido acético 4-(1H-imidazol-2-il)-fenil ester	
4		

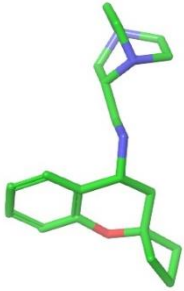
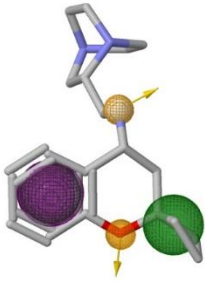
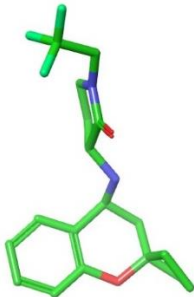
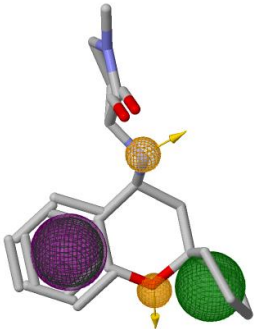
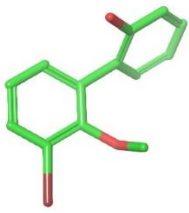
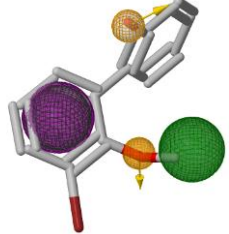
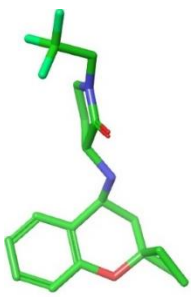
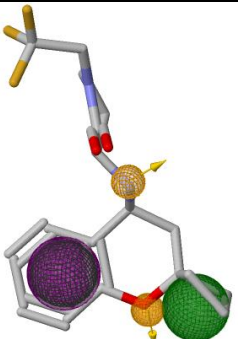
Continuación Tabla 3-6

S3b	Free Maestro	ZincPharmer
1	<p data-bbox="500 331 1187 352">N-(1,3-benzodioxol-5-il)-6-imidazol-1-il-5-nitro-pirimidina-4-amina</p> 	
2	<p data-bbox="467 569 1219 590">N'3-(4-clorobenzilidene)-2-metilimidazol[1,2-a]piridina-3-carbohidrazida</p> 	
3	<p data-bbox="686 800 1000 821">3-ciano-5'-cloro-2,2'-bipiridina</p> 	
4	<p data-bbox="654 1052 1032 1073">2-metil-4H-3,1-benzoxazina-4-ona</p> 	

Continuación Tabla 3-6

S4bR	Free Maestro	ZincPharmer
1		
(7R,8aR)-N-[(4S)-espiro[cromano-2,1'-ciclobutano]-4-il]-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidroindolizina-7-amina		
2		
(3R)-3-[[[(4S)-epiro[cromano-2,1'-ciclobutano]-4-il]amino]-1-(2,2,2-trifluoroetil)pirrolidina-2-ona		
3		
(3R)-1-metil-3-[[[(4S)-epiro[cromano-2,1'-ciclobutano]-4-il]amino]pirrolidina-2-ona		
4		

Continuación Tabla 3-6

S4bS	Free Maestro	ZincPharmer
1	<p>(4R)-N-[[[(3R)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-3-il]metil]espiro[cromano-2,1'-ciclobutano]-4-amina</p> 	
2	<p>(3R)-1-metil-3-[[[(4S)-espiro[cromano-2,1'-ciclopentano]-4-il]amino]pirrolidina-2-ona</p> 	
3	<p>2-(3-bromo-2-metoxi-fenil)fenol</p> 	
4	<p>(3R)-3-[[[(4S)-espiro[cromano-2,1'-ciclobutano]-4-il]amino]-1-(2,2,2-trifluoroetil)pirrolidina-2-ona</p> 	

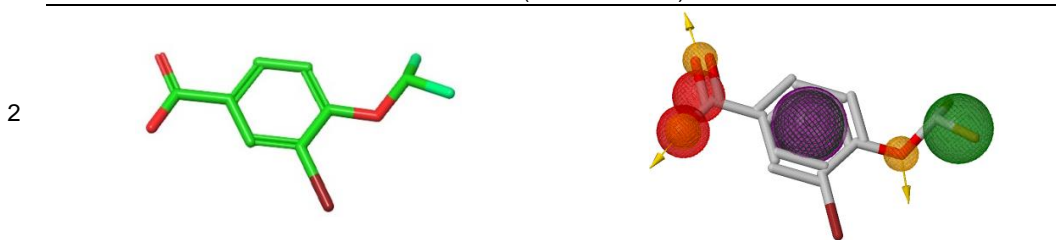
Continuación Tabla 3-6

S5d	Free Maestro	ZincPharmer
-----	--------------	-------------

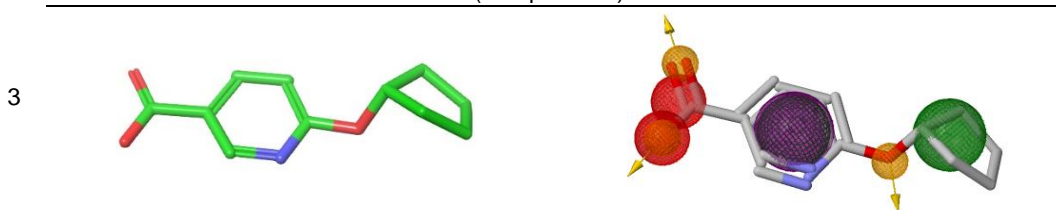
Acido-2-bromo-4-etoxi-benzoico



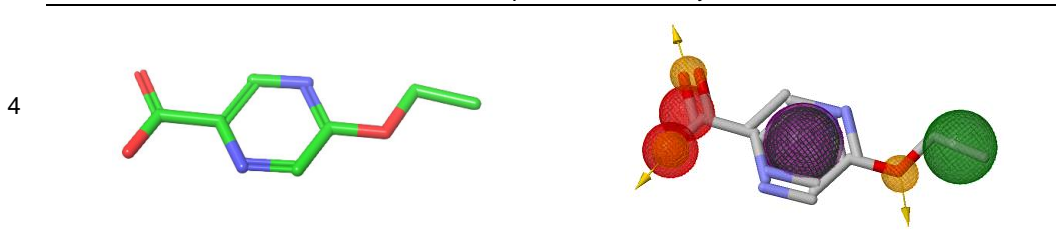
Acido-3-bromo-4-(difluorometoxi)benzoico



Acido-6-(ciclopentiloxi) nicotínico



Acido-5-etoxipirazina-2-carboxílico



Se debe tener en cuenta que de las estructuras hay unas poseen grupos voluminosos que podrían afectar la interacción del ligando con el sitio activo de la diana ⁷¹, que las estructuras muy pequeñas pueden presentar afinidad con diversas dianas, por estas razones se debe validar el modelo, verificando la actividad de los compuestos candidatos por medio de ensayos experimentales.

3.4 Conclusiones

La determinación de la actividad antifúngica contra *F. oxysporum f.sp.passiflorae* de 49 compuestos naturales y sintéticos, son un aporte en las investigaciones en la búsqueda de sustancias con propiedades antifúngicas, siendo el primer reporte de las propiedades biológica para la mayoría de las sustancias, en esta investigación se concluye:

- De los compuestos aislados de extracto de inflorescencias se encontró que los compuestos **N10** y **N2** presentaron la mejor actividad antifúngica con los mejores valores de CI_{50} 35,3 y 52,5 μ M respectivamente, contra el hongo fitopágeno. Adicionalmente el compuesto **N10** es el único compuesto que presenta actividad fungicida, también presenta efectos tóxicos bajos en el ensayo de germinación de semillas de *L. perenne* y *L. sativa*, haciéndolo un compuesto interesante para la optimización en la búsqueda de agentes fitosanitarios.
- De los 42 compuestos sintéticos, 18 compuestos lograron inhibir el crecimiento del hongo fitopágeno en un rango de 78,8 al 100%. Pero ningún compuesto sintético presentó actividad fungicida, todos poseen una actividad fungistática. Los compuestos **S2g**, **S2h**, **S3b**, **S4b** y **S1f** poseen las menores CI_{50} de 7,6; 9,8; 23,4; 24,9 y 95,7 μ M respectivamente.
- Del análisis preliminar de la relación de estructura-actividad de los compuestos tipo cromenos, se evidencia que la actividad antifúngica contra el hongo de estudio puede variar según posiciones y tipos de grupos funcionales. Observándose que la ausencia del grupo 2,2-dimetil genera la perdida de la actividad. La presencia de grupos carbonilo o hidroxilo puede aumentar la actividad, pero influye el sustituyente en la posición 6, por ejemplo, cuando está presente un átomo de bromo es favorable la actividad, mientras con otros sustituyentes ensayados la actividad es casi nula. Cuando los compuestos poseen grupo ácido carboxílico en posición 6 y alqueno, presenta una mejor actividad, pero si en vez de un alqueno hay una cetona o alcohol disminuye la actividad.
- En el estudio computacional realizado se obtuvieron 500 resultados de estructuras con similares características farmacofóricas, de las cuales al final del tamizaje realizado teniendo en cuenta bibliografía y menor valor de RMSD se postularon 4 estructuras por cada farmacóforo utilizado, estos compuestos posiblemente pueden presentar actividad antifúngica contra *F. oxysporum f.sp.passiflorae*.

3.5 Anexos actividad antifúngica

Resultados de porcentaje de inhibición y valores de CI_{50} contra *F. oxysporum sp passiflorae* para compuestos evaluados.

Sustanci a	% Inhibición a	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ ^b	Sustancia	% Inhibición ^a	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ ^b
Benomil [®]	99,4 ± 0,3	4,7 (1,8-10,0)	S2e	78,8 ± 3,5	114,2 (82,2-158,7)
N1	35,4 ± 2,3		S2f	58,3 ± 0,5	127,7 (109,4-192,6)
N2	68,3 ± 2,6	18,7 (10,0-34,9)	S2g	100,0 ± 0,0	1,4 (0,4-2,7)
N3	39,4 ± 1,5		S2h	100,0 ± 0,0	1,8 (1,0-2,1)
N4	0,0 ± 0,0		S3a	31,0 ± 7,4	
N5	0,0 ± 0,0		S3b	100,0 ± 0,0	6,0 (2,6-16,2)
N8	36,9 ± 2,1		S3c	24,3 ± 2,9	
N9	9,4 ± 1,0		S3d	92,3 ± 5,0	120,8 (79,1-184,5)
N10	100,0 ± 0,0	7,2 (1,6-9,7)	S3e	82,0 ± 2,2	112,7 (80,4-157,9)
A1	37,4 ± 0,5		S3f	21,1 ± 3,3	
A2	38,6 ± 1,8		S3g	74,4 ± 1,4	84,5 (58,3-122,5)
A3	30,1 ± 1,1		S4a	43,9 ± 4,3	
A4	18,8 ± 2,5		S4b	94,5 ± 3,7	6,4 (4,3-9,5)
A5	19,6 ± 2,3		S4c	100,0 ± 0,0	70,5 (51,7-96,1)
A6	20,3 ± 0,8		S4d	39,0 ± 3,8	
D1	12,0 ± 2,7		S4e	83,8 ± 1,0	159,8 (89,9-199,8)
D2	49,0 ± 4,6		S4f	53,0 ± 2,3	126,1 (117,7-216,8)
S1c	21,2 ± 3,2		S5a	13,3 ± 3,1	
S1d	100,0 ± 0,0	139,3 (78,4-247,5)	S5b	32,4 ± 5,0	
S1e	100,0 ± 0,0	79,1 (54,5-91,5)	S5c	6,8 ± 3,2	
S1f	100,0 ± 0,0	20,3 (14,9-27,7)	S5d	100,0 ± 0,0	7,2 (1,6-9,7)
S1g	100,0 ± 0,0	18,2 (15,3-25,6)	S5e	38,0 ± 9,5	
S2a	12,9 ± 2,2		S5f	22,4 ± 2,5	
S2b	24,2 ± 1,8		S6a	66,3 ± 1,6	187,7 (130,5-216,8)
S2c	15,2 ± 2,8		S6b	28,3 ± 1,1	
S2d	86,0 ± 1,9	134,6 (113,3-185,4)	S7	21,7 ± 2,4	

a=La concentración máxima probada fue de 0,50 mg/ml. El dato se representa como Media ± error estándar (n = 4).

b= Los datos se presentan como valores de CI_{50} con los intervalos de confianza del 95% obtenidos por regresión no lineal (n = 4 para cada concentración). Control positivo utilizado Benomil[®].

3.6 Bibliografía

1. Horbach, R.; Navarro-Quesada, A. R.; Knogge, W.; Deising, H. B., When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* **2011**, *168* (1), 51-62.
2. Sperschneider, J.; Gardiner, D. M.; Thatcher, L. F.; Lyons, R.; Singh, K. B.; Manners, J. M.; Taylor, J. M., Genome-Wide analysis in three *Fusarium* pathogens identifies rapidly evolving chromosomes and genes associated with pathogenicity. *Genome Biology and Evolution* **2015**, *7* (6), 1613-1627.
3. Leslie, J. F.; Summerell, B. A., *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons: **2008**.
4. Rana, A.; Sahgal, M.; N. Johri, B., *Fusarium oxysporum: Genomics, Diversity and Plant-Host Interaction*. **2017**; p 159-199.
5. Lima, L. K. S.; Jesus, O. N. d.; Soares, T. L.; Oliveira, S. A. S. d.; Haddad, F.; Girardi, E. A., Water deficit increases the susceptibility of yellow passion fruit seedlings to *Fusarium* wilt in controlled conditions. *Scientia Horticulturae* **2019**, *243*, 609-621.
6. Ali, A.; Junda, M.; Rante, H.; Nuramelia, R., Characterization of Actinomycetes Antagonist *Fusarium oxysporum f.sp. passiflora* Isolated from *Rhizosphere Soil* of Purple Passion Fruit Plants, South Sulawesi, Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series* **2018**, *1028*, 012015.
7. Bahlai, C. A.; Xue, Y.; McCreary, C. M.; Schaafsma, A. W.; Hallett, R. H., Choosing Organic Pesticides over Synthetic Pesticides May Not Effectively Mitigate Environmental Risk in Soybeans. *Plos One* **2010**, *5* (6), 11250-11259.
8. Paul, N. D.; Mandal, S.; Otte, M.; Cui, X.; Zhang, X. P.; de Bruin, B., Metalloradical Approach to 2H-Chromenes. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (3), 1090-1096.
9. Rapado, N. L.; Freitas, C. G.; Polpo, A.; Rojas-Cardozo, M.; Rincón, V. J.; Scotti, T. M.; Kato, J. M.; Nakano, E.; Yamaguchi, F. L., A Benzoic Acid Derivative and Flavokawains from *Piper* species as *Schistosomiasis* Vector Controls. *Molecules* **2014**, *19* (4).
10. Dean, R.; Kan, J. A. L. V.; Pretorius, Z. A.; Hammond-Kosack, K. E.; Pietro, A. D.; Spanu, P. D.; Rudd, J. J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; Foster, G. D., The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **2012**, *13* (4), 414-430.
11. Lombard, L.; Sandoval-Denis, M.; Lamprecht, S.; Crous, P., Epitypification of *Fusarium oxysporum*—clearing the taxonomic chaos. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **2019**, *43*, 1-47.
12. Abeywickrawa, A.; Beal, S., The *Fusarium* relation races. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1992**, *32*, 89-92.
13. Fravel, D.; Olivain, C.; Alabouvette, C., *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* **2003**, *157* (3), 493-502.

14. Gordon, T. R.; Martyn, R. D., The evolutionary biology of *Fusarium Oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology* **1997**, 35 (1), 111-128.
15. Kistler, H. C., Evolution of host specificity in *Fusarium oxysporum*. *Fusarium* **2001**, 70-82.
16. De Granada, E. G.; De Amezquita, M. C. O.; Mendoza, G. R. B.; Zapata, H. A. V., *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta biológica colombiana* **2001**, 6 (1), 7-25.
17. Ortiz C.; Emiro; Hoyos C., Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *rev.colomb.cienc.hortic.* **2012**, 6 (2011-2173.), 110-116.
18. Díaz, G. A.; Latorre, B. A., Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection* **2013**, 46, 106-112.
19. Strand, J. F., Some agrometeorological aspects of pest and disease management for the 21st century. *Agricultural and Forest Meteorology* **2000**, 103 (1), 73-82.
20. Kotan, R.; Kordali, S.; Cakir, A.; Kesdek, M.; Kaya, Y.; Kilic, H., Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Biochemical Systematics and Ecology* **2008**, 36 (5), 360-368.
21. Ye, J.; Zhao, M.; Liu, J.; Liu, W., Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern chiral pesticides. *Environmental Pollution* **2010**, 158 (7), 2371-2383.
22. Douglas, A. E., Strategies fore enhanced crop resistance to insect pests. *Annual Review of Plant Biology* **2018**, 69 (1), 637-660.
23. Regnault-Roger CP, B. V., C. , *Biopesticidas de origen vegetal*. 2004.
24. Agronet Volúmenes exportados en gulupa entre 2014 y 2015. <http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/VerReporte.aspx>; (accessed diciembre **2018**).
25. Ocampo, J., Diversidad y distribución de las Passifloraceae en el departamento del Huila en Colombia. *Acta Biológica Colombiana* **2013**, 18, 511-516.
26. DANEComerciointernacionaldeexportaciones. <http://www.dane.gov.co/index.php/comercio-y-servicios/comercio-exterior/exportaciones>. (accessed marzo **2018**).
27. legiscomex.com Exportación de frutas exóticas colombianas. <http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos> PDF/estudio-frutas-exoticas-colombia-completo.pdf. (accessed marzo **2018**).
28. Orjuela, B., Nubia Marcela; Moreno, C., Leonardo; Hernández, M. S.; Melgarejo, L. M., Caracterización fisicoquímica de frutos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) bajo condiciones de almacenamiento. *Capítulo* **2011**, 3, 33-44.
29. Ploetz, R. C., *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI: **2003**; p 708.
30. Agrios, G., Plant diseases caused by fungi. *Plant pathology* **2005**, 4.
31. Porter, K. A.; Desta, I.; Kozakov, D.; Vajda, S., What method to use for protein-protein docking? *Current Opinion in Structural Biology* **2019**, 55, 1-7.
32. Rabelo, V. W.-H.; Viegas, D. d. J.; Tucci, E. M. N.; Romeiro, N. C.; Abreu, P. A., Virtual screening and drug repositioning as strategies for the discovery of new antifungal inhibitors of oxidosqualene cyclase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2019**, 185, 189-199.

33. Saldívar, G., Fernanda; Prieto, M., Fernando D.; Medina, F., José L., Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química* **2017**, *28* (1), 51-58.
34. Krüger, J.; Thiel, P., Drug Design *molecules* **2014**, *2*, 3D.
35. Maldonado, R., Wilson; Noguera, O., Katia; Olivero, V., Jesús, Acoplamiento inverso y mapeo de farmacóforo como herramientas para encontrar nuevos blancos farmacológicos de compuestos naturales. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **2012**, *36* (140), 411-420.
36. Wermuth, C. G., Pharmacophores: historical perspective and viewpoint from a medicinal chemist. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* **2006**, *32*, 3-16.
37. Capobianco, P., M.; Cordero, D. T., M.I., Diseño racional de compuestos antibacterianos derivados del 5-nitrofurano usando modelado molecular. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **2001**, *46*, 113-119.
38. Lu, X.; Yang, H.; Chen, Y.; Li, Q.; He, S.-y.; Jiang, X.; Feng, F.; Qu, W.; Sun, H., The Development of Pharmacophore Modeling: Generation and Recent Applications in Drug Discovery. *Current Pharmaceutical Design* **2018**, *24* (29), 3424-3439.
39. Pearson, M. A.; Miller, G. W., Benomyl. In *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Wexler, P., Ed. Academic Press: Oxford, 2014; pp 411-412.
40. Cosoveanu, A.; Silva, E. d.; Gimenez, M.; Núñez, T.; González-Coloma, A.; Frias, V.; Cabrera, R., *Artemisia thuscula* cav.: antibacterial, antifungal activity of the plant extracts and associated endophytes. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* **2012**, *16* (1), 87-90.
41. Boyraz, N.; Özcan, M., Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia* **2005**, *76* (7), 661-665.
42. Martín, L.; Julio, L. F.; Burillo, J.; Sanz, J.; Mainar, A. M.; González-Coloma, A., Comparative chemistry and insect antifeedant action of traditional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO₂) of two cultivated wormwood (*Artemisia absinthium* L.) populations. *Industrial Crops and Products* **2011**, *34* (3), 1615-1621.
43. Julio, L. F.; Barrero, A. F.; Herrador del Pino, M. M.; Arteaga, J. F.; Burillo, J.; Andres, M. F.; Díaz, C. E.; González-Coloma, A., Phytotoxic and nematocidal components of *Lavandula luisieri*. *Journal of Natural Products* **2016**, *79* (2), 261-266.
44. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. *Gaussian 16 Rev. B.01*, Wallingford, CT, **2016**.
45. Schrödinger, M. *Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017*.
46. Koes, D. R.; Camacho, C. J., Pharmer: Efficient and Exact Pharmacophore Search. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2011**, *51* (6), 1307-1314.
47. Koes, D. R.; Camacho, C. J., ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40* (W1), W409-W414.

48. Sterling, T.; Irwin, J. J., ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2015**, *55* (11), 2324-2337.
49. Marques, J. V.; Kitamura, R. O. S.; Lago, J. H. G.; Young, M. C. M.; Guimarães, E. F.; Kato, M. J., Antifungal Amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. *Journal of Natural Products* **2007**, *70* (12), 2036-2039.
50. Lago, J. H. G.; Ramos, C. S.; Casanova, D. C. C.; Morandim, A. d. A.; Bergamo, D. C. B.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. d. S.; Furlan, M.; Guimarães, E. F.; Young, M. C. M.; Kato, M. J., Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products* **2004**, *67* (11), 1783-1788.
51. Klaiklay, S.; Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Buatong, J.; Sakayaroj, J., Chlorinated chromone and diphenyl ether derivatives from the mangrove-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA69. *Tetrahedron* **2012**, *68* (10), 2299-2305.
52. Hadacek, F.; Greger, H., Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis* **2000**, *11* (3), 137-147.
53. Cheng, H.-M.; Eto, M.; Kuwatsuka, S.; Oshima, Y., Studies on the Phenylphenol Derivatives with Biological Activity. *Agricultural and Biological Chemistry* **1968**, *32* (3), 353-358.
54. Meletiadis, J.; Antachopoulos, C.; Stergiopoulou, T.; Pournaras, S.; Roilides, E.; Walsh, T. J., Differential Fungicidal Activities of Amphotericin B and Voriconazole against *Aspergillus* Species Determined by Microbroth Methodology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, *51* (9), 3329.
55. Yang, Y.; Li, T.; Yan, L.; Yu, Y.; Wang, S.; Li, C.; Wen, Y.; Zhao, Y., Investigation on the relationship between critical body residue and bioconcentration in zebrafish based on bio-uptake kinetics for five nitro-aromatics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2018**, *98*, 18-23.
56. Chung, K. T.; Murdock, C. A.; Zhou, Y.; Stevens Jr, S. E.; Li, Y. S.; Wei, C. I.; Fernando, S.; Chou, M. W., Effects of the nitro-group on the mutagenicity and toxicity of some benzamines. *Environmental and molecular mutagenesis* **1996**, *27* (1), 67-74.
57. Nepali, K.; Lee, H.-Y.; Liou, J.-P., Nitro-Group-Containing Drugs. *Journal of medicinal chemistry* **2018**.
58. Tan, B.; Liao, L.; Zhou, Y.; Long, X.; Li, J., Toward the Toxicology of Some Nitro-Compounds. **2018**.
59. Saka, M.; Tada, N.; Kamata, Y., Chronic toxicity of 1,3,5-triazine herbicides in the postembryonic development of the western clawed frog *Silurana tropicalis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2018**, *147*, 373-381.
60. Li, E.; Bolser, D. G.; Kroll, K. J.; Brockmeier, E. K.; Falciani, F.; Denslow, N. D., Comparative toxicity of three phenolic compounds on the embryo of fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology* **2018**, *201*, 66-72.
61. Jang, Y.; Lee, A. Y.; Kim, J.-E.; Jeong, S.-H.; Kim, J. S.; Cho, M.-H., Benomyl-induced effects of ORMDL3 overexpression via oxidative stress in human bronchial epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology* **2016**, *98*, 100-106.
62. Zhou, J.; Xiong, K.; Yang, Y.; Ye, X.; Liu, J.; Li, F., Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells. *Reproductive Toxicology* **2015**, *51*, 64-71.
63. Kawaratani, Y.; Matsuoka, T.; Hirata, Y.; Fukata, N.; Nagaoka, Y.; Uesato, S., 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* **2015**, 39 (1), 292-299.

64. Alper-Hayta, S.; Arisoy, M.; Temiz-Arpaci, Ö.; Yildiz, I.; Aki, E.; Özkan, S.; Kaynak, F., Synthesis, antimicrobial activity, pharmacophore analysis of some new 2-(substitutedphenyl/benzyl)-5-[(2-benzofuryl)carboxamido]benzoxazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 43 (11), 2568-2578.

65. Chamberlain, K.; Carter, G. A., Fungitoxicity of hydroxy-and methoxy-substituted phenyl-and naphthyl-benzofurans, phenylbenzo [b] thiophenes and phenylindoles. *Pesticide Science* **1981**, 12 (5), 539-547.

66. Taile, V.; Hatzade, K.; Gaidhane, P.; Ingle, V., Synthesis and biological evaluation of novel 2-(4-o-β-d-glucosidoxyphenyl)-4, 5-disubstituted imidazoles. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2010**, 47 (4), 903-907.

67. Zhang, A.; Zhou, J.; Tao, K.; Hou, T.; Jin, H., Design, synthesis and antifungal evaluation of novel pyrazole carboxamides with diarylamines scaffold as potent succinate dehydrogenase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2018**, 28 (18), 3042-3045.

68. Cesur, N.; Cesur, Z.; Ergenc, N.; Uzun, M.; Kiraz, M.; Kasimoğlu, Ö.; Kaya, D., Synthesis and Antifungal Activity of Some 2-Aryl-3-substituted 4-Thiazolidinones. Synthese und antimykotische Aktivität einiger 2-Aryl-3-substituierter 4-Thiazolidinone. *Archiv der Pharmazie* **1994**, 327 (4), 271-272.

69. Chavan, B.; Bhalawane, P.; Kolsure, A.; Chabukswar, A., Synthesis and evaluation of some new 4, 6-disubstituted quinazoline derivatives for antimicrobial and antifungal activities. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* **2014**, 4 (33).

70. Aly, M.; Ibrahim, M.; Okael, A.; Gherbawy, Y., Synthesis, insecticidal, and fungicidal screening of some new quinoline derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **2014**, 40 (2), 214-227.

71. Mortier, J.; Dhakal, P.; Volkamer, A., Truly Target-Focused Pharmacophore Modeling: A Novel Tool for Mapping Intermolecular Surfaces. *Molecules* **2018**, 23 (8), 1959.

Recomendaciones

- Se recomienda realizar ensayos de actividad biológica antifúngica contra otras especies de hongos fitopatógenos. Para revisar si los compuestos naturales y sintéticos evaluados presentan actividad contra otras especies y así podrían ser agentes antifúngicos multifuncional.
- Realizar la obtención de los compuestos predichos por el modelo de farmacóforo ya sea por la compra o síntesis y realizar la determinación del CI_{50} por el método de inhibición de micelio para determinar si presentan actividad y así validar el modelo computacional.