

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Búsqueda de sustancias antifúngicas para
el control de hongos fitopatógenos a partir
de constituyentes químicos presentes en
*Piper pesaresanum***

Luis Carlos Chitiva Chitiva

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2019

Búsqueda de sustancias antifúngicas para el control de hongos fitopatógenos a partir de constituyentes químicos presentes en *Piper pesaresanum*

Luis Carlos Chitiva Chitiva

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de: **Magister en Ciencias-Química**

Director:

Dr. Oscar Javier Patiño Ladino

Profesor asociado Departamento Química

Codirector:

Dr. Fabian Harvey López Vallejo

Profesor asociado Departamento Química

Línea de Investigación:

Química de Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2019

*A mi familia, y a todas las personas que aportaron y contribuyeron a mi crecimiento personal y
formación profesional*

Siempre parece imposible hasta que se hace

Nelson Mandela

Agradecimientos

Agradezco a mi director Oscar Javier Patiño, por darme la oportunidad de trabajar con su grupo de investigación, comunicar su conocimiento, su tiempo y orientación

Agradezco a mi codirector Fabian López Vallejo por la capacitación y colaboración para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al profesor Luis Enrique Cuca Suárez por permitirme hacer parte del grupo y abrirme las puertas del laboratorio.

A los miembros del Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) del Departamento de Química, por darme la oportunidad de trabajar con ellos y compartir su espacio, recursos y apoyo para llevar a feliz término este proyecto.

Al laboratorio de bioensayos del Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana por la capacitación, colaboración y recursos para el desarrollo de los ensayos de actividad biológica. De allí, a la profesora Juliet Angélica Prieto y demás integrantes por su asesoría, orientación y colaboración.

A la Universidad Nacional de Colombia, por la financiación y la formación académica brindada.

A Colciencias por la financiación con recursos del Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas a través del proyecto con contrato FP44842-09-2017.

Resumen

El cacao es una de las especies primordiales del sistema agroforestal campesino de muchas regiones en Colombia y es considerado como uno de los cultivos de mayor proyección económica, dado su valor agregado, a su alta demanda por diversas industrias y a que se puede cultivar junto con otras especies de importancia alimenticia. Los rendimientos de producción en nuestro país son muy bajos, debido a múltiples factores entre los que se destacan las enfermedades causadas por diversos tipos de hongos y oomycetes fitopatógenos. Por lo que es de gran interés el desarrollo de agentes fitosanitarios eficaces y seguros para el control de hongos y oomycetes fitopatógenos asociados al cultivo del cacao con lo que se puedan minimizar las pérdidas y aumentar los rendimientos de producción. En Colombia se encuentran presentes un gran número de especies vegetales, muchas de las cuales no cuentan con investigaciones, o presentan investigaciones preliminares, lo que las hace un objeto interesante para emprender investigaciones hacia la búsqueda de sustancias con actividad antifúngica. Este es el caso de la especie *Piper pesaresanum* de la cual se han reportado algunos estudios químicos y biológicos preliminares. Dado el interés del equipo de investigación en esta temática la presente investigación contribuye a la búsqueda de sustancias antifúngicas para el control de hongos fitopatógenos asociados al cacao, a partir del estudio de los constituyentes químicos presentes en *P. pesaresanum*. El trabajo comprendió el aislamiento y caracterización de los compuestos químicos presentes en *P. pesaresanum* con actividad antifúngica frente a los hongos asociados al fruto del cacao, los cuales fueron *Moniliophthora roreri*, *Fusarium solani* y *Phytophthora sp.* Posteriormente, con los compuestos más activos se realizó un estudio de aproximación de relación estructura-actividad para establecer la influencia de los diferentes grupos funcionales sobre la actividad exhibida frente a los hongos fitopatógenos objeto de estudio. Finalmente se realizó un estudio computacional para el desarrollo de un modelo farmacofórico a partir de las características estructurales más importantes de los compuestos de mayor potencial antifúngico. El estudio fitoquímico biodirigido permitió el aislamiento y la identificación de tres derivados de ácido benzoico (ácido 4-metoxinervogénico **P-1**, ácido nervogénico **P-2** y ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-

(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico **P-3**) y una dihidrochalcona (2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona **P-4**), de los cuales (**P-2** a **P-4**) son reportados por primera vez en la especie. Los compuestos aislados e identificados presentaron actividad antifúngica moderada frente a los tres hongos evaluados, en rangos de CI_{50} de 26,72 a 97,42 μM , siendo los de mayor potencial **P-3** y **P-4**. A partir de los compuestos naturales se realizó la síntesis siete derivados (**P-5** a **P-11**), por modificaciones sencillas en sus grupos funcionales, siendo los compuestos **P-7** y **P-9** los de mayor actividad antifúngica con valores de CI_{50} de 6,68 y 2,95 μM , respectivamente. En este estudio se incluyeron algunos compuestos comerciales (**P-12** a **P-19**) con subestructuras similares a los compuestos bioactivos y otros compuestos aislados previamente en el grupo de especies del género *Piper* (**P-20** a **P-23**). Los resultados permitieron establecer que para los derivados de ácido benzoico la presencia de sustituyentes prenilados y el grupo carboxilo en el anillo aromático son necesarios para la actividad antifúngica. La actividad se incrementó significativamente cuando se sintetizaron los compuestos cíclicos de tipo cromeno **P-9** y 4-cromanona **P-10**. Para los derivados de flavonoides se determinó que el grupo carbonilo en el núcleo tipo dihidrochalcona es importante para mantener la actividad antifúngica, en dónde **P-4** fue el que presentó el mayor potencial antifúngico. Finalmente, a partir de los compuestos de mayor potencial antifúngico (**P-2**, **P-3**, **P-4**, **P-7**, **P-9** y **P-21**), se desarrolló un modelo farmacofórico teniendo en cuenta las características estructurales relevantes para la actividad antifúngica y a partir de él se proponen algunas moléculas que pueden llegar a ser potenciales antifúngicos frente a hongos fitopatógenos asociados al cacao.

Palabras clave: Actividad antifúngica, *Piper pesaresanum*, *Theobroma cacao*, agentes fitopatógenos, Piperaceae.

Abstract

Cocoa is one of the primary species of the rural agroforestry system in many regions in Colombia and is considered as one of the crops with major economic projection due to its added value, to its high demand from several industries and because it can be grown along with other species of nutritional importance. The production yields in our country are very low, due to multiple factors among which diseases caused by various types of fungi and phytopathogenic oomycetes stand out. Therefore, the development of effective and safe phytosanitary agents for the control of fungi and phytopathogenic oomycetes associated with the cultivation of cocoa is of great interest for minimizing losses and increasing production yields. A big number of plant species are present in Colombia, many of which either do not have any research or present just some preliminary research, making them an interesting subject to undertake research towards the search for substances with antifungal activity. This is the case of the *Piper pesaresanum* species of which some preliminary chemical and biological studies have been reported. Given the interest of the research team in this area, this research contributes to the search for antifungal substances to the control the phytopathogenic fungi associated with cocoa, based on the study of the chemical constituents present in *P. pesaresanum*. This work included the isolation and characterization of the chemical compounds present in *P. pesaresanum* with antifungal activity against fungi associated with cocoa fruit, which, for this research consisted in *Moniliophthora roreri*, *Fusarium solani* and *Phytophthora sp.* Subsequently, with the most active compounds, an approximation study of structure-activity relationship was carried out to establish the influence of the different functional groups on the activity exhibited against the phytopathogenic fungi under study. Finally, a computational study was carried out for the development of a pharmacophoric model based on the most important structural characteristics of the compounds with the highest antifungal potential. The bio-directed phytochemical study allowed the isolation and identification of three derivatives of benzoic acid (4-methoxyinervogenic acid **P-1**, nervogenic acid **P-2** and 3-(3',3'-dimethylalkyl-1'-oxo) -5-(3'',3''-dimethylalkyl)-4-hydroxybenzoic **P-3**) and a dihydrochalcone (2',6'-dihydroxy-4'-methoxyhydrochalcone **P-4**), from which (**P-2** to **P**

-4) are reported for the first time in the species. The isolated and identified compounds showed moderate antifungal activity against the three fungi evaluated, with IC_{50} ranging from 26.72 to 97.42 μ M, where the highest potential were **P-3** and **P-4**. From the natural compounds, seven derivatives (**P-5** to **P-11**) were synthesized, by simple modifications in their functional groups, the compounds **P-7** and **P-9** being the ones with the highest antifungal activity with IC_{50} values of 6.68 and 2.95 μ M, respectively. In this study, some commercial compounds (**P-12** to **P-19**) with substructures similar to bioactive compounds and other compounds previously isolated in the group of species of the genus *Piper* (**P-20** to **P-23**) were included. The results allowed to establish that for the benzoic acid derivatives the presence of pre-substituted substituents and the carboxyl group in the aromatic ring are necessary for the antifungal activity. The activity was significantly increased when the cyclic compounds of the chromene type **P-9** and 4-chromanone **P-10** were synthesized. For flavonoid derivatives, it was determined that the carbonyl group in the dihydrochalcone-type nucleus is important for maintaining antifungal activity, where **P-4** was the one that presented the greatest antifungal potential. Finally, from the compounds with the highest antifungal potential (**P-2**, **P-3**, **P-4**, **P-7**, **P-9** and **P-21**), a pharmacophoric model was developed taking into account the structural characteristics relevant to Antifungal activity and from it some molecules are proposed that may become potential antifungal against phytopathogenic fungi associated with cocoa.

Keywords: Antifungal activity, *Piper pesaresanum*, *Theobroma cacao*, phytopathogenic agents, Piperaceae.

Contenido

Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Abstract.....	XI
Contenido	XIII
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XVIII
Introducción	1
Objetivos.....	5
1. Estado actual del tema	6
1.1 Generalidades del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	6
1.1.1 Importancia del cultivo de cacao en el mundo.....	6
1.1.2 Importancia del cultivo de cacao en Colombia.....	8
1.1.3 Factores que afectan la producción del cultivo de cacao	9
1.1.4 Agentes fitopatógenos que afectan el cultivo de cacao	10
1.1.5 Métodos de control de agentes fitopatógenos.....	12
1.1.6 Control cultural	12
1.1.7 Control biológico.....	13
1.1.8 Control químico.....	13
1.2 Generalidades del género <i>Piper</i>	15
1.2.1 Estudios del género <i>Piper</i> aplicado a actividad antifúngica.....	19
1.3 Modelado del farmacóforo.....	23
1.3.1 Estudio computacional	23
1.3.2 Farmacóforo.....	23
2. Metodología.....	27
2.1 Procedimientos generales.....	27
2.2 Estudio fitoquímico biondirigido sobre la especie <i>P. pesaresanum</i>	28
2.2.1 Colecta de material vegetal.....	28
2.2.2 Extracción y fraccionamiento realizada sobre la parte aérea de <i>P. pesaresanum</i>	28
2.2.3 Ensayo de actividad antifúngica por el método de bioautografía directa.....	29

2.2.4	Purificación de la fracción de DCM proveniente de <i>P. pesaresanum</i>	30
2.3	Aproximación de relación estructura-actividad a partir de los constituyentes de <i>P. pesaresanum</i>	32
2.3.1	Material biológico del bioensayo	32
2.3.2	Evaluación de actividad antifúngica de los compuestos de origen natural provenientes de <i>P. pesaresanum</i>	32
2.3.3	Preparación de derivados	33
2.3.4	Evaluación de actividad antifúngica de los compuestos sintetizados y otros.....	37
2.4	Estudio computacional para el desarrollo de un modelo farmacofórico	38
2.4.1	Modelado molecular	38
2.4.2	Cribado virtual basado en el farmacóforo	39
3.	Resultados y discusión.....	40
3.1	Estudio fitoquímico realizado de la parte aérea de <i>P. pesaresanum</i>	40
3.1.1	Elucidación estructural de los compuestos aislados	43
3.2	Estudio de la relación estructura-actividad de constituyentes de <i>P. pesaresanum</i> ...	45
3.2.1	Aproximación de relación de estructura-actividad	49
3.3	Estudio computacional	56
3.3.1	Resultados del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo.....	59
3.3.2	Tamizaje en la selección de las moléculas con potencial actividad antifúngica	64
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	73
4.1	Conclusiones	73
4.2	Proyecciones y recomendaciones.....	75
	Producción científica	76
1.	Anexos de fitoquímica.....	77
2.	Anexos de síntesis	85
3.	Anexos de actividad biológica	98
	Bibliografía	100

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Síntomas internos y externos característicos (marchitamiento, necrosis y deformación de frutos tiernos) causados por <i>M. roseri</i>	12
Figura 1-2. Síntomas (forma estructuras florales denominadas escoba de bruja) internos y externos causados por <i>M. pernicioso</i>	12
Figura 1-3. Mazorca infectada por <i>Phytophthora megakarya</i>	12
Figura 1-4. Tronco infectado con <i>C. fimbriata</i>	12
Figura 1-5. Características morfológicas del género <i>Piper</i>	17
Figura 1-6. Metabolitos principales aislados del género <i>Piper</i> (Piperaceae).....	19
Figura 1-7. Metabolitos secundarios con actividad antifúngica aislados del género <i>Piper</i>	22
Figura 1-8. Características de un modelo farmacóforo generado en la plataforma ZINCPharmer.....	25
Figura 1-9. Aplicaciones del modelado farmacofórico.....	26
Figura 2-1. Esquema general de extracción y fraccionamiento de la parte aérea de <i>P. pesaresanum</i>	29
Figura 2-2. Esquema general de purificación de los metabolitos secundarios presentes en la parte aérea de <i>P. pesaresanum</i>	31
Figura 3-1. Compuestos aislados de la parte aérea de <i>P. pesaresanum</i>	41
Figura 3-2. Síntesis de derivados a partir del compuesto P-1	46
Figura 3-3. Síntesis de derivados a partir del compuesto P-2	47
Figura 3-4. Síntesis de derivados a partir del compuesto P-3	48
Figura 3-5. Síntesis de derivados a partir de P-4	48
Figura 3-6. Compuestos evaluados frente a <i>M. roseri</i> , <i>F. solani</i> y <i>Phytophthora sp.</i>	49
Figura 3-7. Resultados del porcentaje de inhibición de los compuestos evaluados frente a <i>M. roseri</i> , <i>F. solani</i> y <i>Phytophthora sp.</i>	50
Figura 3-8. Efecto de los sustituyentes para derivados de ácido benzoico.....	56
Figura 3-9. Efecto de los sustituyentes para los flavonoides.....	56
Figura 4-1. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de P-1	78
Figura 4-2. Espectro APT (CDCl ₃ , 100 MHz) de P-1	79
Figura 4-3. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de P-2	80
Figura 4-4. Espectro APT (CDCl ₃ , 100 MHz) de P-2	81
Figura 4-5. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de P-3	82
Figura 4-6. Espectro APT (CDCl ₃ , 100 MHz) de P-3	83
Figura 4-7. Espectro de RMN ¹ H ((CD ₃) ₂ CO, 400 MHz) de P-4	84
Figura 4-8. Espectro APT ((CD ₃) ₂ CO, 100 MHz) de P-4	84
Figura 4-9. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de P-5	86
Figura 4-10. Espectro APT (CDCl ₃ , 100 MHz) de P-5	87

Figura 4-11. Espectro de RMN ¹ H ((CD ₃) ₂ CO, 400 MHz) de P-6	88
Figura 4-12. Espectro APT ((CD ₃) ₂ CO, 100 MHz) de P-6	89
Figura 4-13. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de P-7	89
Figura 4-14. Espectro APT (CDCl ₃ , 100 MHz) de P-7	90
Figura 4-15. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de P-8	91
Figura 4-16. Espectro APT (CDCl ₃ , 100 MHz) de P-8	92
Figura 4-17. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de P-9	92
Figura 4-18. Espectro APT (CDCl ₃ , 100 MHz) de P-9	93
Figura 4-19. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de P-10	94
Figura 4-20. Espectro APT (CDCl ₃ , 100 MHz) de P-10	95
Figura 4-21. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de P-11	96
Figura 4-22. Espectro APT (CDCl ₃ , 100 MHz) de P-11	97

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Usos a nivel mundial del grano del cacao y de sus derivados.....	7
Tabla 1-2. Clasificación taxonómica del género <i>Piper</i>	16
Tabla 2-1. Bases de datos y filtros utilizados en el cribado virtual.....	39
Tabla 3-1. Resultados de CI_{50} para los compuestos naturales y sintéticos.....	51
Tabla 3-2. Compuestos seleccionados para el planteamiento del modelo farmacofórico.	57
Tabla 3-3. Característica farmacofóricas seleccionadas para las moléculas seleccionadas. ...	57
Tabla 3-4. Moléculas seleccionadas a partir del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo para los compuestos de tipo derivado de ácido benzoico abierto.	59
Tabla 3-5. Moléculas seleccionadas a partir del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo para los compuestos de tipo derivado de ácido benzoico cíclico.	61
Tabla 3-6. Moléculas seleccionadas a partir del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo para los compuestos de tipo dihidrochalcona.	61
Tabla 3-7. Moléculas seleccionadas a partir del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo para los compuestos de tipo flavanona.	62
Tabla 3-8. Moléculas candidatas basadas en los farmacóforos de derivados de ácido benzoico.	65
Tabla 3-9. Moléculas candidatas basadas en los farmacóforos de la dihidrochalcona.	69
Tabla 3-10. Moléculas candidatas basadas en los farmacóforos de la flavanona.	70
Tabla 4 - 1. Resultados de los % inhibición y de CI_{50} de los compuestos naturales y sintéticos.	99

Lista de símbolos y abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
AcOMe	Acetato de metilo
AE	Aceite esencial
AEs	Aceites esenciales
APT	Attached Proton Test
Å	Armstrong
brs	Singlete ancho
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CF	Cromatografía flash
CLV	Cromatografía líquida al vacío
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
d	Doblete
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
dd	Doble doblete
EtOH	Etanol
F₂₅₄	Indicador de fluorescencia en longitud de onda 254 nm
HMBC	¹ H-Detected Multiple Bond Heteronuclear Multiple Quantum
HMQC	¹ H-Detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
h	Horas
Hz	Hertz
IPA	Isopropanol
J	Constante de acoplamiento
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
mg	Miligramo
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
MMFF	Merck Molecular Force Field
MIQ	Cantidad mínima inhibitoria
NP/PEG	Reactivo de productos naturales en polietilenglicol
min	Minuto
mL	Mililitro
ppm	Partes por millón
PM3	Parameterized Model Number 3
PDA	Agar papa dextrosa

RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMSD	Root Mean Square Deviation
s	Singlete
S	Desviación estándar
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
UV	Ultravioleta
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
% I	Porcentaje de inhibición
°C	Grados Celsius
δ	Desplazamiento químico
δ_C	Desplazamiento de carbono
δ_H	Desplazamiento de hidrógeno

Introducción

La agricultura es un factor importante en el desarrollo económico, social y alimenticio del país, especialmente en las diferentes zonas rurales debido a que contribuyen con la producción de una gran variedad de alimentos y materias primas necesarias para el ser humano. Se espera que la demanda mundial de alimentos aumente considerablemente en el futuro, por lo cual, se hace necesario que este sector se proyecte para obtener mayores rendimientos y rentabilidad en muchas zonas del país, ya que sigue siendo la base económica fundamental para muchas familias campesinas (FAO, 2018; Technoserve, 2015). Según los indicadores del banco mundial para el año 2018, el sector agrícola representó el 6,3% del producto interno bruto (PIB) en el país siendo el responsable de más del 60% del total de la producción alimenticia y cerca del 80% del empleo agrícola.

Para fomentar la producción y exportaciones de productos agrícolas el gobierno nacional ha priorizado varios cultivos agrícolas con potencial de crecimiento a corto y mediano plazo. Dentro de la gran variedad de cultivos producidos en el país, el cacao es un cultivo de gran importancia económica, social y ambiental, constituye uno de los pilares fundamentales de la materia prima para diversas industrias y hace parte de la base económica para las familias campesinas que se dedican a su cultivo (AIRD, 2010; CCCA, 2017; Suárez & Hernández, 2010). Adicionalmente, el cacao es uno de los cultivos que se está promoviendo en el país para la sustitución de los cultivos ilícitos como un proyecto productivo-alternativo de gran valor agregado y alta demanda por las características de calidad del cacao que se produce en algunas regiones (Parra, 2017; Ramírez & Adaniya, 2006). De acuerdo a estudios de Fedecacao en el 2017 se produjeron 60.535 toneladas y se exportaron 12 mil toneladas de cacao de alta calidad, cifras que indican un crecimiento del 6,6% frente a la producción del año 2016 con 56.785 toneladas (FEDECACAO, 2018). A pesar de que el cultivo del cacao en el país está creciendo significativamente en los últimos años, aun no es capaz de satisfacer la demanda interna, teniéndose que importar grandes cantidades de cacao y esto se debe a que los rendimientos

de producción son bajos en comparación a los principales productores a nivel mundial (FEDECACAO, 2018).

Diferentes factores bióticos y abióticos están relacionados directamente con los bajos rendimientos en los cultivos de cacao, destacándose las enfermedades causadas por agentes fitopatógenos que reducen de forma considerable la calidad, el valor comercial, la viabilidad del fruto y la vida de la planta. De las principales enfermedades observadas en los cultivos se destacan la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri*, la escoba de bruja causada por *M. perniciosa*, la mazorca negra causada por *Phytophthora sp.* y el mal de machete causado por *Ceratocystis fimbriata* (INFOCACAO, 2017; Meinhardt *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2005; Restrepo *et al.*, 2012). El uso de fungicidas comerciales ha sido uno de los métodos más utilizados por los agricultores para controlar la afectación de hongos fitopatógenos a cultivos de cacao, sin embargo, algunos de estos productos suelen ser de alto costo, de baja eficacia y selectividad, provocando serios daños ambientales y al ser humano (Parra *et al.*, 2014; Restrepo *et al.*, 2012; Suárez & Hernández, 2010). De esta forma se hace necesario desarrollar agentes fitosanitarios eficaces y seguros para el control de fitopatógenos asociados al cultivo del cacao que permitan minimizar las pérdidas ocasionadas por las enfermedades que producen.

En búsqueda de nuevos agentes fitosanitarios, las plantas representan una alternativa interesante y prometedora, pues estas producen diversos tipos de compuestos bioactivos que pueden llegar a ser la base para ser utilizados como métodos de control, o como fuente de inspiración para el desarrollo de sustancias más activas (Mesa *et al.*, 2018). Es así como, la biodiversidad es una fuente del capital bio-económico del mundo representando opciones estratégicas para su aprovechamiento sostenible, mediante la dirección de estudios de bioprospección de diversas especies que sirvan de fuente para descubrir sustancias funcionales (Benítez & Valois, 2004; CONPES, 2011; Madrigal *et al.*, 2014). Por tal razón siendo Colombia uno de los países más biodiversos 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 este país un lugar atractivo para emprender estudios multidisciplinarios dirigidos a la búsqueda de productos con aplicación en el sector agrícola (Agudelo, 2016; Madrigal *et al.*, 2014).

En el país crecen diferentes familias de plantas entre las que podemos mencionar por su importancia económica, usos tradicionales y su variedad en la composición química a la familia Piperaceae. El género *Piper* es uno de los más representativos de esta familia y se caracteriza por que varias de sus especies son promisorias frente a una gran diversidad de hongos fitopatógenos destacando a los géneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Botrytis* y *Phytophthora*, que causan grandes pérdidas económicas en cultivos de gran importancia comercial (Cotoras *et al.*, 2001; Ladino, 2018; Scalvenzi *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018). El Grupo de Investigación en Productos Naturales Bioactivos (QuiProNaB) desde hace varios años ha venido adelantado estudios en actividad antifúngica de sustancias derivadas de especies del género *Piper* sobre algunos hongos fitopatógenos, encontrándose principalmente que compuestos de tipo amidas, flavonoides, fenilpropanos, derivados de ácido benzoico, alquilfenoles y terpenos son los responsables de la actividad antifúngica exhibida por sus especies (Ladino, 2018; Parra *et al.*, 2013; Parra *et al.*, 2011). No obstante, hasta la fecha se registran pocos estudios enfocados a la búsqueda de compuestos obtenidos de especies del género *Piper* que puedan contrarrestar a hongos fitopatógenos que afectan específicamente a los cultivos de cacao. Teniendo en cuenta lo anterior y mediante un tamizaje preliminar de actividad antifúngica de especies del género *Piper* sobre algunos hongos asociados al cacao (*M. rozeri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*), nuestro equipo de investigación ha logrado establecer el potencial antifúngico de algunas especies pertenecientes a este género, siendo la especie objeto de estudio *P. pesaresanum* una de las de mayor potencial.

Con el fin de dar continuidad a las investigaciones del grupo en este campo, el presente trabajo contribuye a la búsqueda de sustancias antifúngicas para el control de hongos fitopatógenos asociados al cacao, a partir del estudio de los constituyentes químicos presentes en *P. pesaresanum*.

Objetivos

Objetivo general:

Contribuir a la búsqueda de agentes antifúngicos para el control de hongos asociados a los frutos del cacao a partir del estudio sintético y computacional de sustancias bioactivas provenientes de la especie *Piper pesaresanum*.

Objetivos específicos:

- Realizar el estudio fitoquímico biodirigido sobre la especie *P. pesaresanum* para aislar e identificar los constituyentes químicos con actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos asociados a los frutos del cacao.
- Establecer algunas aproximaciones de relación estructura-actividad frente a la inhibición de hongos fitopatógenos asociados a los frutos del cacao a partir de los constituyentes bioactivos provenientes de *P. pesaresanum*.
- Realizar un estudio computacional para el desarrollo de un modelo farmacofórico que permita explicar las características estructurales necesarias para ejercer la actividad antifúngica.

1. Estado actual del tema

1.1 Generalidades del cacao (*Theobroma cacao* L.)

1.1.1 Importancia del cultivo de cacao en el mundo

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es conocido mundialmente por ser la materia prima de la industria del chocolate, pertenece a la familia Malvaceae y es el principal cultivo de interés gracias a su alto valor económico en muchos países. Es una planta nativa de América del Sur, en las regiones del Amazonas y Orinoco, además es cultivada en otros continentes como África, Asia y Oceanía. El continente africano encabeza la producción mundial de cacao junto con Costa de Marfil como el primer productor mundial, seguido de Ghana y Nigeria. En América aparece Brasil como el mayor productor, seguido de Ecuador, Colombia y México. Estos cultivos se establecen en zonas o áreas ubicadas en la franja tropical del planeta, y generalmente requieren de alta precipitación, de suelos húmedos y bien drenados. El cultivo de cacao ocupa el tercer lugar en el mercado mundial de materias primas después del azúcar y el café. El volumen mundial de exportación de cacao en grano es de alrededor unos 3.5 millones de toneladas anuales con un valor de USD \$6 mil millones y ha crecido durante los últimos 10 años en un 2,9% por año (AIRD, 2010; De Souza *et al.*, 2018).

Según la Organización Internacional del Cacao (ICCO) la oferta y demanda mundial del cacao va en aumento a un ritmo anual del 2,5% durante los últimos 10 años. La producción mundial del cacao es fluctuante puesto que se ve afectada por las variaciones climáticas y otros factores de gran importancia, presentando una disminución en su productividad. La producción mundial de cacao en grano según el último reporte de la ICCO para el período 2017/2018, en miles de toneladas, fue de 4.645, distribuidas de la siguiente manera en las diferentes zonas del mundo que son productoras, África con 2.922, Asia y Oceanía con 397 y América con 677 (donde Ecuador produjo 232, Brasil contribuyó con 141, y los demás países restantes contribuyeron con 305) (FAO, 2018; FEDECACAO, 2018; ICCO, 2018).

Dentro de la industria cacaotera a nivel mundial del grano se producen varios productos, los cuales han sido posicionados preferencialmente en los mercados más apetecidos y de altos ingresos en el mundo como se describen en la tabla 1-1.

Tabla 1-1. Usos a nivel mundial del grano del cacao y de sus derivados.

PRODUCTO	USOS DEL CACAO Y SUS DERIVADOS
	Elaboración de chocolate.
Manteca de cacao	Usado en la industria cosmética (cremas, humectantes y jabones)
	Usado en la industria farmacéutica (la teobromina presenta una acción diurética y estimulante del sistema nervioso)
Pulpa de cacao	Elaboración de bebidas alcohólicas y no alcohólicas.
Cáscara	Usado como comida para animales.
Cenizas de la cáscara de cacao	Elaboración de jabón y fertilizantes.
Jugo de cacao	Elaboración de jaleas y mermeladas.
	Ingrediente de bebidas chocolatadas, postres, helados, salsas, tortas y galletas.
Polvo de cacao	Elaboración productos de confitería.

El consumo y la comercialización de los derivados del grano de cacao se concentra en su mayoría en Estados Unidos; en Europa en países como Holanda, Alemania, Francia, Suiza, Inglaterra y Escocia y en el continente asiático en países como Japón y China (Ruiz, 2014).

En el mercado mundial, los granos o almendras del cacao se clasifican usualmente en dos grandes categorías: conocidos en Estados Unidos como "basic beans" y en Europa como "bulk beans", los cuales representan el 95% de la producción mundial proveniente de las variedades de cacao tipo Forastero utilizados en la fabricación de manteca de cacao y de productos con gran cantidad de chocolate, a diferencia de los granos "basic beans" provenientes de las variedades de cacao tipo Criollo o Trinitario, y constituyen el 5% de la producción mundial dando características específicas de aroma o color en chocolates finos y de varios revestimientos en productos (AIRD, 2010; Parra, 2017; Sánchez & Castellanos, 2008).

El cacao tipo forastero presenta características propias como la acidez del grano, el tamaño y el sabor amargo que en términos de calidad tienden a dar cacaos comunes de menor calidad relacionada con el sabor y el aroma. Sin embargo, presenta condiciones de calidad favorables

para la industria, en el rendimiento en contenido de grasa. En cambio, el tipo criollo corresponde a un tipo de almendras grandes, produciendo un grano de olor dulce y sabor agradable, junto a un aroma delicado caracterizándolo como un tipo de cacao fino. Este tipo de cacao presenta condiciones desfavorables para su manejo resultando ser muy delicado, mostrando una alta susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades. Por último, el cacao tipo trinitario es el producto del cruce entre el criollo y forastero realizados de forma natural, donde la calidad que posee corresponde a las características intermedias de ambos; de tal forma mediante estos híbridos se obtienen ventajas interesantes como mayor precocidad frente a plantaciones reproducidas por semillas de tipo común o criollo. Además, generan determinadas características deseables en su cultivo y producción en los granos que presenten una alta calidad (CCCA, 2017; FEDECACAO, 2014).

1.1.2 Importancia del cultivo de cacao en Colombia

Actualmente, el cacao se perfila como un producto que ofrece un creciente e importante mercado gracias a su elevada demanda a nivel mundial. Colombia cuenta con condiciones favorables a nivel geográfico y agroecológico para su cultivo y producción, además, y gracias a los excelentes materiales genéticos se pueden producir cacaos especiales. Sin embargo, las prácticas y tecnologías de pre y poscosecha que se emplean en la actualidad deben ser mejoradas para la explotación de manera competitiva y apropiada de los cacaos de alta calidad (AIRD, 2010; Parra, 2017; Sánchez & Castellanos, 2008).

En el territorio colombiano se encuentra una amplitud y variedad de zonas con condiciones óptimas para cultivos de cacao, siendo en los departamentos de Santander, Arauca, Tolima, Nariño y Antioquia, en donde se presentan los principales cultivos. En los últimos años el cultivo de cacao se ha incrementado en los departamentos del Meta, Cesar, Córdoba, Guaviare, Casanare y Cundinamarca entre otros. Estas zonas en nuestro país y según las estadísticas de la ICCO para el año 2018 representaron una participación del 5% en producción con cerca de 60.535 toneladas, que comparadas con la producción a nivel mundial de otros países es superado en un 70%, ocupando Colombia el doceavo puesto. Debido a lo anterior se abre la posibilidad de aumentar su competitividad frente al mercado internacional incentivando la siembra de este cultivo como un sustento económico alternativo para las familias campesinas.

En Colombia se estima que aproximadamente más de 120.000 hectáreas de cacao sembradas son las que producen unas 38.000 toneladas, beneficiando cerca de 30.000 familias de manera directa, generando un empleo rural permanente, en varias zonas del país que presentan diversas problemáticas sociales como pobreza, desempleo, violencia, presencia de cultivos ilícitos y grupos armados. De acuerdo con las cifras de producción para el año 2018 Colombia produjo 60.535 toneladas, en donde los principales departamentos productores fueron: Santander (40%), Arauca (11%), Antioquia (9%), Huila (7%), Tolima (6%) y Cundinamarca (4%). En el año 2017 lograron producir 46.938 toneladas aumentando en un 10 % cada año (AGRONET, 2018; FEDECACAO, 2018; ICCO, 2018). Actualmente, en nuestro país se cultiva el cacao, como una alternativa a los cultivos ilícitos, como sustituto del café, como parte integral de sistemas forestales con maderables y frutales, como fuente económica de numerosas familias, aportando al desarrollo sostenible del país (CCCA, 2017; FEDECACAO, 2018; ICCO, 2018).

1.1.3 Factores que afectan la producción del cultivo de cacao

El mal manejo de los cultivos, el ataque de plagas y enfermedades, las condiciones climáticas etc., son algunos de los factores que limita y reduce la producción a nivel mundial. El cultivo del cacao necesita unas condiciones óptimas para expresar su máximo potencial productivo. Las condiciones climáticas (temperatura, presión, vientos, humedad y precipitaciones), influyen de manera directa e importante en la producción de la materia prima. Se deben establecer condiciones óptimas de precipitación (1.500 y 2.600 m.s.n.m), temperatura (24 a 28 °C) y humedad con el fin de no afectar la producción y el crecimiento de la planta.

Otra de las limitantes más importantes de la producción del cacao está asociada con las enfermedades causadas por el ataque de hongos fitopatógenos. Estas enfermedades se caracterizan por atacar a los cultivos reduciendo de forma considerable la calidad, el valor comercial, la viabilidad del fruto y la vida de la planta, causando pérdidas que pueden fluctuar entre el 30 y 40% de la producción y en algunos casos se pueden presentar pérdidas de hasta el 100% para cierto tipo de enfermedades ocasionadas por los hongos que atacan completamente la planta (AIRD, 2010; FEDECACAO, 2013; ICCO, 2018). A continuación, se presenta la descripción de las generalidades de cada uno de los hongos que atacan a los cultivos de cacao.

1.1.4 Agentes fitopatógenos que afectan el cultivo de cacao

En la actualidad, las enfermedades del cacao con mayor potencial de daño son las causadas por diversos tipos de hongos fitopatógenos, las cuales presentan un gran impacto a nivel mundial en el ámbito económico y social. Se pueden presentar pérdidas considerables que pueden llegar hasta el 100% afectando la calidad del fruto y la supervivencia de la planta, dependiendo de la severidad de la enfermedad y el tipo de fitopatógeno. Los hongos más relevantes que disminuyen la producción de los cultivos de cacao son *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora* y *Ceratocystis fimbriata* (Engelbrecht & Harrington, 2005; Suárez & Hernández, 2010; Tahi *et al.*, 2006).

M. roreri: es un hongo basidiomiceto hemibiotrófico que presenta conidias de forma globosas, subglobosas y elipsoidales, presenta un micelio de tipo alargado de color café generando un crecimiento radial. Este hongo afecta principalmente los frutos mediante la producción de conidias y micelio intercelular, produciendo posteriormente hifas infectivas que luego penetran a nivel intracelular, causando la enfermedad denominada moniliasis. La sintomatología se observa mediante la aparición de manchas cafés, necrosis, deformación de frutos tiernos, madurez prematura e irregular de los frutos mayores, pudrición y maceración de los tejidos infectados (figura 1-1). La severidad de estos síntomas es variable dependiendo de la edad del fruto y de la infestación del ataque del fitopatógeno. Los reportes de pérdidas en producción indican que pueden llegar hasta el 80% dependiendo de las condiciones ambientales, en donde para este caso la humedad favorece el desarrollo del fitopatógeno (Contreras, 2016; Mora & Fiallos, 2012; Suárez & Hernández, 2010; Suárez & Delgado, 1993).

M. perniciosa: es un hongo de tipo basidiomicota hemibiotrófico con dos fases de reproducción características (biotrófica y saprotrofica), presenta basidiósporas hialinas y ovales formando micelio de tipo biotrófico monocariótico de crecimiento radial. Este hongo afecta principalmente los cojines florales o estructuras reproductivas del fruto produciendo hipertrofia, hiperplasia, proliferación de brotes o cojines florales y la formación de tallos anormales, causando la enfermedad denominada como escoba de bruja. La sintomatología se observa cuando las ramas y brotes vegetativos provocan hinchazón en la parte afectada, acompañada con la proliferación de pequeños brotamientos próximos a los frutos, donde se forman las hojas con apariencia de una escoba de bruja; además, se puede evidenciar pudrición de los frutos los cuales son susceptibles durante el desarrollo de la enfermedad (figura 1-2).

Los reportes de pérdidas en producción indican que pueden llegar hasta el 60% dependiendo de las condiciones ambientales favorables para el desarrollo del fitopatógeno (Osorio *et al.*, 2012; Restrepo *et al.*, 2012; Suárez & Hernández, 2010; Tirado *et al.*, 2016).

P. palmivora: es un hongo oomyceto que produce clamidiosporas resultado de su reproducción asexual, está conformado por micelio con hifas completamente uniformes. Este hongo afecta principalmente a raíces, hojas, tallos y frutos produciendo manchas y lesiones de color negro sobre la parte afectada causando la enfermedad denominada como mazorca negra. La sintomatología se observa sobre la superficie de la mazorca con una mancha descolorida que al pasar el tiempo se convierte en una lesión de color chocolate o negra con límites bien definidos (figura 1-3). El fitopatógeno aparece sobre la superficie de la mazorca como una pelusa de color blanco que al final se ennegrece y marchita al ser infectada por el hongo. Los reportes de pérdidas en producción indican que pueden llegar hasta el 80% dependiendo de las condiciones ambientales, en donde para este caso la humedad, altura (800 m.s.n.m) y temperatura (15 a 38°C) favorecen el desarrollo del fitopatógeno (Pokou *et al.*, 2008; Suárez & Hernández, 2010; Tahi *et al.*, 2006).

C. fimbriata: es un hongo ascomiceto que produce conidióforos formando los conidios hialinos, presenta ascosporas pequeñas, hialinas y con forma de sombrero que luego genera un micelio de tipo hialino que a través del tiempo se vuelve marrón verdoso oscuro. Este hongo ataca principalmente tallos y ramas y la infección se da a través de heridas frescas, aunque también se puede dar por medio de la raíz causando la enfermedad denominada como el mal de machete. La sintomatología se observa cuando el micelio y las esporas invaden las heridas y se mueven a través del xilema en las células conductoras del agua y en las células del parénquima, generando así manchas oscuras de color marrón rojizo a púrpura a marrón oscuro o negro en la xilema (figura 1-4). Este síntoma se puede extender varios metros desde las raíces, hasta el tronco del árbol y hacia las ramas produciendo marchitamiento total de la planta. Los reportes de pérdidas en producción indican que pueden llegar hasta el 100% dependiendo de las condiciones ambientales favorables para el desarrollo del fitopatógeno (Herrera *et al.*, 2015; Ramírez & Adaniya, 2006).



Figura 1-1. Síntomas internos y externos característicos (marchitamiento, necrosis y deformación de frutos tiernos) causados por *M. roleri*.



Figura 1-2. Síntomas (forma estructuras florales denominadas escoba de bruja) internos y externos causados por *M. perniciosa*.



Figura 1-3. Mazorca infectada por *Phytophthora megakarya*.



Figura 1-4. Tronco infectado con *C. fimbriata*.

1.1.5 Métodos de control de agentes fitopatógenos

Los métodos que se utilizan para el control de hongos fitopatógenos asociados al cultivo de cacao suelen combinar métodos culturales, biológicos y químicos, alcanzando una efectividad del 80% en el control del patógeno.

1.1.6 Control cultural

Los métodos culturales en el manejo del cultivo permiten la manipulación del ambiente para generar condiciones menos favorables para el desarrollo de la enfermedad; estas condiciones son logradas mediante la modificación de las practicas regulares del agricultor. El método

cultural se encuentra asociado a métodos mecánicos involucrando aspectos del cultivo y manejo del suelo tomando como referencia las buenas prácticas agrícolas (BPA) las cuales involucran labores para adecuar la sombra y el tamaño del dosel de los árboles, con lo cual se permite regular la entrada de luz y flujo de aire dentro del cultivo. Además, se incluye el uso de la distancia de siembra, las podas regulares acompañadas de fertilización y riego, manejo de drenaje, control de arvenses y la remoción y destrucción de frutos infectados periódicamente. Es importante tener en cuenta que este método de control puede ser poco efectivo sobre la mortalidad del fitopatógeno, ya que por lo general está orientado a prevenir la aparición de la enfermedad. (Suárez & Hernández, 2010).

1.1.7 Control biológico

En la actualidad el control biológico se enfatiza en la utilización de microorganismos vivos para el control de otros microorganismos vivos dañinos encontrados en los ecosistemas naturales. Por lo general estos organismos son de gran interés por su potencial como agentes de control biológico permitiendo una adaptabilidad a los diversos factores bióticos y abióticos de un agroecosistema. Las interacciones de los biocontroladores con el fitopatógeno involucran diversos mecanismos, sin embargo, la durabilidad del control o eliminación de la enfermedad está definida por la capacidad de establecimiento y adaptación del microorganismo al ambiente. De acuerdo con esto, se han adelantado investigaciones a nivel *in vitro* con microorganismos como *Trichoderma sp.*, *T. ovalisporum*, *T. koningiopsis*, *T. Paucisporum* y *Bacillus sp.*, mostrando un potencial antifúngico en condiciones de campo controladas; lo cual genera una reducción en la esporulación de los hongos fitopatógenos sobre las partes infectadas. Sin embargo, a pesar de los avances en la investigación en este campo durante los últimos años y que los resultados muestran ser promisorios a nivel *in vitro*, aún no existen productos comerciales que ayuden a inhibir estos microorganismos. (Guest, 2007; Mejía *et al.*, 2016; Suárez & Hernández, 2010; Tirado *et al.*, 2016; Villamil *et al.*, 2015).

1.1.8 Control químico

La estrategia de control más empleada por los agricultores se basa en un adecuado manejo integrado del cultivo, que combina métodos culturales de control con el uso de diversos tipos de fungicidas químicos comerciales los cuales son utilizados para eliminar o evitar el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Existen dos clases de fungicidas que son empleados

para impedir el crecimiento del fitopatógeno y están clasificados como protectantes o de contacto y los sistémicos o erradicadores caracterizados por la diferencia en el modo de acción.

Los fungicidas protectantes de efecto preventivo presentan generalmente acción múltiple, afectando al mismo tiempo varias de las funciones celulares de la planta frente al fitopatógeno, que previenen el crecimiento e infección de la enfermedad. Estos fungicidas generalmente afectan la germinación de esporas y pueden ocasionar la muerte después de la germinación e incluso antes de que el tubo germinativo haya penetrado en los espacios intercelulares de la zona afectada. El modo de acción de estos fungicidas se basa en la formación de una barrera sobre la superficie de la planta impidiendo la germinación de esporas y son absorbidos por el fitopatógeno en proporciones tóxicas denominado como efecto de contacto sobre estructuras fuera de la planta. Una de las ventajas que presentan este tipo de fungicidas es que, debido a su acción múltiple con respecto a las funciones celulares, impiden el desarrollo de resistencia hacia ciertos productos, debido a que es muy difícil que el fitopatógeno pueda bloquear todos los sitios de acción del fungicida (Céspedes & Alarcon, 2011; García & Portilla, 2011; Suárez & Hernández, 2010).

Dentro de los fungicidas con carácter protectante se destacan los que contienen como ingrediente activo a mancozeb, propineb, captafol, fentin acetato, fentinhidroxido, oxiclورو de cobre, clorotalonil, fentinacetato, captan, vinclozolin etc., muchos de estos fungicidas se encuentran regulados y son comúnmente utilizados para el control de hongos fitopatógenos en varios cultivos de importancia comercial (FRAC, 2019; Melgarejo & Abella, 2011).

Los fungicidas de tipo sistémico se caracterizan por ser de amplio espectro y el modo de acción se realiza por medio de la absorción de la planta a través de las estomas de las hojas o por medio de las raíces. Su efectividad es alta a dosis relativamente bajas en comparación con los fungicidas protectantes y se caracterizan por presentar un efecto preventivo, curativo y en algunos casos erradicantes, dependiendo de la dosis y el tipo de fitopatógeno a controlar. El efecto curativo del fungicida hace referencia al control del proceso de infección sin hacer referencia a la recuperación de los tejidos muertos de la planta. El modo de acción de estos fungicidas se realiza de manera directa y provoca cambios sobre la biología del microorganismo, la reacción bioquímica, cambio fisiológico o llega a producir hasta la muerte del hongo (FEDECACAO, 2013; FRAC, 2019).

Dentro del grupo de fungicidas sistémicos y dependiendo del modo de acción (inhibición del metabolismo energético, interferencia con la biosíntesis, interferencia con la estructura celular y/o actividad multisitio) se encuentran varios que están constituidos en el grupo de los bencimidazoles y tiofanatos a base de ingredientes activos como benomil, carbendazim, metiltiofanato, tiofanato, tiazabenzadazole, fuberidazole, fludioxonil etc. (Céspedes & Alarcon, 2011; FAO, 2018; Meinhardt *et al.*, 2008; Suárez & Hernández, 2010).

Durante años han surgido una gran variedad de productos químicos sintéticos utilizados ampliamente para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que atacan a cultivos de gran importancia comercial. En la actualidad se conocen cientos de ingredientes activos registrados como fungicidas comerciales en el mundo. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha conllevado desde hace varios años a una serie de problemáticas medioambientales correspondientes a que son sustancias altamente tóxicas, persistentes, eliminan especies benéficas, generan plagas resistentes etc., y que además afectan la salud humana (Becerra *et al.*, 2010; FEDECACAO, 2013).

Actualmente, se ha generado un creciente interés en la investigación de varias familias de plantas utilizadas como fungicidas naturales, que suelen ser relativamente menos perjudiciales para el ambiente. De acuerdo con esto, en los últimos años el uso de las plantas con aplicación antifúngica en el sector agrícola cada día se hace más relevante. Las plantas producen diversos tipos de compuestos bioactivos que pueden llegar ser utilizados como métodos de control, o que pueden ser la fuente de inspiración para el desarrollo de nuevas sustancias activas.

1.2 Generalidades del género *Piper*

El género *Piper* perteneciente a la familia Piperaceae comprende alrededor de 2500 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. Colombia es uno de los países con mayor distribución, principalmente en la región andina en los bosques húmedos y tropicales.

Dentro de las especies más representativas del género *Piper* en Colombia se encuentran *Piper aduncum*, *P. artanthe*, *P. asperiusculum*, *P. bogotense*, *P. hispidum*, *P. arboreum*, *P. nigrum*, *P. peltatum*, *P. imperiale*, *P. marginatum* etc., distribuidas en todo el territorio nacional (Trujillo & Callejas, 2015; Trujillo & Hoyos, 2013).

La clasificación taxonómica del género *Piper* se muestra en la tabla 1-2.

Tabla 1-2. Clasificación taxonómica del género *Piper*.

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophita
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	<i>Piper</i>

El género *Piper* comprende generalmente, arbustos, subarbustos, hierbas y/o enredaderas, conocidos popularmente como “cordoncillos” o “anises”, debido a la presencia de diminutas flores agrupadas en una inflorescencia en forma de espiga o en racimos; presenta tallos que son característicos de tipo nudosos con hojas alternas, penninervias o palmatinervias, aunque morfológicamente terminales como resultado del desarrollo del crecimiento simpodial. Las espigas son cilíndricas carnosas y desifloras en la mayoría de las especies, mientras que las flores protegidas por una pequeña bráctea son desnudas y hermafroditas en especies neotropicales, flores triangulares, ocasionalmente lisas, brillantes densamente agrupadas en el eje vertical, pistilo de 3-5 carpelos, fruta suave elegante, deprimido o truncado (Trujillo & Callejas, 2015; Trujillo & Hoyos, 2013). En la figura 1-5 se ilustran algunas de las características morfológicas más importantes para el género *Piper* (Pelajo *et al.*, 2016).

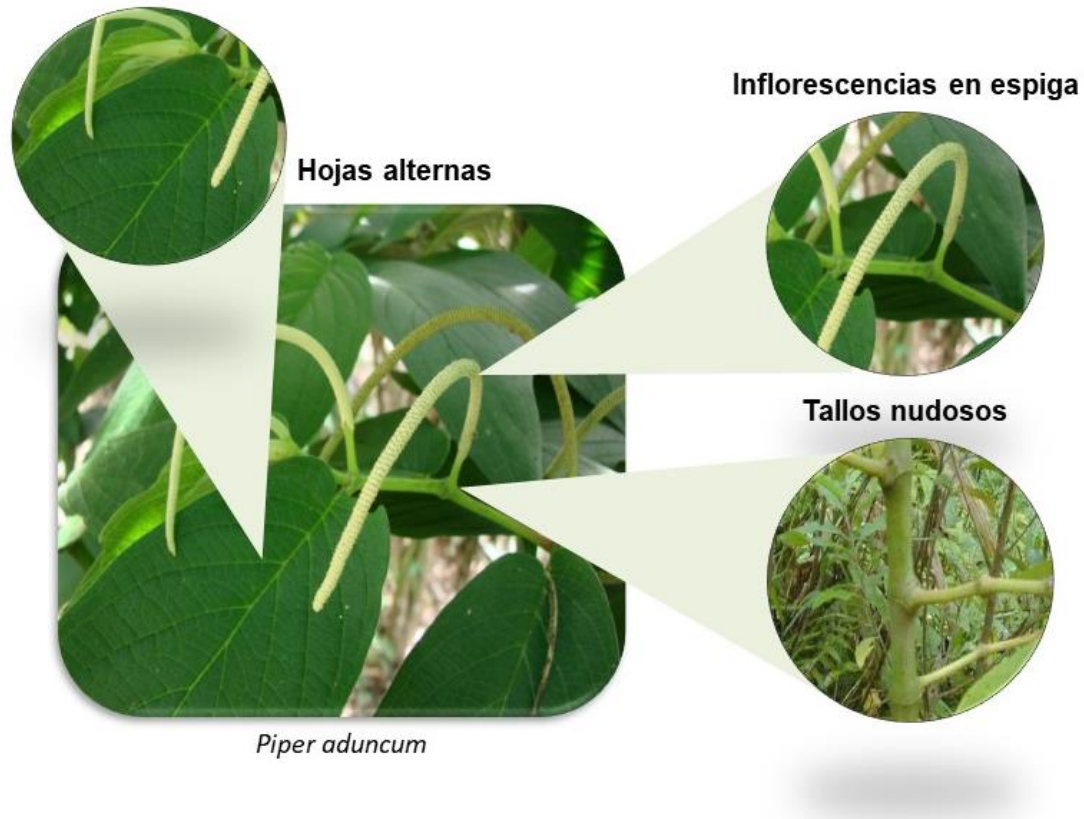


Figura 1-5. Características morfológicas del género *Piper*.

Diversas especies del género *Piper* son empleadas tradicionalmente en el tratamiento de dolor de estómago, caries dentales y como cicatrizante. Las comunidades indígenas emplean diversas especies mediante infusiones y aplicaciones directas de la pasta de los órganos usándolos como antiinflamatorios, analgésicos, antirreumáticos y contra la picadura de serpientes (Benítez & Valois, 2004; Bruneton, 2001; Guirado *et al.*, 2012). Otras especies son utilizadas como remedios para aliviar dolores de pecho, fiebre, hemorroides, como antiinflamatorio, en el tratamiento del asma, bronquitis, diabetes, gripe, anemia, cólera, malaria, reumatismo y artritis etc. La especie *P. methysticum* conocida tradicionalmente como “*Kava-Kava*” es usada como bebida en las ceremonias de las culturas nativas del Océano Pacífico como Polinesia, Vanuatu, Melanesia y en algunas zonas de Micronesia y Australia (D’ Angelo *et al.*, 1997; Mesa *et al.*, 2012).

Además, muchas especies son utilizadas a nivel culinario y medicinal, comúnmente es conocida como la familia de la pimienta debido a su representante más conocido la *P. nigrum*, la cual es la fuente principal de la pimienta utilizada en la industria alimenticia. Se ha reportado que

muchas especies de esta familia posee propiedades farmacológicas dentro de las que se destacan la anticancerígena, hipoglucemiante, antituberculosa, antioxidante, antifúngica y antimalárica entre otras (Jeffrey *et al.*, 2014; Masuoka *et al.*, 2003; Trujillo & Callejas, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2006). Este género se caracteriza a nivel ecológico debido a que sus frutos proveen alimento para aves y murciélagos frugívoros (Chaveerach *et al.*, 2006; Trujillo & Callejas, 2015; Trujillo & Hoyos, 2013).

Las especies del género *Piper* poseen un alto valor económico, debido a la gran variedad de especies y a la aplicabilidad que tienen en la industria alimenticia por el elevado contenido de aceites esenciales, usado en alimentos y perfumes. A nivel agrícola varias especies presentan un potencial como insecticidas o antifúngicos (Boonphong *et al.*, 2007; Céspedes & Alarcon, 2011; Korosec *et al.*, 2013; Ladino, 2018; Trujillo & Callejas, 2015).

Dentro de los estudios de composición química para el género *Piper* se han aislado flavonoides **1**, quinonas **2**, lignanos **3**, alcaloides **4**, derivados de ácido benzoico **5**, **6**, fenilpropanoides **7**, terpenos **8**, amidas **9**. En la figura 1-6 se ilustran los metabolitos principales aislados del género *Piper*. De este tipo de compuestos se han reportado actividad biológica importantes como citotóxica, antiinflamatoria, antioxidante, antifúngica, anticancerígena, antimicrobiana, antimalárica, antiparasitaria, insecticida, antiplasmodial, repelente, antialimentaria etc. (Ghosh *et al.*, 2014; Ladino, 2018; Neethu *et al.*, 2016; Parmar *et al.*, 1997; Pelayo *et al.*, 2016).

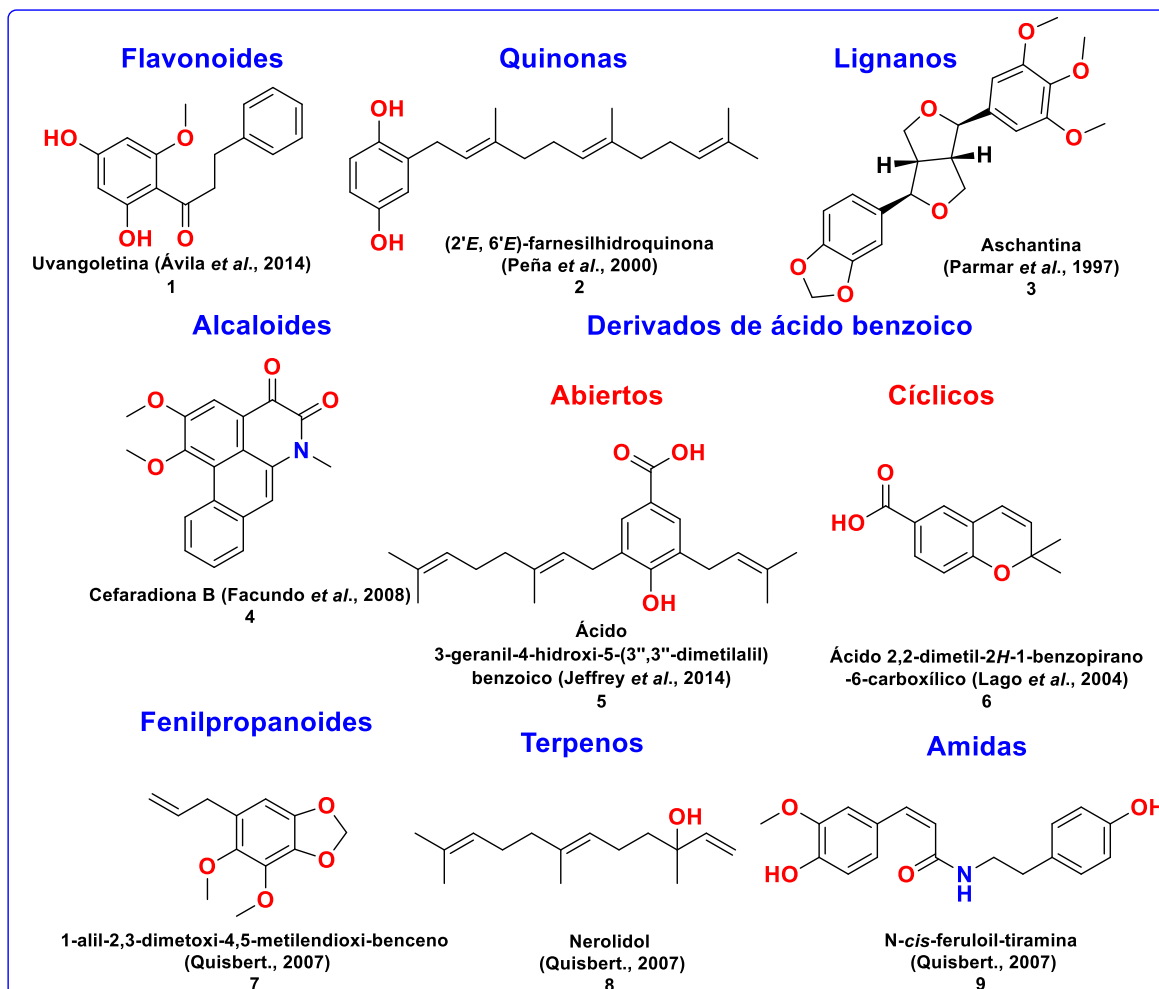


Figura 1-6. Metabolitos principales aislados del género *Piper* (Piperaceae).

1.2.1 Estudios del género *Piper* aplicado a actividad antifúngica

La mayoría de las investigaciones realizadas para el género *Piper* en búsqueda de extractos, fracciones, aceites esenciales y compuestos puros bioactivos que permiten el control de hongos fitopatógenos que afectan a cultivos de gran importancia económica, se concentra principalmente en una variedad de especies de hongos fitopatógenos como: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Botryotinia fuckeliana*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *C. cucumerinum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *Thanatephorus cucumeris*. (Agris, 2005; Dean *et al.*, 2012; Ladino, 2018; Nacimiento *et al.*, 2015; Xu & Li, 2011; Xu *et al.*, 2018).

Para extractos y fracciones de 25 especies del género *Piper* como *P. betle*, *P. nigrum*, *P. chaba*, *P. guineense* y *P. longum*, entre otras., se ha reportado actividad antifúngica frente a algunos hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cladosporium*. Estudios realizados muestran que para el extracto etanólico de hojas de *P. betle* se determinó el 100% de inhibición frente a los hongos *C. gloesporoides*, *C. capsici*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* y *Piricularia oryzae* (Singburadom, 2015). Para el extracto etanólico de la parte aérea de *P. septuplinervium* se determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 100 µg frente a *F. oxysporum* (Ávila, 2014). Para el extracto metanólico de *P. krukoffi* se reporta la bioactividad sobre hongos del género *Cladosporium* principalmente *C. cladosporioides* y *C. sphaerospermum* en donde se determinó la inhibición total del crecimiento del hongo a cantidades aplicadas inferiores a 0,5 µg/mL mediante un ensayo bioautográfico (Da Silva *et al.*, 2011).

Es importante destacar que las investigaciones en este campo siguen siendo preliminares, puesto que han sido realizadas únicamente en ensayos *in vitro*, por lo cual, no se ha podido determinar la efectiva potencialidad de las especies del género *Piper* como agentes fitosanitarios de interés en el sector agrícola para el control de hongos fitopatógenos (García *et al.*, 2012; Ladino, 2018).

Los aceites esenciales (AEs), obtenidos especialmente de hojas e inflorescencias de diversas especies del género *Piper*, se caracterizan por la presencia de constituyentes mayoritarios de tipo monoterpeno (1,8-cineol y/o limoneno), sesquiterpeno (β -cariofileno, germacreno y/o óxido de germacreno) y fenilpropano (safrol, apiol, dilapiol y/o miristicina), a los que se le atribuye la actividad antifúngica. El aceite de hojas de *P. betle*, en concentraciones menores a 0,7 µg/mL inhibe el 100% del crecimiento de los hongos *A. flavus* y *Penicillium expansum* (Basak & Guha, 2017; Prakash *et al.*, 2010). El aceite de la parte aérea de *P. aduncum* presentó un valor de CMI de 0,6 a 1,0 mg/mL frente a los fitopatógenos *M. roreri* y *M. pernicioso* (De Almeida *et al.*, 2009; Scalvenzi *et al.*, 2016). Los AEs de hojas de *P. callosum*, *P. enckea* y *P. marginatum* presentaron una CMI de 0,75 a 1,0 µL/mL frente a los hongos *M. pernicioso*, *P. palmivora* y *P. capsici*. Además, sobre *M. pernicioso* se reportan que los aceites de hojas de las especies *P. cyrtopodum*, *P. dilatatum* y *P. tuberculatum* presentaron valores de CMI inferiores a 1,0 µL/mL (Regnier & Combrick, 2010). El aceite esencial proveniente de *P. aduncum* presentó una fracción rica en dilapiol **8** con una CMI de 0,6 mg/mL inhibiendo la germinación de conidios sobre *M. pernicioso*. En otro estudio evaluaron los AEs de varias especies tales

como *P. dilatatum*, *P. cyrtopodon*, *P. tuberculito*, *P. marginatum*, *P. enckea* y *P. divaricatum* las cuales presentaron una CMI de 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ inhibiendo el crecimiento micelial de *M. perniciosa*. (Meinhardt *et al.*, 2008; Silva & Bastos, 2007).

De acuerdo con la revisión en la literatura se reportan compuestos con actividad antifúngica de tipo amida como aristolactamas **10**, isobutilamidas **11**, piperidinas **12** y pirrolidinas **13**; de tipo derivados de ácido benzoico de cadena abierta **14**, cíclicos **15** y derivados de ácido cinámico **16**; de tipo fenilpropanoide **17**; flavonoides **18**; fenoles prenilados **19**, kawalactonas **20**, neolignanones **21** y piperólidos **22** (ver figura 1-7), que son promisorios frente a hongos fitopatógenos como *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *A. flavus*, *A. niger*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *M. perniciosa*, *Botryodiplodia theobromae* etc. (Ávila *et al.*, 2011; Ladino, 2018; Parra *et al.*, 2013; Xuan *et al.*, 2006).

Estudios fitoquímicos realizados en varias especies del género *Piper* en el grupo de investigación QuiProNaB, muestran a este género con un potencial para el control de algunos hongos fitopatógenos importantes, en el cual para la especie *P. septuplinervium* se aislaron compuestos de tipo flavonoide presentando actividad promisoriosa frente al hongo *F. oxysporum f. sp dianthi* (Ávila *et al.*, 2011). De la especie *P. cumanense* se aislaron varios derivados de ácido benzoico de los cuales el ácido cuménico **5** y un cromeno denominado ácido gaudichaudianico **6**, presentando actividad frente a *B. cinérea* y *F. oxysporum f. sp dianthi*. En un estudio realizado para la especie *P. cumanense cf. cumanense* Kunth se aislaron seis derivados de ácido benzoico de los cuales el ácido-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico y el ácido (2'Z) cuménico, presentaron porcentajes de inhibición de 100% y 68%, respectivamente frente a *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae* (Parra *et al.*, 2013; Parra, 2019; Parra *et al.*, 2011).

De acuerdo con los antecedentes mencionados y siguiendo la línea de investigación sobre especies del género *Piper*, se realizó una recolección de 20 especies en diferentes zonas de la región andina colombiana, en donde se les realizó una evaluación preliminar por bioautografía directa frente a *M. roleri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*

De los resultados obtenidos se determinó que varias especies presentan potencial para el control de hongos fitopatógenos asociados al cacao, en donde el extracto etanólico de la parte aérea de la especie *P. pesaresanum* fue uno de los que presentó mayores zonas de inhibición frente a los hongos evaluados. Sumado a lo anterior y a los pocos reportes de estudios

fitoquímicos realizados para esta especie, se decidió seleccionar a *P. pesaresanum* como objeto de estudio en el presente trabajo.

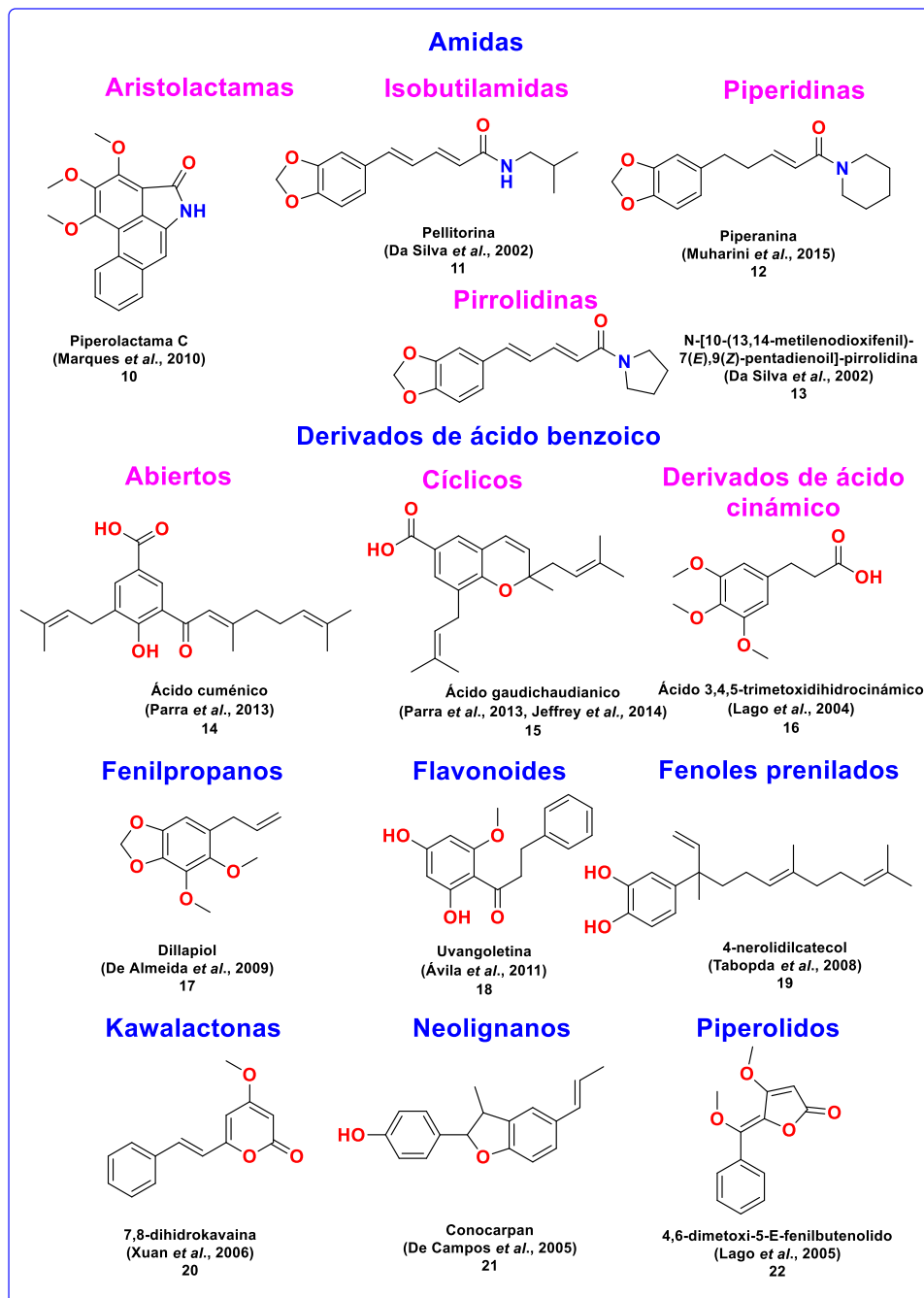


Figura 1-7. Metabolitos secundarios con actividad antifúngica aislados del género *Piper*.

P. pesaresanum es una especie que se encuentra distribuida en la región andina colombiana, principalmente en los departamentos de Antioquia, Santander y Cauca. Dentro de los estudios

realizados sobre esta especie se encuentra, que las fracciones de hexano y DCM presentaron un porcentaje de inhibición del 100% frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, un hongo ascomiceto que ocasiona la enfermedad Sigatoka negra en los cultivos de banano (Aricapa, 2012). Por otra parte un estudio muestra que mediante un estudio fitoquímico biodirigido de la fracción de éter de petróleo obtenido del extracto etanólico de las hojas, aislaron un derivado de ácido benzoico con actividad para inhibir la enzima a acetilcolinesterasa (Nitola *et al.*, 2016).

1.3 Modelado del farmacóforo

1.3.1 Estudio computacional

El papel de las moléculas de origen natural es notable en la producción y diseño de fármacos beneficiosos para la salud humana. Desafortunadamente, desde la década de 1990, muchas compañías farmacéuticas redujeron la búsqueda y el interés en el desarrollo de nuevos fármacos a partir de compuestos naturales. Debido a esto, y gracias a la aparición de tecnologías como la búsqueda de alto rendimiento, del inglés *High Throughput Screening* (HTS), acoplada con la química combinatoria, originó una reducción en la investigación en esta área. Sin embargo, la disponibilidad estructural de biomoléculas, la aparición de nuevas herramientas computacionales de acoplamiento proteína-ligando y el desarrollo de nuevas metodologías de diseño asistido por computadores han facilitado el resurgimiento del interés en el descubrimiento de nuevos fármacos a partir de productos naturales como modelos estructurales (Harvey, 2008; Maldonado *et al.*, 2012).

1.3.2 Farmacóforo

El farmacóforo es un conjunto de características estructurales responsables de la actividad biológica y tiene una alta relación con los métodos cuantitativos de la relación estructura-actividad, conocidos por sus siglas en inglés (QSAR), en donde se produce una serie de arreglos tridimensionales del grupo funcional que se requiere para que haya actividad. Los farmacóforos se utilizan generalmente para derivar la relación entre la estructura y la actividad de un conjunto de moléculas con el fin de determinar su potencial de actividad. Los sistemas de farmacóforos pueden utilizar múltiples descriptores de calidad como la energía conformacional, puntaje de volumen (medida de superposición entre las moléculas) y puntaje

de característica (correspondencia entre las propiedades particulares de las moléculas sumadas en los puntos del farmacóforo). De acuerdo con esto, un modelo de farmacóforo es el conjunto de características estéricas y electrónicas comunes que son necesarias para garantizar las interacciones moleculares óptimas y estables teniendo en cuenta un objetivo biológico específico. El modelo se utiliza para representar y caracterizar moléculas a nivel esquemático 2D o 3D mediante la identificación de propiedades similares del reconocimiento molecular. Es importante reconocer que cada tipo de átomo o grupo funcional en un compuesto puede significar una característica de farmacóforo o huella dactilar que lo identifica, permitiendo así establecer varias propiedades farmacofóricas específicas, como, por ejemplo, los átomos donadores o aceptores de enlaces de hidrógeno, aromáticos, catiónicos, etc. Estas características son la base para analizar su similitud estructural con otras moléculas en bases de datos y así poder identificar la huella dactilar del farmacóforo contribuyendo con la función biológica objetivo (Koes & Camacho, 2012; Peter *et al.*, 2018).

Los perfiles para obtener un modelo farmacofórico a partir de una base de datos se deben realizar mediante la distribución del conjunto de características farmacofóricas teniendo en cuenta los grupos aceptores y donadores de enlace de hidrógeno, centros negativos y positivos ionizables y la presencia de los sitios hidrofóbicos (ver figura 1-8). Para este tipo de estudios se hace necesario clasificar los grupos que presentan un tipo de comportamiento de pH tanto básico como ácido, con el fin de establecer la afinidad de la molécula hacia algún ligando o proteína en una diana específica (Maldonado *et al.*, 2012; Zuccotto, 2003).

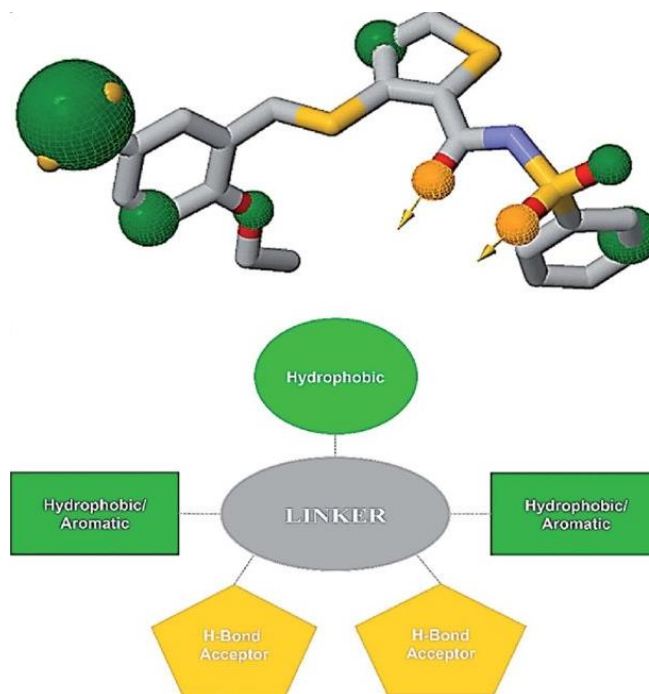


Figura 1-8. Características de un modelo farmacóforo generado en la plataforma ZINCPharmer.

(Tomado de: https://www.Allosteric_inhibition_induces_an_open_WPD-loop_a_new_avenue_towards_glioblastoma_therapy/).

El modelo de farmacóforo es utilizado cuando un compuesto activo ha sido determinado, siendo la estructura 3D de la proteína blanco o receptor por lo general desconocida. El modelo de farmacóforo intenta proveer un arreglo en tres dimensiones de los grupos funcionales o características estructurales que una molécula debe poseer para ser reconocido por el receptor. Un mapeo de farmacóforo es una descripción 3D del mismo, desarrollado mediante la especificación de la naturaleza de las características electrónicas y topológicas claves, así como de su distancia 3D en el mapa. Existen programas disponibles que permiten modelar esta relación y por lo general estas plataformas son utilizadas para la generación de farmacóforos para una o varias moléculas (Kansal *et al.*, 2010; Maldonado *et al.*, 2012).

Una parte esencial de la búsqueda y diseño de fármacos es la predicción del posible acoplamiento o interacción entre moléculas pequeñas y macromoléculas blanco. Dentro de las aplicaciones más importantes del modelado farmacofórico se ha establecido el diseño de fármacos multitarget, determinación del perfil de actividad y la identificación de moléculas con potencial biológico (ver figura 1-9) (Maldonado *et al.*, 2012).

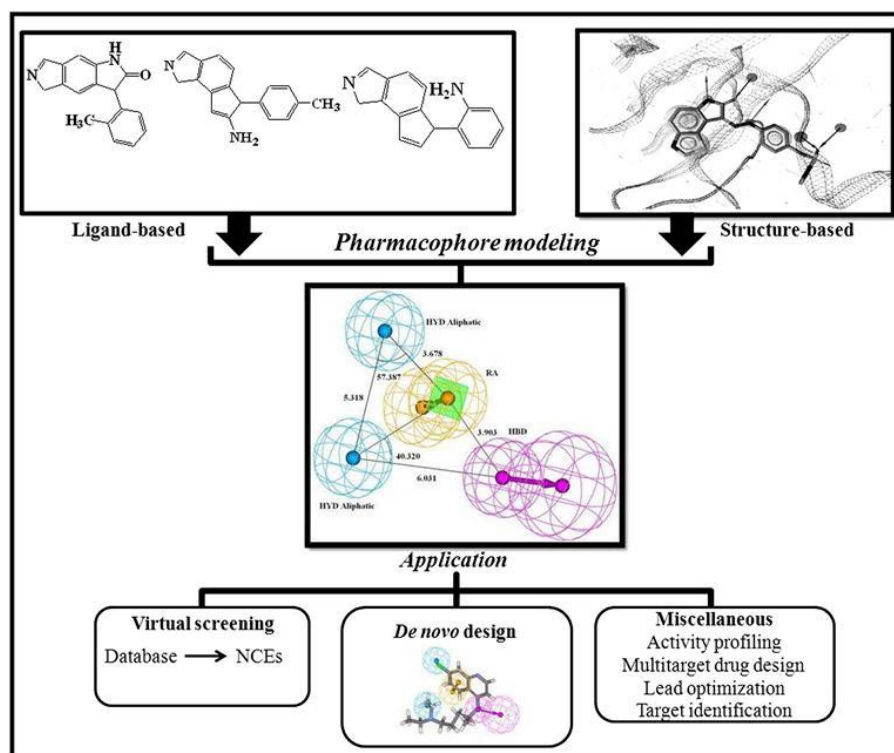


Figura 1-9. Aplicaciones del modelado farmacofórico.
(Tomado de: <https://basicmedicalkey.com/other-related-techniques/>)

2. Metodología

2.1 Procedimientos generales

Para el fraccionamiento del extracto se utilizó cromatografía líquida al vacío (CLV) utilizando como fase estacionaria sílica gel 60 F₂₅₄ SiliaPlate™ (5-20 μm). Las separaciones cromatográficas en la parte fitoquímica y sintética se realizaron por aplicación de presión mediante cromatografía flash (CF) utilizando sílica gel P60 SiliaFlash® (40-63 μm) como fase estacionaria. Los estudios cromatográficos, el monitoreo de las cromatografías líquida al vacío y flash se realizaron por cromatografía en capa delgada (CCD) empleando cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ SiliaPlate™ (5-20 μm), utilizando como reveladores vapores de yodo, luz UV (254 y 365 nm) y/o vainillina al 0,1% en H₂SO₄.

Los solventes utilizados para las separaciones cromatográficas fueron adquiridos grado técnico y destilados antes de su uso. Por otra parte, los solventes empleados en las reacciones químicas (diclorometano, metanol, acetona, acetato de etilo) fueron de grado analítico y en algunos casos almacenados en atmosfera inerte sobre tamiz de 4 Å. Los demás reactivos fueron adquiridos comercialmente y usados sin purificación adicional.

Los compuestos aislados y sintetizados fueron elucidados mediante el empleo de técnicas espectroscópicas como RMN ¹H, experimentos APT, COSY, HMQC y/o HMBC, y por comparación con los datos reportados en la literatura. Los espectros fueron tomados en un espectrómetro Bruker Avance AC-400, operado a 400 MHz. Se empleó cloroformo deuterado (CDCl₃) y acetona deuterada ((CD₃)₂CO) como solventes a una temperatura de 25 °C. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hertz (Hz). Las multiplicidades están asignadas como s = singlete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, dd = doble doblete, dt = doble triplete, m = multiplete etc. Los datos de ¹³C, así como los tipos de carbonos para cada una de las moléculas elucidadas fueron obtenidos de los análisis de los experimentos APT.

2.2 Estudio fitoquímico biodirigido sobre la especie *P. pesaresanum*

2.2.1 Colecta de material vegetal

La parte aérea de *Piper pesaresanum* fue recolectada en el municipio de Santa Bárbara departamento de Santander (Colombia). La especie fue determinada por el biólogo Ricardo Callejas del Herbario Nacional Colombiano y un espécimen fue depositado en el Herbario con el número COL-553307.

2.2.2 Extracción y fraccionamiento realizada sobre la parte aérea de *P. pesaresanum*

La parte aérea seca y molida de *P. pesaresanum* (1000 g) fue sometida a extracción con etanol al 96% utilizando el método de maceración a temperatura ambiente. La solución resultante fue concentrada por destilación a presión reducida para obtener 150,5 g de extracto etanólico. Una parte del extracto (90,5 g) fue fraccionada por cromatografía líquida al vacío (CLV) eluyendo con solventes de diferente polaridad: diclorometano (DCM), acetato de metilo (AcOMe), Isopropanol (IPA) y mezcla de etanol-agua (EtOH-H₂O) (80:20). Después de la evaporación de los solventes a presión reducida se obtuvieron las fracciones DCM (40,4 g), AcOMe (20,5 g), IPA (14,0 g) y EtOH-H₂O (15,0 g). En la figura 2-1 se ilustra el esquema general de extracción y fraccionamiento realizado sobre *P. pesaresanum*.

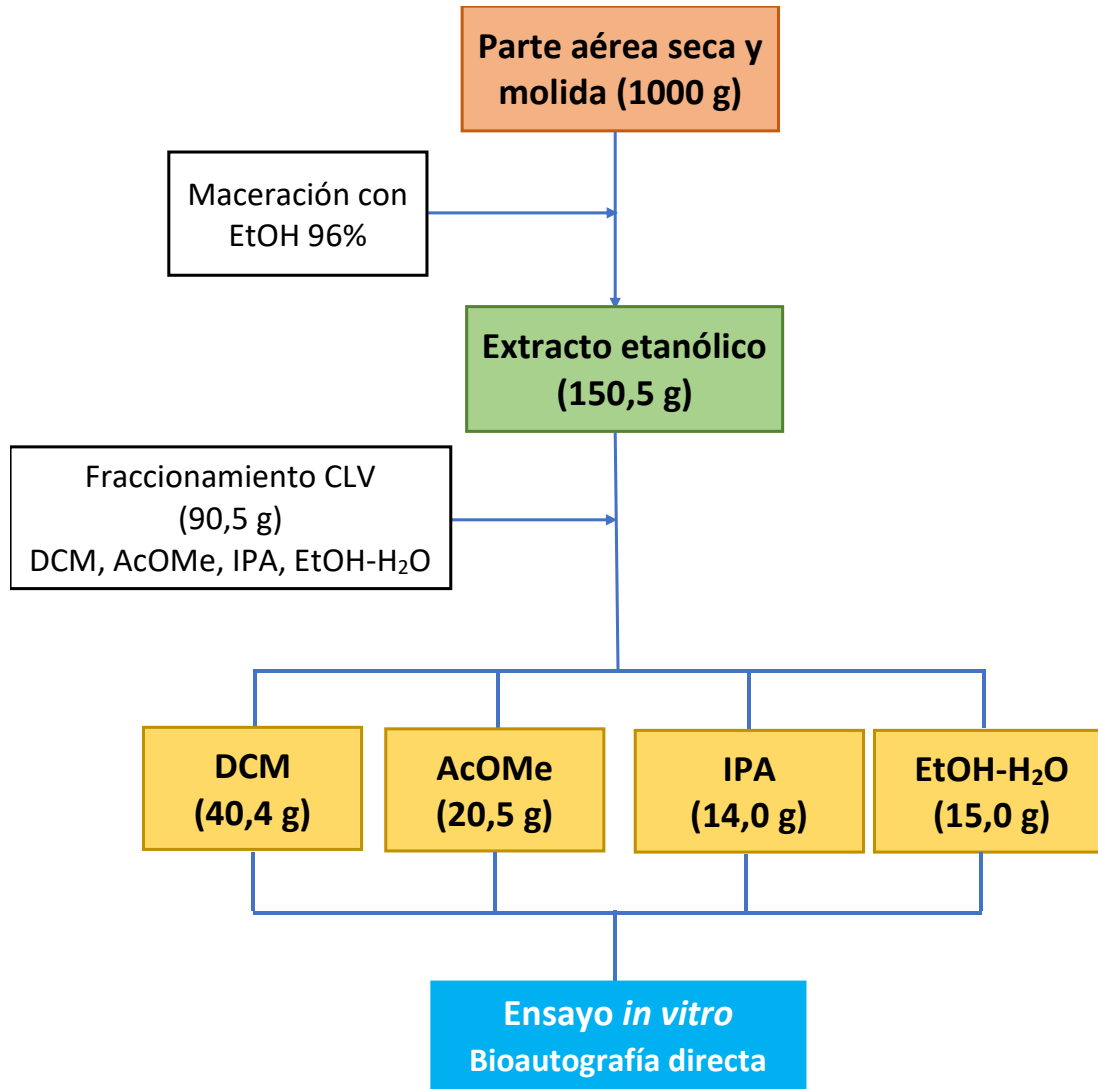


Figura 2-1. Esquema general de extracción y fraccionamiento de la parte aérea de *P. pesaresanum*.

2.2.3 Ensayo de actividad antifúngica por el método de bioautografía directa

2.2.3.1 Cepas fúngicas: Las cepas fúngicas empleadas para el ensayo de bioautografía directa fueron *Moniliophthora roreri*, *Fusarium solani* y *Phytophthora sp.*, las cuales fueron previamente aisladas de frutos de cacao enfermos y caracterizadas mediante técnicas moleculares por miembros del grupo de investigación del laboratorio de bioensayos de la

Pontificia Universidad Javeriana, en donde fueron mantenidas en incubadora a 25 °C bajo oscuridad en medio de agar papa dextrosa (PDA).

2.2.3.2 Ensayo de bioautografía directa en CCD: Con el fin de determinar la actividad antifúngica del extracto y las fracciones obtenidas de *P. pesaresanum* frente a *Moniliophthora roreri*, *Fusarium solani* y *Phytophthora sp* se realizó el ensayo por bioautografía directa en CCD (Grzelak *et al.*, 2013). Se prepararon soluciones *stock* de 50 mg/mL de las sustancias a evaluar (extracto y/o fracciones), de las cuales se aplicaron 10 µL por cada punto de siembra sobre placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ de marca SiliaPlate™. Las placas fueron eluidas en dos sistemas diferentes, utilizando cloroformo-MeOH (90:10) y hexano-AcOEt (80:20).

Después de dejar secar las placas para eliminar totalmente el solvente, fueron asperjadas con una solución de esporas de cada hongo a una concentración de 1x10⁶ UFC/mL, en solución de medio nutritivo compuesto por KH₂PO₄ 0,7%, Na₂HPO₄.2H₂O 0,3%, KNO₃ 0,1%, MgSO₄.7H₂O 0,1% y NaCl 0,1%, junto con glucosa al 30%. Finalmente, las placas se incubaron en atmósfera húmeda y oscura a 25 °C por periodos de 24 h para *F. solani* y *Phytophthora sp.* y 72 h para *M. roreri*. La actividad antifúngica se determinó por la presencia de zonas blancas de inhibición en la placa, después de revelar con el reactivo Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol (MTT) (Dewanjee *et al.*, 2015). Como control positivo se empleó el fungicida comercial Mancozeb y como control negativo se emplearon los solventes en los que se disolvieron las muestras. Terminado el tiempo de incubación se realizaron lecturas de las zonas de inhibición sobre la placa y de esta forma se determinó la actividad antifúngica frente a los hongos evaluados.

2.2.4 Purificación de la fracción de DCM proveniente de *P. pesaresanum*

La fracción de DCM (40,4 g) se sometió a cromatografía flash (CF) eluyendo con una mezcla de hexano-AcOEt en polaridad creciente (95:5 a 50:50), obteniéndose 50 fracciones que fueron reunidas en 10 fracciones finales de acuerdo con el estudio por CCD. Las fracciones 1 y 2 se reunieron (18,9 g) y fueron purificadas por CF sucesivas con hexano-AcOEt (95:5), DCM-AcOEt (85:15) y DCM, en donde se obtuvo un sólido blanco cristalino correspondiente al ácido 4-metoxinervogénico **P-1** (2,2 g). Las fracciones 3 y 4 (15,6 g) se sometieron a purificación

mediante repetidas CF eluyendo con mezcla de hexano-AcOEt (97:3), DCM-AcOEt (90:10) y DCM, de donde se obtuvo un sólido incoloro cristalino correspondiente al ácido nervogénico **P-2** (60,2 mg). Las fracciones 5, 6, y 7 fueron reunidas (3,6 g) y sometidas mediante CF con mezcla de hexano-AcOEt (95:5) y DCM-AcOEt (80:20), obteniéndose un sólido amarillo cristalino en forma de agujas correspondiente al ácido 3-(3',3'-dimetilalil)-5-(2"-butenil-3"-metil-1"-oxo)-4-hidroxibenzoico **P-3** (70,5 mg). Las fracciones 8, 9 y 10 fueron reunidas (2,3 g) y sometidas a purificación por CF eluyendo con mezcla de hexano-AcOEt (80:20) y DCM-AcOEt (70:30) para obtener un sólido cristalino blanco correspondiente al compuesto 2', 6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona **P-4** (1,4 g). En la figura 2 -2 se muestra el esquema de purificación de la fracción de DCM.

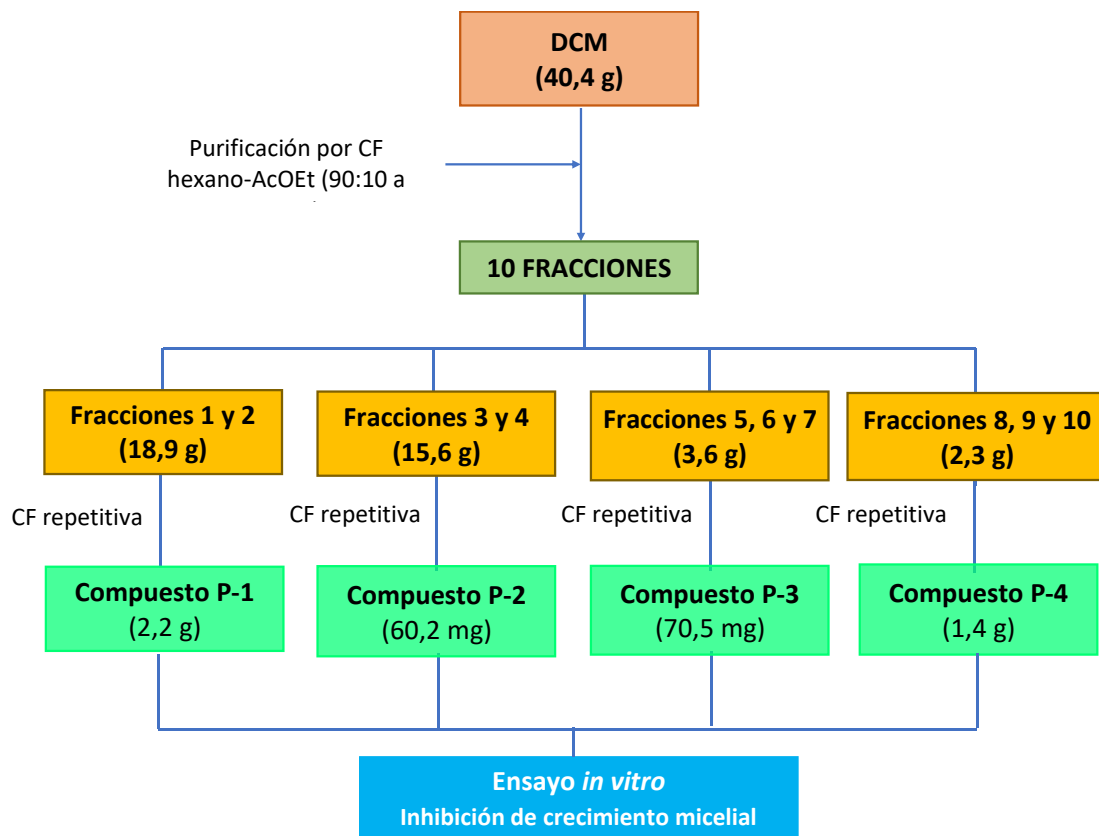


Figura 2-2. Esquema general de purificación de los metabolitos secundarios presentes en la parte aérea de *P. pesaresanum*.

2.3 Aproximación de relación estructura-actividad a partir de los constituyentes de *P. pesaresanum*

Con el fin de establecer algunas relaciones de estructura-actividad frente a hongos fitopatógenos del cacao a partir de constituyentes aislados e identificados en *P. pesaresanum*, se realizó el ensayo de inhibición de crecimiento micelial para determinar la CI_{50} de los compuestos de origen natural. Posteriormente, se realizó la síntesis de derivados a partir de los compuestos de mayor potencial por modificación de sus grupos funcionales. Finalmente, los compuestos sintetizados se sometieron al ensayo de inhibición de crecimiento micelial frente a *M. royeri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*

2.3.1 Material biológico del bioensayo

Las cepas fúngicas empleadas para el bioensayo de inhibición de crecimiento micelial fueron las mismas descritas en el ensayo de actividad antifúngica por el método de bioautografía directa correspondientes a *M. royeri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*, mencionados en el numeral 2.2.3.1.

2.3.2 Evaluación de actividad antifúngica de los compuestos de origen natural provenientes de *P. pesaresanum*

Para evaluar la actividad antifúngica de los compuestos aislados e identificados se empleó el ensayo de inhibición de crecimiento micelial (Cosoveanu *et al.*, 2012). Se prepararon soluciones para cada uno de los compuestos en etanol, con concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, en un tubo de ensayo se adicionaron 460 μL de cada solución y 1840 μL de medio PDA, se sometió a agitación y de la mezcla resultante se aplicaron 500 μL por pozo en una caja de 12 pozos, y se dejó en reposo hasta que solidificará el agar. Las concentraciones finales efectivas por pozo fueron: 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La inoculación con el hongo se realizó ubicando en el centro de cada pozo un *plug* de 2 mm de diámetro proveniente de un cultivo del hongo de 15 días de crecimiento para *M. royeri*, 5 días para *F. solani* y 10 días para *Phytophthora sp.* Las placas se incubaron en oscuridad a 25 °C, y pasados 13 días para *M. royeri*, 3 días para *F. solani* y 8 días para *Phytophthora sp.*, se determinó

el crecimiento micelial de cada microorganismo, empleando el programa *Image-J* con el cual se estableció el área de crecimiento en controles y tratamientos. Como control positivo se utilizó Mancozeb para todos los hongos y como control negativo etanol al 2%. Para cada concentración evaluada se realizaron cuatro (4) réplicas. El cálculo del porcentaje de inhibición se realizó mediante la fórmula

$$\%I = \left[\frac{C - T}{C} \right] \times 100$$

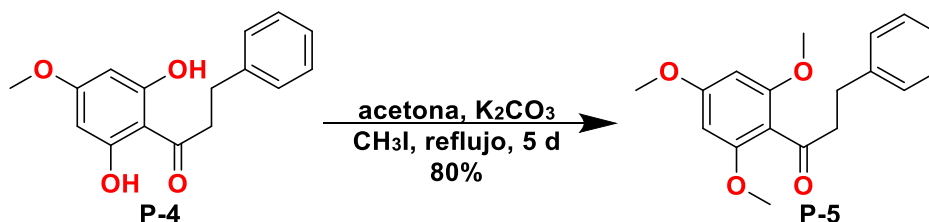
donde C = área de crecimiento en el control y T = área de crecimiento en el tratamiento (Deressa *et al.*, 2015; Marentes *et al.*, 2019).

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa *Graphpad Prism 6*. Los valores de CI₅₀ fueron estimados por un análisis de regresión no lineal. Todos los resultados reportados corresponden a la media de cuatro réplicas junto con su desviación estándar, utilizando una significancia estadística de P<0.05.

2.3.3 Preparación de derivados

Teniendo en cuenta los resultados de actividad antifúngica y la cantidad obtenida para cada uno de los compuestos naturales se realizaron las modificaciones sintéticas que se describen a continuación para la obtención de los diferentes derivados.

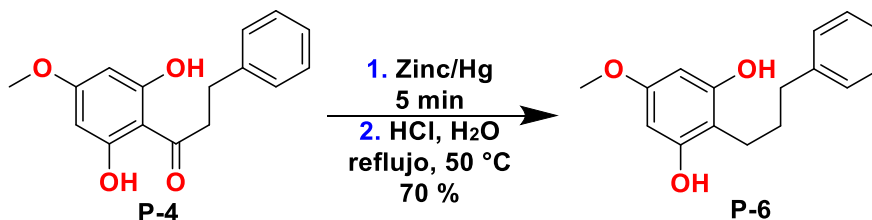
2.3.3.1 Síntesis de 2',4',6'-trimetoxidihidrochalcona (P-5)



En un experimento típico de metilación adaptado del descrito en la literatura (Suryaprakasa & Reddy, 1940), a una solución de P-4 (100 mg, 0,36 mmol) en acetona (10 mL) se adicionaron K₂CO₃ anhidro (400 mg, 1,11 mmol) y CH₃I (2,28 mL 3,51 mmol). La mezcla resultante se sometió a reflujo con agitación continua por un periodo de 5 días y durante el proceso de reacción se adicionaron porciones de la solución de CH₃I (0,50 mL) cada día hasta finalizar la reacción. Transcurrido el tiempo, se eliminó el exceso de CH₃I por destilación a presión

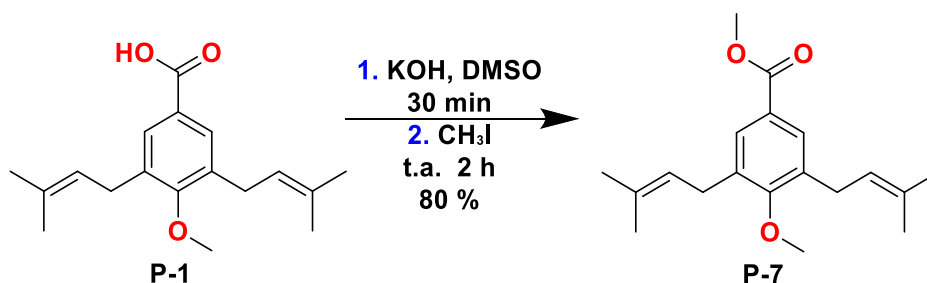
reducida. La mezcla obtenida se lavó con una solución saturada de NaCl (3 x 10 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto obtenido se purificó por CF empleando un sistema de elución DCM-AcOEt (90:10), obteniéndose un sólido amarillo correspondiente a **P-5** (80 mg, 80%).

2.3.3.2 Síntesis de 1-(2',6'-dihidroxi-4'-metoxifenil)-3-fenilpropano (**P-6**)



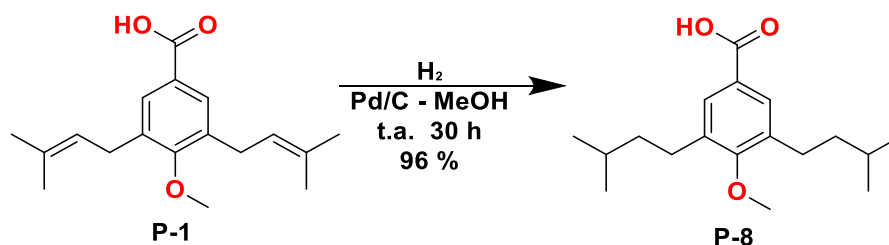
Se realizó la reducción de Clemmensen sobre el compuesto **P-4** adaptando la metodología descrita en la literatura para compuestos de este tipo, (Vogel, 1974). En la primera etapa se preparó la amalgama de zinc para lo cual en un balón de reacción se adicionó zinc en polvo (1000 mg, 15,10 mmol), HgCl₂ (100 mg, 0,36 mmol), H₂O (1,5 mL) y HCl al 37% (50,0 μL). La mezcla fue agitada por 5 minutos y posteriormente fue filtrada para la obtención de la amalgama. En la segunda etapa sobre la amalgama de zinc preparada se adicionaron H₂O (10,0 mL), HCl al 37% (5,0 mL) y **P-4** (250 mg, 0,91 mmol). La mezcla resultante se sometió a reflujo y se agitó durante aproximadamente 10 h, en la que durante el proceso se fueron adicionando porciones de HCl al 37% (0,5 mL) cada 2 h hasta finalizar la reacción. Posteriormente la mezcla se enfrió sobre un baño de agua-hielo y se filtró para retirar el exceso de amalgama. La solución resultante fue sometida a extracción con DCM (4 x 15 mL). Las fases orgánicas fueron reunidas y secadas con Na₂SO₄, y finalmente el disolvente orgánico fue eliminado por destilación a presión reducida. El residuo resultante se sometió a purificación por CF empleando como sistema de elución DCM-AcOEt (95:5), obteniéndose un sólido blanco correspondiente a **P-6** (175 mg, 70%).

2.3.3.3 Síntesis de 3,5-bis(3',3'-dimetilalil)-4-metoxibenzoato de metilo (**P-7**)



La formación del éster metílico **P-7** a partir del compuesto **P-1** fue adaptada de la metodología descrita en la literatura (Ávila & Martínez, 2001). En un experimento típico se adicionó dentro de un balón dimetilsulfóxido (3,0 mL) y KOH al 80% en solución acuosa (3,0 mL). La mezcla se sometió a agitación continua durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se le adicionó el compuesto **P-1** (100 mg, 0,34 mmol) disuelto en dimetilsulfóxido (3,0 mL). La mezcla fue agitada durante 15 minutos y luego de este tiempo fue enfriada sobre un baño de agua con hielo. Posteriormente, a la mezcla en frío se le adicionó CH_3I (31,0 μL , 0,51 mmol), se agitó durante 2 h llevándolo a temperatura ambiente y finalmente se le adicionó una mezcla de agua-hielo para finalizar la reacción. La solución resultante se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se reunieron y se lavaron con una solución saturada de NaCl (3 x 15 mL), luego fueron secadas con Na_2SO_4 anhidro y finalmente el disolvente fue removido por destilación a presión reducida. El residuo resultante se purificó por CF en un sistema hexano- AcOMe (96:4), obteniéndose un aceite amarillo correspondiente a **P-7** (80 mg, 80%).

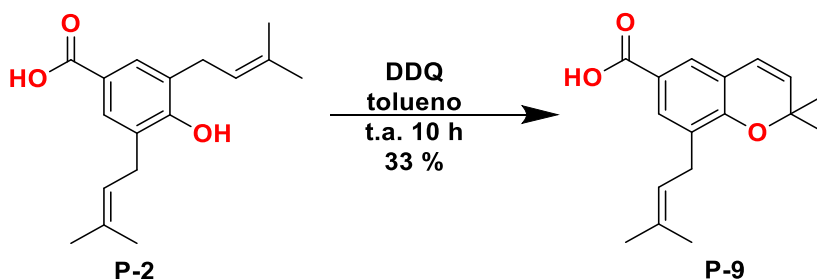
2.3.3.4 Síntesis de ácido 3,5-diisopentil-4-metoxibenzoico (**P-8**)



El compuesto **P-1** fue sometido a una reacción de hidrogenación adaptando la metodología descrita en la literatura (Zheng *et al.*, 1992). En un experimento típico a una solución de **P-1** (100 mg, 0,34 mmol) en metanol anhidro (4,0 mL) se le adicionó paladio soportado sobre carbono (4,60 mg, 0,04 mmol) y el recipiente luego se saturó con hidrógeno molecular. La mezcla de reacción resultante se agitó continuamente a temperatura ambiente durante 40 h. Posteriormente, la mezcla se filtró sobre papel Whatman cuantitativo y se lavó con DCM (3 x

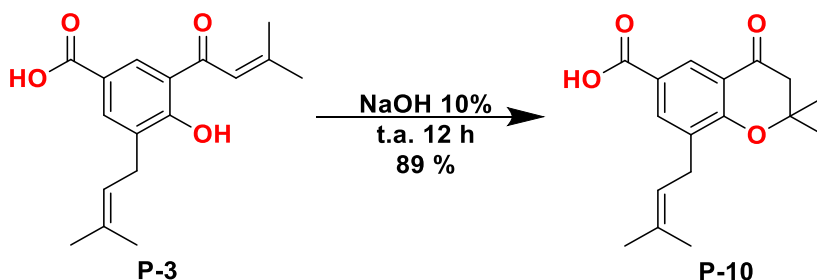
10 mL). El residuo resultante de la evaporación de los disolventes se purificó por CF empleando como fase móvil hexano-AcOEt (97:3), obteniéndose un aceite amarillo correspondiente a **P-8** (95,70 mg, 96%).

2.3.3.5 Síntesis del ácido 2,2-dimetil-8-(3',3'-dimetilalil)-2H-1-cromeno-6-carboxílico (**P-9**)



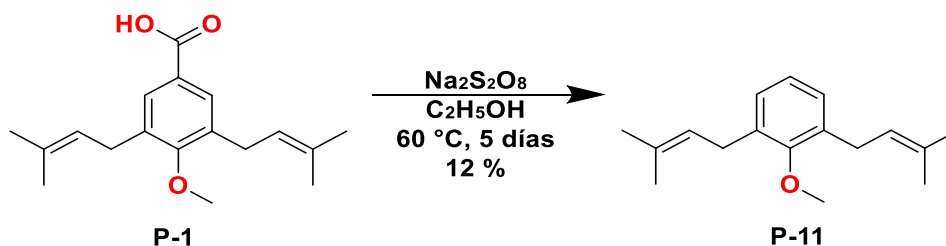
En un experimento adaptado del descrito en la literatura para compuestos similares (Keßberg *et al.*, 2018), a una solución del compuesto **P-2** (32 mg, 0,11 mmol) en tolueno (8,0 mL) se le adicionó DDQ (49,94 mg, 0,22 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 10 h a temperatura ambiente y luego el disolvente fue removido por destilación a presión reducida. El residuo resultante fue sometido a purificación por CF con un sistema de elución DCM-AcOEt (70:30), obteniéndose un sólido amarillo correspondiente a **P-9** (10 mg, 33%).

2.3.3.6 Síntesis del ácido 2,2-dimetil-8-(3',3'-dimetilalil)-4-oxocromano-6-carboxílico (**P-10**)



En un experimento adaptado del descrito en la literatura para compuestos similares (Iguchi *et al.*, 2014), se adicionaron dentro de un balón el compuesto **P-3** (40,2 mg, 0,13 mmol) y NaOH al 10% (2,0 mL, 0,01 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 12 h a temperatura ambiente y posteriormente se neutralizó añadiendo gotas de HCl al 10%, y se extrajo con AcOEt (4 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto obtenido se purificó por CF empleando un sistema de elución DCM-AcOEt (80:20), obteniéndose un sólido amarillo correspondiente a **P-10** (35 mg, 89%).

2.3.3.7 Síntesis de 2,6-bis(3',3'-dimetilalil)-1-metoxibenceno **P-11**



En un experimento adaptado del descrito en la literatura (Fang *et al.*, 2017), a una solución del compuesto **P-1** (100 mg, 0,34 mmol) en etanol (5,0 mL) se le adicionó persulfato de sodio (81,0 mg, 0,34 mmol). La mezcla de reacción fue agitada durante 5 días a una temperatura de $60\text{ }^\circ\text{C}$ y posteriormente se extrajo con DCM (4 x 25 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por CF empleando DCM-AcOEt (90:10) como sistema de elución, obteniéndose un sólido amarillo correspondiente a **P-11** (10 mg, 12%).

2.3.4 Evaluación de actividad antifúngica de los compuestos sintetizados y otros

La evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos sintetizados frente a *M. roreri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*, se realizó mediante el ensayo de inhibición del crecimiento micelial, descrito en el numeral 2.3.2 (Cosoveanu *et al.*, 2012; Hadacek & Greger, 2000). Para el estudio de relación estructura-actividad, se evaluaron algunos compuestos comerciales adquiridos en Sigma-Aldrich (USA) con subestructuras similares a los compuestos activos (fenol **P-12**, ácido benzoico **P-13**, ácido 4-hidroxibenzoico **P-14**, 4-hidroxibenzoato de metilo **P-15**, 4-hidroxibenzoato de etilo **P-16**, 4-hidroxibenzaldehído **P-17**, 4-metoxibenzaldehído **P-18**, 3,4,5-trimetoxibenzaldehído **P-19**). Adicionalmente, en el estudio se incluyeron algunos compuestos aislados previamente por el grupo de investigación de otras especies del género *Piper* con núcleos similares a los compuestos de origen natural obtenidos en el presente trabajo (4'-metilnaringenina **P-20**, pinocembrina **P-21**, ácido 5-(3'',3''-dimetilalil)-3-geranil-4-metoxibenzoico **P-22** y ácido 3-(3'-3'-dimetilalil)-4-metoxibenzoico **P-23**).

2.3.4.1 Aproximación de relación estructura-actividad

Para establecer la aproximación de relación estructura-actividad frente a *M. roreri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*, se realizaron comparaciones por tipo de metabolito secundario, cambios en los grupos funcionales y resultados de actividad antifúngica.

2.4 Estudio computacional para el desarrollo de un modelo farmacofórico

2.4.1 Modelado molecular

De acuerdo con los valores obtenidos de CI_{50} se seleccionaron las moléculas que presentaron los mejores resultados de actividad antifúngica y se clasificaron teniendo en cuenta el tipo de núcleo básico: derivados de ácido benzoico de cadena abierta y cíclicos, dihidrochalconas y flavanonas. Para el caso de los derivados de ácido benzoico de cadena abierta se seleccionó para *M. roreri* el compuesto **P-7**, para *F. solani* el compuesto **P-3** y para *Phytophthora sp.* el compuesto **P-2**, en donde se realizó un modelo de farmacóforo para cada hongo respectivamente. Para el caso de los derivados de ácido cíclicos se seleccionó el compuesto **P-9**, para las dihidrochalconas el compuesto **P-4** y para las flavanonas el compuesto **P-21**, en donde se realizó un solo modelo farmacóforo para los tres hongos por cada compuesto seleccionado respectivamente.

Seguido se dibujó cada una de las estructuras con el software *Free Maestro* y se optimizaron geoméricamente con el programa *Gaussian 16*. La optimización geométrica de cada molécula se hizo en dos etapas: primero se minimizó la energía mediante mecánica molecular con el campo de fuerza molecular de Merck (MMFF) y posteriormente por el método semiempírico parametrizado 3 (PM3), con el fin de establecer para cada molécula el conformero estable de mínima energía para su posterior análisis.

Las estructuras optimizadas fueron guardadas en formato .sdf y luego fueron subidas a la plataforma *ZINCPharmer* online, en donde fueron representados los respectivos farmacóforos de las estructuras seleccionadas. Se establecieron varias características farmacofóricas teniendo en cuenta el carácter hidrofóbico, donador y aceptor de enlaces de hidrógeno, ion positivo, negativo y carácter aromático.

2.4.2 Cribado virtual basado en el farmacóforo

Para realizar el cribado virtual en la plataforma *ZINCPharmer* online, basado en los farmacóforos generados para las moléculas seleccionadas, fue necesario desactivar algunas de sus características farmacofóricas para varias moléculas permitiendo visualizar y abarcar una mayor cantidad de moléculas en la base de datos de *ZINCPharmer*. Además, para la búsqueda se tuvo en cuenta el uso de varias librerías y filtros, cumpliendo con las condiciones de búsqueda establecidas. En la tabla 2-1 se describe las bases de datos y filtros utilizados para el cribado virtual para la identificación de la molécula con posible actividad antifúngica. Para cada molécula representada en la plataforma se realizó la selección de los primeros 15 compuestos, de 100 resultados que arroja el programa, utilizando como criterio de selección el menor valor de RMSD. Cada compuesto seleccionado de la base de datos se superpuso frente a la molécula modelo con el fin de comparar su similitud estructural (Koes & Camacho, 2012).

Tabla 2-1. Bases de datos y filtros utilizados en el cribado virtual.

Bases de datos utilizadas	Filtros utilizados
<i>ZINC Purchasable: Last Updated 12/20/14</i>	
<i>ZINC Natural Derivates: Last Updated 09/22/14</i>	Máximas conformaciones de Hits: 1
<i>ZINC Drug Database (Metabolites): Last Updated 09/22/14</i>	Máximas conformaciones de moléculas de Hits: 1
<i>ZINC Natural Products: Last Updated 09/23/14</i>	Máximo total de Hits: 100
	Máximo RMSD: 1
	Peso molecular: 100 a 600 g/mol
	Enlaces rotables: 1 a 4

De los 15 compuestos seleccionados se realizó una búsqueda de reportes sobre actividad biológica, específicamente antifúngica en las bases de datos de *SciFinder*, *ChEMBL* y *PubChem*, seleccionando 4 estructuras por grupo, teniendo en cuenta como criterio de selección su similitud estructural, menor valor de la desviación cuadrática media (RMSD) y reportes previos de actividad antifúngica. Finalmente se espera que la actividad de las moléculas seleccionadas frente a *M. royeri*, *F. solani* y *Phytophthora sp* sea mayor o igual a la de los compuestos de referencia usados para la generación de los farmacóforos.

3. Resultados y discusión

3.1 Estudio fitoquímico realizado de la parte aérea de *P. pesaresanum*

Del estudio fitoquímico realizado sobre la fracción de DCM proveniente del extracto etanólico de la parte aérea de *P. pesaresanum* condujo al aislamiento de cuatro compuestos, los cuales fueron identificados por métodos espectroscópicos y por comparación con los datos descritos en la literatura. Los compuestos aislados e identificados se ilustran en la figura 3-1 y corresponden a tres derivados de ácido benzoico, ácido 4-metoxinervogénico **P-1**, ácido nervogénico **P-2** y ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico **P-3** y una dihidrochalcona denominada 2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona **P-4**.

De los metabolitos aislados e identificados en la parte aérea de *P. pesaresanum*, este es el primer reporte de los compuestos **P-2**, **P-3** y **P-4** para la especie. El derivado de ácido benzoico denominado ácido 4-metoxinervogénico **P-1** ha sido previamente reportado en sus hojas (Nitola *et al.*, 2016). Todos los compuestos han sido identificados en otras especies del género *Piper* y están de acuerdo con la quimiotaxonomía del género. En algunas de sus especies es común la presencia de derivados de ácido benzoico que se caracterizan por sustituyentes oxigenados en la posición 4 y cadenas preniladas de 5 a 20 carbonos en las posiciones 3 y/o 5 sobre el anillo aromático (López *et al.*, 2010; Malami, 2012; Parmar *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 2006). De igual forma es común la presencia de dihidrochalconas en algunas especies del género *Piper* que se caracterizan porque en el anillo A se encuentran sustituyentes oxigenados en las posiciones 2', 4' y 6', mientras que su anillo B generalmente no se encuentra sustituido (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Mezrag *et al.*, 2017; Parmar *et al.*, 1997).

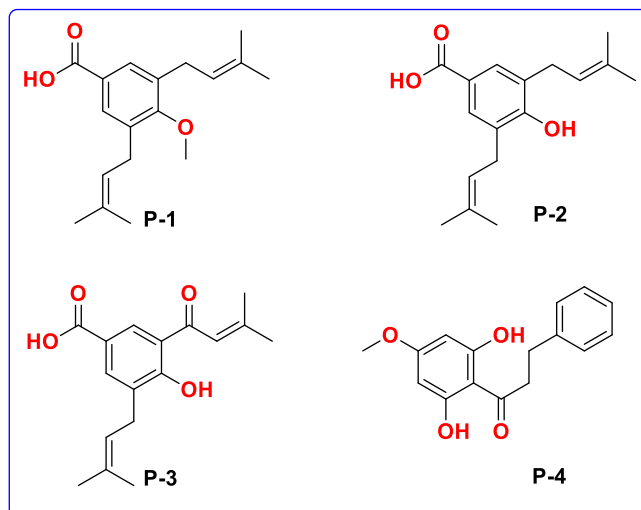


Figura 3-1. Compuestos aislados de la parte aérea de *P. pesaresanum*.

El ácido 4-metoxinervogénico **P-1** ha sido reportado en la familia Piperaceae en las especies *P. aduncum*, *P. hispidum*, *P. glabratum*, *P. acutifolium*, *P. dennisii* (Burke & Nair, 1986; Cabanillas *et al.*, 2012; Flores *et al.*, 2008; Friedrich *et al.*, 2005). De un estudio realizado sobre sustancias provenientes de *P. pesaresanum* se ha determinado de forma cualitativa que el extracto, algunas fracciones y el compuesto **P-1**, tienen potencial para inhibir la enzima acetilcolinesterasa (Nitola *et al.*, 2016). En otras investigaciones se le ha determinado a **P-1** la actividad antiparasitaria frente a *Leishmania amazonensis* y *Plasmodium falciparum*, con valores de CI_{50} de 20,8 y 261,5 μ M, respectivamente (Cabanillas *et al.*, 2012). En otro estudio para **P-1** se le determinó la actividad insecticida mostrando porcentajes de inhibición del 20% frente a *Tribolium confusum*, un gorgojo que infesta a granos almacenados (Nair *et al.*, 1986). También se le ha determinado actividad molusquicida frente a *Biomphalaria glabrata* presentando inhibición a una cantidad de 10 μ g/mL por el método de bioautografía directa (Orjala *et al.*, 1993). Finalmente, a **P-1** y **P-2** se les ha evaluado el efecto citotóxico frente a células de carcinoma de vejiga de humano en donde se determinó que estos derivados de ácidos no presentan efectos citotóxicos ($CI_{50} > 50$ mg/mL) (Friedrich *et al.*, 2005).

El ácido nervogénico **P-2** ha sido reportado en especies de las familias Orchidaceae, Myrsinaceae y Piperaceae. En la familia Piperaceae se ha reportado en *P. glabratum*, *P. acutifolium*, *P. hispidum*, *P. aduncum*, *P. dennisii*, *P. elongatum* (Cabanillas *et al.*, 2012; Masuoka *et al.*, 2003). En investigaciones previas para **P-2** se le determinó actividad antibacteriana cualitativa por el método de bioautografía frente a *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y

Escherichia coli, respectivamente (Orjala *et al.*, 1993). En otro estudio se estableció la actividad antiparasitaria frente a *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum* con valores de CI_{50} de 43,3, 34,1 40,0, >20 y >10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Flores *et al.*, 2008). A **P-2** también se le ha evaluado la actividad antioxidante por el método colorimétrico con tiocianato férrico mostrando un efecto moderado a una concentración de 0,5 y 0,02 μM . Adicionalmente, se le determinó su potencialidad para inhibir la enzima tirosinasa dado que los resultados encontrados indican que se presenta una inhibición a una concentración de 0,1 mM comparable con el control positivo utilizado correspondiente al ácido kójico (Masuoka *et al.*, 2003).

El ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico **P-3** ha sido reportado en las especies *P. heterophyllum*, *P. aduncum*, *P. dennisii* (Flores *et al.*, 2009; Orjala *et al.*, 1993). En investigaciones previas para **P-3** presentó actividad antiparasitaria frente a *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani*, con valores de CI_{50} entre 17,8 y 63,1 $\mu\text{g/mL}$ (Flores *et al.*, 2009). Finalmente, **P-3** ha presentado actividad antibacteriana de forma cualitativa por el método de bioautografía frente a *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* a una concentración de 0,9 $\mu\text{g/mL}$ (Orjala *et al.*, 1993).

El compuesto 2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona **P-4** ha sido reportado en las familias Fabaceae, Salicaceae, Francoaceae, Zingiberaceae, Annonaceae y Piperaceae. En la familia Piperaceae se ha reportado en *P. mollicomum*, *P. lhotzkyanum*, *P. hispidum*, *P. aduncum*, *P. dennisii*, *Piper hostmannianum* var. *berbicense*, *P. elongatum* y *P. longicaudatum* (Hermoso *et al.*, 2003; Joshi *et al.*, 2001; Lago *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 1986; Portet *et al.*, 2007). De un estudio realizado para **P-4** proveniente de *P. mollicomum* y *P. lhotzkyanum*, presentó actividad antifúngica frente a *Cladosporium cladosporoides* y *C. sphaerospermum*, con valores de cantidad mínima inhibitoria (MIQ) de 5,0 y 10,0 μg , respectivamente (Lago *et al.*, 2007). A **P-4** se le ha determinado actividad insecticida frente a *Tribolium confusum* con porcentajes de inhibición superiores al 20% (Nair *et al.*, 1986). También se le ha determinado su actividad frente a *Plasmodium falciparum* con valores de CI_{50} de 12,69 μM (Portet *et al.*, 2007), y frente a *Leishmania braziliensis*, *L. tropica*, *L. infantum* con valores de CI_{50} de 27,04, 21,29 y 15,30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Hermoso *et al.*, 2003). Finalmente, por el método de DPPH a una concentración de 0,2 μM se le ha determinado su potencial aplicación para eliminar de radicales libres (Masuoka *et al.*, 2003).

En un estudio realizado con *P. dennisii* y *P. aduncum* se aislaron los compuestos **P-1**, **P-2**, **P-3** y **P-4**, y se determinó la actividad frente a *Leishmania amazonensis* con valores de CI_{50} de 244,6, 261,5, 112,1 y 183,4 μM , respectivamente, encontrándose que tanto los derivados como la dihidrochalcona presentaron moderada actividad comparada con la anfotericina B utilizada como control positivo con un CI_{50} de 0,15 μM (Cabanillas *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que, aunque compuestos similares a los aislados han presentado actividad antifúngica frente a diversos hongos fitopatógenos, no se encontraron reportes de este tipo para los compuestos aislados e identificados en este trabajo.

3.1.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados

Los compuestos **P-1**, **P-2** y **P-3** se obtuvieron como sólidos cristalinos de color blanco que en CCD se caracterizaron por la coloración azul producida al ser revelados con el reactivo de vainillina, siendo esto un indicativo de la posible presencia de derivados de ácido benzoico prenilados (Parra, 2019). Los espectros RMN para **P-1** a **P-3** presentados en el anexo 1 (figura 4-1 a figura 4-6) muestran perfiles similares para estos compuestos, con señales características de derivados de ácido benzoico prenilados reportados en especies del género *Piper*. (Hermoso *et al.*, 2003; Orjala *et al.*, 1993)

Del análisis de RMN para el compuesto **P-1** se determinó la presencia de un anillo aromático 1,3,4,5-tetrasustituido por la señal en RMN 1H con δ_H 7.80 (s, 2H) y las señales en APT con δ_C 161.2 (C), 133.4 (C), 130.4 (CH), 125.1 (C). Los sustituyentes sobre el anillo aromático correspondieron a un grupo carboxilo por la señal en APT con δ_C 172.2 (C), un grupo metoxilo por las señales en RMN 1H con δ_H 3.78 (s, 3H) y en APT por δ_C 61.1 (OMe), y de dos grupos 3',3'-dimetilalilo por las señales en RMN 1H con δ_H 5.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.40 (d, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.76 (s, 6H), 1.75 (s, 6H) junto con las señales en APT de δ_C 135.3 (C), 122.4 (CH), 28.5 (CH₂), 25.9 (CH₃) y 18.0 (CH₃). Del análisis anterior y por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura se identificó al compuesto **P-1** como ácido 4-metoxinervogénico (Orjala *et al.*, 1993).

El compuesto **P-2** presenta un perfil en RMN (ver anexo 1 figura 4-3 vs figura 4-1) similar al del compuesto **P-1**. La diferencia en sus espectros se observa en que para **P-2** no se observa la señal característica del grupo metoxilo en RMN 1H (δ_H 3.78 (s, 3H)), pero si se mantiene el

carbono aromático oxigenado con señal en δ_c 158.0 (C), lo que sugiere la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 4 del anillo aromático. Por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura se identificó al compuesto **P-2** como ácido nervogénico (Orjala *et al.*, 1993).

El compuesto **P-3** presenta un perfil en RMN (ver anexo 1 figura 4-5 vs figura 4-3) similar a **P-2**, a excepción de que en que **P-3** una de las cadenas preniladas contiene un grupo carbonilo y que se evidencia por las señales en RMN ^1H con δ_H 6.88 (s, 1H), 2.24 (s, 3H), 20.9 (s, 3H) y las señales en APT con δ_c 196.0 (C), 159.8 (C), 119.6 (CH), 28.4 (CH₃), 21.6 (CH₃). Adicionalmente, debido a la presencia del grupo carbonilo cerca de un grupo hidroxilo fenólico se observa la presencia en RMN ^1H de la señal con δ_H 13.79 (s, 1H) característico de un protón quelatado. Del análisis anterior y por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura se identificó al compuesto **P-3** como ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico (Orjala *et al.*, 1993).

El compuesto **P-4** se obtuvo como un sólido amorfo de color blanco que en CCD produjo un color amarillo fluorescente al ser observado en luz UV de 365 nm, luego de ser revelado con el reactivo de productos naturales (NP/PEG), lo que es indicativo de que puede corresponder a un flavonoide (Wagner *et al.*, 1984). Del análisis de RMN (ver anexo 1 figuras 4-7 y 4-8) para el compuesto **P-4** se observan señales que indican que corresponde a un flavonoide tipo dihidrochalcona por las señales en RMN ^1H con δ_H 3.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H) y las señales en APT con δ_c 206.2 (C), 46.5 (CH₂), 31.3 (CH₂). En el anillo B no se encuentran sustituyentes alquílicos ni oxigenados, por las señales que se observan en RMN ^1H con δ_H 7.28 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H), 7.20-7.14 (m, 1H) y las señales en APT con δ_c 142.9 (C), 129.3 (CH), 129.2 (CH), 126.7 (CH). En el anillo A se determinó la presencia de grupos hidroxilos en la posición 2' y 4', por la señal en RMN ^1H con δ_H 11.81 (s, 1H) y señales en APT con δ_c 166.9 (C) y 165.2 (C), y de un grupo metoxilo en la posición 4' por la señal en RMN ^1H con δ_H 3.79 (s, 3H) y la señal en APT con δ_c 55.8 (OMe). De acuerdo al análisis anterior y por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura se identificó al compuesto **P-4** como 2', 6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona (Hermoso *et al.*, 2003).

3.2 Estudio de la relación estructura-actividad de constituyentes de *P. pesaresanum*

A los compuestos **P-1**, **P-2**, **P-3** y **P-4** se les evaluó la actividad antifúngica frente a *Moniliophthora roreri*, *Fusarium solani* y *Phytophthora sp.*, por medio del ensayo de inhibición de crecimiento micelial empleando concentraciones entre 200 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$ para determinar su CI_{50} , las cuales se presentan en la tabla 3-1, donde se puede observar que, sobre los tres hongos, ninguno de los compuestos causó una inhibición superior a la obtenida con el control positivo Mancozeb.

Sobre *M. roreri* se encuentran valores de CI_{50} de 56,07; 97,42; 44,40 y 63,02 μM , respectivamente (**P-1** a **P-4**), siendo el compuesto **P-3** el que presentó la mayor actividad sobre este hongo, que corresponde al derivado de ácido denominado ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico. En el caso de *F. solani* se obtuvieron valores de CI_{50} de 94,27; 50,85; 32,49; 34,30 μM , respectivamente (**P-1** a **P-4**), encontrándose que en este caso también fue el compuesto **P-3** el más activo. Para *Phytophthora sp.* presentándose obtuvieron valores de CI_{50} de 43,07, 31,61, 83,34, 26,72 μM , respectivamente (**P-1** a **P-4**). En este caso el compuesto que presento mayor actividad fue el **P-4** que corresponde a la dihidrochalcona denominada como 2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona. Es importante destacar que no hay reportes de actividad antifúngica para ninguno de los compuestos sobre los hongos evaluados, siendo los resultados de esta investigación el primer de reporte de esta actividad.

Para establecer algunas aproximaciones de relación estructura-actividad se realizaron la síntesis de derivados a partir de los compuestos naturales bioactivos, con el fin de modificar los grupos funcionales y determinar la influencia de estas modificaciones sobre la actividad antifúngica frente a los tres hongos evaluados. Las metodologías utilizadas fueron adaptadas de la literatura para compuestos similares. La elucidación estructural de los compuestos se realizó por medio de técnicas espectroscópicas y en algunos casos por comparación con los datos reportados en la literatura. En el Anexo 2 se encuentran los datos espectroscópicos para cada uno de los productos obtenidos.

El derivado de ácido benzoico prenilado **P-1** fue sometido a reacciones de hidrogenación, metilación y descarboxilación, las cuales se ilustran en la figura 3-2. De esta forma se realizó la

reducción de los dobles enlaces presentes en las cadenas preniladas ubicadas en la posición 3 y 5 del anillo aromático de **P-1** y para lo cual se utilizaron las condiciones típicas de una hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C, lo que permitió la obtención con buen rendimiento del compuesto **P-8** (Zheng *et al.*, 1992). Al someter a **P-1** a condiciones de metilación en presencia de CH₃I, KOH y DMSO se obtuvo el éster metílico **P-7** en buen rendimiento (Ávila & Martínez, 2001). Finalmente para establecer la influencia del grupo carboxilo en la actividad antifúngica se sometió a **P-1** a una descarboxilación en presencia de persulfato de sodio, lo que permitió la obtención de **P-11** (Fang *et al.*, 2017). Este es el primer reporte para los compuestos **P-8** y **P-11**, mientras que **P-7** ya había sido previamente reportado en *P. aduncum* (Orjala *et al.*, 1993). Al compuesto **P-7** se le ha determinado actividad antimicrobiana frente a *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* con valores de CMI de 12,9 y 52,3 µg, respectivamente (Orjala *et al.*, 1993).

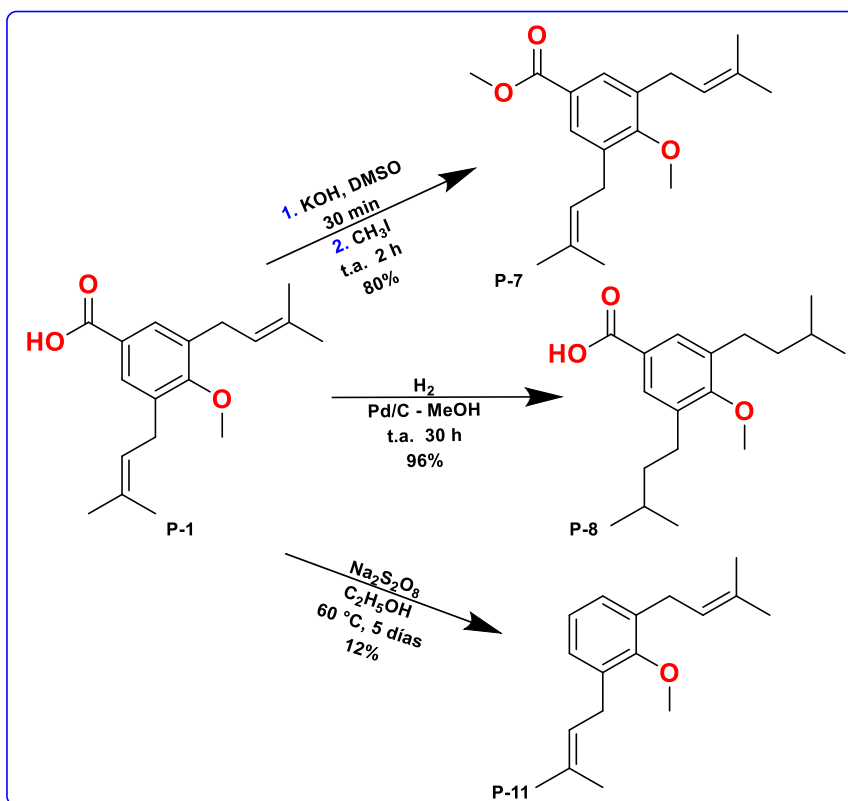


Figura 3-2. Síntesis de derivados a partir del compuesto **P-1**.

El compuesto **P-2** fue sometido a una ciclación oxidativa ilustrada en la figura 3-3, para lo cual se aprovechó el hidroxilo fenólico en posición 4 y el doble enlace de una cadena de prenilo en posición adyacente. La reacción se llevó a cabo en presencia de 2,3-dicloro-4,5-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), lo que permitió la formación del cromeno **P-9** con rendimientos comparables a los reportados en la literatura (Keßberg *et al.*, 2018). Este compuesto ha sido previamente reportado en especies del género *Piper* como es el caso de *P. dennisii*, *P. aduncum*, *P. mollicomum*, *P. ihotzkyanum*. De investigaciones realizadas se ha determinado que posee potencial leishmanicida y antifúngico (Cabanillas *et al.*, 2012; Lago *et al.*, 2007).

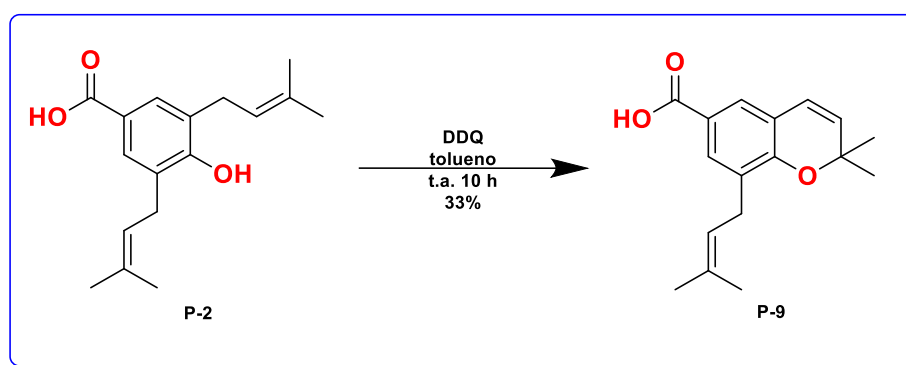


Figura 3-3. Síntesis de derivados a partir del compuesto **P-2**.

Al derivado de ácido **P-3** se le realizó mediante una ciclación por adición intramolecular oxo-Michael para la formación de la 4-cromanona **P-10**, en la que se aprovechó el hidroxilo fenólico en posición 4 y el grupo carbonilo α, β insaturado en posición adyacente (Iguchi *et al.*, 2014; Parra, 2019). La síntesis se llevó a cabo en presencia de NaOH y en condiciones suaves de reacción lo que permitió obtener con buenos rendimientos a **P-10**, el cual no había sido reportado previamente en literatura.

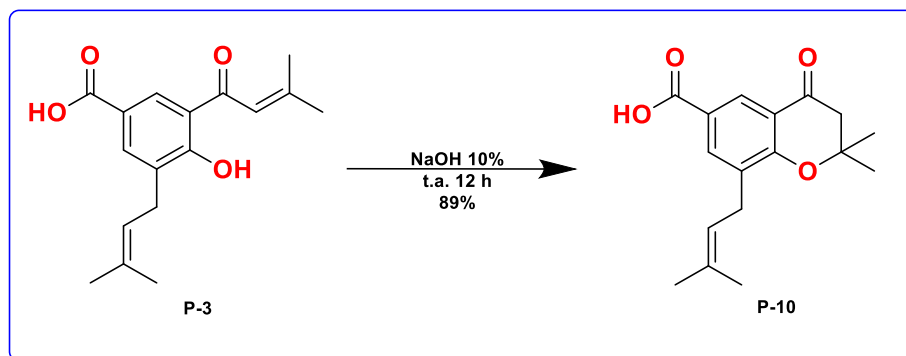


Figura 3-4. Síntesis de derivados a partir del compuesto **P-3**.

La dihidrochalcona **P-4** fue sometida a reacciones de metilación y reducción, las cuales se ilustran en la figura 3-5. La metilación se realizó para los hidroxilos libres en las posiciones 2' y 6' en el anillo A de **P-4**, en presencia de CH_3I y K_2CO_3 , lo que permitió la obtención con buen rendimiento el compuesto **P-5** (Suryaprakasa & Reddy, 1940). Adicionalmente, para **P-4** se realizó la reducción del grupo carbonilo a un grupo metileno, en presencia de amalgama de zinc y medio ácido, lo que permitió la obtención de **P-6** (Vogel, 1974). Este es el primer reporte para el compuesto **P-6**, mientras que **P-5** ya había sido previamente reportado en *P. hispidum* Kunth. Al compuesto **P-5** se le ha reportado actividad de letalidad frente a *Artemia salina* (Plazas *et al.*, 2008).

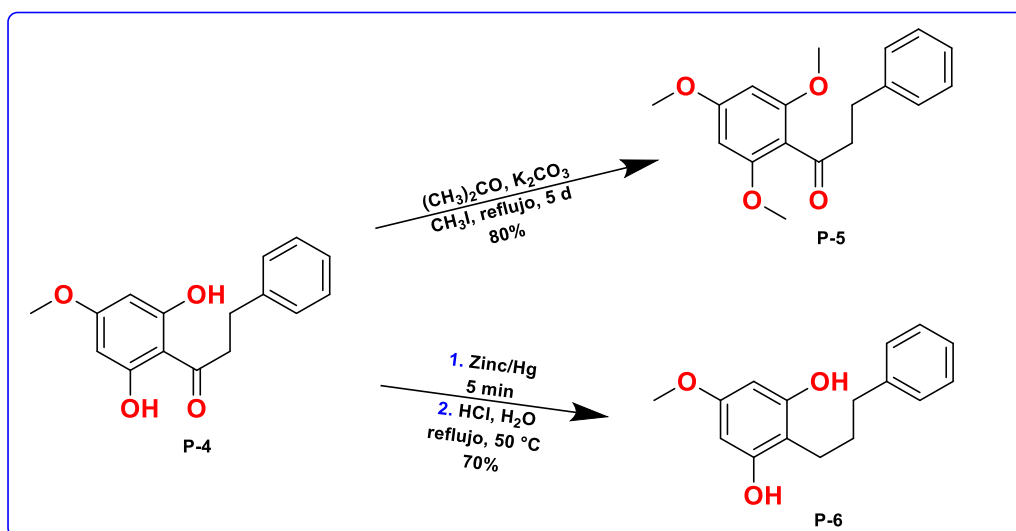


Figura 3-5. Síntesis de derivados a partir de **P-4**.

3.2.1 Aproximación de relación de estructura-actividad

Con los compuestos sintetizados P-5 a P-11, algunos compuestos obtenidos comercialmente P-12 a P-19 y otros compuestos aislados del género *Piper* en el grupo de investigación P-20 a P-23 que contienen estructuras similares a la de los aislados, se realizó un estudio de actividad antifúngica sobre los hongos de interés, empleando una concentración máxima de 200 µg/mL. En la figura 3-6 se presentan las estructuras de los 23 compuestos que fueron evaluados frente a *Moniliophthora roreri*, *Fusarium solani* y *Phytophthora sp.*

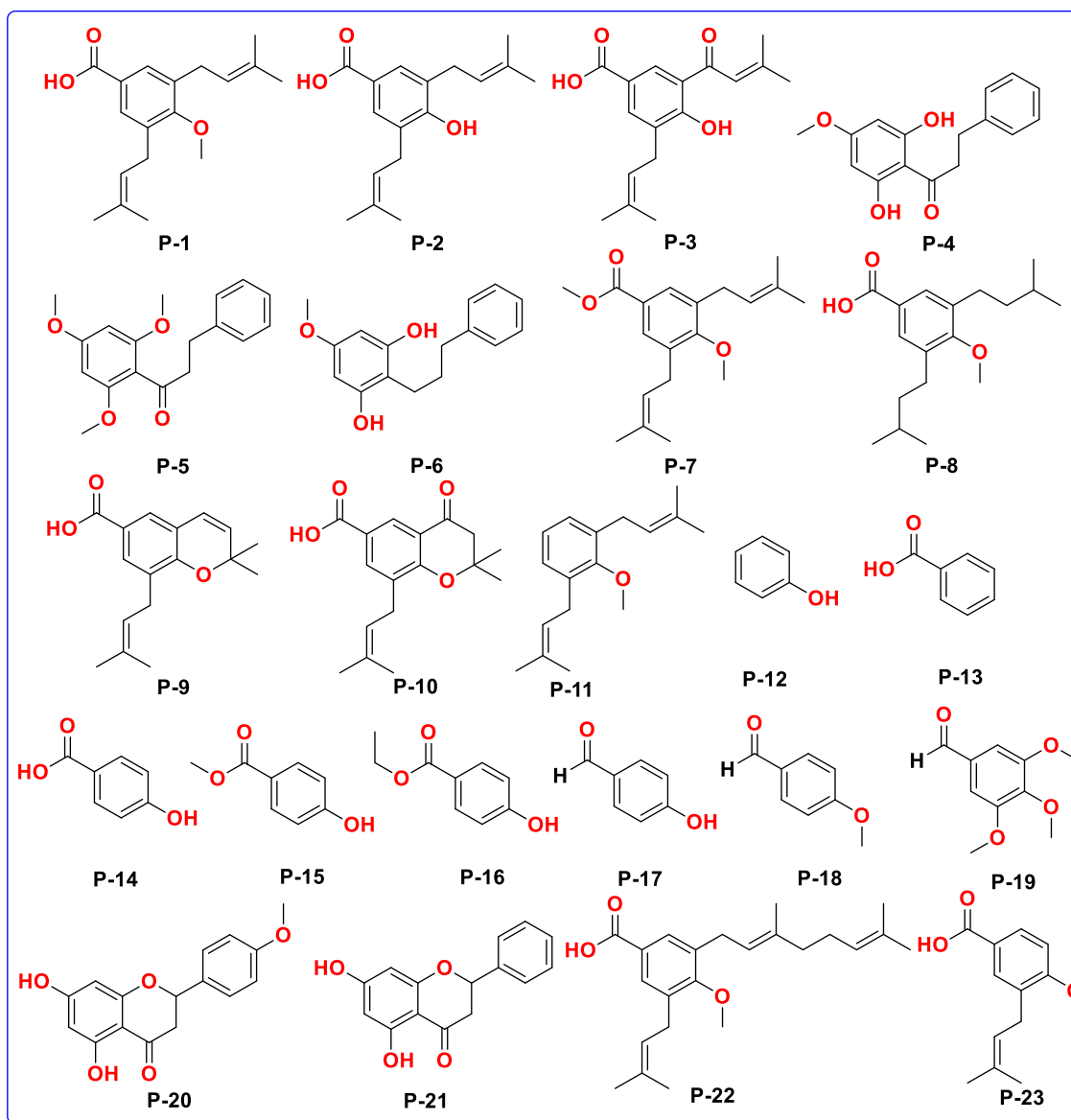


Figura 3-6. Compuestos evaluados frente a *M. roreri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*

Los resultados de actividad antifúngica de los compuestos **P-5** a **P-23** a la máxima concentración se presentan en la figura 3-7. Se observa que de los 19 compuestos evaluados frente a *M. rozeri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*, 12 presentaron un porcentaje de inhibición superior al 65% sobre los hongos de interés, aunque es importante aclarar que el compuesto **P-23** solo logró inhibir el crecimiento de *F. solani* en un 44,19%.

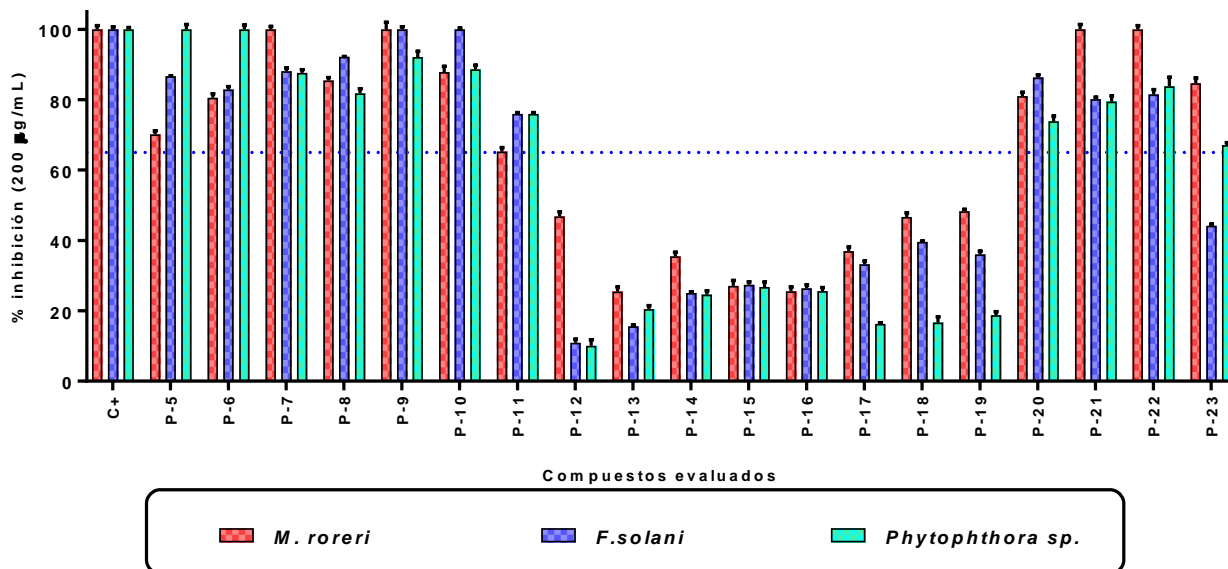


Figura 3-7. Resultados del porcentaje de inhibición de los compuestos evaluados frente a *M. rozeri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*

Los compuestos que causaron un 100% de inhibición del crecimiento de *M. rozeri* fueron **P-7**, **P-9**, **P-21** y **P-22**, destacándose la presencia de dos naturales (**P-21** y **P-22**) y dos provenientes de la síntesis (**P-7** y **P-9**). Para *F. solani* los compuestos **P-3**, **P-4**, **P-9** y **P-10** fueron los más activos, causando inhibiciones del 100%, los cuales corresponden a dos compuestos de origen natural (**P-3** y **P-4**) y dos provenientes de la síntesis (**P-9** y **P-10**). Para *Phytophthora sp.* los compuestos **P-2**, **P-4**, **P-5** y **P-6** inhibieron en 100% el crecimiento de este patógeno, en este caso también se encuentra que dos de estos compuestos son naturales (**P-2** y **P-4**) y dos sintéticos (**P-5** y **P-6**). En la figura 3-7 también es posible observar que los compuestos aromáticos **P-12** a **P-19** presentaron una inhibición inferior al 50% sobre los tres hongos, lo que indica que los grupos prenilo en las posiciones **C-3** y **C-5** en el anillo aromático son importantes para poder ejercer el efecto antifúngico.

Con los compuestos que causaron porcentajes de inhibición superiores o iguales a 65% se realizó el estudio de actividad para determinar su CI_{50} . En la tabla 3-1 se relacionan los valores de concentración expresados en μM para todos los compuestos evaluados sobre cada uno de los hongos, ordenados de mayor a menor actividad antifúngica.

Tabla 3-1. Resultados de CI_{50} para los compuestos naturales y sintéticos.

Comp.	<i>M. roseri</i>	Comp.	<i>F. solani</i>	Comp.	<i>Phytophthora sp.</i>
	$CI_{50} \mu M$		$CI_{50} \mu M$		$CI_{50} \mu M$
P-9	2,95 ± 0,61	C+	10,16 ± 0,70	C+	9,90 ± 0,73
P-22	3,25 ± 0,63	P-3	32,49 ± 0,94	P-4	26,72 ± 1,49
C+	4,94 ± 0,55	P-4	34,30 ± 0,22	P-6	29,02 ± 1,16
P-7	6,68 ± 1,19	P-9	35,07 ± 0,72	P-2	31,61 ± 0,45
P-21	19,35 ± 1,44	P-10	35,96 ± 0,50	P-5	32,23 ± 0,92
P-8	40,13 ± 0,97	P-22	41,40 ± 0,97	P-22	34,27 ± 1,33
P-10	43,09 ± 0,53	P-7	45,52 ± 0,42	P-10	35,91 ± 0,51
P-3	44,40 ± 2,29	P-20	48,53 ± 0,65	P-8	38,80 ± 1,91
P-20	49,02 ± 0,85	P-2	50,85 ± 0,70	P-9	39,06 ± 1,72
P-1	56,07 ± 1,49	P-5	68,03 ± 0,22	P-1	43,07 ± 2,48
P-4	63,02 ± 0,76	P-8	80,96 ± 0,74	P-7	45,30 ± 0,43
P-23	78,72 ± 1,47	P-1	94,27 ± 0,19	P-23	60,69 ± 0,69
P-2	97,42 ± 0,72	P-6	101,8 ± 0,18	P-20	80,48 ± 1,13
P-5	97,96 ± 0,89	P-21	115,50 ± 1,08	P-3	83,34 ± 0,98
P-11	216,60 ± 1,44	P-11	124,60 ± 0,52	P-21	107,72 ± 1,40
P-6	243,10 ± 0,18	ND	ND	P-11	496,01 ± 0,53

Los valores de CI_{50} (μM) están expresados como $\pm DS$ (Desviación Estándar), donde $n = 4$, Comp. = compuesto, C+ = control positivo Mancozeb, ND = No determinado ($P < 0.05$).

Es importante resaltar que para ninguno de los compuestos evaluados (**P-1** a **P-23**) se ha reportado la actividad antifúngica sobre los hongos estudiados, haciendo que los resultados presentados en este trabajo constituyan el primer reporte de esta actividad para dichos compuestos. A continuación, se describe un análisis preliminar cualitativo de relación estructura-actividad teniendo en cuenta los resultados para cada hongo y comparando la influencia de los valores de CI_{50} a nivel estructural.

3.2.1.1 Estudio de relación estructura-actividad para *M. roseri*.

Al analizar los resultados de actividad antifúngica obtenidos para los compuestos evaluados frente a *M. roseri* se puede deducir que los compuestos más activos fueron **P-9** de origen natural y **P-22** de origen sintético con valores de CI_{50} de 2,95 y 3,25 μM , respectivamente. Estos dos compuestos superaron el valor de actividad del control positivo Mancozeb, que tiene una CI_{50} de 4,94 μM . Estos compuestos corresponden al grupo de los derivados de ácido benzoico de tipo cíclico y de cadena abierta, respectivamente. Para este tipo compuesto no hay reportes de estudios de actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos del cacao por lo cual este sería el primer reporte de actividad frente a *M. roseri*. No obstante, se han reportado estudios

previos para compuestos de tipo cromeno en donde han determinado la actividad antifúngica frente a *F. oxysporum* f. sp. y *B. cinerea* por el método de bioautografía directa presentando un valor de cantidad mínima inhibitoria MIQ de 1 y 100 µg respectivamente, superior al control utilizado Benomyl (Parra *et al.*, 2011).

A continuación, para realizar un análisis cualitativo preliminar de relación estructura-actividad se dividirán los resultados teniendo en cuenta cada uno de los grupos de metabolitos establecidos clasificados como derivados de ácido benzoico y flavonoides.

Para el grupo de los derivados de ácido benzoico, al comparar la actividad exhibida por **P-1** con la de **P-2** se observa que la presencia del grupo metoxilo en la posición **C-4** del anillo aromático favorece la actividad, comparando ahora **P-2** con **P-3** se encuentra que la presencia del grupo carbonilo en la cadena lateral de prenilo favorece la actividad con respecto a **P-1** y **P-2**. Al comparar **P-1** con **P-9**, se encuentra que la formación del ciclo tipo cromeno conlleva a un aumento considerable del efecto antifúngico. Al comparar **P-10** con **P-3** se observa que la ciclación para la formación de la respectiva 4-cromanona no presenta una variación significativa de actividad, por lo que se puede sugerir que la presencia del carbonilo es muy importante para mantener la actividad independientemente si el derivado de ácido esta ciclado o si está abierto. Se observa que la presencia del grupo carboxilo en la posición **C-1** es indispensable para que haya actividad antifúngica, debido a que **P-11** perdió totalmente la actividad al realizar la descarboxilación. También se observa que entre más larga sea la cadena de tipo prenilo ubicada en las posiciones **C-3** y **C-5** del anillo aromático se favorece la actividad de manera importante, hecho que se evidencia al comparar la actividad exhibida por **P-22** con la actividad de **P-1** y **P-2**. Se evidencia también que para **P-23** la ausencia de la cadena en la posición *meta* con respecto al grupo funcional ácido desfavorece la actividad. Se observa también que para **P-7** la formación del éster metílico del derivado de ácido benzoico favorece la actividad comparado con **P-1**. Para **P-8** vs **P-1**, **P-2** y **P-3** compuestos naturales se observa que la reducción de los dobles enlaces mediante la hidrogenación catalítica favorece la actividad moderadamente, pero se determina que la actividad puede ser comparable con **P-7** cuando se da la formación del éster.

Para el grupo de los flavonoides, al comparar las CI_{50} de las dihidrochalconas **P-4** y **P-6**, se encuentra que la actividad se desfavorece de manera sustancial al perder el grupo carbonilo. Se observa que para **P-5** vs **P-4** la presencia de los grupos metoxilo en las posiciones 2', 4' y 6'

en el anillo A de la dihidrochalcona desfavorece la actividad, pero se puede deducir que la presencia de grupos hidroxilos en las mismas posiciones puede aumentar la actividad. Al comparar la actividad de **P-20** con la de **P-4**, se observa que el flavonoide ciclado de tipo flavanona favorece la actividad. Además, se observa que al comparar **P-20** y **P-21** la sustitución del anillo B en la posición **C-4** por un grupo metoxilo desfavorece la actividad, lo cual permite deducir que las sustituciones en el anillo B no son importantes para ejercer el efecto antifúngico sobre *M. roseri*.

3.2.1.2 Estudio de relación estructura-actividad para *F. solani*.

Al realizar la comparación de los compuestos evaluados frente a *F. solani* se puede deducir que los compuestos más activos fueron **P-3** y **P-4** ambos de origen natural con valores de CI_{50} de 32,49 y 34,30 μM , respectivamente. A diferencia de lo observado para *M. roseri*, en este caso los dos compuestos más activos no superaron el valor de actividad del control positivo Mancozeb con un valor de CI_{50} de 10,16 μM . A continuación, para realizar un análisis de relación estructura-actividad se dividirán los resultados teniendo en cuenta cada uno de los grupos de metabolitos establecidos clasificados como derivados de ácido benzoico y flavonoides.

Para el grupo de los derivados de ácido benzoico, al comparar las CI_{50} de **P-3** y **P-1**, se encuentra que el grupo carbonilo presente en la cadena de prenilo en la posición **C-3** del anillo aromático favorece la actividad. Con respecto a **P-1** y **P-2**, se evidencia que la presencia del grupo hidroxilo en posición *para* con respecto al grupo carboxilo favorece también la actividad. Para **P-8**, **P-9** y **P-10** el valor de actividad es comparable debido a que el derivado de ácido abierto como en su forma cíclica presentan los valores de actividad en un mismo rango. Al comparar la actividad de **P-9** y **P-10** con la de **P-1** y **P-2**, es posible observar que la formación tanto del cromeno como de la 4-cromanona favorecen considerablemente la actividad. Comparando ahora **P-1** con **P-7**, se encuentra que la formación del éster metílico del derivado de ácido favorece la actividad. También se observa que al realizar las reducciones de los dobles enlaces mediante la hidrogenación catalítica (**P-8** vs **P-1** y **P-2**) no influye en la actividad debido a que los valores de CI_{50} no presentan una variación considerable. Se observa que la pérdida del grupo carboxilo de la posición **C-1** del anillo aromático desfavorece completamente la actividad comparada con los derivados de ácido benzoico (**P-11** vs **P-1** a **P-3**). Al comparar **P-22** y **P-1** se determina que la longitud de la cadena tipo prenilo influye en el

aumento de actividad, esto se confirma con **P-23** que al no presentar la cadena de tipo prenilo en la posición **C-3** del anillo aromático no presentó actividad frente a este hongo.

Para el grupo de los flavonoides, al comparar la actividad exhibida por las dihidrochalconas **P-4** vs **P-6** se encuentra que la actividad se desfavorece de manera sustancial al perder el grupo carbonilo, por lo cual es importante que esté presente para exhibir el efecto antifúngico. También se encuentra, al comparar **P-4** vs **P-5**, que la sustitución de los grupos carboxilo en las posiciones 2', 4' y 6' en el anillo A no favorece la actividad. Finalmente, al comparar **P-20** vs **P-21**, se evidencia que las sustituciones en el anillo B de tipo metoxilo hace que disminuya la actividad considerablemente.

3.2.1.3 Estudio de relación estructura-actividad para *Phytophthora sp.*

Al realizar la comparación de los compuestos evaluados frente a *Phytophthora sp.* se puede deducir que los compuestos más activos fueron **P-4** de origen natural y **P-6** de origen sintético con valores de CI_{50} de 26,72 y 29,02 μM , respectivamente. Se observa que estos dos compuestos no superaron el valor de actividad del control positivo Mancozeb con un valor de CI_{50} de 9,90 μM . A continuación, para realizar un análisis de relación estructura-actividad se dividirán los resultados teniendo en cuenta cada uno de los grupos de metabolitos establecidos clasificados como derivados de ácido benzoico y flavonoides.

Para el grupo de los derivados de ácido benzoico se observa que, comparando **P-2** vs **P-1**, la presencia del grupo hidroxilo libre en posición *para* con respecto al grupo ácido favorece la actividad. Caso contrario a la tendencia presentada para los anteriores hongos, la presencia del grupo carbonilo en la cadena de prenilo desfavorece sustancialmente la actividad, hecho que es evidente al comprar las CI_{50} obtenidas para **P-3** vs **P-2**. Al comparar **P-10** y **P-3** se encuentra que la presencia del grupo carbonilo aumenta el efecto antifúngico siempre y cuando se encuentre ciclada en su forma 4-cromanona. Al comparar la actividad de **P-22**, **P-9** y **P-10** con la de **P-2**, se puede establecer que tanto la longitud de la cadena tipo prenilo como la ciclación para la formación del cromeno y la 4-cromanona presentan un efecto leve de actividad antifúngica, pues se encuentran que los CI_{50} son muy cercanos y no se pueden diferenciar de una forma apreciable. Al comparar **P-22** con **P-23** se observa que la presencia de la cadena tipo prenilo en la posición *meta* con respecto al grupo ácido favorece la actividad. La presencia del grupo funcional ácido en la posición **C-1** del anillo aromático es de alta

importancia para ejercer la actividad antifúngica, hecho que se hace evidente al observar que la CI_{50} encontrada para **P-11** fue la más alta. Comparando ahora **P-1** con **P-7**, se observa que el éster metílico del ácido no influye en la actividad debido a que no hay una variación significativa en los valores de CI_{50} . Al comparar **P-8** con **P-1** se observa que la hidrogenación de los dobles enlaces favorece la actividad siempre y cuando se encuentre un hidroxilo libre en posición *orto* a la cadena de isopentilo, teniendo en cuenta que cuando hay un sustituyente de tipo metoxilo en esa misma posición la actividad disminuye.

Para el grupo de los flavonoides se observa que, al comparar la actividad de las dihidrochalconas **P-4** vs **P-6**, la actividad se favorece con o sin la presencia del grupo carbonilo, teniendo en cuenta que los valores se encuentran en un rango de 26,72 y 29,02 μM , respectivamente. Comparando a ahora **P-5** con los compuestos anteriores, se puede determinar que nuevamente la presencia de los grupos metoxilos en la posición 2', 4' y 6' del anillo **A** hacen que disminuya la actividad. Se observa que la formación de los compuestos de tipo flavanona (**P-20** y **P-21**) no favorece la actividad antifúngica. También se observa que la sustitución en el anillo **B** para **P-20** con un grupo metoxilo aumenta levemente la actividad, pero no tanto comparando con los compuestos de tipo dihidrochalcona que fueron las más activos sobre este hongo.

Teniendo en cuenta lo anterior, se observa que en el estudio cualitativo preliminar de relación estructura-actividad para los derivados de ácido benzoico evaluados frente a los tres hongos la influencia de la actividad está ligada a la presencia del grupo funcional ácido en la posición **C-1**, a la presencia de cadenas preniladas en las posiciones **C-3** y **C-5** del anillo aromático y a la presencia de compuestos ciclados tipo cromeno o 4-cromanona (ver figura 3-8).

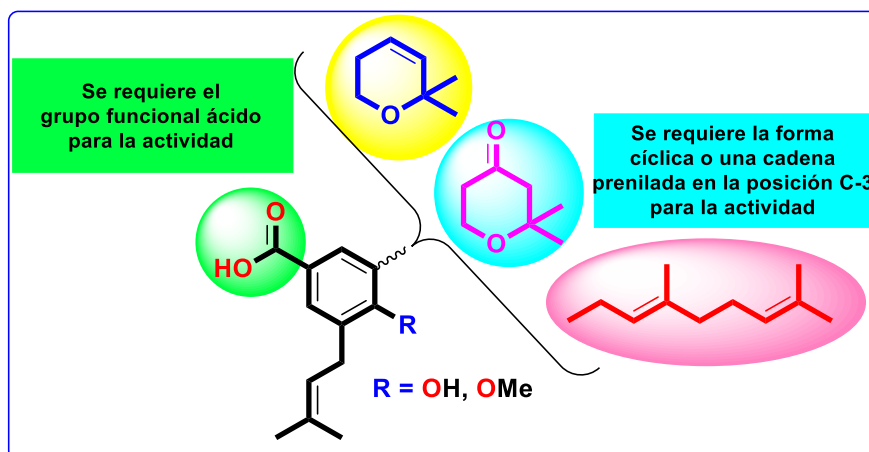


Figura 3-8. Efecto de los sustituyentes para derivados de ácido benzoico.

Para el caso de los flavonoides evaluados frente a *M. roseri* y *F. solani* la influencia de la actividad está ligada presencia del grupo carbonilo en los compuestos de tipo dihidrochalcona a diferencia de *Phytophthora sp.*, que no necesita de ese grupo para poder ejercer actividad frente a los compuestos de este tipo (ver figura 3-9).

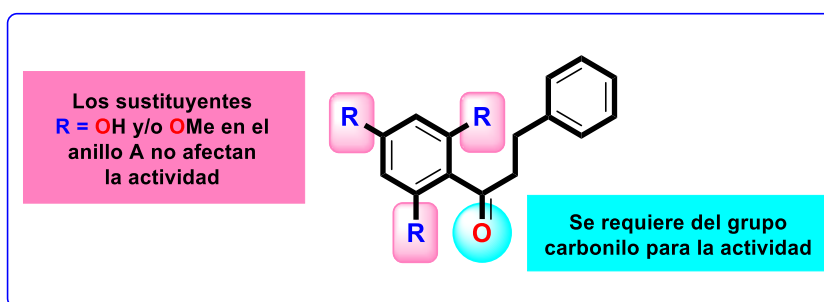


Figura 3-9. Efecto de los sustituyentes para los flavonoides.

Este es el primer reporte que se presenta de un estudio de relación estructura-actividad para los compuestos evaluados frente a *M. roseri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*, hongos que afecta al cultivo de cacao.

3.3 Estudio computacional

El estudio computacional se realizó basado en un modelo farmacóforo, para lo cual se seleccionaron las moléculas que mejor actividad presentaron frente a los hongos evaluados. Para el caso de los derivados de ácido benzoico de cadena abierta se seleccionó un compuesto

por cada hongo. Para los núcleos de tipo dihidrochalcona, flavanona y derivado de ácido cíclico se realizó la selección de una sola molécula para los tres hongos de acuerdo con la siguiente forma:

Tabla 3-2. Compuestos seleccionados para el planteamiento del modelo farmacofórico.

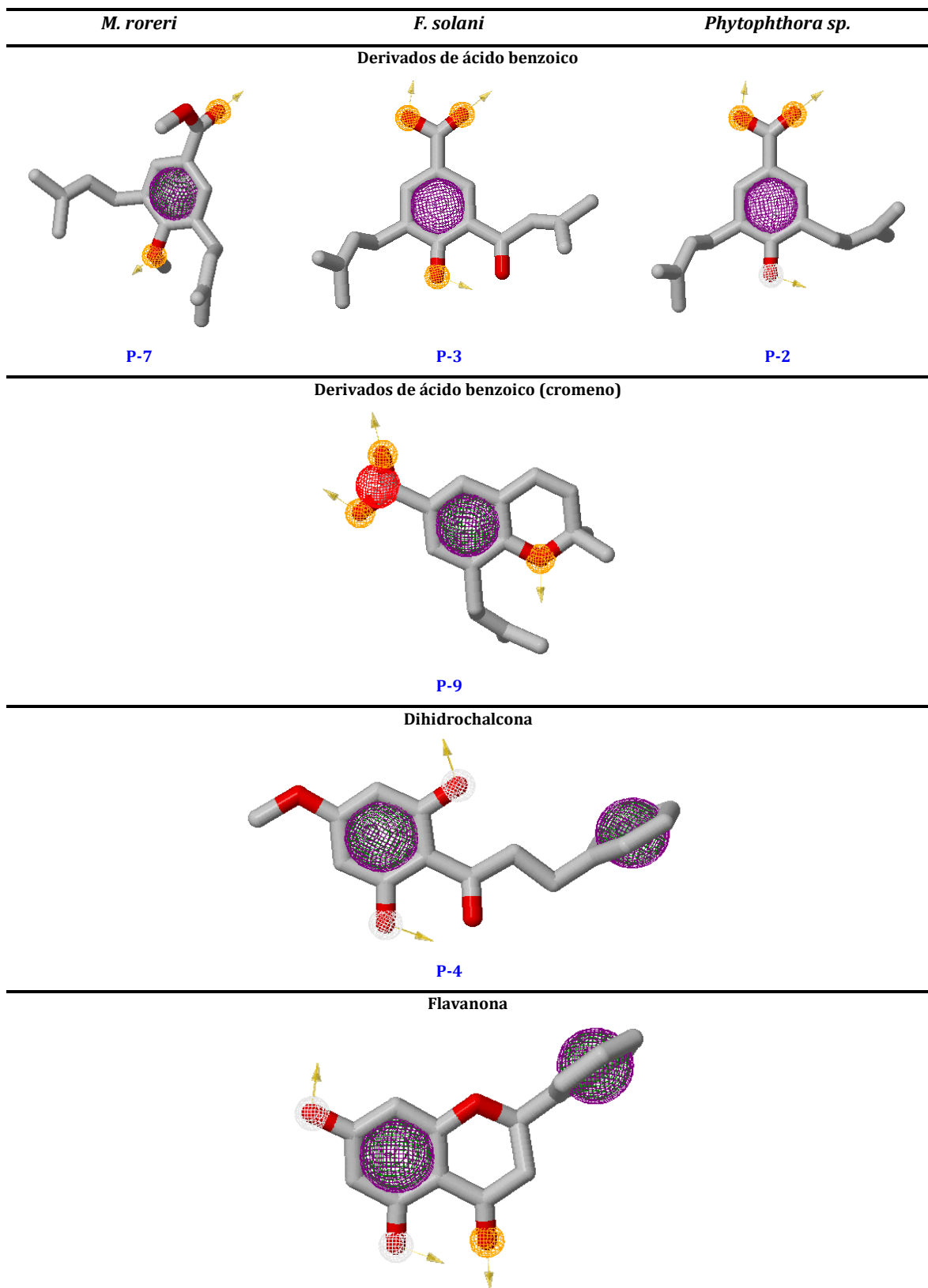
Tipo de núcleo	Compuestos seleccionados		
	<i>M. royeri</i>	<i>F. solani</i>	<i>Phytophthora sp.</i>
Derivado de ácido abierto	P-7	P-3	P-2
Derivado de ácido cíclico	P-9		
Dihidrochalcona	P-4		
Flavanona	P-21		

Las moléculas seleccionadas fueron optimizadas geoméricamente usando el campo de fuerza de Merck (MMFF) seguido del semiempírico PM3, con el objetivo de obtener el confórmero de mínima energía más estable, las cuales fueron guardadas y subidas a la plataforma *ZINCPharmer* online en donde se definieron las características farmacofóricas o modelo de farmacóforo para cada una de las estructuras seleccionadas.

En la tabla 3-3 se presentan las características farmacofóricas en diferentes colores para cada molécula seleccionada. Los seis farmacóforos estructuralmente representados presentan en común la característica hidrofóbica en sus anillos aromáticos en color verde, la característica de aceptor de enlace de hidrógeno en color amarillo, la característica de donador de enlace de hidrógeno en color blanco y la característica aromática de color morado. Una vez se estableció el modelo de farmacóforo para cada molécula, se realizó un cribado virtual sobre 4 bases de datos o librerías de moléculas. Para cada modelo de farmacóforo se seleccionaron 15 moléculas, las cuales presentaron la mejor puntuación de ajuste al farmacóforo, es decir, el menor valor de la desviación cuadrática media (RMSD) y una alta similitud estructural a la molécula usada como referencia para derivar el modelo de farmacóforo. Seguido se realizó la búsqueda de reportes sobre actividad biológica en las bases de datos *SciFinder*, *ChEMBL* y *PubChem* de las moléculas seleccionadas con el fin de seleccionar las mejores cuatro y que podrían presentar un potencial antifúngico frente a los hongos del cacao.

Tabla 3-3. Característica farmacofóricas seleccionadas para las moléculas seleccionadas.

Color	Tipo de característica farmacofórica
Verde	Hidrofóbica
Morado	Aromática
Amarillo	Aceptor de enlace de hidrógeno
Blanco	Donador de enlace de hidrógeno



3.3.1 Resultados del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo.

A continuación, se presentan los resultados de la selección de las moléculas para cada uno de los modelos de farmacóforo con cada uno de los hongos de estudio. Todas las moléculas candidatas fueron obtenidas de la base datos *ZINCPharmer*, obteniéndose 100 estructuras en donde se presentan solo las primeras 15 moléculas con mejor puntuación junto con los reportes de actividad basados en los estudios de actividad antifúngica. A continuación, en las tablas 3-4 a 3-7 se presentan los resultados de la selección de las 15 moléculas y los reportes encontrados sobre actividad antifúngica.

Tabla 3-4. Moléculas seleccionadas a partir del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo para los compuestos de tipo derivado de ácido benzoico abierto.

P-7	RMSD	Reportes de actividad biológica			Bibliografía
		SciFinder	ChEMBL	PubChem	
ZINC06096765	0.050	X	X	X	NR
ZINC03871176	0.052	SI	X	X	Citotóxica y antiprotozoaria <i>Leishmania donovani</i> <i>Trypanosoma brucei</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tasdemir <i>et al.</i> , 2006)
ZINC03871576	0.055	SI	X	SI	Antifúngica <i>Candida albicans</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Malassezia furfur</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichosporon beigelii</i> (Lee <i>et al.</i> , 2018) (Herrera, 2010)
ZINC00057682	0.059	SI	X	X	Citotóxica y antiprotozoaria <i>Leishmania donovani</i> <i>Trypanosoma brucei</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tasdemir <i>et al.</i> , 2006)
ZINC00899592	0.060	SI	X	SI	Antiplasmodial <i>Plasmodium falciparum</i> (Portet <i>et al.</i> , 2007)
ZINC00001785	0.064	SI	X	SI	Antifúngica <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Botritis cinerea</i> (Huqail <i>et al.</i> , 2019) (Cotoras <i>et al.</i> , 2001)
ZINC13838739	0.064	SI	X	X	Antibacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> Citotóxica Antioxidante (Chukaew <i>et al.</i> , 2019)
ZINC31775760	0.075	X	X	X	NR
ZINC13459780	0.079	SI	X	X	Antifúngica <i>Phomopsis helianthi</i> <i>Puccinia helianthi</i> (Avantaggiato <i>et al.</i> , 1999)
ZINC04291713	0.080	SI	X	SI	Antifúngica <i>Macrophomina phaseolina</i> (Rani <i>et al.</i> , 2009)

ZINC03824868	0.081	SI	X	X	<i>Sclerotium rolfsii</i> Antifúngica <i>Glomerella graminicola</i> <i>Colletotrichum musae</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Alternaria musae</i> <i>Lasiodiplodia theobromae</i> <i>Botryosphaeria ribis</i> <i>Botryosphaeria rhodina</i> <i>Fusarium sp.</i>	(Xu et al., 2018) (Barros et al., 2011)
ZINC00035569	0.128	X	X	X	NR	
ZINC08729751	0.134	X	X	X	NR	
ZINC06059207	0.135	SI	X	SI	Antifúngica <i>Cochliobolus lunatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	(Korosec et al., 2013)
ZINC19484352	0.246	X	X	X	NR	
P-3	RMSD	Reportes de actividad biológica			Bibliografía	
		<i>SciFinder</i>	<i>ChEMBL</i>	<i>PubChem</i>		
ZINC31777074	0.118	X	X	X	NR	
ZINC82237870	0.215	X	X	X	NR	
ZINC01744435	0.383	SI	X	X	Antibacteriana <i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	(Muluka et al., 2016)
ZINC94593389	0.383	X	X	X	NR	
ZINC20281433	0.403	X	X	X	NR	
ZINC00190183	0.427	X	X	X	NR	
ZINC01599999	0.430	X	X	X	NR	
ZINC02513008	0.433	X	X	X	NR	
ZINC34514323	0.435	X	X	X	NR	
ZINC38811394	0.449	SI	X	X	Antifúngica <i>Aspergillus niger</i> Antibacteriana <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i>	(Bawa & Alzaraiide, 2015) (Sahoo & Paidesetty, 2015)
ZINC70462745	0.449	SI	X	X	NR	
ZINC03897160	0.456	SI	X	SI	Antifúngica <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Macrophomina phaseolina</i>	(Mann, 2017)
ZINC52521553	0.478	SI	SI	X	Antifúngica <i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i>	(Waisser et al., 2003)
ZINC16889933	0.481	X	X	X	NR	
ZINC35404961	0.481	X	X	X	NR	
P-2	RMSD	Reportes de actividad biológica			Bibliografía	
		<i>SciFinder</i>	<i>ChEMBL</i>	<i>PubChem</i>		
ZINC85343511	0.217	X	X	X	NR	
ZINC20192027	0.373	X	X	X	NR	
ZINC13209834	0.375	X	X	X	NR	
ZINC20281433	0.376	X	X	X	NR	
ZINC85342511	0.379	X	X	X	NR	
ZINC94592086	0.381	X	X	X	NR	
ZINC94592087	0.381	X	X	X	NR	
ZINC94591952	0.381	X	X	X	NR	
ZINC94591574	0.381	X	X	X	NR	
ZINC94592598	0.381	X	X	X	NR	
ZINC94591878	0.381	X	X	X	NR	
ZINC94592595	0.381	X	X	X	NR	
ZINC16134038	0.517	X	X	X	NR	
ZINC36020472	0.518	X	X	X	NR	
ZINC02329663	0.655	X	X	X	NR	

Tabla 3-5. Moléculas seleccionadas a partir del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo para los compuestos de tipo derivado de ácido benzoico cíclico.

P-9	RMSD	Reportes de actividad biológica			Bibliografía
		SciFinder	ChEMBL	PubChem	
ZINC03845295	0.351	SI	X	X	Antibacteriana <i>Salmonella typhimurium</i> (Brown & Dietrich, 1978)
ZINC14822038	0.370	SI	X	X	Antimalárico <i>Plasmodium falciparum</i> (Ignatushchenko et al., 2000)
ZINC31775760	0.560	SI	X	X	Antidiabético <i>Inhibición de la enzima aldosa reductasa</i> (Nakai et al., 1985)
ZINC04783234	0.564	SI	SI	X	Carcinogénica Antifilarial <i>Brugia malayi</i> (Chou et al., 2018) (Dhananjeyan et al., 2005)
ZINC04098690	0.564	SI	SI	X	Antifilariasis <i>Brugia malayi</i> (Dhananjeyan et al., 2005)
ZINC03824868	0.564				Antifúngica <i>Glomerella graminicola</i> <i>Colletotrichum musae</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Lasiodiplodia theobromae</i> <i>Botryosphaeria ribis</i> <i>Botryosphaeria rhodina</i> <i>Fusarium sp.</i> (Xu et al., 2018) (Barros et al., 2011)
ZINC03872206	0.567	SI	X	X	Anticancerígena Citotóxica Antimicrobial (Ali et al., 2000)
ZINC11865144	0.568	SI	X	X	Antifúngica <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizoctonia solani</i> (Daniel & Krupadanam, 2012)
ZINC03871576	0.569	SI	X	X	Antifúngica <i>Candida albicans</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Malassezia furfur</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichosporon beigeli</i> (Lee et al., 2018)
ZINC04348965	0.571	SI	X	SI	Antifúngica <i>Botrytis cinérea</i> <i>Trichoderma glaucum</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> (Krolicki & Zarawska, 1987)
ZINC13334942	0.572	SI	X	SI	Antifúngica <i>Cladosporium cucumerinum</i> (Gafner et al., 1995)
ZINC05791666	0.576	X	X	X	NR
ZINC32086279	0.581	SI	SI	X	Antiplasmodial <i>Euglena gracilis</i> (Foltinova et al., 2000)
ZINC05997152	0.589	X	X	X	NR
ZINC06090922	0.592	SI	X	X	Antifúngica <i>Candida albicans</i> (Zubricka et al., 2015)

Tabla 3-6. Moléculas seleccionadas a partir del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo para los compuestos de tipo dihidrochalcona.

P-4	RMSD	Reportes de actividad biológica			Bibliografía
		SciFinder	ChEMBL	PubChem	
ZINC08880095	0.250	SI	X	X	Citotóxica Proliferación celular (Liu et al., 2014)

ZINC79193632	0.331	X	X	X	NR	
ZINC62001295	0.434	X	X	X	NR	
ZINC62001540	0.438	X	X	X	NR	
ZINC12297008	0.439	X	X	X	NR	
ZINC32123808	0.439	X	X	X	NR	
ZINC32124337	0.446	X	X	X	NR	
ZINC12664621	0.450	X	X	X	NR	
ZINC32123767	0.494	X	X	X	NR	
ZINC40309934	0.495	X	X	X	NR	
ZINC32124003	0.495	X	X	X	NR	
ZINC72325447	0.495	X	X	X	NR	
ZINC32124228	0.495	X	X	X	NR	
ZINC08880096	0.525	SI	X	X	Citotóxica	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
					Proliferación celular	
ZINC79193629	0.595	X	X	X	NR	

Tabla 3-7. Moléculas seleccionadas a partir del cribado virtual basado en el modelo de farmacóforo para los compuestos de tipo flavanona.

P-21	RMSD	Reportes de actividad biológica			Bibliografía
		SciFinder	ChEMBL	PubChem	
ZINC03871633	0.047	SI	X	X	Antifúngica <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida parapsilosis</i> (Serpa <i>et al.</i> , 2012)
ZINC00001785	0.064	X	X	X	NR
ZINC00391893	0.065	X	X	X	NR
ZINC03581770	0.065	X	X	X	NR
ZINC00391893	0.065	X	X	X	NR
ZINC06090922	0.065	X	X	X	NR
ZINC04098433	0.073	SI	X	X	Antifúngica <i>Candida albicans</i> (Boonphong <i>et al.</i> , 2007)
ZINC03824868		X	X	X	NR
ZINC14767012		X	X	X	NR
ZINC72194123	0.100	SI	X	SI	Inhibición de α-glucosidasa (Gao & Kawabata, 2005)
ZINC00391893	0.571	X	X	X	NR
ZINC00057752	0.592	X	X	X	NR
ZINC06527075	0.593	X	X	X	NR
ZINC00057685	0.593	X	X	X	NR
ZINC05934539	0.593	X	X	X	NR

NR = Información de actividad biológica no reportado en las bases de datos seleccionadas.

A continuación, se describe el análisis del planteamiento del modelo farmacofórico teniendo en cuenta el tipo de núcleo seleccionado.

3.3.1.1. Moléculas seleccionadas para el derivado de ácido abierto

Para establecer el modelo de farmacóforo para *M. roleri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.* se seleccionaron 3 moléculas **P-7**, **P-3** y **P-2**, respectivamente las cuales fueron las que presentaron la mayor actividad. En la tabla 3-4 se presentan los resultados de las moléculas seleccionadas, en donde se encontró que para **P-7**, **P-3** y **P-2** de las 45 moléculas seleccionadas

9 presentaron reporte de actividad antifúngica frente a una gran variedad de hongos, de los cuales se destacan *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Malassezia furfur*, *Penicillium chrysogenum*, *Puccinia helianthi*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *F. culmorum*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Lasiodiplodia theobromae* etc. De 6 moléculas se encontró reportes de actividad antibacteriana, antioxidante, citotóxica, antiplasmodial y antiprotozoaria. De las 30 moléculas restantes no se encontró ningún tipo de reportes sobre actividad en las bases de datos consultadas.

3.3.1.2. Moléculas seleccionadas para el derivado de ácido cíclico

Para establecer el modelo de farmacóforo para *M. roreri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.* se seleccionó una molécula **P-9**, la cual fue la que presentó la mayor actividad. En la tabla 3-5 se presentan los resultados de las moléculas seleccionadas, en donde se encontró que para **P-9** de las 15 moléculas seleccionadas 6 presentaron reporte de actividad antifúngica frente a una gran variedad de hongos, de los cuales se destacan *Colletotrichum musae*, *Fusarium sp.*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria ribis*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus fumigatus* etc. De las 9 moléculas restantes se encontró reportes de actividad antiplasmodial, anticancerígena, antifilarial, antidiabética y antimalárica.

3.3.1.3. Moléculas seleccionadas para la dihidrochalcona

Para establecer el modelo de farmacóforo para *M. roreri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.* se seleccionó una molécula **P-4**, la cual fue la que presentó la mayor actividad. En la tabla 3-6 se presentan los resultados de las moléculas seleccionadas, en donde se encontró que para **P-9** de las 15 moléculas seleccionadas 2 presentaron reporte de actividad citotóxica. De los 14 restantes no se encontró ningún tipo de actividad de acuerdo con las bases de datos consultadas.

3.3.1.4. Moléculas seleccionadas para la flavanona

Para establecer el modelo de farmacóforo para *M. roreri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.* se seleccionó una molécula **P-21**, la cual fue la que presentó la mayor actividad. En la tabla 3-7 se presentan los resultados de las moléculas seleccionadas, en donde se encontró que para **P-21** de las 15 moléculas seleccionadas 2 presentaron reporte de actividad antifúngica frente a una gran variedad de hongos, de los cuales se destacan *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*. De una molécula se encontró reportes de actividad frente a la inhibición

de α -glucosa. De los 12 restantes no se encontró ningún tipo de actividad de acuerdo con las bases de datos consultadas.

Un resultado interesante y teniendo en cuenta los pocos estudios enfocados hacia el control de hongos fitopatógenos que ataquen específicamente a los cultivos de cacao, se encontró que el farmacóforo ZINC13459780 denominado como emodina una antraquinona aislada de *Coccoloba mollis* presentó actividad antifúngica frente a *Lasiodiplodia theobromae* un fitopatógeno que ataca a varios cultivos entre los que se encuentran el cacao causante de lesiones y necrosis en el fruto (Barros *et al.*, 2011). Otro estudio realizado para la emodina mostró que presenta actividad antifúngica frente a varias especies de *Colletotrichum* entre los que se destacan *C. musae*, *C. graminicola* y *C. gloeosporioides* con porcentajes de inhibición del 60 al 80 % a una concentración de 10 mg/mL (Xu *et al.*, 2018). No obstante, con este estudio de aproximación preliminar se busca que los farmacóforos modelados y representados en este trabajo puedan ser promisorios frente a *M. roleri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*, y pueda ser confirmada la bioactividad de los compuestos encontrados mediante ensayos *in vitro*.

Los reportes encontrados para **P-3**, **P-7**, **P-9** y **P-21** permiten confirmar que tanto las moléculas naturales como sintéticas presentan características químicas comunes a las encontradas en las bases de datos, por lo cual estas pueden ser una fuente promisoriosa para el aislamiento o síntesis de nuevas sustancias que permitan el control de hongos fitopatógenos provenientes del cacao.

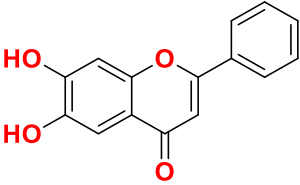

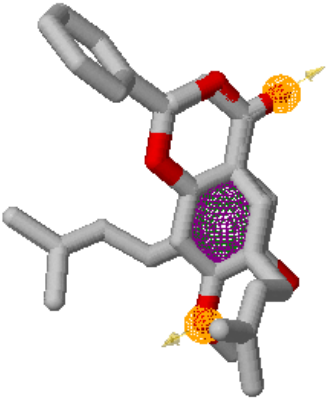
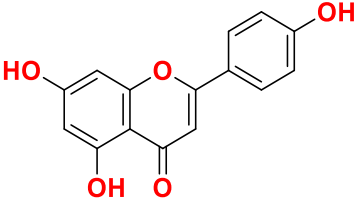
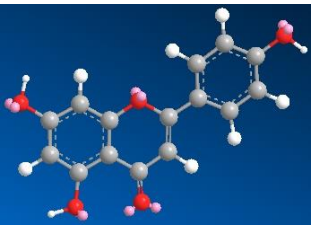
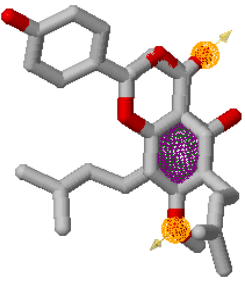
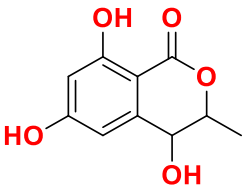

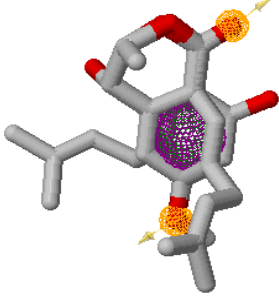
3.3.2 Tamizaje en la selección de las moléculas con potencial actividad antifúngica

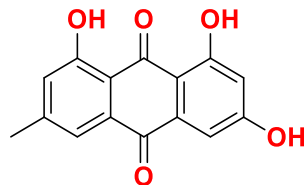
A partir de las moléculas seleccionadas se realizó un tamizaje a cuatro moléculas que probablemente pueden presentar una actividad antifúngica comparable o mayor frente a *M. roleri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*; la selección de las moléculas candidatas se realizó usando como criterio los antecedentes de actividad biológica tomados de la literatura, el menor valor de RMSD y algunas similitudes estructurales.

Las tablas 3-8, 3-9 y 3-10 muestran los resultados del tamizaje y los alineamientos entre las moléculas usadas para definir los modelos farmacofóricos y las moléculas candidatas seleccionadas en el tamizaje; adicionalmente se muestran las características farmacofóricas en

cada alineamiento. Se puede observar que las moléculas candidatas se ajustan a los modelos farmacofóricos derivados a partir de las moléculas más activas contra los hongos en estudio.

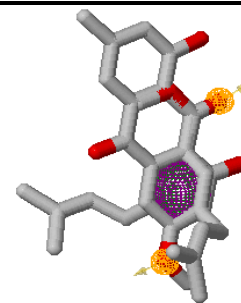
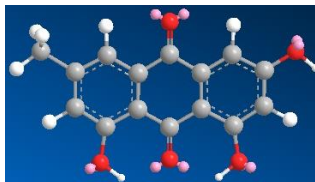
Tabla 3-8. Moléculas candidatas basadas en los farmacóforos de derivados de ácido benzoico.

Farmacóforo P-7		
<i>ChemDraw Profesional</i>	<i>Chem3D</i>	Alineación del farmacóforo <i>ZINCPharmer</i>
6,7-dihidroxi flavona		
 <p>ZINC03871176 RMSD=0.052</p>		
Apigenina		
 <p>ZINC03871576 RMSD=0.055</p>		
4,6,8-trihidroxi-3-metilisocroman-1-ona		
 <p>ZINC13459780 RMSD=0.079</p>		
Emodina		



ZINC03824868

RMSD=0.081



Farmacóforo P-3

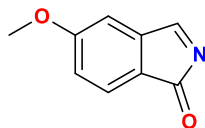
ChemDraw Profesional

Chem3D

Alineación del farmacóforo

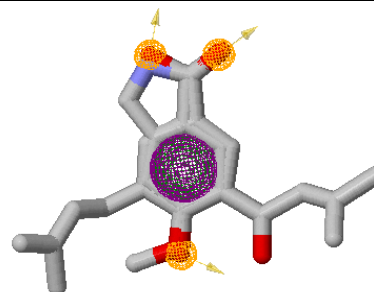
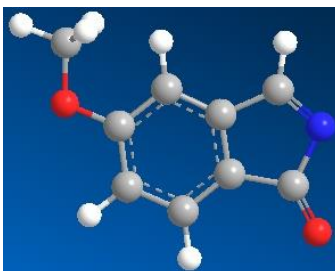
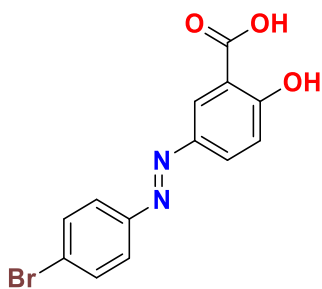
ZINCPharmer

5-metoxiisindolin-1-ona



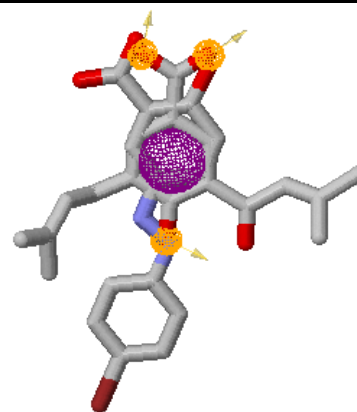
ZINC82237870

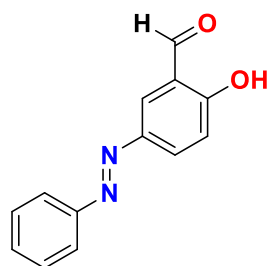
RMSD=0.215

Ácido (*E*)-5-((4-bromofenil)diazenil)-2-hidroxi benzoico

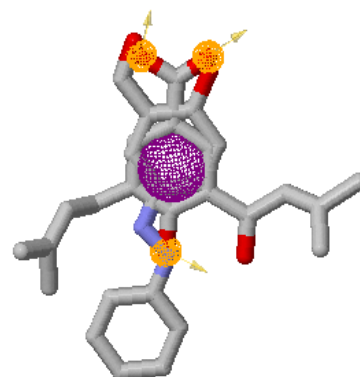
ZINC38811394

RMSD=0.449

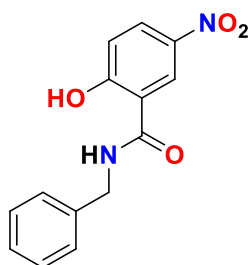
(*E*)-2-hidroxi-5-(fenildiazenil)benzaldehído



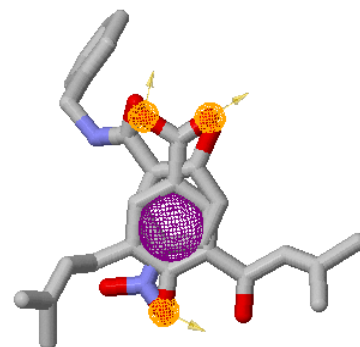
ZINC03897160
RMSD=0.456



N-bencil-2-hidroxi-5-nitrobenzocarbamida



ZINC52521553
RMSD=0.478



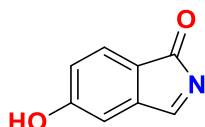
Farmacóforo P-2

ChemDraw Profesional

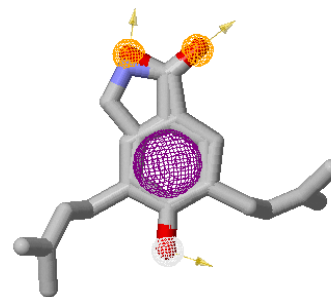
Chem3D

Alineación del farmacóforo
ZINCPharmer

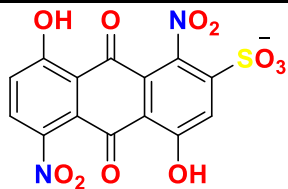
6-nitro-7-(p-tolilamino)quinazolin-4(3H)-ona



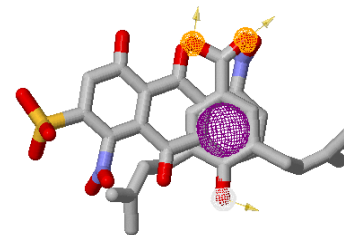
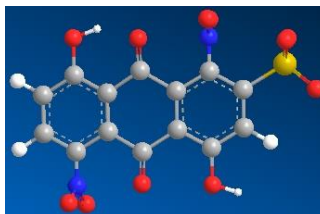
ZINC85343511
RMSD=0.217



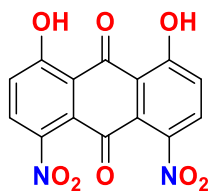
4,8-dihidroxi-1,5-dinitro-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2-sulfonato



ZINC20192027
RMSD=0.373

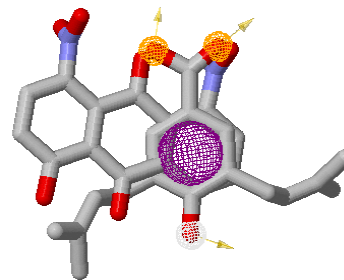
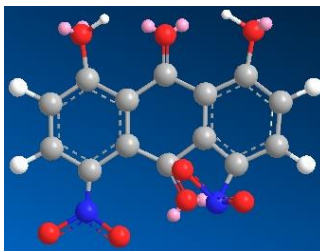


1,8-dihydroxy-4,5-dinitroanthraquinone

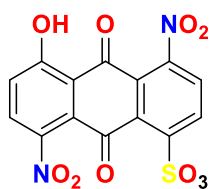


ZINC13209834

RMSD=0.375

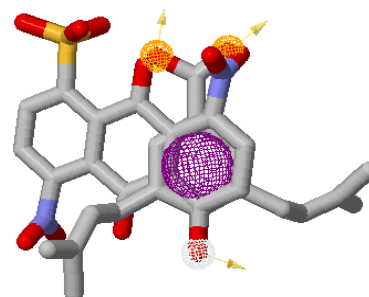
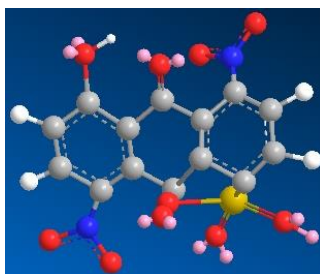


5-hidroxi-4,8-dinitro-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-1-sulfonato



ZINC20281433

RMSD=0.376



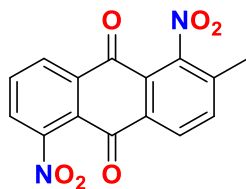
Farmacóforo P-9

ChemDraw Profesional

Chem3D

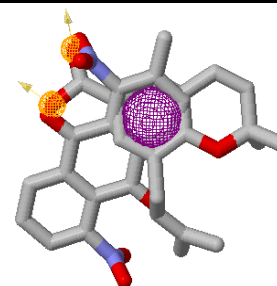
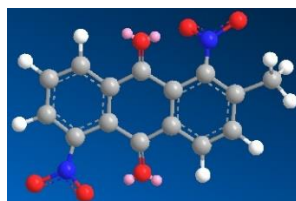
Alineación del farmacóforo
ZINCPharmer

2-metil-1,5-dinitroantraceno-9,10-diona

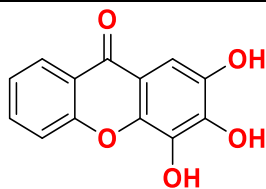


ZINC03845295

RMSD=0.351

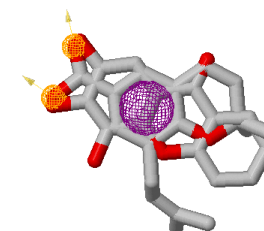


2,3,4-trihidroxixanten-9-ona



ZINC14822038

RMSD=0.370



(2,4-dihidroxifenil)(piridin-3-il)metanona

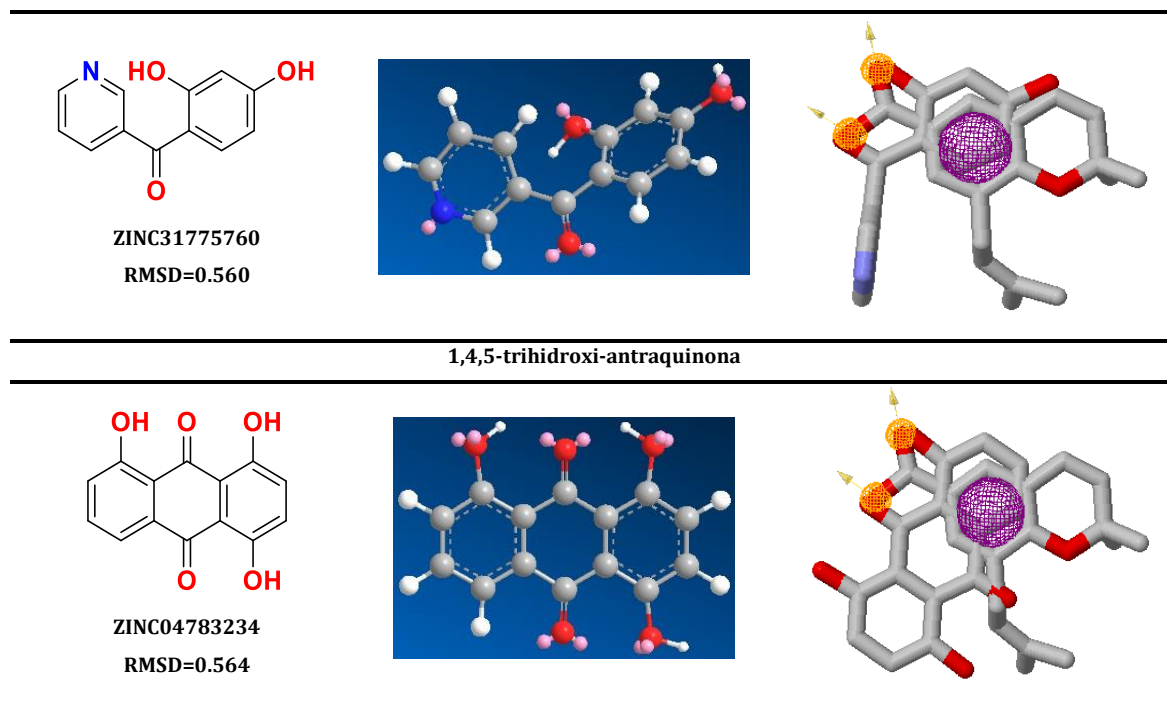
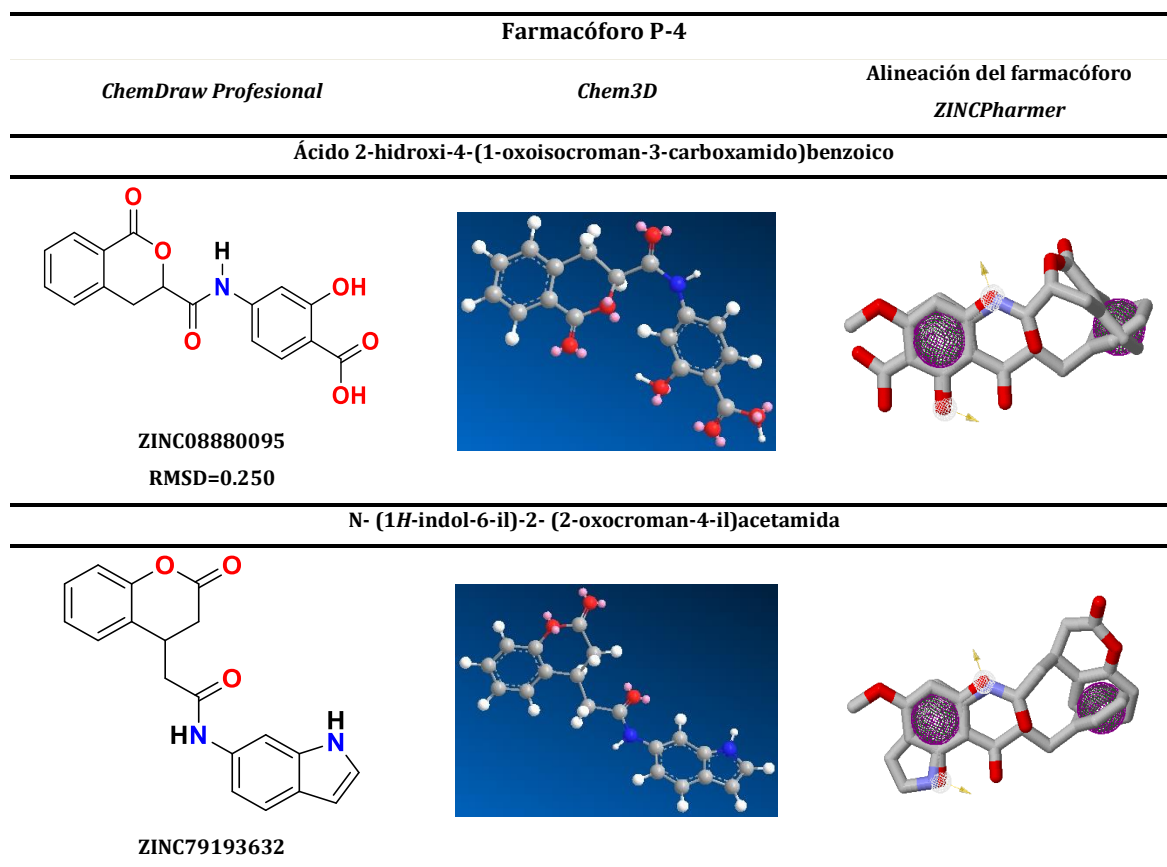
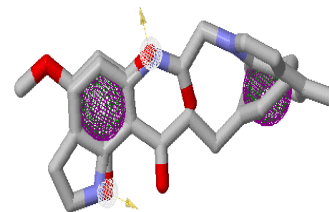
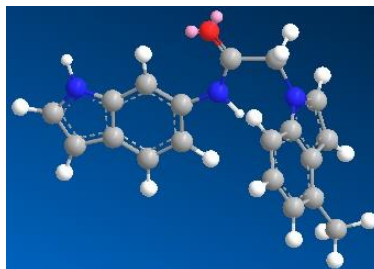
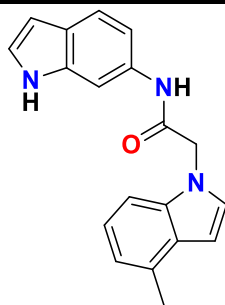


Tabla 3-9. Moléculas candidatas basadas en los farmacóforos de la dihidrochalcona.

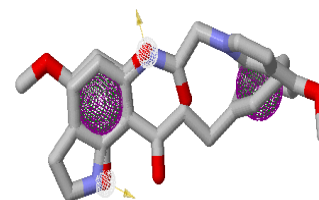
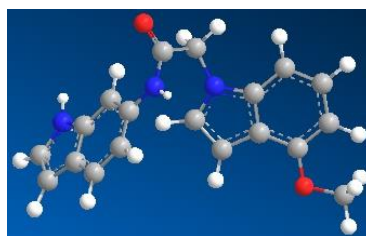
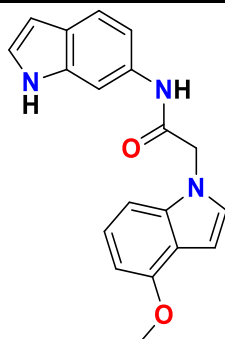


RMSD=0.331

N-(1*H*-indol-6-il)-2-(4-metil-1-*H*-indol-1-il)acetamida

ZINC62001295

RMSD=0.434

N-(1*H*-indol-6-il)-2-(4-metoxi-1-*H*-indol-1-il)acetamida

ZINC62001540

RMSD=0.438

Tabla 3-10. Moléculas candidatas basadas en los farmacóforos de la flavanona.

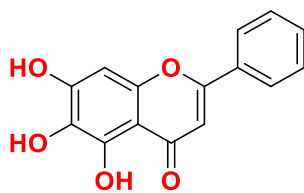
Farmacóforo P-21

ChemDraw Profesional

Chem3D

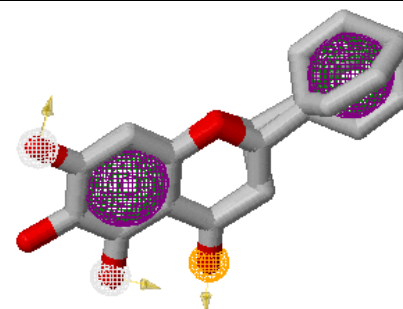
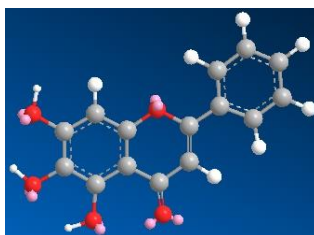
Alineación del farmacóforo ZINCPharmer

Baicaleína

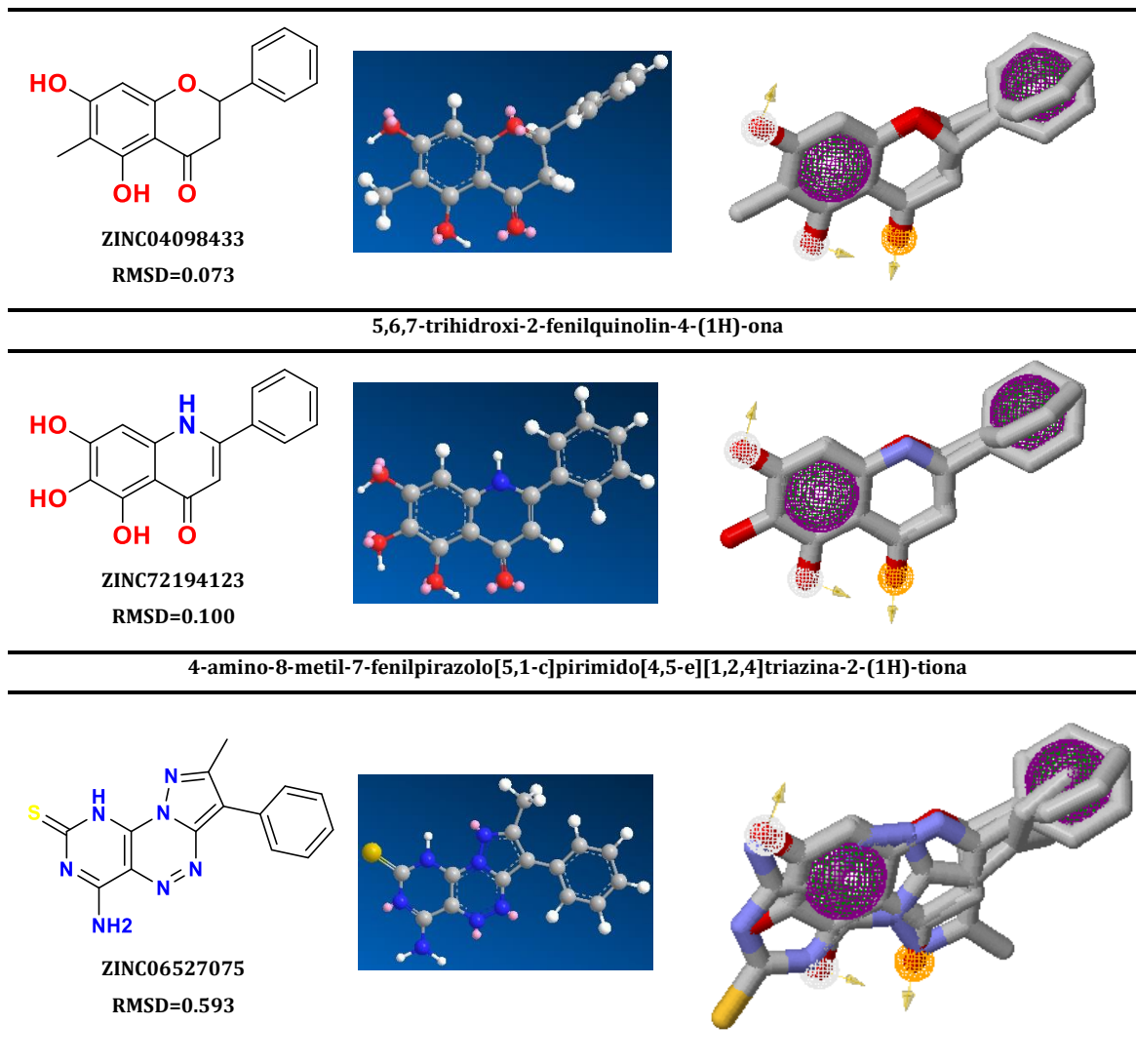


ZINC03871633

RMSD=0.047



Estrobopinina



En las tablas 3-7 a 3-8 se presentan las moléculas que fueron seleccionadas para cada uno de los modelos de farmacóforo planteados para los hongos en estudio, las cuales fueron seleccionadas mediante un cribado virtual, bajo la búsqueda en diferentes bases de datos seleccionadas de *ZINCPharmer*, en donde se observa que para las moléculas **P-7**, **P-9** y **P-21**, los farmacóforos correspondientes presentan una alineación con respecto al núcleo común del farmacóforo seleccionado. Además se presentan reportes de que las moléculas resultado del cribado fueron aisladas de plantas y la mayoría hace parte del grupo de los flavonoides que han mostrado un potencial antifúngico (Ávila *et al.*, 2011). La molécula identificada como ZINC00001785 denominada como naringenina, así como los flavonoides pinocembrina, quercetina y galangina presentaron actividad antifúngica frente *Botrytis cinerea* un

fitopatógeno que causa la enfermedad de podredumbre en cultivos de gran importancia comercial como la uva (Cotoras *et al.*, 2001).

Las moléculas seleccionadas cumplen con las hipótesis establecidas a la hora de aplicar el modelo, se espera que a nivel de actividad biológica sean mejores o iguales que los compuestos modelo, pero es necesario tener en cuenta que se pueden obtener algunos resultados que pueden ser falsos positivos, algo muy común en este tipo de métodos computacionales. Con lo anterior, la búsqueda de los reportes de actividad biológica para las moléculas seleccionadas permitió establecer una lógica real del modelo planteado en este trabajo, para lo cual muchas de las moléculas seleccionadas presentaron reportes sobre actividad antifúngica indicando que pueden ser candidatos base para el diseño de nuevas sustancias y ser importantes para el control de los hongos en estudio. Siendo este el primer reporte en el planteamiento de un modelo farmacóforo en la búsqueda de nuevas moléculas que permitan el control de hongos provenientes del cacao.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

El presente estudio realiza un aporte a las investigaciones en agentes fitosanitarios para el control de hongos fitopatógenos asociados al cacao, a partir de los constituyentes químicos presentes en *P. pesaresanum*. Los resultados de esta investigación permitieron concluir:

- El estudio fitoquímico desarrollado sobre la parte aérea de *P. pesaresanum* permitió el aislamiento y la identificación de tres derivados de ácido benzoico (ácido 4-metoxinervogénico **P-1**, ácido nervogénico **P-2** y ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico **P-3**), y de una dihidrochalcona (2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona **P-4**), de los cuales tres compuestos (**P-2** a **P-4**) son reportados por primera vez en la especie.
- La síntesis desarrollada a partir de los compuestos naturales provenientes de *P. pesaresanum* permitió la obtención de siete derivados (**P-5** a **P-11**), de los cuales **P-6**, **P-8**, **P-10** y **P-11**, fueron reportados por primera vez en este trabajo.
- Este es el primer reporte de actividad antifúngica frente a *M. roreri*, *F. solani* y *Phytophthora sp.*, de los compuestos aislados y sintetizados, destacándose el cromeno **P-9** como uno de los de mayor potencial antifúngico sobre *M. roreri*.
- En el estudio de estructura actividad se estableció que para los derivados de ácido benzoico la actividad antifúngica, sobre los tres hongos, se ve influenciada positivamente por la presencia del grupo funcional ácido carboxílico en la posición C-1, por la presencia de cadenas tipo prenilo, geranilo y/o farnesilo en las posiciones C-3 y C-5 del anillo aromático y por la presencia de compuestos ciclados tipo cromeno o

4-cromanona. En el caso de los flavonoides, se logró establecer que frente a *M. roreri* y *F. solani* la actividad antifúngica está relacionada con la presencia del grupo carbonilo en los compuestos tipo dihidrochalcona, a diferencia de lo observado sobre *Phytophthora* sp., donde se encontró que no es necesaria la presencia del carbonilo para causar la inhibición del crecimiento micelial de este patógeno.

- El modelo farmacofórico desarrollado a partir de los compuestos más activos permitió postular a 24 moléculas que posiblemente pueden presentar un potencial antifúngico frente a hongos fitopatógenos asociados al cultivo del cacao.

4.2 Proyecciones y recomendaciones

Es necesario continuar con las investigaciones fitoquímicas en especies del género *Piper* con el fin de aislar e identificar más constituyentes antifúngicos para dar mayor robustez a los estudios enfocados en determinar el potencial de las especies del género *Piper* como fuente de sustancias para el control de hongos fitopatógenos asociados al cacao.

Teniendo en cuenta la tendencia antifúngica presentada por algunos de los compuestos evaluados, es necesario continuar con la realización ensayos más específicos para determinar cuáles son los más promisorios de acuerdo con su relación de actividad-toxicidad.

Es necesario continuar con los estudios sintéticos basados en las moléculas naturales bioactivas provenientes del género *Piper* con el fin de dar mayor robustez a los estudios de relación estructura-actividad y que permitan la implementación de un estudio computacional que soporte las relaciones encontradas.

Se recomienda determinar el potencial antifúngico de las moléculas propuestas por el modelo farmacofórico desarrollado a partir de los compuestos más activos.

Producción científica

Participación en eventos



7th BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS

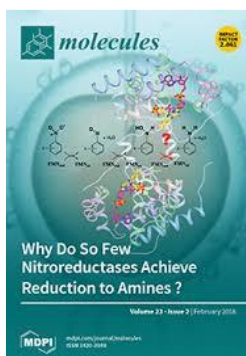
Chitiva, L. C., Prieto, J. A., Ladino, C., López, F. H., Cuca, L. E., Patiño, O. J. Qualitative study of structure-activity relationship of compounds derived from *Piper* against *Monilophthora roreri*. Rio de Janeiro, Brasil, **2019**. Participación en modalidad póster.



XIV CONGRESO COLOMBIANO DE FITOQUÍMICA Y I CONGRESO COLOMBIANO DE SEMILLEROS DE FITOQUÍMICA EN INSTITUCIONES DE EDUCACIÓN MEDIA

Chitiva, L. C., Prieto, J. A., Ladino, C., López, F. H., Cuca, L. E., Patiño, O. J. Antifungal potential of species of the genus *Piper* for the control of *Fusarium solani*. Sincelejo, Colombia, **2020**. Participación en modalidad oral.

Publicaciones Sometidas



MOLECULES

Chitiva, L. C., Prieto, J. A., Cuca, L. E., Patiño, O. J. Antifungal activity of chemical constituents of *Piper pesaresanum* against cocoa fungi. *Molecules*, **2020**, (Sometido).

1. Anexos de fitoquímica

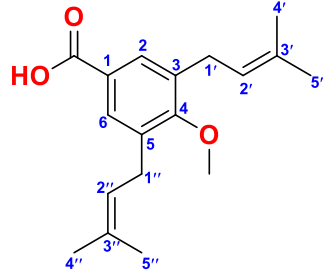
Datos espectroscópicos y constantes físicas de los compuestos:

Ácido 4-metoxinervogénico **(P-1)**

Ácido nervogénico **(P-2)**

Ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico **(P-3)**

2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona **(P-4)**

	Nombre	Ácido 4-metoxinervogénico (P-1)
	Estado físico	Sólido cristalino blanco
	Fórmula molecular	C ₁₈ H ₂₄ O ₃
	Peso molecular	288.39 g/mol
	Punto de fusión	80 - 82 °C
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.80 (s, 2H, H-2, H-6), 5.29 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, H-2', H-2''), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.40 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 4H, H-1', H-1''), 1.76 (s, 6H, H-5', H-5''), 1.75 (s, 6H, H-4', H-4'').		
APT (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 172.2 (C=O), 161.2 (C-4), 135.3 (C-3', C-3''), 133.4 (C-3, C-5), 130.4 (C-2, C-6), 125.1 (C-1), 122.4 (C-2', C-2''), 61.1 (OMe), 28.5 (C-1', C-1''), 25.9 (C-4', C-4''), 18.0 (C-5', C-5'').		
Datos descritos en la literatura: (Orjala <i>et al.</i> , 1993).		

P-1 Mod. (RMN 1H, CDCl3)

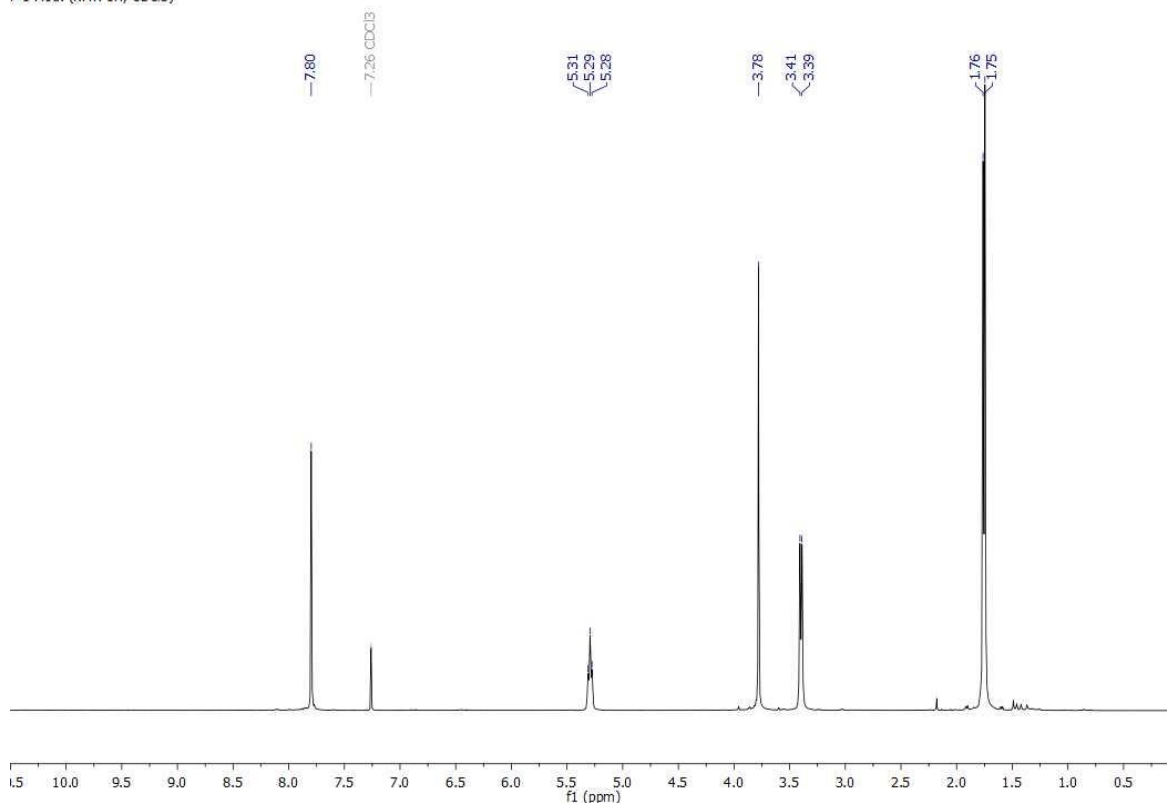


Figura 4-1. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **P-1**.

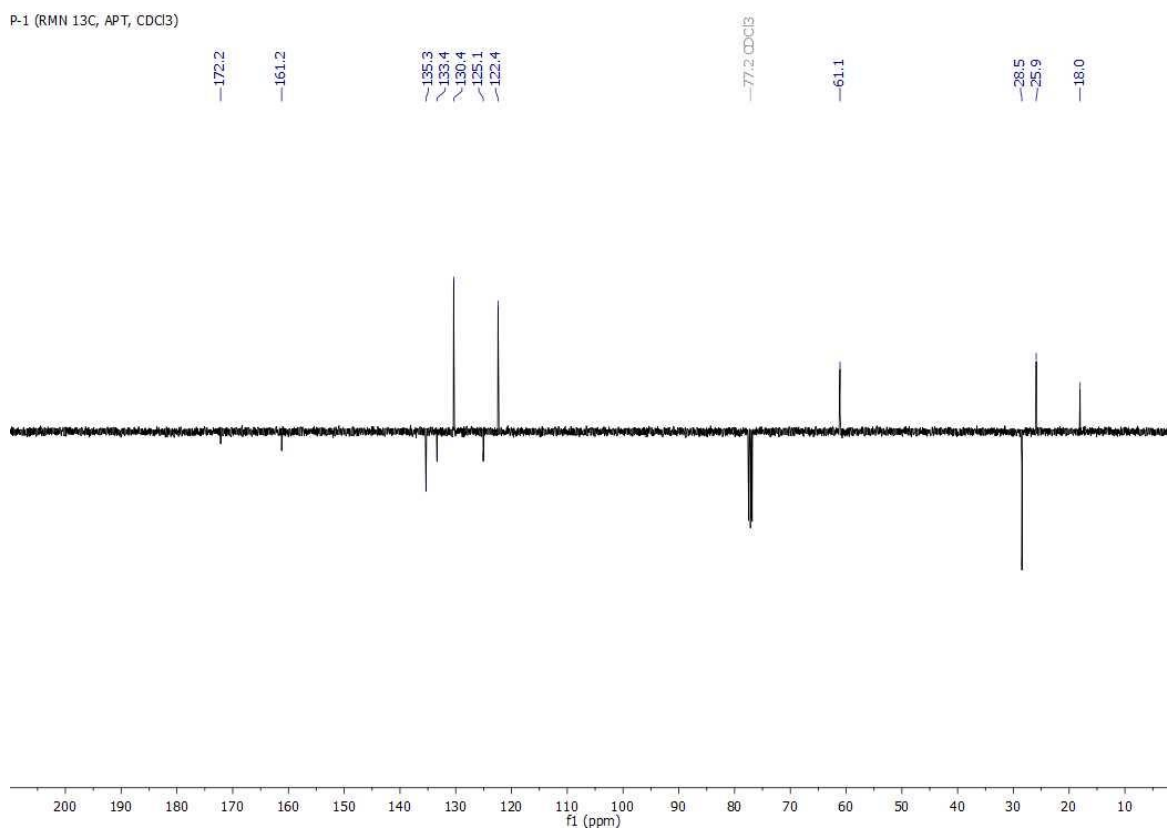


Figura 4-2. Espectro APT (CDCl₃, 100 MHz) de P-1.

	Nombre	Ácido nervogénico (P-2)
	Estado físico	Sólido cristalino blanco
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₂ O ₃
	Peso molecular	274.36 g/mol
	Punto de fusión	79 - 81 °C
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.77 (s, 2H, H-2, H-6), 5.32 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H, H-2', H-2''), 3.38 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 4H, H-1', H-1''), 1.79 (s, 12H, H-4', H-5', H-4'', H-5'').		
APT (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 172.0 (C=O), 158.0 (C-4), 135.4 (C-3', C-3''), 130.6 (C-2, C-6), 127.3 (C-3, C-5), 121.4 (C-2', C-2''), 121.2 (C-1), 29.7 (C-1', C-1''), 26.0 (C-4', C-4''), 18.1 (C-5', C-5'').		
Datos descritos en la literatura: (Orjala <i>et al.</i> , 1993).		

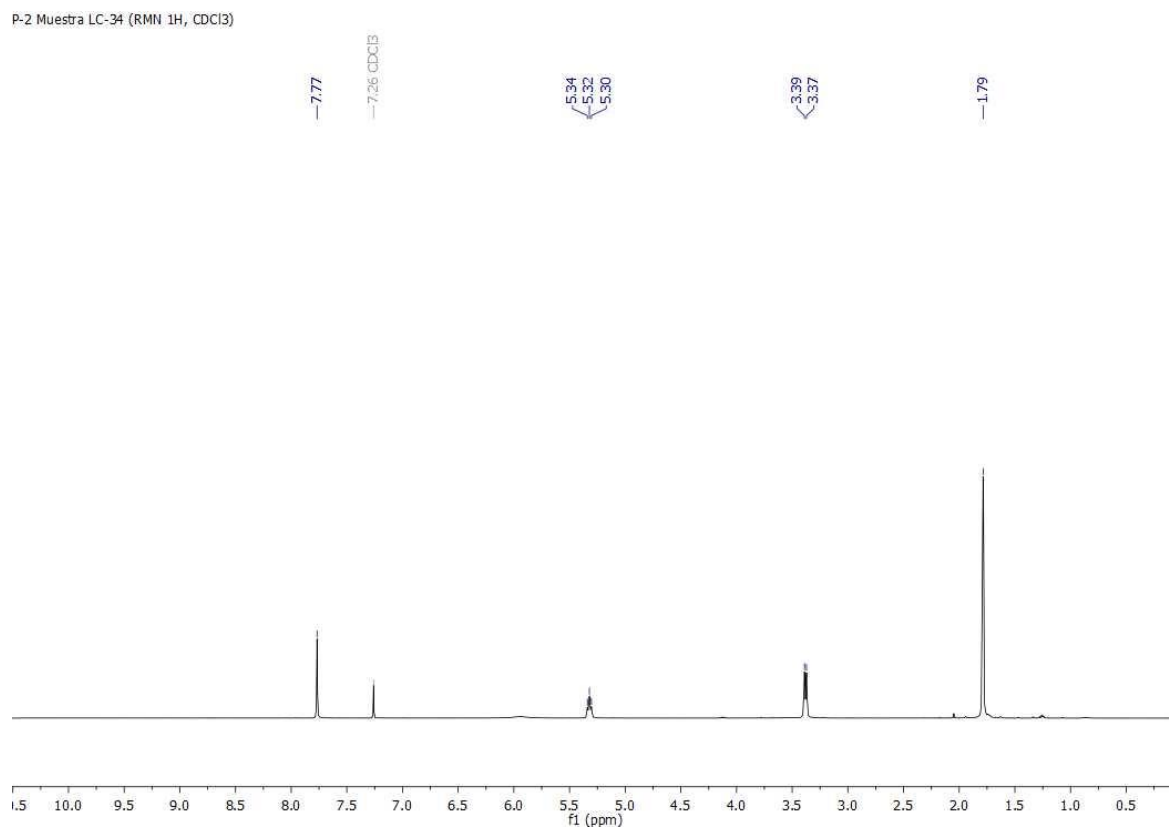
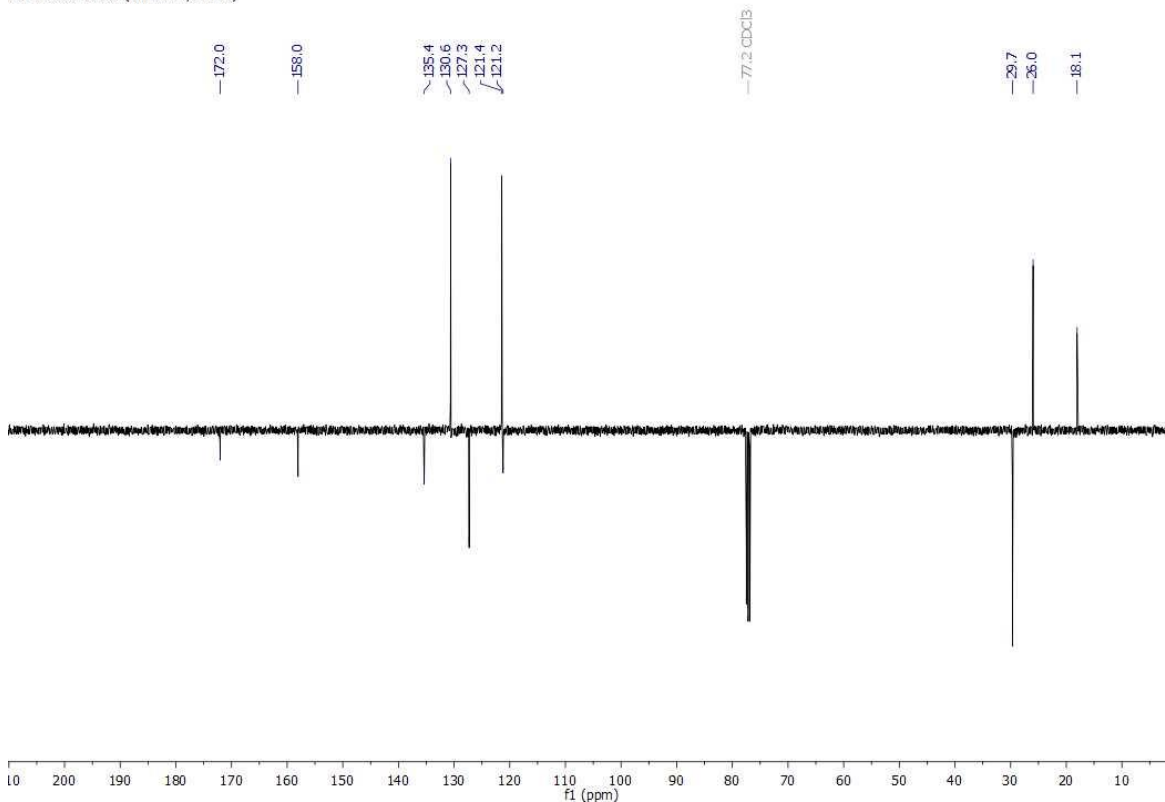


Figura 4-3. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **P-2**.

P-2 Muestra LC-34 (RMN APT, CDCl₃)Figura 4-4. Espectro APT (CDCl₃, 100 MHz) de P-2.

	Nombre	Ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidrobenzoico (P-3)
	Estado físico	Sólido cristalino amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₀ O ₄
	Peso molecular	288.34 g/mol
	Punto de fusión	178 - 180 °C
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13.79 (s, 1H, OH), 8.48 (s, 1H, H-2), 8.03 (s, 1H, H-6), 6.88 (s, 1H, H-2'), 5.34 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, H-2''), 3.39 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H, H-1''), 2.24 (s, 3H, H-5'), 2.09 (s, 3H, H-4'), 1.78 (s, 3H, H-4''), 1.73 (s, 3H, H-5'').		
APT (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 196.0 (C=O), 171.3 (C=O), 166.1 (C-4), 159.8 (C-3'), 136.1 (C-2), 134.0 (C-3''), 131.6 (C-3), 131.0 (C-6), 120.9 (C-2''), 119.6 (C-2'), 119.5 (C-5), 118.8 (C-1), 28.4 (C-4'), 27.7 (C-1''), 25.8 (C-4''), 21.6 (C-5'), 17.8 (C-5'').		
Datos descritos en la literatura: (Orjala <i>et al.</i> , 1993).		

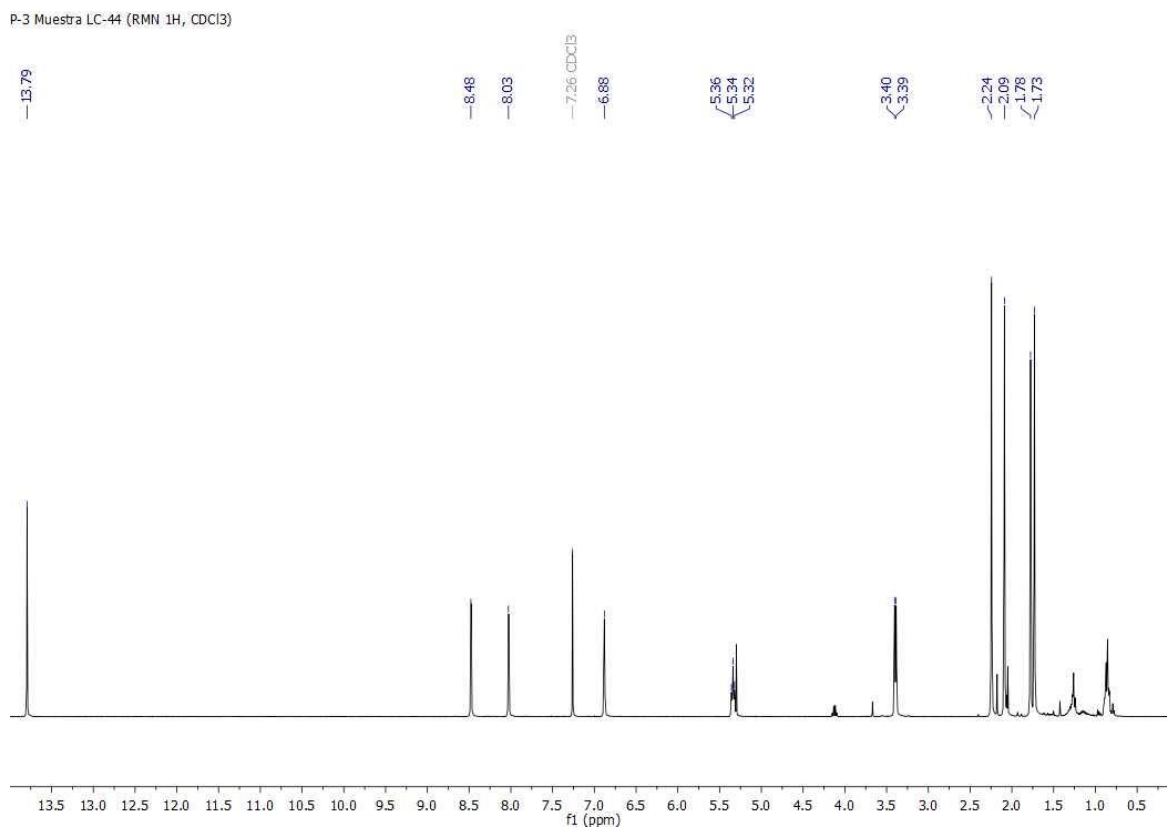
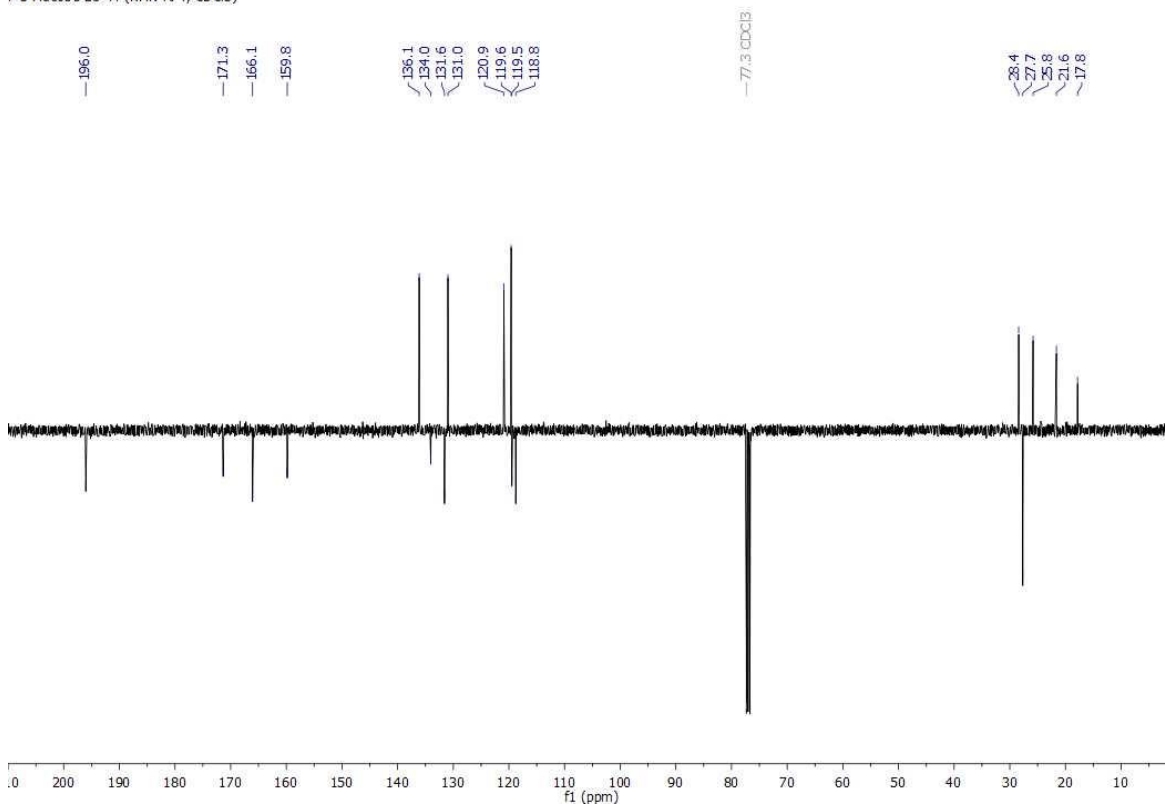
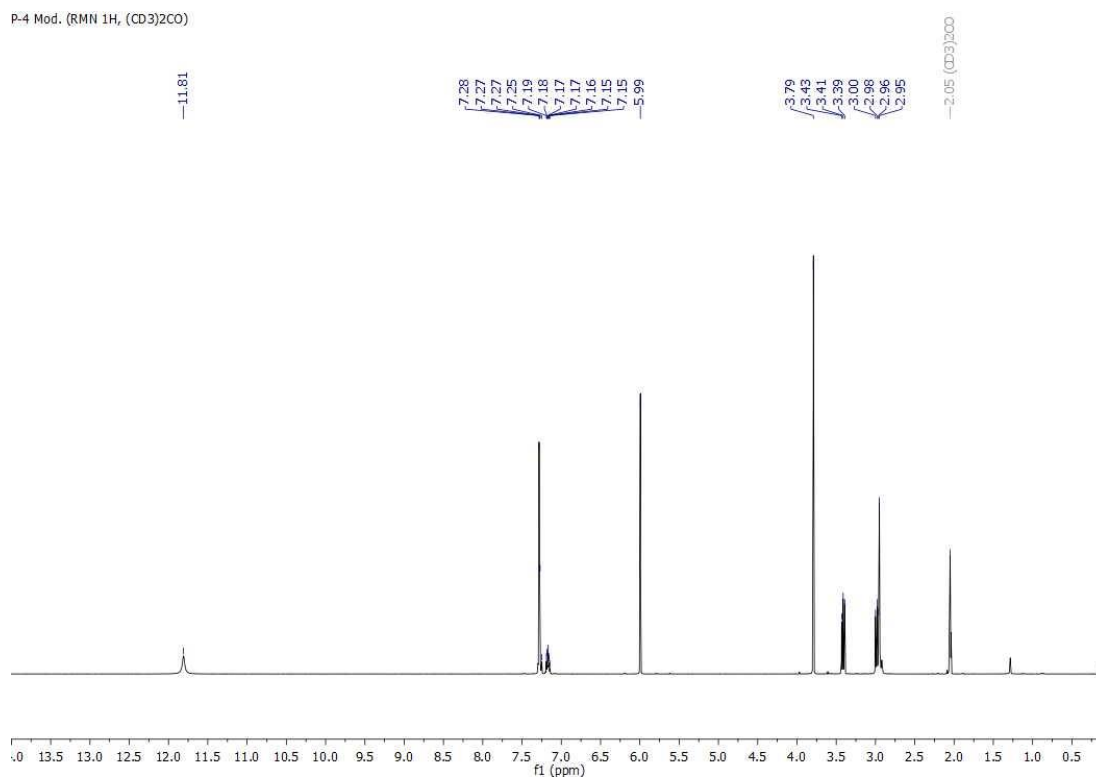
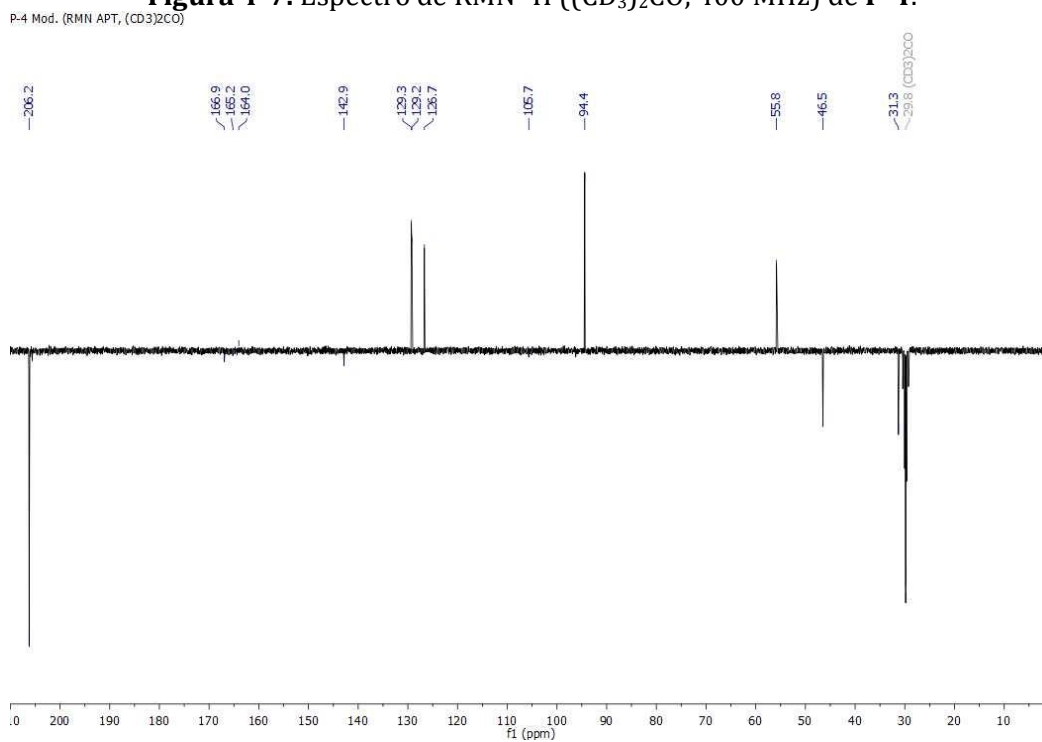


Figura 4-5. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **P-3**.

P-3 Muestra LC-44 (RMN APT, CDCl₃)Figura 4-6. Espectro APT (CDCl₃, 100 MHz) de P-3.

	Nombre	2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona (P-4)
	Estado físico	Sólido blanco
	Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₆ O ₄
	Peso molecular	272.30 g/mol
	Punto de fusión	169 - 171 °C
RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 11.81 (s, 1H, OH), 7.28 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 4H, H-2, H-6, H-3, H-5), 7.20 - 7.14 (m, 1H, H-4), 5.99 (s, 2H, H-3', H-5'), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.41 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H, H-α), 2.98 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H, H-β).		
APT (100 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 206.2 (C=O), 166.9 (C-2'), 165.2 (C-6'), 164.0 (C-4'), 142.9 (C-1), 129.3 (C-2, C-6), 129.2 (C-3, C-5), 126.7 (C-4), 105.7 (C-1'), 94.4 (C-3', C-5'), 55.8 (OMe), 46.5 (C-α), 31.3 (C-β).		
Datos descritos en la literatura: (Hermoso <i>et al.</i> , 2003).		

**Figura 4-7.** Espectro de RMN ¹H ((CD₃)₂CO, 400 MHz) de P-4.**Figura 4-8.** Espectro APT ((CD₃)₂CO, 100 MHz) de P-4.

2. Anexos de síntesis

Datos espectroscópicos y constantes físicas de los compuestos:

2',4',6'-trimetoxidihidrochalcona **(P-5)**

1-(2',6'-dihidroxi-4'-metoxifenil)-3-fenilpropano **(P-6)**

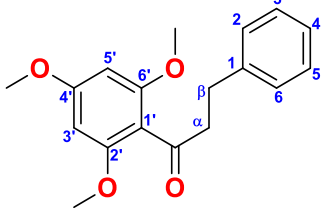
3,5-bis(3',3'-dimetilalil)-4-metoxibenzoato de metilo **(P-7)**

Ácido 3,5-diisopentil-4-metoxibenzoico **(P-8)**

Ácido 2,2-dimetil-8-(3',3'-dimetilalil)-2H-1-cromeno-6-carboxílico **(P-9)**

Ácido 2,2-dimetil-8-(3',3'-dimetilalil)-4-oxocromano-6-carboxílico **(P-10)**

2,6-bis(3',3'-dimetilalil)-1-metoxibenceno **(P-11)**

	Nombre	2',4',6'-trimetoxidihidrochalcona (P-5)
	Estado físico	Sólido cristalino amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₈ H ₂₀ O ₄
	Peso molecular	300.35 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.21 (dd, <i>J</i> = 15.0, 8.0 Hz, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 6.08 (s, 2H, CH-3', H-5'), 3.81 (s, 3H, OMe-4'), 3.74 (s, 6H, OMe-2',6'), 3.48 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, H-α), 3.02 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, H-β).		
APT (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 203.3 (C=O), 162.0 (C-4'), 157.9 (C-2', C-6'), 141.3 (C-1), 128.1 (C-5, C-3), 128.0 (C-2, C-6), 125.5 (C-4), 112.3 (C-1'), 90.2 (C-3', C-5'), 55.5 (OMe-2',6'), 55.2 (OMe-4'), 46.0 (C-α), 29.7 (C-β).		
Datos descritos en la literatura: (Burmaoglu <i>et al.</i> , 2016).		

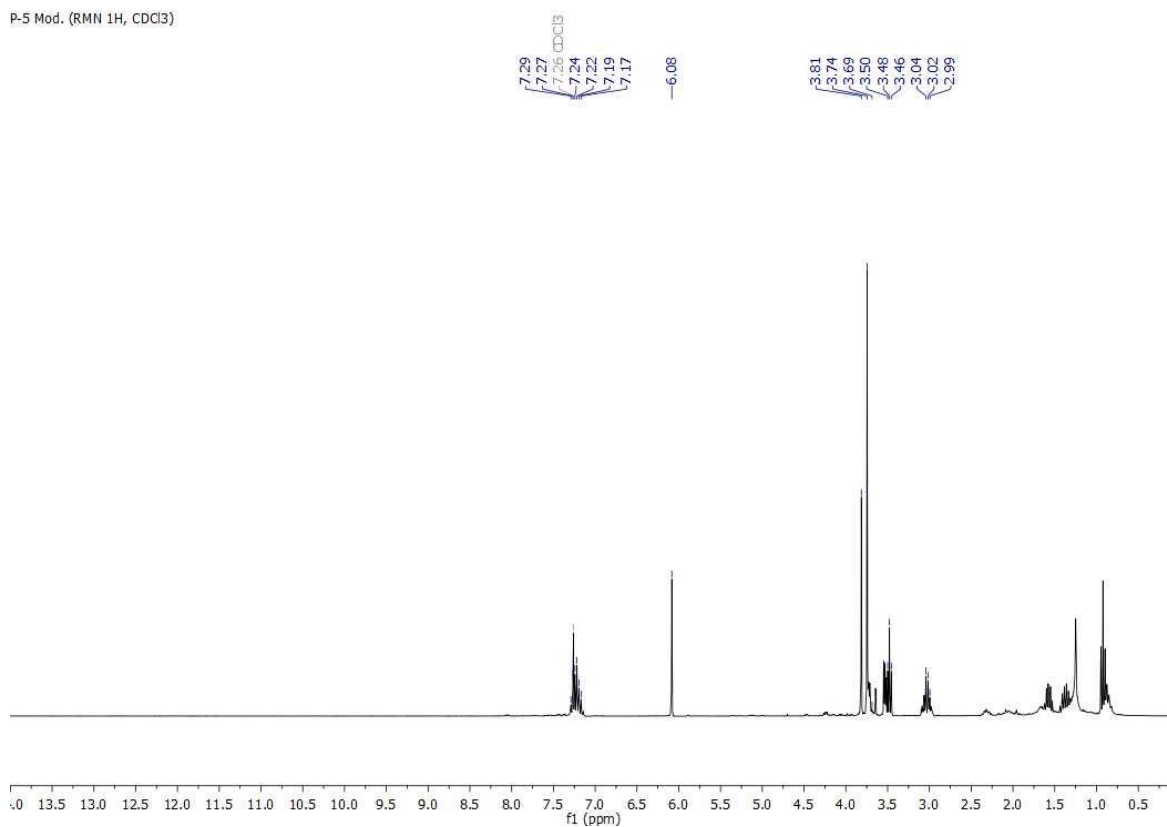
P-5 Mod. (RMN ¹H, CDCl₃)

Figura 4-9. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de P-5.

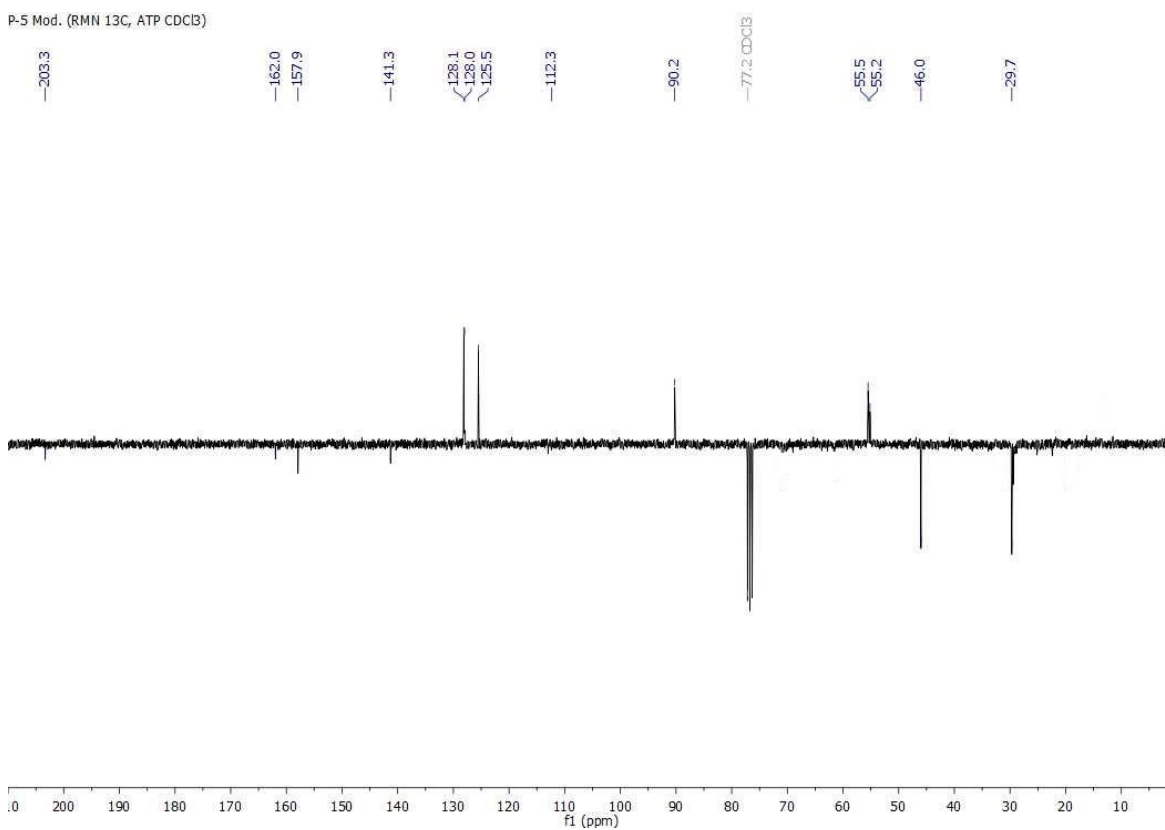


Figura 4-10. Espectro APT (CDCl₃, 100 MHz) de P-5.

	Nombre	1-(2',6'-dihidroxi-4'-metoxifenil)-3-fenilpropano (P-6)
	Estado físico	Sólido amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₈ O ₃
	Peso molecular	258.32 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 8.02 (s, 2H, OH), 7.39 - 7.15 (m, 5H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 5.99 (s, 2H, H-3', H-5'), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.41 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, H-1), 2.98 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, H-3), 2.20 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, H-2).		
APT (100 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 161.4 (C-4'), 158.2 (C-2', C-6'), 142.3 (C-4), 128.7 (C-6, C-8), 128.4 (C-5, C-9), 126.7 (C-7), 111.0 (C-1'), 96.4 (C-3', C-5'), 55.5 (OMe), 35.8 (C-3), 31.3 (C-2), 24.6 (C-1).		
Datos descritos en la literatura: No reportado.		

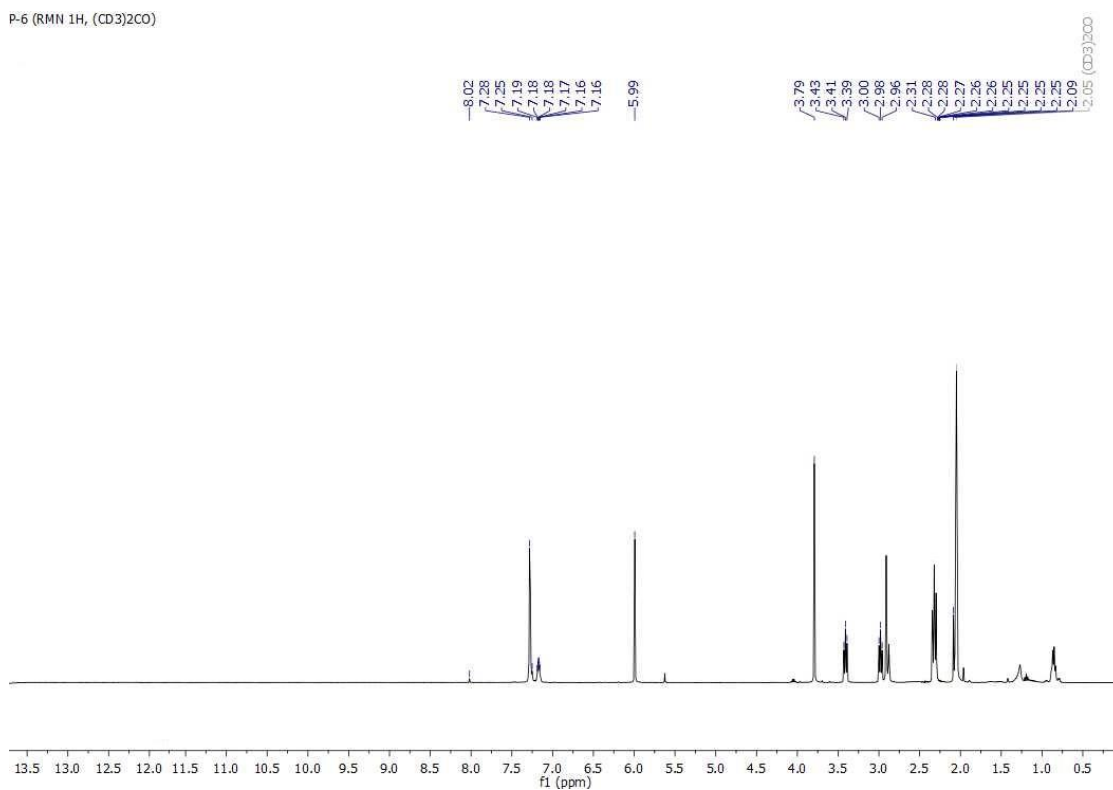
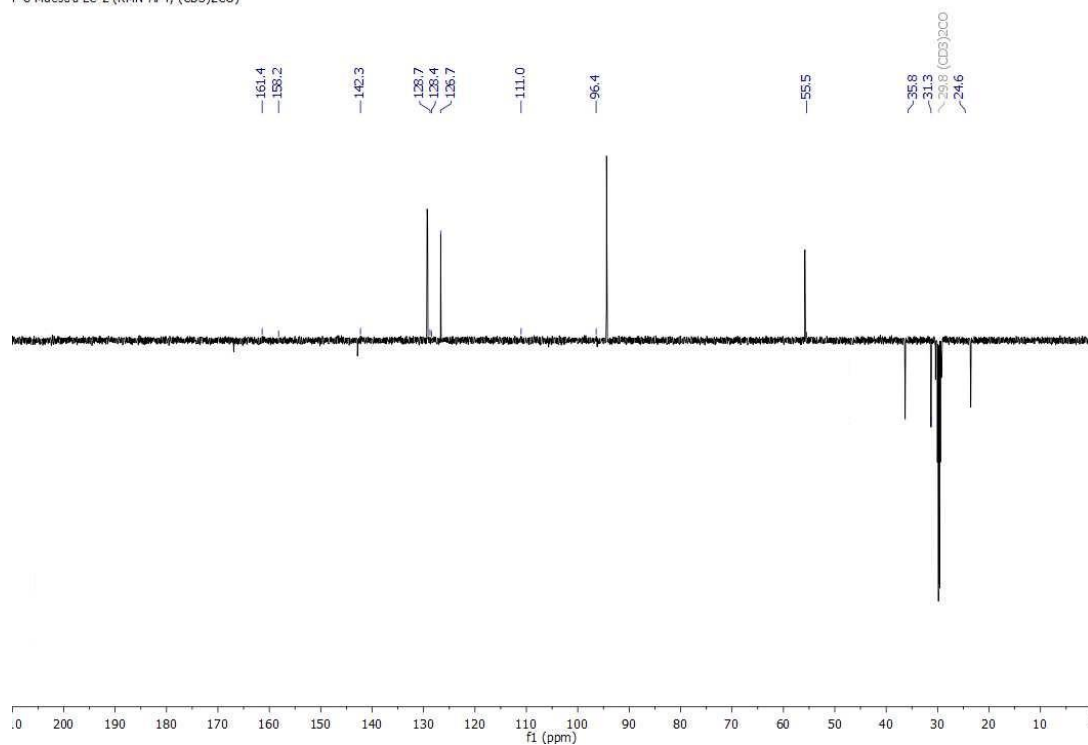
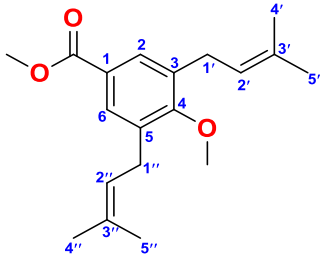
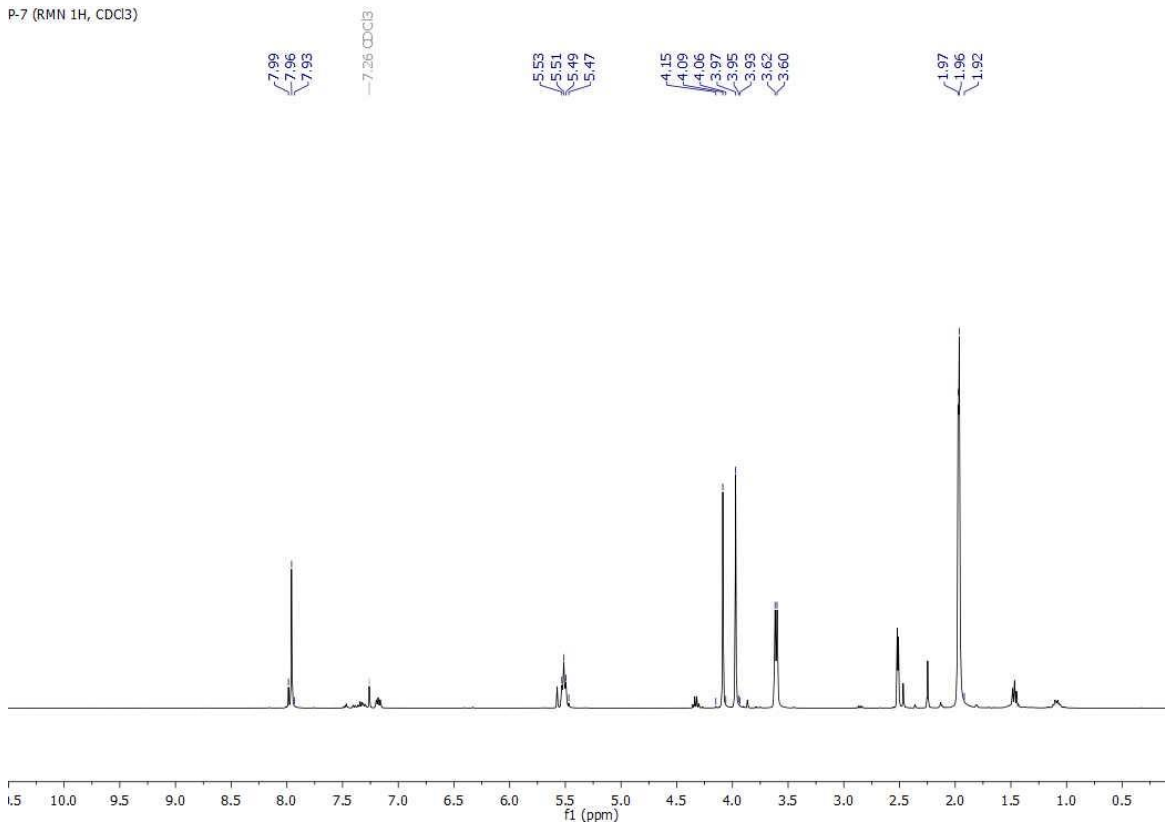
**Figura 4-11.** Espectro de RMN ^1H $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz de P-6.P-6 Muestra LC-2 (RMN APT, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

Figura 4-12. Espectro APT ((CD₃)₂CO, 100 MHz) de P-6.

	Nombre	3,5-bis(3',3'-dimetilalil)-4-metoxibenzoato de metilo (P-7)
	Estado físico	Aceite amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₉ H ₂₆ O ₃
	Peso molecular	302.41 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.96 (s, 2H, H-2, H-6), 5.51 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-2', H-2''), 4.09 (s, 3H, OMe-éster), 3.97 (s, 3H, OMe), 3.61 (d, J = 7.2 Hz, 4H, H-1', H-1''), 1.97 (s, 6H, H-4', H-4''), 1.96 (s, 6H, H-5', H-5'').		
APT (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 167.0 (C=O), 160.3 (C-4), 135.0 (C-3', C-3''), 132.9 (C-3, C-5), 129.6 (C-2, C-6), 125.9 (C-1), 122.6 (C-2', C-2''), 60.9 (OMe), 51.8 (OMe-éster), 28.4 (C-1', C-1''), 25.7 (C-4', C-4''), 17.8 (C-5', C-5'').		
Datos descritos en la literatura: (Orjala <i>et al.</i> , 1993).		

P-7 (RMN ¹H, CDCl₃)Figura 4-13. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de P-7.

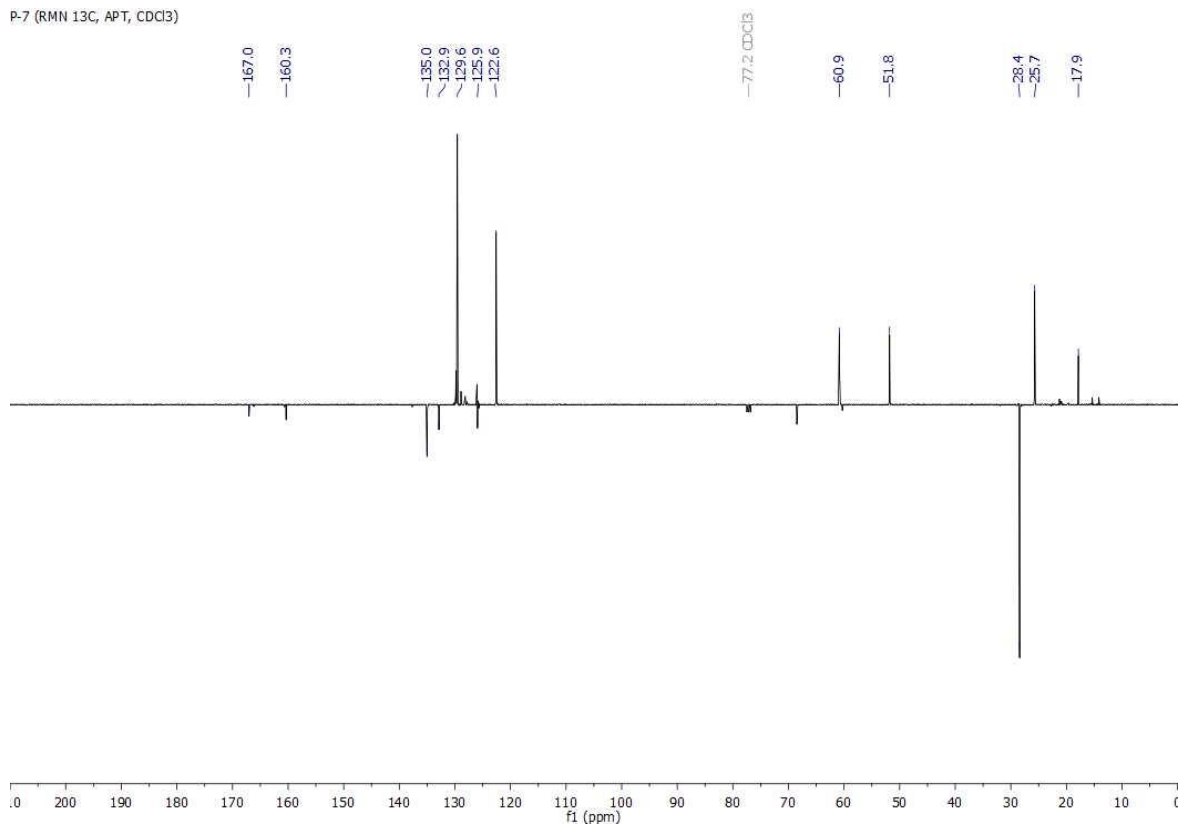


Figura 4-14. Espectro APT (CDCl₃, 100 MHz) de P-7.

	Nombre	Ácido 3,5-diisopentilo-4-metoxibenzoico (P-8)
	Estado físico	Aceite amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₈ H ₂₈ O ₃
	Peso molecular	292.42 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.82 (s, 2H, H-2, H-6), 3.79 (s, 3H, OMe), 2.75 – 2.60 (m, 4H, H-1', H-1''), 1.65 (dt, <i>J</i> = 6.9, 6.5 Hz, 2H, H-3', H-3''), 1.53 (q, <i>J</i> = 6.9, 6.5 Hz, 4H, H-2', H-2''), 0.98 (s, 6H, H-4', H-4''), 0.96 (s, 6H, H-5', H-5'').		
APT (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 172.6 (C=O), 161.4 (C-4), 136.6 (C-3, C-5), 130.1 (C-2, C-6), 124.9 (C-1), 61.4 (OMe), 40.0 (C-2', C-2''), 28.3 (C-3', C-3''), 27.9 (C-1', C-1''), 22.7 (C-4', C-4''), 22.6 (C-5', C-5'').		
Datos descritos en la literatura: No reportado.		

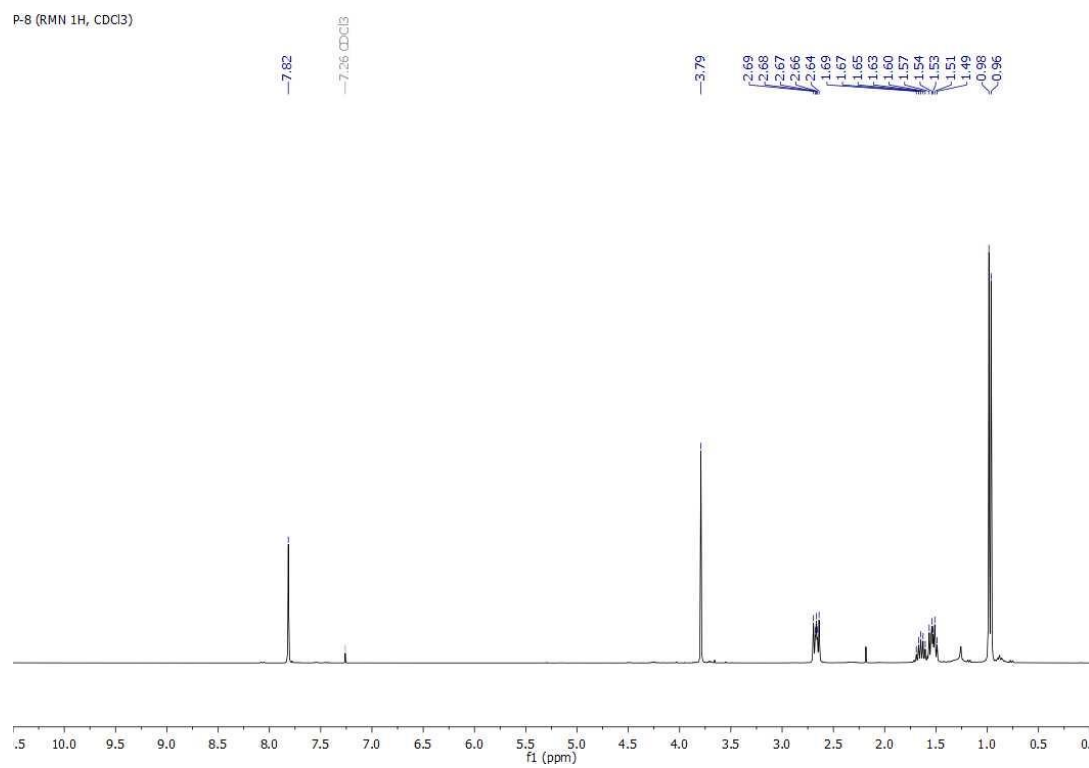


Figura 4-15. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **P-8**.

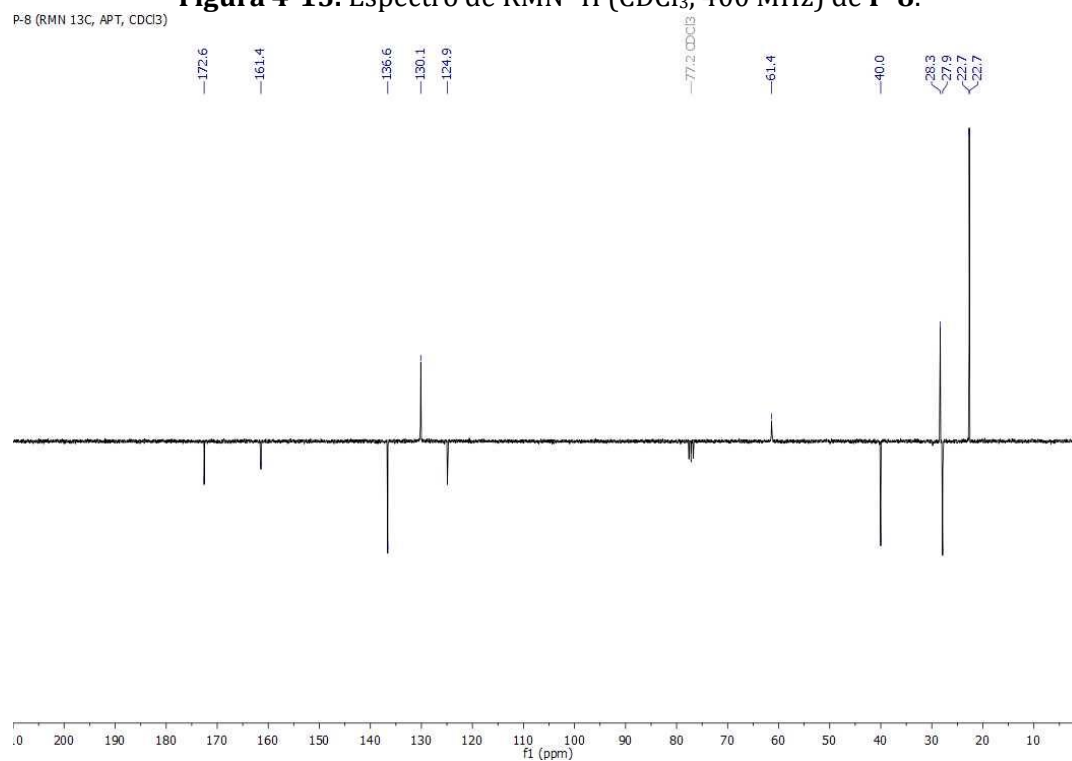
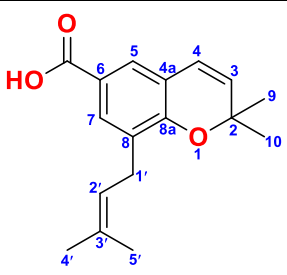
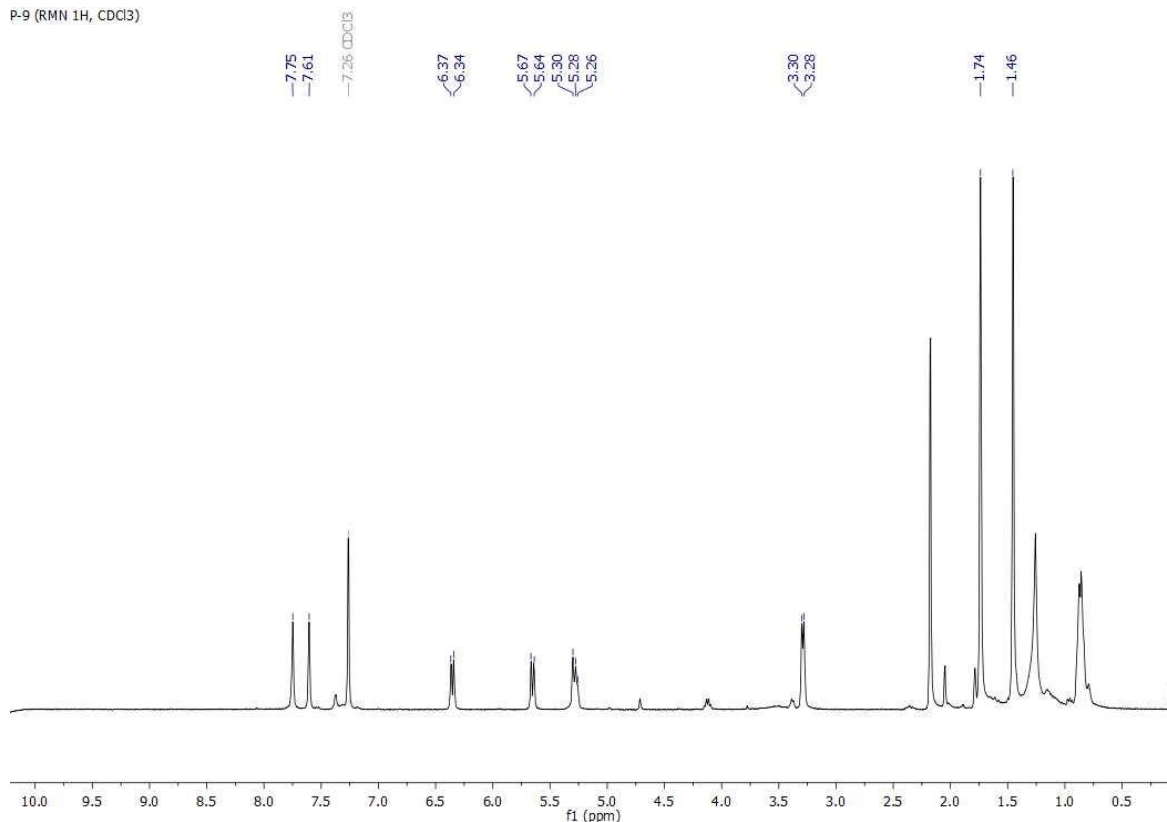
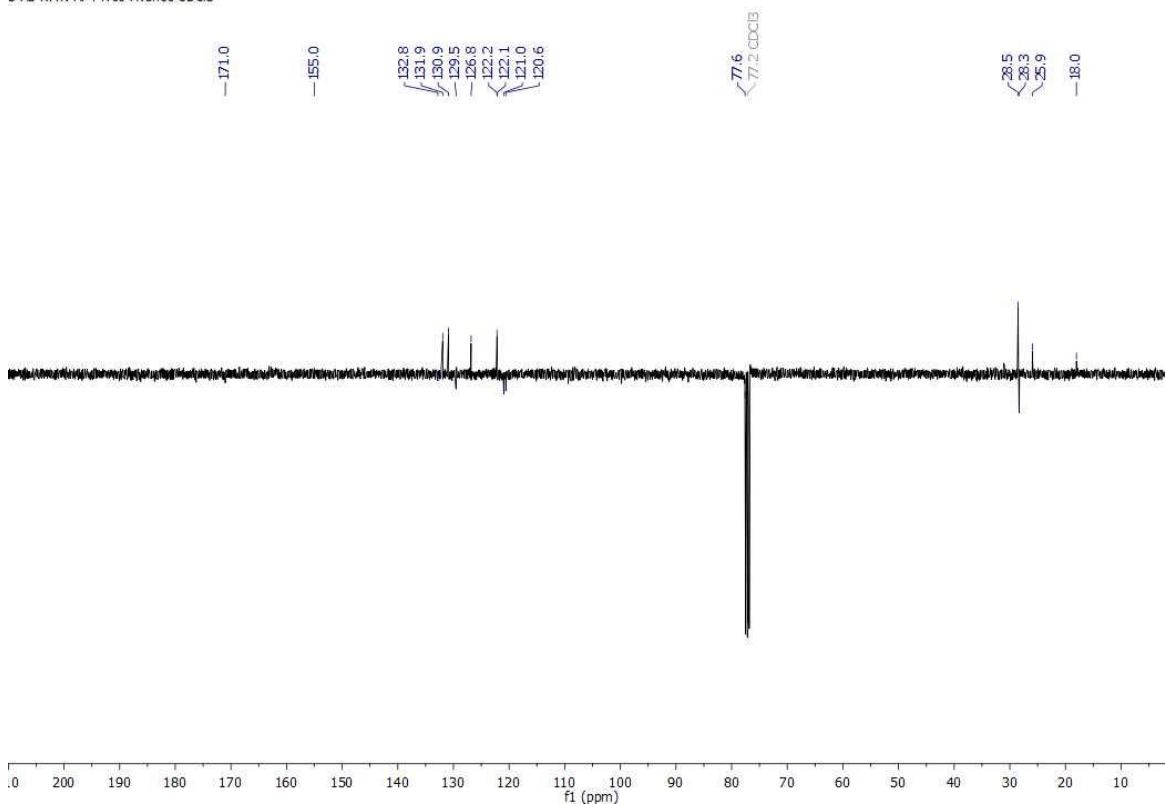


Figura 4-16. Espectro APT (CDCl₃, 100 MHz) de P-8.

	Nombre	Ácido 2,2-dimetil-8-(3',3'-dimetilalil)-2H-1-cromeno-6-carboxílico (P-9)
	Estado físico	Sólido amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₀ O ₃
	Peso molecular	272.34 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.75 (s, 1H, H-7), 7.61 (s, 1H, H-5), 6.35 (d, <i>J</i> = 9.9 Hz, 1H, H-4), 5.65 (d, <i>J</i> = 11.4 Hz, 1H, H-3), 5.28 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, H-2'), 3.29 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H, H-1'), 1.74 (s, 6H, H-4', H-5'), 1.46 (s, 6H, H-9, H-10).		
APT (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.0 (C=O), 155.0 (C-8a), 132.8 (C-3'), 131.9 (C-7), 130.9 (C-3), 129.5 (C-8), 126.8 (C-5), 122.2 (C-4), 122.1 (C-2'), 121.0 (C-6), 120.6 (C-4a), 77.6 (C-2), 28.5 (C-9,10), 28.3 (C-1'), 25.9 (C-4'), 18.0 (C-5').		
Datos descritos en la literatura: (Orjala <i>et al.</i> , 1993).		

P-9 (RMN ¹H, CDCl₃)Figura 4-17. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de P-9.

S-A3 RMN APT Neo Avance CDCl₃Figura 4-18. Espectro APT (CDCl₃, 100 MHz) de P-9.

	Nombre	Ácido 2,2-dimetil-8-(3',3'-dimetilalil)-4-oxocromano-6-carboxílico (P-10)
	Estado físico	Sólido amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₀ O ₄
	Peso molecular	288.34 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.51 (s, 1H, H-5), 8.03 (s, 1H, H-7), 5.26 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 1H, H-2'), 3.34 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H, H-1') 2.77 (s, 2H, H-3), 1.76 (s, 3H, H-4') 1.74 (s, 3H, H-5'), 1.49 (s, 6H, H-9, H-10).		
APT (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 191.9 (C=O), 170.3 (C=O), 157.8 (C-8a), 133.8 (C-3'), 131.2 (C-7), 130.2 (C-8), 127.8 (C-5), 121.4 (C-6), 121.2 (C-2'), 119.8 (C-4a), 80.3 (C-2), 48.6 (C-3), 28.4 (C-1'), 26.9 (C-9, C-10), 25.9 (C-4'), 18.1 (C-5').		
Datos descritos en la literatura: No reportado.		

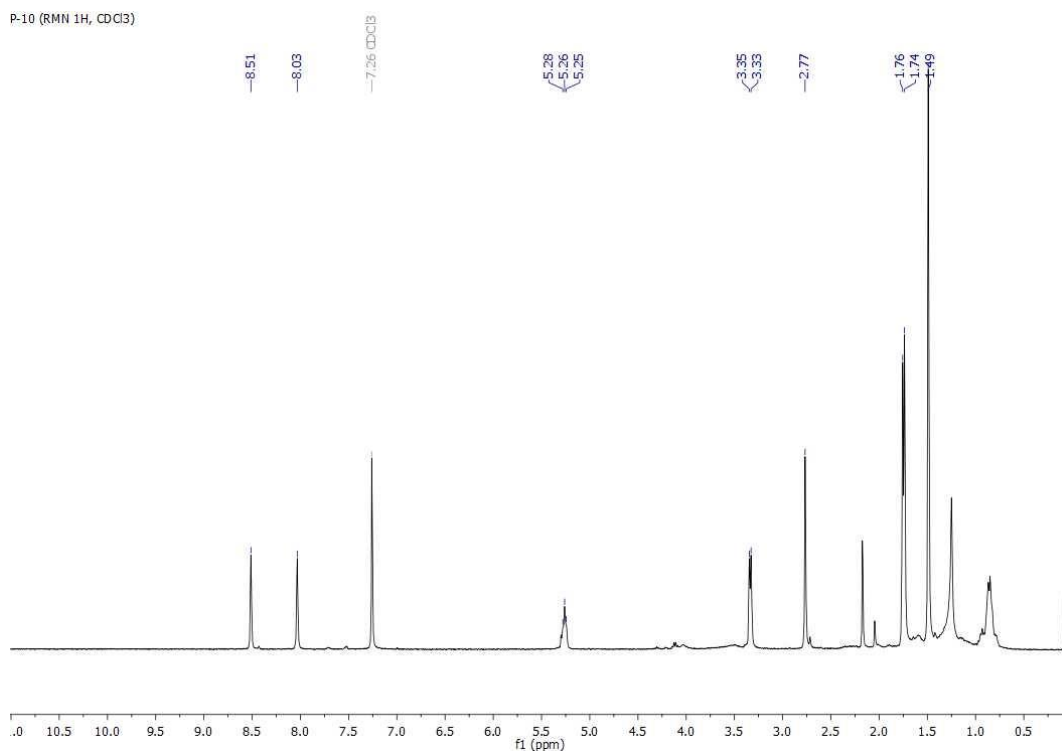


Figura 4-19. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **P-10**.

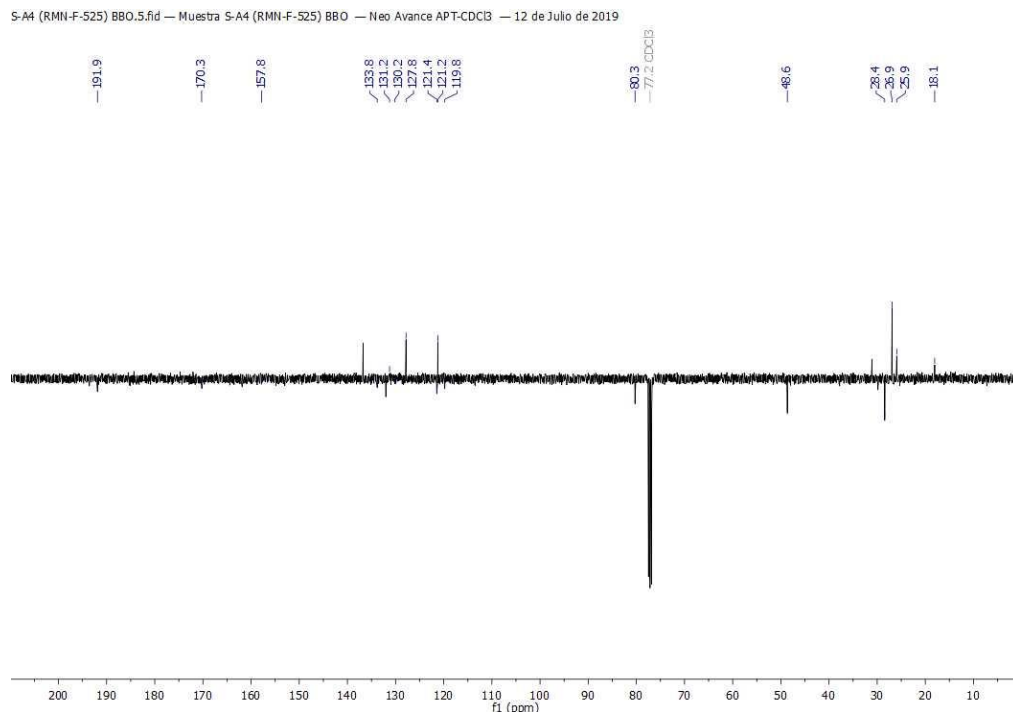


Figura 4-20. Espectro APT (CDCl₃, 100 MHz) de P-10.

	Nombre	2,6-bis(3',3'-dimetilalil)-1-metoxibenceno (P-11)
	Estado físico	Sólido amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₄ O
	Peso molecular	244.38 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.59 – 7.50 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 5.29 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, H-2', H-2''), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.38 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 4H, H-1', H-1''), 1.75 (s, 12H, H-4', H-4'', H-5', H-5'').		
APT (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 160.4 (C-1), 135.1 (C-3', C-3''), 133.1 (C-2, C-6), 129.7 (C-3, C-5), 125.8 (C-4), 122.7 (C-2', C-2''), 61.1 (OMe), 28.6 (C-1', C-1''), 25.9 (C-4', C-4''), 18.1 (C-5', C-5'').		
Datos descritos en la literatura: No reportado.		

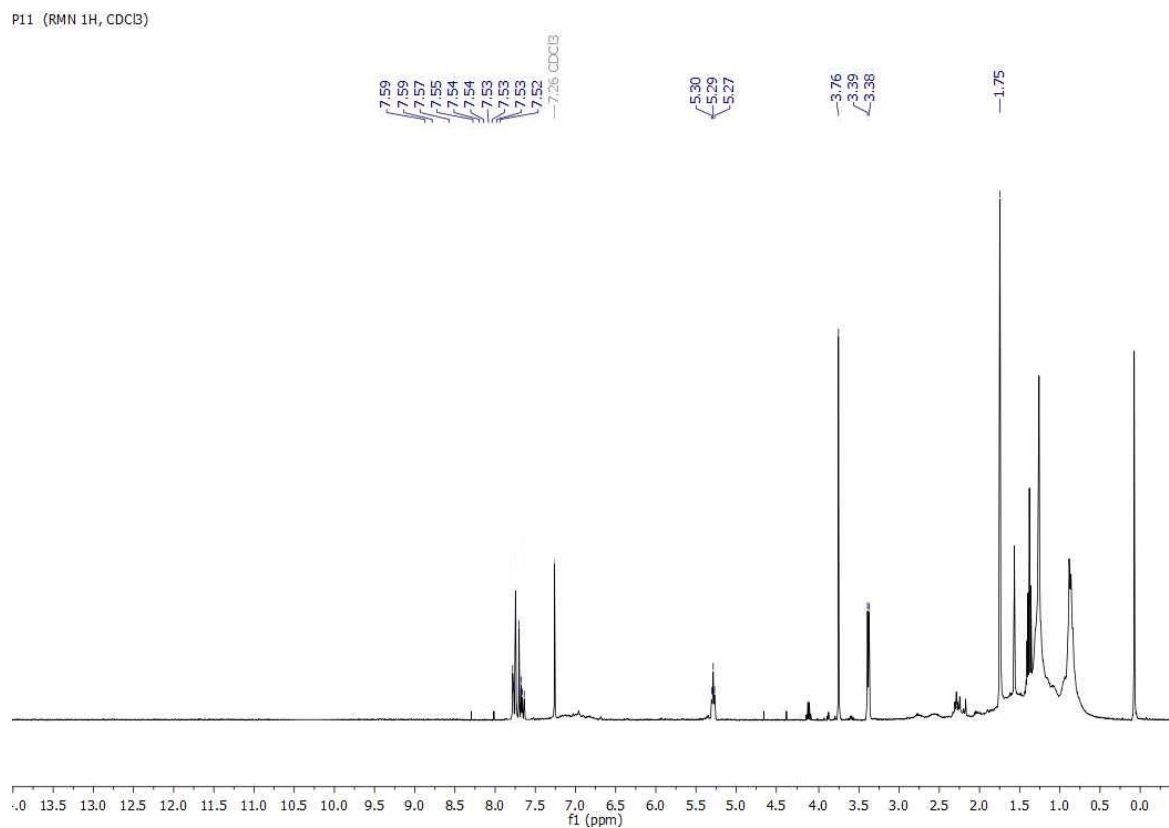


Figura 4-21. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **P-11**.

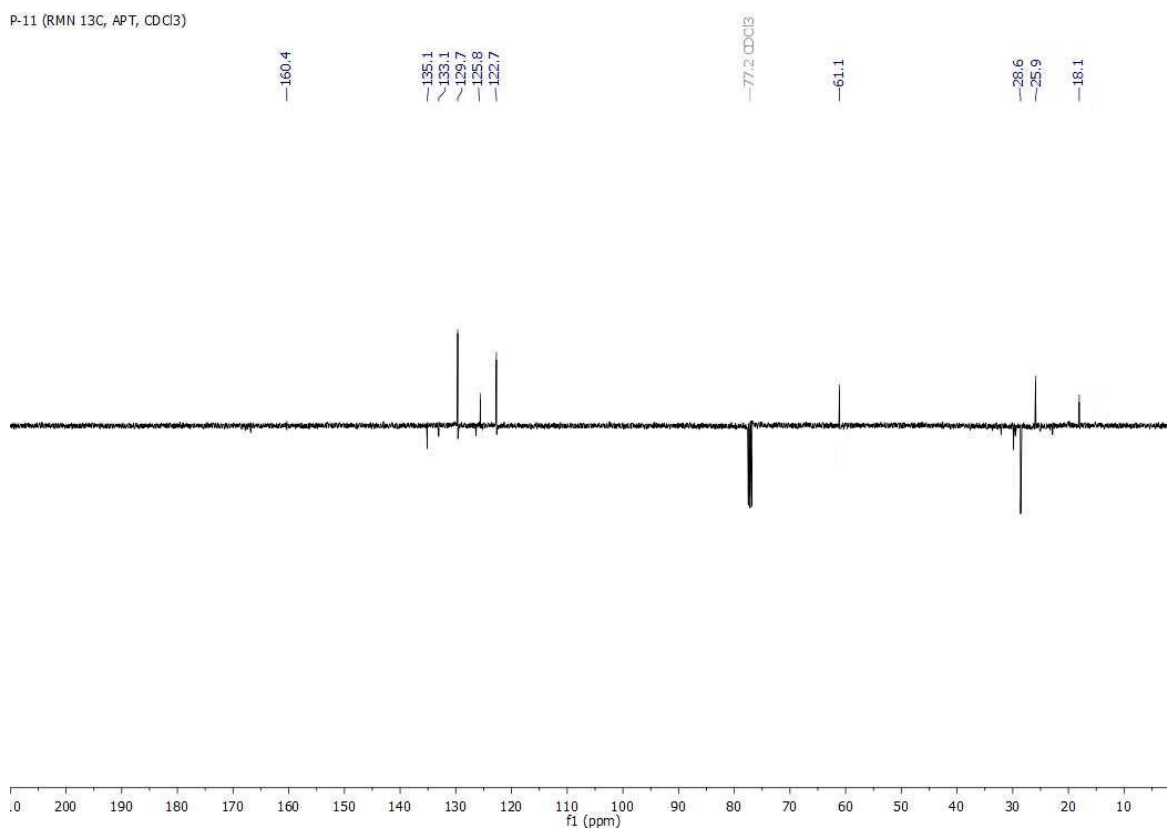


Figura 4-22. Espectro APT (CDCl₃, 100 MHz) de **P-11**.

3. Anexos de actividad biológica

Tabla 4 - 1. Resultados de los % inhibición y de CI₅₀ de los compuestos naturales y sintéticos.

Compuesto	<i>M. roseri</i>			<i>F. solani</i>			<i>Phytophthora sp.</i>		
	^a % inhibición	^b CI ₅₀ µg/mL	^b CI ₅₀ µM	^a % inhibición	^b CI ₅₀ µg/mL	^b CI ₅₀ µM	^a % inhibición	^b CI ₅₀ µg/mL	^b CI ₅₀ µM
C+	100,00 ± 1,04	2,76 ± 0,22	4,94 ± 0,55	100,00 ± 0,70	5,57 ± 0,70	10,16 ± 0,70	100,00 ± 0,53	5,26 ± 0,74	9,90 ± 0,73
P-1	80,66 ± 0,97	16,17 ± 1,49	56,07 ± 1,49	71,26 ± 0,71	27,19 ± 0,19	94,27 ± 0,20	84,70 ± 1,29	12,42 ± 2,47	43,07 ± 2,47
P-2	71,57 ± 1,19	26,90 ± 0,71	97,42 ± 0,73	67,14 ± 0,70	14,73 ± 0,69	50,85 ± 0,70	100,00 ± 2,13	12,03 ± 0,50	31,61 ± 0,45
P-3	69,61 ± 1,11	12,81 ± 2,29	44,40 ± 2,29	100,00 ± 0,11	9,37 ± 0,94	32,49 ± 0,94	89,99 ± 1,34	24,04 ± 0,98	83,34 ± 0,98
P-4	75,38 ± 0,63	17,65 ± 0,77	63,02 ± 0,76	100,00 ± 0,77	14,52 ± 0,20	34,30 ± 0,22	100,00 ± 2,21	8,72 ± 1,45	26,72 ± 1,49
P-5	70,13 ± 1,05	19,05 ± 0,89	97,96 ± 0,89	86,66 ± 0,12	20,54 ± 0,22	68,03 ± 0,23	100,00 ± 1,36	10,18 ± 0,87	32,23 ± 0,92
P-6	80,57 ± 1,18	24,06 ± 0,70	243,10 ± 0,18	82,89 ± 0,89	24,06 ± 0,17	101,80 ± 0,18	100,00 ± 1,22	13,38 ± 1,23	29,02 ± 1,16
P-7	100,00 ± 0,86	2,02 ± 0,19	6,68 ± 1,19	88,09 ± 0,91	13,75 ± 0,42	45,52 ± 0,42	87,60 ± 1,00	13,68 ± 0,43	45,30 ± 0,43
P-8	85,44 ± 0,84	13,01 ± 0,97	40,13 ± 0,97	92,20 ± 0,12	23,96 ± 0,72	80,96 ± 0,75	81,81 ± 1,35	12,52 ± 1,89	38,80 ± 1,91
P-9	100,00 ± 2,00	1,84 ± 0,53	2,95 ± 0,61	100,00 ± 0,77	9,51 ± 0,74	35,07 ± 0,73	92,17 ± 1,57	10,94 ± 1,73	39,06 ± 1,71
P-10	87,84 ± 1,69	12,43 ± 0,53	43,09 ± 0,53	100,00 ± 0,36	10,37 ± 0,50	35,96 ± 0,50	88,67 ± 1,10	10,36 ± 0,51	35,91 ± 0,51
P-11	65,25 ± 1,20	53,17 ± 1,44	216,60 ± 1,44	75,99 ± 0,39	30,90 ± 0,54	124,60 ± 0,53	75,99 ± 0,39	121,70 ± 0,52	496,00 ± 0,52
P-12	46,82 ± 1,32	ND	ND	10,92 ± 1,01	ND	ND	10,05 ± 1,74	ND	ND
P-13	25,49 ± 1,26	ND	ND	15,61 ± 0,39	ND	ND	20,51 ± 1,01	ND	ND
P-14	35,51 ± 1,15	ND	ND	25,03 ± 0,39	ND	ND	24,59 ± 1,07	ND	ND
P-15	27,11 ± 1,54	ND	ND	27,43 ± 0,81	ND	ND	26,78 ± 1,43	ND	ND
P-16	25,53 ± 1,26	ND	ND	26,40 ± 0,99	ND	ND	25,58 ± 1,01	ND	ND
P-17	36,93 ± 1,20	ND	ND	33,25 ± 0,89	ND	ND	16,25 ± 0,34	ND	ND
P-18	46,68 ± 1,18	ND	ND	39,63 ± 0,18	ND	ND	16,68 ± 1,61	ND	ND
P-19	48,33 ± 0,52	ND	ND	35,99 ± 0,99	ND	ND	18,80 ± 1,01	ND	ND
P-20	81,02 ± 1,13	14,48 ± 0,83	49,02 ± 0,85	86,32 ± 0,78	14,81 ± 0,65	48,53 ± 0,65	73,88 ± 1,49	23,38 ± 1,15	80,48 ± 1,13
P-21	100,00 ± 1,36	9,09 ± 1,44	19,35 ± 1,44	80,15 ± 0,60	29,66 ± 1,08	115,50 ± 1,08	79,44 ± 1,67	27,80 ± 1,44	107,70 ± 1,40
P-22	100,00 ± 1,05	1,15 ± 0,57	3,25 ± 0,63	81,52 ± 1,36	15,47 ± 0,80	41,40 ± 0,97	83,82 ± 2,59	14,06 ± 1,31	34,27 ± 1,33
P-23	84,71 ± 1,41	17,87 ± 1,42	78,72 ± 1,47	44,19 ± 0,45	ND	ND	67,14 ± 0,70	14,73 ± 0,69	60,69 ± 0,69

^a La concentración máxima evaluada fue de 200 µg/mL. ^b Los valores del % de inhibición y CI₅₀ (µg/mL y µM) están expresados como ± S (Desviación Estándar), donde n = 4, C+ = control positivo Mancozeb, ND = No determinado (P<0.05).

Bibliografía

- Agrios, G. (2005). Introduction to plant pathology *Introduction to plant pathology* (5 ed., pp. 15). Estados Unidos
- AGRONET. (2018). Red de Información y comunicación del Sector Agropecuario - AGRONET. Retrieved 8/09/2019, 2019, from [https://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/La-producci%C3%](https://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/La-producci%C3%9)
- Agudelo, C. (2016). Biodiversidad y pobreza en Colombia: un análisis desde el enfoque institucional. *Ciudad paz-ando*, 9(2), 11-24.
- AIRD. (2010). Estudio de benchmarking del Sector de Cacao entre República Dominicana y Colombia. In A. d. i. d. l. R. Dominicana (Ed.), *Estudio de Mercado* (pp. 36-40). Colombia: Aird.
- Ali, A., Mackeen, M., Mohamed, S., & Lajis, N. (2000). Antiviral, Cytotoxic And Antimicrobial Activities Of Anthraquinones Isolated From The Roots Of *Morinda Elliptica*. *Pharmaceutical Biology*, 38(4), 298-301.
- Aricapa, G. (2012). *Estudio Fitoquímico De Piper pesaresanum y Piper crassinervium (Piperaceae)*. (Tesis de Grado), Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Avantaggiato, G., Solfrizzo, M., Tosi, L., Zizzerini, A., Fanizzi, F., & Visconti, A. (1999). Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *Phomopsis helianthi*. *Natural Toxins*, 7(3), 119-127.
- Ávila, & Martínez, R. (2001). Efficient methylation of carboxylic acids with potassium hydroxide/methyl sulfoxide and iodomethane. *Journal Synthetic Communications*, 31(14), 2177-2183.
- Ávila, Patiño, O., Prieto, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2011). Flavonoides con actividad antifúngica aislados de *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC (Piperaceae). *Revista Colombiana de Química*, 40(1), 1-9.
- Barros, I., Souza, J., Pinto, J., Rezende, M., Filho, R., & Ferreira, D. (2011). Phytochemical and antifungal activity of anthraquinones and root and leaf extracts of *Coccoloba mollis* on phytopathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(3), 535-541.
- Basak, S., & Guha, P. (2017). Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion: Characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *Food Science and Technology*, 75, 616-623.
- Bawa, R., & Alzaraid, E. (2015). Antifungal study of two synthesized phenolic azo derivatives. *Organic Chemistry an Indian Journal*, 11(1), 014-018.
- Becerra, G., Morales, M., & Lopéz, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 14-23.
- Benítez, N., & Valois, H. (2004). Ethnobotany of Four Black Communities of the Municipality of Quibdo, Choco - Colombia. *Iyona a Journal of Ecology and Application*, 7(2), 62-69.
- Boonphong, S., Puangsombat, P., Baramée, A., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2007). Bioactive Compounds from *Bauhinia purpurea* Possessing Antimalarial,

- Antimycobacterial, Antifungal, Anti-inflammatory, and Cytotoxic Activities. *Journal of Natural Products*, 70, 795-801.
- Brown, J., & Dietrich, P. (1978). Mutagenicity of anthraquinone and benzanthrone derivatives in the salmonella/microsome test: Activation of anthraquinone glycosides by enzymic extracts of rat cecal bacteria. *Mutation Research*, 66(1), 9-24.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales. In E. Acribia (Ed.), *Amidas piperidínicas: Piperaceae* (Vol. 1, pp. 302-310)
- Burke, B., & Nair, M. (1986). Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of jamaican *Piper*. *Phytochemistry*, 25(6), 1427-1430.
- Burmaoglu, S., Algul, O., Anil, D., Gobek, A., Duran, G., Ersan, R., & Duran, N. (2016). Synthesis and anti-proliferative activity of fluoro-substituted chalcones. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 26, 3172-3176.
- Cabanillas, B. J., Le Lamer, A. C., Castillo, D., Arevalo, J., Estevez, Y., Rojas, R., . . . Fabre, N. (2012). Dihydrochalcones and benzoic acid derivatives from *Piper dennisii*. *Planta medica*, 78(09), 914-918.
- CCCA. (2017). Cacao: una apuesta colombiana al mercado internacional. 21/08/ 2019, from <https://www.amchamcolombia.co/images/docs/cacao.pdf>
- Céspedes, C., & Alarcon, J. (2011). Biopesticidas de origen botánico, fitoquímicos y extractos de Celastraceae, Rhamnaceae y Scrophulariaceae. *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromáticas*, 10(3), 175-181.
- CONPES. (2011). Consejo Nacional de Política Económica y Social Bogotá: Departamento Nacional de Planeación
- Contreras, L. (2016). Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(1), 51-57.
- Cosoveanu, A., Da Silva, E., Gimenez, C., Núñez, G., González, A., Frias, V., & Cabrera, R. (2012). *Artemisia thuscula* Cav.: antibacterial, antifungal activity of the plants extracts and associated endophytes. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16(1), 87-90.
- Cotoras, M., García, C., Lagos, C., Folch, C., & Mendoza, L. (2001). Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenoids isolated from the surface of pseudognaphalium spp. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46(4), 1-5.
- Chaveerach, A., Mokkamul, P., Sudmoon, R., & Tane, T. (2006). Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand. *Ethnobotany Research & Applications*, 4, 223-231.
- Chou, Y., Hsu, D., Chen, Y., Hsu, H., Hsu, J., & Chau, L. (2018). Identification of danthron as an isoform-specific inhibitor of HEME OXYGENASE-1/cytochrome P450 reductase interaction with anti-tumor activity. *Journal of Biomedical Science*, 25(6), 1-10.
- Chukaew, A., Saithong, S., Chusri, S., Limsuwan, S., Watanapokasin, R., Voravuthikunchai, S., & Chakthong, S. (2019). Cytotoxic xanthenes from the roots of *Mesua ferrea* L. *Phytochemistry*, 157, 64-70.
- D' Angelo, L., Xavier, H., Torres, L., Lapa, A., & Souccar, C. (1997). Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. a folk medicinal plant used as an analgesic, antiinflammatory and hemostatic. *Phytomedicine*, 4(1), 33-40.
- Da Silva, J., Andrade, E., Kato, M., Carreira, L., Guimarães, E., & Maia, J. (2011). Antioxidant capacity and larvicidal and antifungal activities of essential oils and extracts from *Piper krukoffii*. *Natural Product Communications*, 6(9), 1361-1366.
- Da Silva, R., Navickiene, H., Kato, M., Bolzani, V., Méda, C., & Young, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 59(5), 521-527.

- Daniel, V., & Krupadanam, D. (2012). Role of isoflavones and its derivatives on the growth of *Aspergillus niger* and *Rhizactonia solani* *Journal of Phytology*, 4(4), 04-07.
- De Almeida, R., Souto, R., Bastos, C., Da Silva, M., & Maia, J. (2009). Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil. *Chemistry y Biodiversity*, 6, 1427-1434.
- De Campos, M., Filho, V., Da Silva, R., Yunes, R., Zacchino, S., Juarez, S., & Cruz, A. (2005). Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae) *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(8), 1527-1530.
- De Souza, P., Moreira, L., Sarmento, D., & Da Costa, F. (2018). Cacao. *Theobroma cacao* L (pp. 69-76). Brasil: Exotic Fruits. Elsevier
- Dean, R., Van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond, K., Di Prieto, A., Spanu, P., . . . Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.
- Deressa, T., Lemessa, F., & Wakjira, M. (2015). Antifungal activity of some invasive alien plant leaf extracts against mango (*Mangifera indica*) anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *International Journal of Pest Management*, 61(2), 99-105.
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75-84.
- Dhananjeyan, M., Milev, Y., Kron, M., & Nair, M. (2005). Synthesis and Activity of Substituted Anthraquinones against a Human Filarial Parasite, *Brugia malayi*. *J. Med. Chem.*, 48, 2822-2830.
- Engelbrecht, C., & Harrington, T. (2005). Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia*, 97(1), 57-69.
- Facundo, V., Polli, A., Rodrigues, R., Militao, T., Stabelli, R., & Cardoso, C. (2008). Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. *Acta Amazonica*, 38(4), 733-742.
- Fang, J., Wang, D., Deng, G., & Gong, H. (2017). Transition metal-free protodecarboxylation of electron rich aromatic acids under mild conditions. *Tetrahedron letters*, 58, 4503-4506.
- FAO. (2018). Boletín de agricultura familiar de América Latina y el Caribe. Retrieved 10 de diciembre de 2018, 2018, from <http://www.fao.org/americas/publicaciones-audio-video/baf/es/>
- FEDECACAO. (2013). Guía Ambiental para el Cultivo de Cacao. In M. d. A. y. D. Rural (Ed.), (pp. 12-25). Bogotá: Fondo Nacional del Cacao
- FEDECACAO. (2014). Guía para el Cultivo de Cacao. In C. N. d. Chocolates (Ed.), (pp. 5-6). Colombia
- FEDECACAO. (2018). Cadena de Cacao. Indicadores e Instrumentos. In M. d. Agricultura (Ed.), (pp. 5-6)
- FEDECACAO. (2018). Componente comercial. Por un campo productivo, moderno, que siembra, se transforma y vende., Agosto 21 de 2019, from <https://www.fedecacao.com.co/portal/images/Cartilla/Cartilla%20Componente%20Comercial.pdf>
- Flores, Jiménez, I., Giménez, A., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Bourdy, G., & Bazzocchi, I. (2008). Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Antiparasitic Activity. *Journal of Natural Products*, 71, 1538-1543.

- Flores, Jiménez, I., Giménez, A., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Bourdy, G., & Bazzocchi, I. (2009). Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry*, *70*, 621-627.
- Foltinova, P., Lacova, M., & Loos, D. (2000). Activity of some 3-formylchromone derivatives on the induction of chloroplast-free mutants in *Euglena gracilis*. *Farmaco*, *55*, 21-26.
- FRAC. (2019). *Clasificación de fungicidas y bactericidas según el modo de acción*. (Primera ed.). España: Fungicide Resistance Action Committee. Universidad de Málaga.
- Friedrich, U., Siems, K., Solis, P., Gupta, M., & Jenett-Siems, K. (2005). New prenylated benzoic acid derivatives of *Piper hispidum*. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, *60*(6), 455-457.
- Gafner, S., Wolfender, J., Mavi, S., & Hostettman, K. (1995). Antifungal and Antibacterial Chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Med.*, *62*, 1-3.
- Gao, H., & Kawabata, J. (2005). α -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as α -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *13*, 1661-1671.
- García, J., & Portilla, F. (2011). Mecanismo de acción de los fungicidas. *Revista Vnetana al Campo*, *1*(1), 1-10.
- Garcia, R., Juliatti, F., Barbosa, K., & Casseiro, T. (2012). Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal*, *28*(1), 48-57.
- Ghosh, R., Darin, K., Nath, P., & Panchali, D. (2014). An overview of various *Piper* Species for Their Biological Activities. *International Journal of Pharma Research & Review*, *3*(1), 67-75.
- Grzelak, E., Dziedzic, B., & Choma, I. (2013). Applications of Novel Direct Bioautography Tests for Analysis of Antimicrobials: A Review. *Journal of AOAC International*, *96*(6), 1167-1174.
- Guest, D. (2007). Black pod: diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology*, *97*(12), 1650-1653.
- Guirado, O., Tamargo, A., Montes, M., & Vocero, L. (2012). Farmacognosia, farmacobotánica, farmacogeografía y farmacoeuimología del platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *17*(2), 181-193.
- Hadacek, F., & Greger, H. (2000). Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. *Phytochemical Analysis*, *11*, 137-147.
- Harvey, A. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, *13*(19-20), 894-901.
- Hermoso, A., Jiménez, I., Mamani, Z., Bazzocchi, I., Piñero, J., Ravelo, A., & Valladares, B. (2003). Antileishmanial Activities of Dihydrochalcones from *Piper elongatum* and Synthetic Related Compounds. Structural Requirements for Activity *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *11*, 3975-3980.
- Herrera, L., Grillo, H., Harrington, T., Díaz, A., & Álvarez, R. (2015). *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. f. sp. *spathodense* (nueva especialización): agente causal de la marchitez en *Spathodea campanulata* Beauv. en Cuba. *Rev Protección Veg*, *30*(1), 40-45.
- Herrera, C. (2010). The antifungal effect of six commercial extracts of *Chilean propolis* on *Candida* spp. *Ciencia e investigación agraria*, *37*(1), 75-84.
- Huqail, A., Behiry, S., Salem, M., Ali, H., Siddiqui, M., & Salem, A. (2019). Antifungal, Antibacterial, and Antioxidant Activities of Acacia Saligna (Labill.) H. L. Wendl. Flower Extract: HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Compounds. *molecules*, *24*(700), 1-14.

- ICCO. (2018). The International Cocoa Organization (ICCO) | Cocoa Producing and Cocoa Consuming Countries. Retrieved 26 de noviembre de 2018, 2019, from <https://www.icco.org/>
- ICCO. (2018). Pests y Diseases. Retrieved 26 de noviembre de 2018, 2018, from <https://www.icco.org/about-cocoa/pest-a-diseases.html>
- Ignatushchenko, M., Winter, R., & Riscoe, M. (2000). Xanthones as antimalarial agents: stage specificity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(1), 77-81.
- Iguchi, D., Balsells, E., & Bonesi, S. (2014). Expeditious photochemical reaction toward the preparation of substituted chroman-4-ones. *Tetrahedron letters*, 55(33), 4653-4656.
- INFOCACAO. (2017). Reconociendo los síntomas y signos de la mazorca negra [Internet]. Ciencia y tecnología del sector cacaotero. Retrieved 07/07/2019, 2019, from http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/infocacao/InfoCacao_No13_Jul_2017.pdf
- Jeffrey, C., Leonard, M., Glassmire, A., Dodson, C., Richards, L., Kato, M., & Dyer, L. (2014). Antiherbivore Prenylated Benzoic Acid Derivates from *Piper kelleyi*. *Journal of Natural Products*, 77, 148-153.
- Joshi, A., Li, X., Nimrod, A., ElSohly, H., Walker, L., & Clark, A. (2001). Dihydrochalcones from *Piper longicaudatum*. *Planta Medica*, 67, 186-188.
- Kansal, N., Silakari, O., & Ravikumar, M. (2010). Three dimensional pharmacophore modelling for c-Kit receptor tyrosine kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(1), 393-404.
- Keßberg, A., Lübken, T., & Metz, P. (2018). Enantioselective Total Synthesis of Natural Isoflavans: Asymmetric Transfer Hydrogenation/Deoxygenation of Isoflavanones with Dynamic Kinetic Resolution. *Organic letters*, 20(10), 3006-3009.
- Koes, D., & Camacho, C. (2012). ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res*, 40, 409-414.
- Korosec, B., Sova, M., Turk, S., Krasevec, N., Novak, M., Lah, L., . . . Komel, R. (2013). Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). *Journal of Applied Microbiology*, 116, 955-966.
- Krolicki, Z., & Zarawska, L. (1987). Investigation of antifungal effect of flavonoids. 1 [hesperidin, naringin, phellodendroside, luteolin-7-glucoside, hipotethin-7-glucoside, quecetin, celastroside, amentoflavone; *Botrytis cinerea*, *Trichoderma glaucum*, *Aspergillus fumigatus*] *Katedra Biologii i Botaniki Farmaceutycznej*, 30(1), 53-57.
- Ladino, C. (2018). *Potencialidad del género Piper como fuente de sustancias para el control de hongos fitopatógenos*. (Magister en Ciencias-Química), Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Lago, J., Ramos, C., Casanova, D., Morandim, A., Bergamo, D., Calvalheiro, A., & Young, M. (2004). Benzoic Acid Derivates from *Piper* Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporoides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products*, 67(11), 1783-1788.
- Lago, J., Tanizaki, T., Young, M., Guimaraes, E., & Kato, M. (2005). Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. . *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(2), 153-156.
- Lago, J., Young, M., Reigada, J., Soares, M., & Kato, M. (2007). Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (Piperaceae). *Química Nova*, 30(5), 1678-1664.
- Lee, H., Woo, E., & Lee, D. (2018). Apigenin induces cell shrinkage in *Candida albicans* by membrane perturbation *Journals investing in science*, 18(1), 1-9.

- Liu, J., Leung, K., Chan, D., Wang, Y., Ma, D., & Leung, C. (2014). Identification of a natural product-like STAT3 dimerization inhibitor by structure-based virtual screening. *Cell Death and Disease*, 5(6), 1-10.
- López, A., Lopes, A., Batista, J., Flausino, J., Bolzani, V., Kato, M., & Furlan, M. (2010). Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). *Bioresource Technology*, 101, 4251-4260.
- Madrigal, L., Torres, E., & Rivera, J. (2014). Bioprospección y sustentabilidad participativa: una mirada desde el derecho de la biodiversidad. *Ciencia jurídica*, 3(5), 7-24.
- Malami, I. (2012). Prenilated Benzoic Acid Derivates From *Piper* Species as Source of Anti-Infective Agents. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(6), 1554-1559.
- Maldonado, W., Noguera, K., & Olivero, J. (2012). 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*, 36(140), 411-420.
- Mann, K. (2017). *Synthesis and antifungal evaluation of azo compounds containing heterocyclic moiety*. (Integrated Master of Science (Hons) in Chemistry), Punjab Agricultural University, Ludhiana.
- Marentes, R., Orduz, L., & Coy, E. (2019). Targeted Metabolite Profiling-Based Identification of Antifungal 5-n-Alkylresorcinols Occurring in Different Cereals against *Fusarium oxysporum*. *molecules*, 24(4), 770 - 784.
- Marques, J., Oliveira, A., Raggi, L., Young, M., & Kato, M. (2010). Antifungal activity of natural and synthetic amides from *Piper* species. *J Braz Chem Soc*, 21(10), 1807-1813.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271-278.
- Masuoka, C., Ono, M., Ito, Y., & Nohara, T. (2003). Antioxidative, Antihyaluronidase and Antityrosinase Activities of Some Constituents from the Aerial Part of *Piper elongatum* VAHL. *Food Science and Technology Research*, 9(2), 197-201.
- Meinhardt, L., Rincones, J., Bailey, B., Aime, M., Griffith, G., Zhang, D., & Pereira, G. (2008). *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Mol Plant Pathol*, 9(5), 577-588.
- Mejía, F., Rodríguez, A., & Ybrahím, R. (2016). *Evaluación in vitro de hongos nativos antagonistas de Moniliophthora roreri (Cif. & Par., Evans et al.,) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.)*. (Tesis de Doctorado), Universidad Nacional Agraria, Nicaragua.
- Melgarejo, J., & Abella, F. (2011). Mecanismo de Acción de los Fungicidas. Manejo Integrado de Enfermedades. *Revista Ventana al Campo*, 193-201.
- Mesa, A., Toro, J., Cardona, F., & Blair, S. (2012). Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies del género *Piper*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2), 154-162.
- Mesa, V., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monzalve, Z. (2018). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos *Revisiones*, 1-8.
- Mezrag, A., Malafrente, N., Bouheroum, M., Travaglino, C., Russo, D., Milella, L., . . . Dal Piaz, F. (2017). Phytochemical and antioxidant activity studies on *Ononis angustissima* L. aerial parts: isolation of two new flavonoids. *Natural Product Research*, 31(5), 507-514.
- Mora, F., & Fiallos, F. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Sci Agropecu*, 3(3), 249-258.

- Muharini, R., Liu, Z., Lin, W., & Proksch, P. (2015). New amides from the fruits of *Piper retrofractum*. *Tetrahedron letters*, 56(19), 2521-2525.
- Muluka, H., Sheelu, G., & Nageshwar, D. (2016). Bioconversion of Iminodiacetonitrile to Iminodiacetic acid with whole cells of *Lysinibacillus boronitolerans* MTCC 107614 (IICT-akl252). *Bioprocess Biosyst Eng.*, 39(3), 413-420.
- Nair, G., Mansingh, P., & Burke, A. (1986). Insecticidal Properties of Some Metabolites of Jamaican *Piper* spp., and the Amides Synthesized from 5,6-Z and E-Butenolides of *Piper fadyenii*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(12), 3053-3058.
- Nakai, N., Fujil, Y., Kobashi, K., & Nomura, K. (1985). Aldose reductase inhibitors: flavonoids, alkaloids, acetophenones, benzophenones, and spirohydantoin of chroman. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 239(2), 491-496.
- Nascimento, S., Araujo, E., Da Silva, M., & Ramos, C. (2015). Chemical study and antimicrobial activities of *Piper arboreum* (Piperaceae). *Journal of the Chilean Chemical Society*, 60(1), 2837-2839.
- Neethu, M., Kavitha, M., & Krishnakumar, K. (2016). Review on the pharmacological activities of *Piper* species. *International Journal of Phytopharmacy Research*, 7(2), 66-70.
- Nitola, L., Muñoz, R., Patiño, O., & Prieto, J. (2016). Caracterización fitoquímica y evaluación de actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa de hojas de *Piper pesaresanum* C. DC. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1-10.
- Orjala, J., Erdelmeier, C., Wright, A., Rali, T., & Sticher, O. (1993). Five New Prenylated p-Hydroxybenzoic Acid Derivates with Antimicrobial and Molluscicidal Activity from *Piper aduncum* Leaves. *Planta Medica*, 59, 546-551.
- Orjala, J., Erdelmeier, J., Wright, D., Rali, T., & Sticher, O. (1993). Five New Prenylated p-Hydroxybenzoic Acid Derivatives with Antimicrobial and Molluscicidal Activity from *Piper aduncum* Leaves. *Planta Med.*, 59, 546-551.
- Osorio, C., Orozco, C., López, G., & Rivera, F. (2012). Genetic variability of *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, comb. nov.(Agaricales-Marasmiaceae) in varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 93-101.
- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., ... Boll, P. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46(4), 597-673.
- Parra, A., Cortes, T., Pérez, P., & Lepe, M. (2014). El cutivo del cacao, enfermedades, identificación de hongos, modelado y métodos de control. *Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial*, 58, 1-8.
- Parra, J., Patiño, O., Prieto, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2013). A new benzoic acid derivative isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, 6(4), 590-592.
- Parra, J. (2019). *Búsqueda de agentes fitosanitarios provenientes de especies del género Piper (Piperaceae) para el control de Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae*. (Doctorado en Ciencias Químicas), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Parra, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2011). Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, 4, 280-282.
- Parra, S. (2017). Planificación tecnológica, competitividad y desarrollo de capacidades locales para posicionar a Colombia como productor de Cacaos especiales. *VirtualPro Agroindustria del Cacao*, 1-5.
- Pelayo, V., Fernandez, S., Hernandez, O., Torres, J., & Garcia, A. (2016). A Phytochemical and Ethnopharmacological Review of the Genus *Piper*: as a Potent Bio-Insecticide. *Research & Reviews: Research Journal of Biology*, 4(2), 45-51.

- Peña, A., Avella, E., & Díaz, A. (2000). Benzoquinona e hidroquinona preniladas y otros constituyentes aislados de *Piper bogotense* C. DC. *Revista Colombiana de Química*, 29(2), 1-13.
- Peter, S., Dhanja, J., Malik, V., Radhakrishnam, N., & Sundar, D. (2018). Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR): Modeling Approaches to Biological Applications *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 1-16.
- Phillips, W., Castillo, J., Krauss, U., Rodríguez, E., & Wilkinson, M. (2005). Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathol*, 54(4), 483-490.
- Plazas, E., Cuca, L., & Delgado, W. (2008). Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum* Kunth (Piperaceae) y derivados acetilados. *Revista Colombiana de Química*, 37(2), 135-144.
- Pokou, N., NGoran, J., Kébé, I., Eskes, A., Tahy, M., & Sangaré, A. (2008). Levels of resistance to *Phytophthora* pod rot in cocoa accessions selected on-farm in Côte d'Ivoire. *Crop Prot*, 27(3-5), 302-309.
- Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., . . . Moulis, C. (2007). Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry*, 68(9), 1312-1320.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Kumar, A., Mishra, P., & Dubey, N. (2010). Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, 142((1-2)), 114-119.
- Quisbert, E. (2007). *Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana*. (Tesis Doctoral), Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.
- Ramírez, E., & Adaniya, B. (2006). Propuesta para el manejo de cacao orgánico. In F. C. Internacional (Ed.), (pp. 50-52). Lima: Proyecto "Paz y Conservación Binacional en la Cordillera del Cóndor, Ecuador-Perú-Fase-II (Componente Peruano)
- Rani, A., Jain, S., & Dureja, P. (2009). Synergistic fungicidal efficacy of formulations of neem oil, nicotinic acid and Ferula asafoetida with alfa, beta-unsaturated carbonyl compounds against ITCC 5226 *Sclerotium rolfsii* y ITCC 0482 *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Pesticide Science*, 34(4), 1-6.
- Regnier, T., & Combrick, S. (2010). In vitro and in vivo screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. *South African Journal of Botany*, 76(4), 681-685.
- Restrepo, J., Peñaranda, A., Jiménez, L., Álvarez, R., & Rosero, A. (2012). Manejo Fitosanitario del cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.). Medidas para la temporada invernal (pp. 15-20). Bogotá: ICA
- Ruiz, J. (2014). *Cacao y su aporte al desarrollo Colombiano* (Especialización en Gerencia Comercio Internacional), Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá.
- Sahoo, J., & Paidesetty, K. (2015). Antimicrobial, analgesic, antioxidant and in silico study of synthesized salicylic acid congeners and their structural interpretation. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(4), 268-280.
- Sánchez, A., & Castellanos, O. (2008). Estrategias de desarrollo tecnológico para la postcosecha del cacao mediante la aplicación del roadmapping tecnológico *Congreso latinoamericano y del caribe de ingeniería agrícola CLIA*. Managua: Nicaragua
- Scalvenzi, L., Yaguache, B., Cabrera, P., & Guerrini, A. (2016). Actividad antifúngica in vitro de aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. y *Piper aduncum* L. *Bioagro*, 28(1), 39-46.

- Serpa, R., Franca, J., Maia, L., Andrade, C., Diniz, A., & Furlaneto, M. (2012). In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, *61*, 1704-1708.
- Silva, D., & Bastos, C. (2007). Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de Piper Sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. *Fitopatologia Brasileira*, *32*(2), 143-145.
- Singburadom, N. (2015). Hydroxychavicol from *Piper betle* is an antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Biopesticides*, *8*(2), 82-92.
- Suárez, Y., & Hernández, F. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). In C. C. d. I. Agropecuaria (Ed.), (pp. 42-50). Colombia: Corpoica
- Suárez, C., & Delgado, J. (1993). Moniliasis del cacao. In Iniap (Ed.), *Archivo Histórico* (pp. 17-20). Bogotá
- Suryaprakasa, P., & Reddy, P. (1940). Methylation of hydroxy flavonols using methyl iodide and potassium carbonate. 1-3.
- Tabopda, T., Ngoupayo, L., Liu, J., Mitaine, A., Tanoli, S., Khan, N., & Dubios, M. (2008). Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum* *Phytochemistry*, *69*(8), 1726-1731.
- Tahi, M., Kébé, I., NGoran, J., Sangaré, A., Mondeil, F., Cilas, C., & Eskes, A. (2006). Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing leaf disc inoculations with field observations. *Euphytica*, *149*(1-2), 35-44.
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Thomas, J., Tosun, F., & Ruedi, P. (2006). Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(4), 1352-1364.
- Technoserve. (2015). Construcción de un modelo de agricultura competitiva en Colombia. Estudio Completo. *FAO, Agronet*, 1-123.
- Tirado, P., Lopera, A., & Ríos, L. (2016). Strategies for Control of *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora pernicioso* in *Theobroma cacao* L.: A Systematic Review. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecu*, *17*(3), 417-430.
- Trujillo, W., & Callejas, R. (2015). *Piper Andakiensis* (Piperaceae) una especie nueva de la vertiente amazónica de la cordillera oriental de Colombia. *Caldasia*, *37*(2), 261-269.
- Trujillo, W., & Hoyos, F. (2013). El género *Piper* (Piperaceae) en la reserva natural Las Dalias, municipio de La Montañita-Caquetá. *Momentos de Ciencia*, *10*(2), 88-96.
- Villamil, J., Viteri, S., & Villegas, W. (2015). Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Rev.Fac.Nac.Agron.Medellín*, *68*(1), 7441-7450.
- Vogel, A. (1974). Practical Organic Chemistry. In Longman (Ed.), (pp. 199-200). London
- Wagner, H., Blandt, S., & Zgainski, E. (1984). *Plant Drug Analysis* (Springer-Verlang Ed. 1 ed.). New York, USA.
- Waisser, K., Perina, M., Buchta, V., & Kubanova, P. (2003). Structure-antifungal activity relationships of substituted N-benzylsalicylamides. *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae*, 29-30.
- Xu, W., & Li, X. (2011). Antifungal Compounds from *Piper* Species. *Current Bioactive Compounds*, *7*, 262-267.
- Xu, Y., Ling, S., Zeng, D., & Tang, W. (2018). Antifungal activities and active ingredients of *Melodinus suaveolens* Champ. ex Benth. *Natural Product Research*, *32*(12), 1481-1483.

- Xuan, T., Elzaawely, A., Fukuta, M., & Tawata, S. (2006). Herbicidal and fungicidal activities of lactones in kava (*Piper methysticum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(3), 720-725.
- Yamaguchi, L., Lago, J., Tanizaki, T., Mascio, P., & Kato, M. (2006). Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, *67*(16), 1838-1843.
- Zheng, G., Kenney, P., & Lam, L. (1992). Myristicin: A Potential Cancer Chemopreventive Agent from Parsley Leaf Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(1), 107-110.
- Zubricka, D., Misianikova, A., Henzelyova, J., Valletta, A., Angelis, G., Diodata, F., . . . Cellarova, E. (2015). Xanthones from roots, hairy roots and cell suspension cultures of selected *Hypericum* species and their antifungal activity against *Candida albicans*. *Plant Cell Rep*, *34*(11), 1953-1962.
- Zuccotto, F. (2003). Pharmacophore Features Distributions in Different Classes of Compounds. *The Journal for Chemical Information and Computer Scientists*, *43*, 1542-1552.