

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Síntesis de derivados del ácido 1-
indanona-4-carboxílico y evaluación de
su aplicación en variedades de fríjol
sobre la acumulación de fitoalexinas
isoflavonoide, fitotoxicidad y actividad
antifúngica de sus extractos.**

Diego Andrés Aristizábal Botero

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

2021

Síntesis de derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico y evaluación de su aplicación en variedades de fríjol sobre la acumulación de fitoalexinas isoflavonoide, fitotoxicidad y actividad antifúngica de sus extractos.

Diego Andrés Aristizábal Botero

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Químicas

Director (a):

Ph.D., Doctor, Químico, Diego Luis Durango Restrepo

Codirector (a):

Ph.D., Doctor, Químico, Jesús Gil

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Productos Naturales y Separaciones Químicas

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

2021

A mi familia y amigos.

*“El conocimiento no es una vasija que se llena,
sino un fuego que se enciende”.*

Plutarco

Agradecimientos

Agradezco al Dios del cielo por darme la oportunidad hacer investigación, una de mis grandes pasiones. Asimismo, a mi familia y mi esposa por ser mi soporte en esta investigación y animarme en esas horas bajas, donde las cosas no salían como había planeado.

Quiero agradecer de manera muy especial al Profesor Diego Luis Durango por su apoyo, asesorías, regaños y sus grandes aportes en mi formación profesional y a este proyecto. Dios lo bendiga siempre a él y su familia. También agradezco a los profesores Jesús Gil, Lucia Afanador, Tatiana Lobo y Wiston Quiñones por todos sus aportes y tiempo. Asimismo, le agradezco al señor Antonio Restrepo por todo su apoyo.

No podrían faltar mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Separaciones Químicas, Cesar, Samuel, Janio, Karen, Franklin, Laura, Felipe, Elkin, Sebastián, Manuela, Erika, Yuliana, Miriam, Anamaría y Dayana...extrañare aquellos días en el laboratorio y el buen café de Laura.

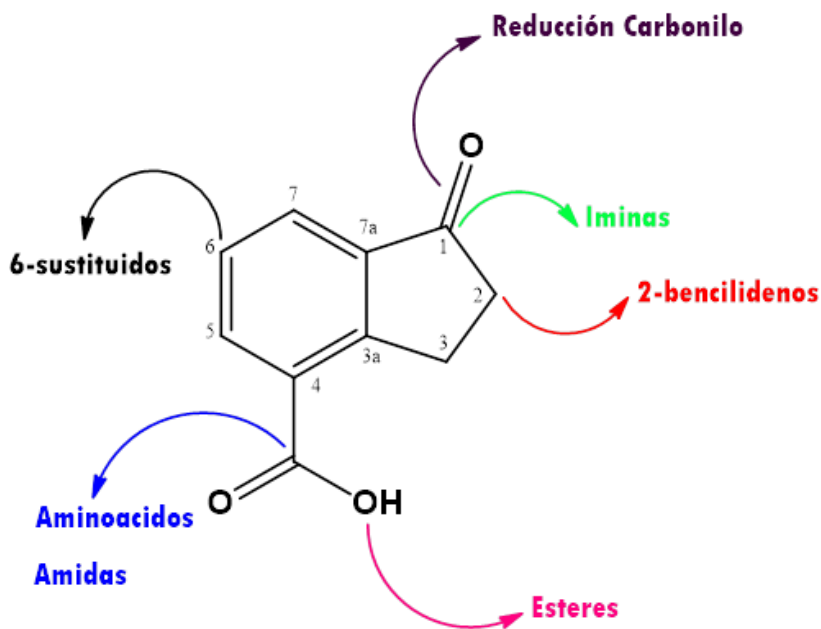
Quiero extender este agradecimiento a Minciencias y a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por la financiación y apoyo al presente trabajo. Asimismo, al Laboratorio de Química Orgánica de Productos Naturales de la Universidad de Antioquia por la asesoría y análisis de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.

Por último, quiero recordar la memoria de Jilmar Andrés Murillo, por la gran persona que fue y todo el apoyo cuando los resultados no se daban, que en paz descanse.

A todos aquellos que me ayudaron en el camino, les doy infinitas gracias.

Resumen

Estimular los mecanismos naturales de defensa de las plantas, como las fitoalexinas, mediante la aplicación de elicitores, ofrece nuevas alternativas para el control de enfermedades en cultivos de importancia para el país. En el presente trabajo se sintetizaron derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico (un compuesto relacionado estructuralmente con la coronatina, un potente elicitor bacteriano), como potenciales elicitores. Estructuralmente, los derivados presentan variaciones del grupo carboxilo (en posición 4) del sistema indanoilo, resultantes del acoplamiento con aminoácidos (glicina metil éster, L-valina metil éster, L-Leucina metil éster y L-iso-leucina metil éster), y la formación de amidas y ésteres. Asimismo, se realizaron reacciones sobre la posición 1 (carbono carbonílico) de reducción y obtención de iminas. Adicionalmente, se efectuaron reacciones de condensación aldólica sobre la posición 2 (carbono α a carbonilo) para la obtención de derivados 2-bencilideno. Además, se realizaron reacciones de sustitución electrofílica aromática para la obtención de derivados 6-sustituidos del ácido 1-indanona-4-carboxílico.



Estos elicitores potenciales fueron evaluados sobre tejidos de plántulas de dos variedades colombianas de frijol (ICA Cerinza y Uribe Rosado), analizando el efecto de la concentración y estructura del elicitor, y el tiempo post-inducción, en la concentración de las fitoalexinas. Se encontró que las fitoalexinas mayoritarias en la variedad Uribe Rosado, luego del proceso de inducción con el compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster, corresponden a los isoflavonoides genisteina, coumestrol y phaseollina con valores

máximos de 39.11, 11.09, y 21.96 µg/g p.f. respectivamente, y un tiempo pos-inducción de 72 h. Estas concentraciones de fitoalexinas fueron comparables a las obtenidas por tratamiento de las plántulas de frijol con el potente elicitor comercial metil jasmonato. Además, se evaluó el efecto de la concentración del 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster en la acumulación de fitoalexinas a 96 h post-inducción, obteniéndose una correlación directa entre la concentración del elicitor y la acumulación de las fitoalexinas. En el caso del metil jasmonato, la producción de fitoalexinas cayó bruscamente para concentraciones superiores a 2.2 mM, observándose un efecto fitotóxico en las raíces de la plántula; lo anterior también se detectó con el elicitor 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster, pero en menor proporción.

Un estudio más detallado de la fitotoxicidad del elicitor 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster en plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado, no reveló diferencias significativas con respecto a las plántulas tratadas con agua, en cuanto a la producción de clorofilas, longitud de las raíces, tamaño de las hojas y la plántula. No obstante, la aplicación del elicitor sobre semillas y en caja Petri mostró una reducción en el número y tamaño de las raíces secundarias. Este efecto no se observó cuando la evaluación se realizó sobre semillas sembradas en arena cuarzo. Finalmente, se evaluó la actividad antifúngica contra *C. lindemuthianum* (agente causal de la antracnosis) de los extractos proveniente de las plántulas de las variedades Cerinza y Uribe Rosado tratadas con dicho elicitor. Los resultados no revelaron diferencias significativas entre los extractos de plántulas tratadas con agua y aquellas tratadas con el elicitor, bajo las condiciones evaluadas.

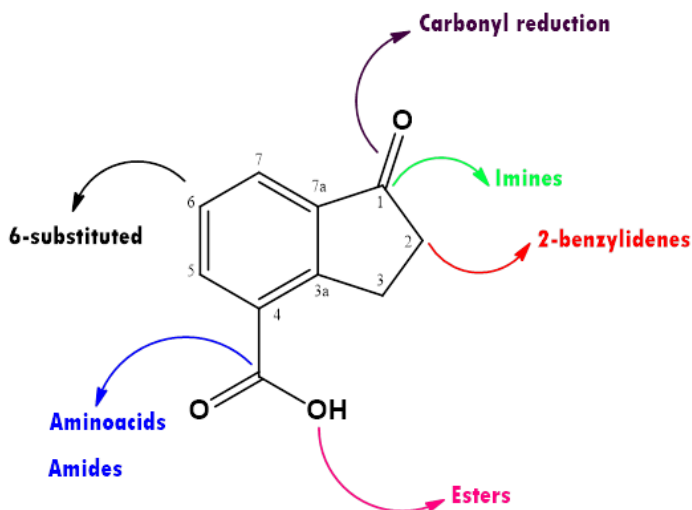
Los resultados demuestran que es posible modular la producción de fitoalexinas en frijol mediante la aplicación de derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico. El tratamiento con los elicitores permitiría incrementar los niveles de defensas químicas contra los patógenos del frijol, y sustituir parcialmente algunos de los fungicidas sintéticos empleados en el cultivo. El compuesto 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster es un elicitor promisorio, que estimula la síntesis y acumulación de fitoalexinas en los tejidos de frijol a niveles similares a los exhibidos por el reconocido elicitor metil jasmonato, y sin efectos fitotóxicos significativos sobre la plántula. Adicionalmente, el método cromatográfico desarrollado en el presente trabajo podría ser usado para determinar rápidamente las variedades de frijol con mejores perspectivas de resistencia a enfermedades, de acuerdo con los niveles de fitoalexinas acumulados.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., frijol, elicitor, fitoalexina, phaseollina, antracnosis.

Synthesis of 1-indanone-4-carboxylic acid derivatives and evaluation of their application in bean varieties on isoflavonoid phytoalexin accumulation, phytotoxicity and antifungal activity of their extracts.

Abstract

Stimulating the natural defense mechanisms of plants, such as phytoalexins, through the application of elicitors, offers new alternatives for the control of diseases in crops of importance for the country. In the present work, derivatives of 1-indanone-4-carboxylic acid (a structurally related compound to coronatine, a powerful bacterial elicitor) were synthesized as potential elicitors. Structurally, the derivatives present variations of the carboxyl group (in position 4) of the indanoyl system, resulting from the coupling with amino acids (glycine methyl ester, L-valine methyl ester, L-Leucine methyl ester and L-isoleucine methyl ester), and the formation of amides and esters. Likewise, reactions were carried out on position 1 (carbonyl carbon) to reduce and obtain imines. Additionally, aldol condensation reactions were carried out on the 2-position (α -carbon to carbonyl) to obtain 2-benzylidene derivatives. In addition, aromatic electrophilic substitution reactions were carried out to obtain 6-substituted 1-indanone-4-carboxylic acid derivatives.



These potential elicitors were evaluated on seedling tissues of two Colombian common bean varieties (ICA Cerinza and Uribe Rosado), analyzing the effect of elicitor concentration and structure, and post-induction time on the concentration of phytoalexins. It was found that the major phytoalexins in the Uribe Rosado variety, after the induction process with the 1-oxo-indanoyl-L-Isoleucine methyl ester compound, correspond to the isoflavonoids genistein, coumestrol and phaseollin with maximum values of 39.11, 11.09,

and 21.96 µg/g f.w. respectively, and a post-induction time of 72 h. These concentrations of phytoalexins were comparable to those obtained by treating common bean seedlings with the powerful commercial elicitor methyl jasmonate. In addition, the effect of the concentration of 1-oxo-indanoyl-L-Isoleucine methyl ester on the accumulation of phytoalexins at 96 h post-induction was evaluated, obtaining a direct correlation between the concentration of the elicitor and the accumulation of phytoalexins. In the case of methyl jasmonate, the production of phytoalexins was strongly decreased for concentrations above 2.2 mM, observing a phytotoxic effect in the roots of the seedling. This was also detected with the elicitor 1-oxo-indanoyl-L-Isoleucine methyl ester, but to a lesser extent. A more detailed study of phytotoxicity of the compound 1-oxo-indanoyl-L-isoleucine methyl ester in common bean seedlings (cv. Uribe Rosado) did not reveal significant differences with respect to the seedlings treated with water, in terms of the production of chlorophylls, length of roots, size of leaves and seedling. However, the application of the elicitor on seeds which were incubated in Petri dishes showed a reduction in the number and size of secondary roots. This effect was not observed when the evaluation was carried out on seeds sown in quartz sand. Finally, the antifungal activity against *C. lindemuthianum* (causal agent of anthracnose) of the extracts from the seedlings of the cultivars Cerinza and Uribe Rosado treated with the elicitor 1-oxo-indanoyl-L-isoleucine methyl ester was evaluated. The results did not reveal significant differences between the extracts of seedlings treated with water and those treated with the elicitor, under the evaluated conditions.

The results show that it is possible to modulate the production of phytoalexins in common bean by applying derivatives of 1-indanone-4-carboxylic acid. Treatment with elicitors would increase the levels of chemical defenses against common bean pathogens, and partially or totally replace some of the synthetic fungicides used in the crop. The compound 1-oxo-indanoyl-L-isoleucine methyl ester is a promising elicitor, which stimulates the synthesis and accumulation of phytoalexins in common bean tissues at levels similar to those exhibited by the recognized elicitor methyl jasmonate, and without significant phytotoxic effects on the seedling. Additionally, the chromatographic method developed in this work could be used to quickly determine the common bean varieties with the best prospects of resistance to diseases, according to the accumulated levels of phytoalexins.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., common bean, elicitor, phytoalexin, phaseollin, anthracnose.

Tabla de Contenido

Introducción	1
Objetivos.....	1
Objetivo General.....	1
Objetivos Específicos.....	1
1. Marco teórico y estado del arte	3
1.1 El cultivo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su importancia económica.....	3
1.2 Enfermedades que afectan el cultivo de frijol	4
1.3. Antracnosis y control de la enfermedad	5
1.3.1. Control químico.....	6
1.3.2. Resistencia varietal	8
1.4. Mecanismos de defensa y elicitors, como alternativa de control de enfermedades en plantas.....	9
1.5. Fitoalexinas producidas en el fríjol (<i>P. vulgaris</i> L.)	11
1.5.1. Definición de fitoalexinas.....	11
1.5.2. Fitoalexinas de fríjol.....	12
1.5.3. Elicitors como estrategia de protección de cultivos	14
2. Materiales y métodos	21
2.1. Métodos generales.....	21
2.2. Síntesis de los derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico.....	21
2.2.1. Ácido 2-Carboxi-hidrocinámico (2.1).....	21
2.2.2. Ácido 1-indanona-4-carboxílico (2.2)	23
2.2.3. Acoplamiento de aminoácidos (conjugados indanoil-aminoácido; 2.3-2.6)	24
2.2.4. 1-oxo-indano-4-carboxilato de 3-hidroxipropilo (2.7).....	28
2.2.5. 1-hidroxi-indanol-L-isoleucina metil éster. Reducción del grupo carbonilo (2.8)	29
2.2.6. Preparación de amidas (2.9-2.10) por sustitución nucleofílica.....	30
2.2.7. 2-(3'-bromobencilideno)-1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.11).....	32
2.2.8. 1-bencilhidrazono-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.12)	33
2.2.9. Ácido 6-bromo-2-Carboxihidrocinámico (2.13)	34
2.2.10. 6-bromo-Ácido 1-oxo-indano-4-carboxílico (2.14).....	35
2.2.11. 6-Bromo-1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.15).....	36
2.3. Aislamiento, purificación e identificación de fitoalexinas	37
2.4. Proceso de elicitación y preparación de muestras para análisis.	40
2.5. Análisis contenido de fitoalexinas.....	41
2.6. Pruebas de fitotoxicidad.	42
2.6.1. Germinación de semillas	42
2.6.2. Dureza de cotiledones de frijol.....	43
2.6.3. Efecto sobre el crecimiento de la plántula.	43
2.6.4. Contenido de clorofilas.....	43
2.6.5. Efecto sobre las raíces de la plántula.....	44
2.7. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos provenientes de plántulas elicidadas	44
2.7.1. Microorganismo	44
2.7.2. Inhibición del crecimiento micelial.....	45
2.7.3. Inhibición de la esporulación.....	45
2.7.4. Metabolismo de phaseollina por el hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	46

3. Resultados y discusión	47
3.1. Derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico	47
3.1.1. 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.3).....	48
3.1.1. 1-oxo-indanoil-L-leucina metil éster (2.4).....	53
3.1.2. 1-oxo-indanoil-L-valina metil éster (2.5).....	57
3.1.3. 1-oxo-indanoil-L-glicina metil éster (2.6).....	60
3.1.4. 1-oxo-indano-4-carboxilato de 3-hidroxipropilo (2.7).....	62
3.1.5. 1-hidroxi-indanol-L-isoleucina metil éster (2.8).....	67
3.1.6. N-(3-(dimetilamino)propil)-1-oxo-indano-4-carboxamida (2.9).....	70
3.1.7. N-(3-(dietilamino)propil)-1-oxo-indano-4-carboxamida (2.10).....	74
3.1.8. 2-(3'-bromobencilideno)-1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.11).....	78
3.1.9. 1-bencilhidrazono-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.12).....	83
3.1.10. 6-Bromo-1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.15).....	87
3.2. Identificación de las fitoalexinas del frijol	92
3.2.1. Genisteína.....	93
3.2.2. Daidzeína.....	97
3.2.3. 2'-Hidroxigenisteína.....	100
3.2.4. Dalbergioidina.....	103
3.2.5. Coumestrol.....	108
3.2.6. Phaseollinisoflavano.....	111
3.2.7. Phaseollidina.....	114
3.2.8. Phaseollina.....	117
3.2.9. Kievitona.....	122
3.3. Detección, identificación y cuantificación de las fitoalexinas	123
3.4. Elicitación de fitoalexinas en frijol con metil jasmonato	127
3.4.1. Efecto del tiempo post-inducción en la elicitación con metiljasmonato.....	127
3.4.2. Efecto de la concentración del elicitor.....	131
3.5. Efecto de la estructura del elicitor en la acumulación de fitoalexinas	134
3.5.1. Acumulación de fitoalexinas con la permutación de la posición 4 del ácido 1-indanona-4-carboxílico.....	135
3.5.2. Acumulación de fitoalexinas con conjugados indanoil-aminoácido.....	137
3.5.3. Acumulación de fitoalexinas con derivados del 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster.....	139
3.6. Efecto del tiempo post-inducción y la concentración en la elicitación con 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.3)	141
3.7. Acumulación de fitoalexinas en vainas de frijol común	146
3.8. Actividad antifúngica contra <i>C. Lindemuthiamun</i>	147
3.8.1. Inhibición del crecimiento micelial.....	147
3.8.2. Efecto sobre la esporulación de <i>C. Lindemuthianum</i>	150
3.9. Metabolismo de la Phaseollina por <i>C. lindemuthianum</i>	152
3.10. Fitotoxicidad de los derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico sobre plántulas de frijol	156
3.10.1. Germinación de semillas.....	156
3.10.2. Dureza de cotiledones de frijol.....	158
3.10.3. Efecto sobre el crecimiento de la plántula.....	158
3.10.4. Efecto sobre las raíces de la plántula.....	161
4. Conclusiones	163
Anexo: Información Suplementaria	165

5. Bibliografía.....	175
----------------------	-----

Listado de figuras

Figura 1-1. Enfermedades y plagas del frijol.....	5
Figura 1-2. Síntomas de Antracnosis en Frijol.....	6
Figura 1-3. Fungicidas más empleados en Colombia para el control de la antracnosis en frijol.....	7
Figura 1-4. Fitoalexinas de frijol.....	15
Figura 1-5. Señales químicas en plantas.....	16
Figura 1-6. Elicitores con mayor potencial.....	18
Figura 2.1. Obtención del compuesto 2.1	22
Figura 2.2. Espectro IR del compuesto 2.1	22
Figura 2.3. Obtención del compuesto 2.2	23
Figura 2.4. Espectro IR del compuesto 2.2	24
Figura 2.5. Obtención de conjugados indanoil-aminoácido.....	25
Figura 2.6. Estructura del compuesto 2.3	25
Figura 2.7. Estructura del compuesto 2.4	26
Figura 2.8. Estructura del compuesto 2.5	27
Figura 2.9. Estructura del compuesto 2.6	27
Figura 2-10. Obtención del compuesto 2.7	28
Figura 2-11. Estructura del compuesto 2.7	29
Figura 2-12. Estructura del compuesto 2.8	30
Figura 2-13. Obtención de amidas.....	31
Figura 2-14. Estructura del compuesto 2.9	31
Figura 2-15. Estructura del compuesto 2.10	32
Figura 2-16. Estructura del compuesto 2.11	33
Figura 2-17. Estructura del compuesto 2.12	34
Figura 2-18. Obtención del compuesto 2.13	35
Figura 2-19. Obtención del compuesto 2.14	35
Figura 2-20. Estructura del compuesto 2.15	36
Figura 2-21. Sistema de elución por gradiente empleado en el análisis por HPLC.....	41
Figura 3.1. Estructura del compuesto 2.3	49
Figura 3.2. Espectro IR del compuesto 2.3	49
Figura 3.3. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.3	50
Figura 3.4. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.3	50
Figura 3.5. Espectro Dept del compuesto 2.3	51
Figura 3.6. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.3	51
Figura 3.7. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.3	52
Figura 3.8. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.3	52
Figura 3-9. Estructura del compuesto 2.4	54
Figura 3-10. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.4	54
Figura 3-11. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.4	55
Figura 3-12. Espectro Dept del compuesto 2.4	55
Figura 3-13. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.4	56
Figura 3-14. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.4	56

Figura 3-15. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.4	57
Figura 3-16. Estructura del compuesto 2.5	58
Figura 3-17. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.5	58
Figura 3-18. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.5	59
Figura 3-19. Espectro Dept del compuesto 2.5	59
Figura 3-20. Estructura del compuesto 2.6	60
Figura 3-21. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.6	61
Figura 3-22. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.6	61
Figura 3-23. Espectro Dept del compuesto 2.6	62
Figura 3-24. Estructura del compuesto 2.7	63
Figura 3-25. Espectro IR del compuesto 2.7	63
Figura 3-26. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.7	64
Figura 3-27. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.7	64
Figura 3-28. Espectro Dept del compuesto 2.7	65
Figura 3-29. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.7	65
Figura 3-30. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.7	66
Figura 3-31. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.7	66
Figura 3-32. Estructura del compuesto 2.8	68
Figura 3-33. Espectro IR del compuesto 2.8	68
Figura 3-34. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.8	69
Figura 3-35. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.8	69
Figura 3-36. Espectro Dept del compuesto 2.8	70
Figura 3-37. Estructura del compuesto 2.9	71
Figura 3-38. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.9	71
Figura 3-39. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.9	72
Figura 3-40. Espectro Dept del compuesto 2.9	72
Figura 3-41. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.9	73
Figura 3-42. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.9	73
Figura 3-43. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.9	74
Figura 3-44. Estructura del compuesto 2.10	75
Figura 3-45. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.10	75
Figura 3-46. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.10	76
Figura 3-47. Espectro Dept del compuesto 2.10	76
Figura 3-48. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.10	77
Figura 3-49. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.10	77
Figura 3-50. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.10	78
Figura 3-51. Estructura del compuesto 2.11	79
Figura 3-52. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.11	80
Figura 3-53. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.11	80
Figura 3-54. Espectro Dept del compuesto 2.11	81
Figura 3-55. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.11	81
Figura 3-56. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.11	82
Figura 3-57. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.11	82
Figura 3-58. Estructura del compuesto 2.12	84
Figura 3-59. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.12	84
Figura 3-60. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.12	85
Figura 3-61. Espectro Dept del compuesto 2.12	85
Figura 3-62. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.12	86
Figura 3-63. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.12	86
Figura 3-64. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.12	87
Figura 3-65. Estructura del compuesto 2.15	88

Figura 3-66. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.15	88
Figura 3-67. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.15	89
Figura 3-68. Espectro Dept del compuesto 2.15	89
Figura 3-69. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.15	90
Figura 3-70. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.15	90
Figura 3-71. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.15	91
Figura 3-72. Estructuras de los derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico sintetizados	91
Figura 3-73. Cromatografía de capa fina de extractos de frijol	92
Figura 3-74. Espectro de absorción UV de la Genisteína	94
Figura 3-75. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Genisteína	94
Figura 3-76. Espectro de ^1H RMN de la Genisteína	95
Figura 3-77. Espectro de ^{13}C RMN de la Genisteína	95
Figura 3-78. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) de la Genisteína	96
Figura 3-79. Espectros ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HMBC de la Genisteína	96
Figura 3-80. Espectro de absorción UV de la Daidzeína	97
Figura 3-81. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Daidzeína	98
Figura 3-82. Espectro de ^1H RMN de la Daidzeína	98
Figura 3-83. Espectro de ^{13}C RMN de la Daidzeína	99
Figura 3-84. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) de la Daidzeína	99
Figura 3-85. Espectro de absorción UV de la 2'-Hidroxigenisteína	100
Figura 3-86. Espectro de ^1H RMN de la 2'-Hidroxigenisteína	101
Figura 3-87. Espectro de ^{13}C RMN de la 2'-Hidroxigenisteína	101
Figura 3-88. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) de la 2'-Hidroxigenisteína	102
Figura 3-89. Espectro ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC de la 2'-Hidroxigenisteína	103
Figura 3-90. Espectro de absorción UV de la Dalbergoidina	104
Figura 3-91. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Dalbergoidina	105
Figura 3-92. Espectro de ^1H RMN de la Dalbergoidina	106
Figura 3-93. Espectro de ^{13}C RMN de la Dalbergoidina	106
Figura 3-94. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) de la Dalbergoidina	106
Figura 3-95. Espectros ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC de la Dalbergoidina	107
Figura 3-96. Espectro de absorción UV del Coumestrol	108
Figura 3-97. Espectro de masas (FAB de ion positivo) del Coumestrol	109
Figura 3-98. Espectro de ^1H RMN del Coumestrol	109
Figura 3-99. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) del Coumestrol	110
Figura 3-100. Espectro ^1H - ^1H COSY del Coumestrol	110
Figura 3-101. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del Coumestrol	111
Figura 3-102. Espectro de masas (FAB de ion positivo) del Phaseollinisoflavano	112
Figura 3-103. Espectro de ^1H RMN de la Phaseollinisoflavano	112
Figura 3-104. Espectro de ^{13}C RMN (JMOD) de la Phaseollinisoflavano	113
Figura 3-105. Espectro ^1H - ^1H COSY RMN de la Phaseollinisoflavano	113
Figura 3-106. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC del Phaseollinisoflavano	114
Figura 3-107. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Phaseollidina	115
Figura 3-108. Espectro de ^1H RMN de la Phaseollidina	115
Figura 3-109. Espectro de ^{13}C RMN (JMOD) de la Phaseollidina	116
Figura 3-110. Espectro ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HSQC de la Phaseollidina	117
Figura 3-111. Espectro de absorción UV de la Phaseollina	118
Figura 3-112. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Phaseollina	119
Figura 3-113. Espectro de ^1H RMN de la Phaseollina	119

Figura 3-114. Espectro de ^{13}C RMN de la Phaseollina.....	120
Figura 3-115. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT 135) de la Phaseollina	120
Figura 3-116. Espectro ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC de la Phaseollina	121
Figura 3-117. Espectro de absorción UV de la Kievitona	122
Figura 3-118. Tiempo de retención y espectro de masas para la kievitona.....	122
Figura 3-119. Fitoalexinas de fríjol identificadas y aisladas.....	123
Figura 3-120. HPLC-DAD para las fitoalexinas identificadas en fríjol	124
Figura 3-121. Adición de estándar de fitoalexina a un extracto de frijol inducido para la identificación de los tiempos de retención.....	125
Figura 3-122. Curvas de calibración para la cuantificación de fitoalexinas en plántulas de frijol	126
Figura 3-123. Perfil cromatográfico característico inducción fitoalexinas en la variedad ICA Cerinza con Metil Jasmonato.....	128
Figura 3-124. Estudio de la concentración de fitoalexinas en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Cerinza inducida con una solución del compuesto metil jasmonato 0.44 mM.....	129
Figura 3-125. Estudio de la concentración de fitoalexinas en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto metil jasmonato 0.44 mM.....	131
Figura 3-126. Estudio de la concentración de fitoalexinas a las 96 h realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto metil jasmonato a diferentes concentraciones 0.04 mM a 4.40 mM.....	132
Figura 3-127. Estudio de la concentración de fitoalexinas a las 96 h realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto metil jasmonato a diferentes concentraciones 0.04 mM a 4.40 mM.....	133
Figura 3-128. Efecto de la concentración de MeJA (0.04 a 4.40 mM) sobre las raíces de las plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado, con un tiempo de incubación de 96 h.	134
Figura 3-129. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad ICA Cerinza, elicitados con solución 1.0 mM de derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico y 72 h post-inducción.....	135
Figura 3-130. . Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitados con solución 1.0 mM de derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico y 72 h post-inducción.	136
Figura 3-131. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad ICA Cerinza, elicitada con soluciones 1.0 mM de conjugados indanoil-aminoácido, y 72 h post-inducción..	138
Figura 3-132. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitada con soluciones 1.0 mM de conjugados indanoil-aminoácido, y 72 h post-inducción..	138
Figura 3-133. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad ICA Cerinza, elicitada con soluciones 1.0 mM de derivados del 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster, y 72 h post-inducción.....	140
Figura 3-134. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitada con soluciones 1.0 mM de derivados del 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster, y 72 h post-inducción.	140
Figura 3-135. Estudio de la concentración de fitoalexinas en el curso del tiempo post-inducción en hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza, elicitada con 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster..	143

Figura 3-136. Estudio de la Concentración de fitoalexinas en el curso del tiempo en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitada con solución 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster..	144
Figura 3-137. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad ICA Cerinza, elicitada con solución de 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster entre 0.44 mM a 4.40 mM, y 96 h post-inducción.	145
Figura 3-138. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitada con solución de 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster entre 0.44 mM y 4.40 mM y 96 h post-inducción	146
Figura 3-139. Estudio de la concentración de fitoalexinas en vainas de frijol variedad Cargamanto Blanco, elicitada con solución 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-iso-leucina metil éster, y 96 h post-inducción	147
Figura 3-140. Inhibición del crecimiento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> de extractos de plántulas de frijol variedades ICA Cerinza y Uribe Rosado, elicitadas con 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (3) y metil jasmonato, no elicitadas (control negativo) y phaseollina.	148
Figura 3-141. Crecimiento de <i>C. lindemuthianum</i> .	150
Figura 3-142. Porcentaje de inhibición de la esporulación de <i>C. lindemuthianum</i> por extractos de plántulas de frijol variedades ICA Cerinza y Uribe Rosado elicitadas con 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (3), metil jasmonato, control negativo y phaseollina.	151
Figura 3-143. Perfil en HPLC-DAD del metabolismo en el curso del tiempo de phaseollina por <i>C. lindemuthianum</i> .	152
Figura 3-144. Abundancia relativa en el curso del tiempo de la phaseollina y los productos del metabolismo (I y II) con <i>C. lindemuthianum</i>	153
Figura 3-145. Espectro de ¹ H RMN del producto I.	154
Figura 3-146. Espectro de ¹ H RMN de la mezcla de los productos I y II.	155
Figura 3-147. Efecto sobre el número y longitud de las radículas después de la germinación de semillas.	157
Figura 3-148. Efecto sobre el crecimiento de las plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado.	160

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Porcentaje Germinación semillas variedad Uribe Rosado.....	157
Tabla 2. Dureza de cotiledones de frijol tratados con elicitores	158
Tabla 3. Contenido de clorofilas en hojas de plántulas de frijol tratados con elicitores .	160
Tabla 4. Efecto sobre las raíces de la aspersión de elicitores	162
Tabla 5. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto metil jasmonato 0.44 mM.	165
Tabla 6. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 0.44 mM.	165
Tabla 7. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 1.0 mM.	165
Tabla 8. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la concentración del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto Metil Jasmonato.	166
Tabla 9. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la concentración del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3).	166
Tabla 10. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la estructura del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución de los compuestos 2.3 – 2.6 a 1.0 mM.	167
Tabla 11. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la estructura del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución de los compuestos 2.7 - 2.15 a 1.0 mM.	167
Tabla 12. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto metil jasmonato 0.44 mM.	167
Tabla 13. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 0.44 mM.	168
Tabla 14. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 1.0 mM.	168
Tabla 15. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la concentración del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto Metil Jasmonato.	168

Tabla 16. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la concentración del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster.	169
Tabla 17. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la estructura del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución de los compuestos 2.3 – 2.6 a 1.0 mM.	169
Tabla 18. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la estructura del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución de los compuestos 2.7 - 2.15 a 1.0 mM.....	170
Tabla 19. Pruebas de Múltiple Rangos para Dalbergioidina.	170
Tabla 20. Pruebas de Múltiple Rangos para 2'-Hidroxigenisteina.	171
Tabla 21. Pruebas de Múltiple Rangos para Daidzeina.	171
Tabla 22. Pruebas de Múltiple Rangos para Genisteína.....	171
Tabla 23. Pruebas de Múltiple Rangos para Coumestrol.....	172
Tabla 24. Pruebas de Múltiple Rangos para Phaseollinisoflavano.	172
Tabla 25. Pruebas de Múltiple Rangos para Phaseollidina.....	172
Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos para Phaseollina.	172
Tabla 27. Pruebas de Múltiple Rangos para Kievitona.	173

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo o abreviatura	Significado	Símbolo o abreviatura	Significado
kg	Kilogramo	DCM	Diclorometano
mg	Miligramo	(COCl) ₂	Cloruro de oxalilo
µg	Microgramo	DMF	N,N-dimetilformamida
L	Litro	AlCl ₃	Tricloruro de aluminio
mL	Mililitro	NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
ha	Hectárea	SiO ₂	Óxido de silicio
nm	Nanómetros	K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
mm	Milímetros	HCl	Ácido clorhídrico
cm	Centímetros	THF	Tetrahidrofurano
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical	NaBH ₄	Borohidruro de sodio
CORPOICA	Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria	HOBt	1- Hidroxibenzotriazol
FAO	Food and Agriculture Organization	DCC	Diciclohexilcarbodiimida
CdCl ₂	Cloruro de cadmio (II)	Pd/C	Paladio/Carbono
CuCl ₂	Cloruro de cobre (I)	MeOH	Alcohol metílico
HgCl ₂	Cloruro de mercurio (II)	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia Analítica
JA	Ácido jasmónico	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
LOX	Enzimas lipoxigenasas	IR	Espectroscopia Infrarroja
α-DOX	Enzimas α-dioxigenasas	EM	Espectrometría de Masas
MeJA	Metil jasmonato	¹³ C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

OPDA	Ácido 12-oxo-fitodienoico	^1H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
COR1	Jasmonato COR-insensible	COSY	Espectroscopia de Correlación (Correlation Spectroscopy)
CFA	Ácido coronafacico	HMQC	Coherencia Cuántica Múltiple Heteronuclear (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)
CMA	Ácido coronamico	HMBC	Correlación a Múltiples Enlaces Heteronuclear (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
ACC	Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	DEPT	Mejora sin Distorsión por Transferencia de Polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
CCF	Cromatografía de capa fina	Hz	Hertz
AcOEt	Acetato de etilo	MHz	Megahertz
CHCl_3	Cloroformo	J	Constante de Acoplamiento
CH_2Cl_2	Diclorometano	δ	Desplazamiento Químico en ppm
UV	Espectroscopia Ultravioleta Visible	CDCl_3	Cloroformo deuterado
CC	Cromatografía en Columna	Metanol- d_4	Metanol deuterado
AcOH	Ácido acético	JMOD	Experimento J-Modulación (J-Modulation Experiment)
H_2SO_4	Ácido sulfúrico	ν_{max}	Frecuencia Máxima
H_2O	Agua	M^+	Ión Molecular en Espectrometría de Masas
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius	m/z	Relación Masa a Carga en Espectrometría de Masas
u.m.a.	Unidad de Masa Atómica	min	Minutos
h	Hora	PDA	Agar papa-dextrosa
Rf	Factor de retención		

Introducción

El sector agrícola colombiano enfrenta grandes retos, resumidos en el incremento de la productividad y competitividad para hacer frente a la globalización de los mercados, la generación de nuevas y mejores políticas agrarias, y el cumplimiento de las cada vez más exigentes normas fitosanitarias. Adicionalmente, las tendencias actuales en el consumo de alimentos han generado una creciente demanda por productos más saludables y obtenidos mediante procesos más amigables con el medio ambiente. Infortunadamente en nuestro país, el control de plagas y enfermedades en los cultivos se ha llevado a cabo mediante la aplicación en su gran mayoría, de sustancias sintéticas con alta toxicidad (biocidas) y baja especificidad (como los plaguicidas de amplio espectro), que tienen un impacto deletéreo para la salud y el medio ambiente.

Hoy en día se estudian alternativas diferentes para incrementar la productividad agrícola y reducir la aplicación de fungicidas sintéticos, desde enfoques efectivos y ecológicamente más seguros. Además, es apremiante la búsqueda de sustancias nuevas y mejores para combatir agentes fitopatogénicos, pero cuyo desarrollo parte de un diseño racional de sus estructuras y mecanismos de acción, lo que precisa de un íntimo conocimiento de la bioquímica de la planta y su interacción con el patógeno. Grandes esfuerzos se han realizado en el hallazgo de nuevas sustancias con actividad biológica que ayuden a combatir enfermedades en los cultivos, pero sin efectos nocivos; también se ha incursionado en el uso de plantas modificadas genéticamente resistentes a enfermedades. Uno de los enfoques que actualmente se viene explorando involucra la inducción de los mecanismos de defensa innatos que tienen las plantas contra patógenos, entre los que se incluyen la producción de sustancias fungitóxicas llamadas fitoalexinas. Se considera que las fitoalexinas ofrecen un excelente modelo estructural y bioquímico para el desarrollo de nuevas alternativas de control de enfermedades. Por una parte, porque son sustancias que han demostrado poseer actividad antibiótica *in vitro* y, además, parecen biosintetizarse de una manera diferencial en variedades y especies resistentes y susceptibles a microorganismos patogénicos.

El análisis de la generación de las fitoalexinas en condiciones normales, así como elicitando su producción, podría generar información bioquímica acerca del punto en el

cual se regula su producción, lo que plantea varias expectativas. De un lado aplicar en la planta esas sustancias cuya producción está reprimida, o mejor aún, aplicar análogos estructurales antibióticamente más potentes que las fitoalexinas originales y obtenidos por métodos sintéticos.

Otra alternativa, en la cual se basa la presente Tesis, es la factibilidad de aplicar elicitores (sustancias que activan los mecanismos de defensa de las plantas) para que de-repriman las enzimas que están trabajando deficientemente, y preparen la planta para una posterior infección (Thakur & Sohal, 2013). La ventaja de los elicitores sobre los fungicidas sintéticos actuales es que su mecanismo de acción es no-biocida; simplemente estimulan los mecanismos de defensa de la planta, lo que los hace más amigables con el medio ambiente. Recientemente se ha reportado el aislamiento de una fitotóxina de medios de cultivo de *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea*, llamada coronatina. Este compuesto es un conjugado del ácido coronafácico y un aminoácido raro llamado ácido coronámico. Actualmente hay un gran interés en la coronatina, la cual exhibe varias actividades biológicas similares o incluso superiores a las presentadas por potentes elicitores como el ácido jasmónico, el ácido salicílico y el ácido nicotínico, en algunos sistemas evaluados. Desafortunadamente, la estructura de la coronatina es compleja (posee varios centros quirales) y presenta grandes retos en su producción. A la fecha, las aproximaciones sintéticas han resultado poco eficientes debido a la producción de diferentes estereoisómeros, requiriéndose procesos de separación que son poco efectivos (Schüler et al., 2004).

Para evitar estas dificultades, diferentes autores han evaluado compuestos relacionados estructuralmente, pero carentes de carbonos quirales. Estas estructuras planas han mostrado actividad biológica de órdenes cercanos a la coronatina (Schuler et al., 2001; Schüler et al., 2004; Svoboda & Boland, 2010; Lauchli et al., 2002; Hu et al., 2005). Una simplificación de la estructura de la coronatina en la que se eliminan los carbonos quirales y se modifica el aminoácido raro (ácido coronámico) ha conducido a la preparación de un "imitador". Este imitador, llamado coronalona, es un conjugado 6-etilindanoil isoleucina que posee mayores facilidades sintéticas y consecuentemente mejores perspectivas de aplicación en campo que la coronatina.

De otro lado, el frijol constituye uno de los productos agrícolas de mayor importancia en la economía de nuestro país, debido a su papel en la generación de ingresos y empleo rural.

Adicionalmente el frijol es un producto básico de la dieta alimenticia, por su alto contenido de proteínas y elementos minerales esenciales (Arias-Restrepo et al., 2007). Infortunadamente, la producción de frijol en el país está limitada por la alta incidencia de plagas y enfermedades, especialmente aquellas ocasionadas por hongos, lo que se agrava por el uso generalizado de variedades susceptibles. La enfermedad más importante del frijol en Colombia y Antioquia, por su amplia distribución y las pérdidas que ocasiona, es la Antracnosis.

La antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, es una enfermedad que puede causar pérdidas hasta del 100% cuando se siembra semilla severamente afectada. Los síntomas producidos por la infección pueden aparecer en cualquier parte de la planta, afectando en mayor medida en la época de floración y producción de vainas (Durango, 2013). Tradicionalmente, la enfermedad se controla con el uso de fungicidas, algunos de los cuales tienen efectos nocivos sobre la salud humana y el medio ambiente por su baja selectividad, y una limitada eficacia contra la enfermedad.

En el presente trabajo se preparará el ácido 1-indanona-4-carboxílico, un núcleo relacionado estructuralmente con el ácido coronafácico, presente en la coronatina. A partir de éste se sintetizarán derivados, como por ejemplo conjugados con aminoácidos (por ejemplo, L-valina metil éster, L-Leucina metil éster, L-isoleucina metil éster, etc.), amidas, ésteres, entre otros. Estos elicitores potenciales serán evaluados sobre tejidos de plántulas de frijol, analizando el efecto de la concentración del elicitador y el tiempo post-inducción en la acumulación de las fitoalexinas. Finalmente, se evaluará la fitotoxicidad del elicitador más activo en plántulas de frijol y la actividad antifúngica contra *C. lindemuthianum* del extracto proveniente de las plántulas tratadas con dicho elicitador.

Objetivos

Objetivo General

Preparar derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico y evaluar el efecto de su aplicación en variedades de frijol sobre la inducción de fitoalexinas isoflavonoide, fitotoxicidad y actividad antifúngica de sus extractos.

Objetivos Específicos

- ❖ Sintetizar el ácido 1-indanona-4-carboxílico a partir del ácido 2-carboxicinámico mediante reacciones de hidrogenación y acilación intramolecular de Friedel-Crafts.
- ❖ Preparar derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico, mediante reacciones en la posición 4 del grupo indanoilo para la preparación de amidas y ésteres, y en la posición 1 a través de reacciones de reducción del grupo carbonilo y formación de iminas y en la posición 2 con la obtención de bencilidenos.
- ❖ Desarrollar un método de análisis de las fitoalexinas de frijol por cromatografía líquida de alta eficiencia.
- ❖ Evaluar el potencial elicitador de fitoalexinas en plántulas de frijol de los derivados preparados, analizando el efecto de la concentración del elicitador, el tiempo post-inducción y el tejido expuesto.
- ❖ Evaluar la fitotoxicidad sobre plántulas de frijol del derivado con mayor actividad elicitadora y la actividad antifúngica del extracto de plántulas tratadas con dicho elicitador, contra el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*.
- ❖ Correlacionar cualitativamente la estructura del derivado y el efector inductor de fitoalexinas.

1. Marco teórico y estado del arte

1.1 El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y su importancia económica

El frijol común es una de las leguminosas más importantes en el mundo (Camara de Comercio de Bogota, 2015); es la segunda fuente de proteína en África Oriental y Meridional, y la cuarta en América tropical, donde fue domesticado este cultivo (Zizumbo & Colunga, 2017). La producción promedio mundial en el año 2017 fue de 31.4 millones de toneladas (Minagricultura, 2019). De esta producción, correspondieron a América latina y el Caribe el 30.06%.

En Colombia, el frijol es la leguminosa de grano más importante por su volumen de producción, valor alimenticio, generación de empleo y amplia aceptación en la dieta popular, con 4.25 kg de consumo por persona al año (Arias & Guzmán, 2004). En Colombia se sembraron un total de 92.476 hectáreas de frijol en 2018, con una producción de 113.887 toneladas y un rendimiento promedio de 1.23 toneladas por hectárea (Minagricultura, 2019). Del área sembrada de frijol, el 65% correspondió al frijol voluble, cuya siembra se lleva a cabo en las zonas de clima frío y frío moderado; el otro 35% está determinado por el frijol arbustivo que se siembra en clima medio (Agrosavia, 2018).

Para la zona Andina, el cultivo de frijol reviste especial importancia, ya que además de ser un producto básico en la canasta familiar de los habitantes de esta región del país, es un gran generador de empleo y, presenta niveles de rentabilidad altos por mantener precios estables durante todo el año. En el departamento de Antioquia se siembran (por parte de 30.000 familias) más de 14.000 ha/año de frijol con una producción de más de 20.000 toneladas; siendo las zonas más productoras los Altiplanos del Oriente y Norte, y la región Occidente (Fenalce, 2018). Así, Antioquia se constituye en uno de los primeros productores de frijol en Colombia con los tipos Radical y Cargamanto (Minagricultura, 2018).

El frijol común aparece en el país como una de las principales fuentes de proteínas, así como por formar parte importante de los hábitos alimenticios de la población. Su importancia alimenticia, entre otros, se debe al menor costo de su proteína en relación con la proteína de origen animal (Quintana & Torres, 2016).

1.2 Enfermedades que afectan el cultivo de frijol

Colombia, a pesar de ser un país con variabilidad genética en frijol, con cultura de producción y adaptación del cultivo a variados ambientes, presenta una reducción y déficit en la oferta para suplir el mercado interno; por esta razón tiene que realizar importaciones para poder cubrir la demanda nacional (Fenalce, 2017). Una de las causas principales que ha llevado a la reducción del área cultivada y la disminución en la producción, es la ocurrencia de enfermedades.

El frijol común como todo cultivo depende para su óptimo desarrollo de la disponibilidad de nutrientes y agua, y del mantenimiento de factores ambientales adecuados (Arias & Gúzman, 2001). Este cultivo es notoriamente susceptible a muchos factores adversos que pueden disminuir considerablemente su productividad. Sin embargo, en muchas zonas frijoleras del mundo, son las enfermedades el factor más importante responsable de los rendimientos bajos del cultivo; se han reportado centenares de agentes que causan enfermedades en el frijol, pero no todos tienen la misma distribución geográfica o importancia económica (**Figura 1-1**). Así, para que una enfermedad ocurra y se desarrolle, es necesario un hospedero o una variedad susceptible, la presencia del patógeno, y las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Las enfermedades más importantes del frijol son aquellas causadas por hongos, bacterias y virus, las cuales interfieren en la fabricación, translocación y utilización de nutrientes minerales y agua, y como resultado reducen la productividad del frijol. Por su amplia distribución e importancia económica, las enfermedades (y los organismos que la causan) más importantes en Colombia son:

- **Enfermedades fúngicas:** Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), Roya (*Uromyces phaseoli*), Mustia hilachosa (*Rhizoctonia solani*), Amarillamiento (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*), Pudriciones radicales causadas por un complejo de hongos tales como la pudrición radical por *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*), la pudrición radical por *Fusarium* (*Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*), y la pudrición radical por *Phytium*.
- **Enfermedades virales:** Virus del Mosaico común y del Mosaico dorado.

- **Enfermedades bacterianas:** Bacteriosis común (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) y el Añublo de halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*).



Figura 1-1. Enfermedades y plagas del frijol (IICA, 2008) (CIAT, 2016)

En general, los genotipos regionales de gran aceptación comercial como el Cargamanto, son altamente susceptibles a enfermedades endémicas como la antracnosis.

1.3. Antracnosis y control de la enfermedad

De las enfermedades fúngicas que afectan el cultivo de frijol común en Colombia, la antracnosis (causada por *C. lindemuthianum*) es la más frecuente; puede ocasionar pérdidas económicas que oscilan entre 50 y 100%, si las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo (Tamayo & Londoño, 2001). Los síntomas de la enfermedad se presentan en diferentes partes de la planta: tallos, pecíolos, hojas, vainas y semillas (Araya & Hernández, 2008) (**Figura 1-2**). En los tallos y ramas, las lesiones son generalmente ovaladas, deprimidas y de coloración oscura. Los síntomas en las vainas aparecen como pequeñas manchas o lesiones redondas de color rojo-púrpura. Particularmente, el ataque en vainas causa reducciones entre 20 y 30% del rendimiento. En semillas, esta enfermedad es la principal causa de rechazo de lotes. En ataques tempranos la vaina se tuerce y no produce granos, generando pérdidas económicas importantes.



Figura 1-2. síntomas de Antracnosis en Frijol (IICA, 2008) (CIAT, 2016)

El combate de esta enfermedad se torna difícil por la diversidad de mecanismos genéticos de sobrevivencia y adaptación con que cuenta el agente causal (Pastor-Corrales et al., 1993), así como por la presencia constante de condiciones favorables para la infección y la utilización de variedades susceptibles. En Colombia, el combate por resistencia varietal, rotación de cultivos y uso de semilla sana, son prácticas poco utilizadas por la mayoría de los pequeños agricultores, especialmente aquellos con escasos recursos económicos. En estos casos, la aplicación de sustancias sintéticas biocidas es el método de control de la enfermedad más usado.

1.3.1. Control químico

En el caso de la antracnosis, la aplicación de fungicidas sintéticos (**Figura 1-3**) de baja especificidad resulta ser uno de los métodos de combate más utilizados, por sus resultados a corto plazo; empleándose principalmente Benomil (**1.1**), Carbendazim (**1.2**), y Carboxin (**1.3**), en el tratamiento de la semilla. En ataques intermedios, se emplean los fungicidas Azoxistrobina (**1.4**), Propiconazol (**1.5**), Tebuconazol (**1.6**), y Tiofanato metílico (**1.7**) antes de la floración y durante la formación de vainas. Ataques muy tempranos, sin embargo, limitan la eficiencia de los fungicidas. Infortunadamente, el productor de frijol tratando de mantener la calidad del producto, utiliza un número muy alto de aplicaciones químicas, a veces más de 7 en un cultivo de 70 días (Mena & Velásquez, 2010), lo que desencadena graves problemas.

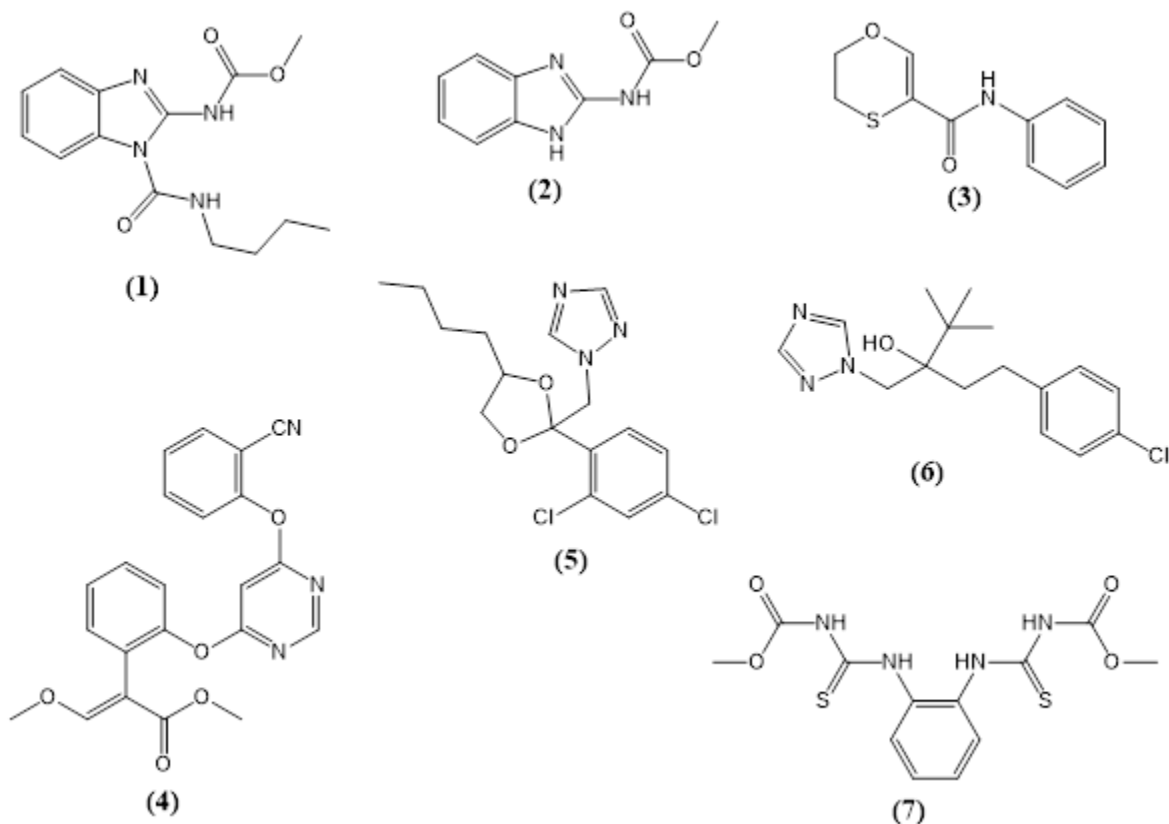


Figura 1-3. Fungicidas más empleados en Colombia para el control de la antracnosis en frijol

La aplicación extensiva y sin control adecuado de este tipo de sustancias biocidas con baja especificidad ha provocado efectos adversos tanto en el ecosistema como en la salud humana; incluyendo tanto a las personas que trabajan en el cultivo como a las que consumen el producto final (Pérez et al., 2012). Además, se ha originado una resistencia por parte del patógeno a los fungicidas actuales, como se ha verificado con *C. lindemuthianum* (Ghini & Kimati, 2000; Maringoni & Barros, 2002; Sartorato, 2006), lo que representa un impacto económico y ambiental negativo considerable. Por ejemplo, se ha reportado una baja sensibilidad de aislados de *C. lindemuthianum* al Tiofanato metílico (Ghini & Kimati, 2000) y resistencia a los benzimidazoles (Maringoni & Barros, 2002), que es debida posiblemente a la mutación del gen α -tubulina; éste causa cambios en la secuencia de bases y consecuentemente en la síntesis de aminoácidos, principalmente en los codones 198 o 200 (Dekker & Georgopoulos, 1982; McKay et al., 1998).

1.3.2. Resistencia varietal

Colombia posee una gran riqueza en cuanto a materiales genéticos. Aprovechando la gran diversidad genética existente, se han realizado en el país numerosas investigaciones para mejorar las variedades con características deseables en cuanto a adaptación al medio, rendimiento, resistencia o tolerancia a enfermedades, y tomando además en cuenta el tipo de grano, de acuerdo con las preferencias que se han identificado en cada región. En el país se han adelantado programas para el mejoramiento del frijol, principalmente por entidades como el ICA, CORPOICA y el CIAT, obteniéndose variedades resistentes a la antracnosis del tipo cargamanto como ICA Viboral, Diacol Catío, ICA-Llanogrande, Frijolica LS3.3 y CORPOICA LAS 106 (Santana et al., 2004). A pesar de estos avances, se ha observado que esta resistencia no es estable y en muchas ocasiones las variedades resultan resistentes a unas razas del patógeno, pero a otras no; además hay diferencias en los resultados de acuerdo con las condiciones climáticas, localidad o año (Pastor-Corrales et al., 1993). Los anteriores cambios se pueden explicar debido a las mutaciones o migraciones de las razas del patógeno (Santana et al., 2004). Por lo anterior, los programas de fitomejoramiento en frijol demandan métodos de detección de las variedades resistentes a la enfermedad que sean rápidos y confiables, dado que los procesos de hibridación y evaluación de resistencia en campo consumen demasiado tiempo, en el cual la resistencia va decreciendo.

Es así como la creciente resistencia de los microorganismos a los fungicidas sintéticos, el costo progresivo que exige la aplicación de dosis mayores y más constantes en el campo, los peligros que representan para el medio ambiente e incluso para el hombre la acumulación y el uso de sustancias con baja especificidad, y los problemas de estabilidad de la resistencia a la antracnosis en variedades mejoradas, han estimulado la búsqueda de métodos de control diferentes, novedosos y de bajo riesgo. Una de las alternativas que ha llamado más la atención en los últimos tiempos, es aquella que se fundamenta en los mecanismos de control innatos que poseen las plantas para defenderse contra patógenos potenciales.

Variedades como ICA Cerinza y Uribe rosado se encuentran clasificadas como clases radical y rosados, con una participación en área sembrada del 13 % y el 5 % respectivamente. En primer lugar, la variedad de frijol ICA Cerinza es de tipo arbustivo y se cultiva en zonas de clima frío y frío moderado, principalmente en los departamentos de Boyacá y Santander. Esta variedad es una de las más productivas del clima frío, además,

es tolerante a las enfermedades más comunes en la región como roya, antracnosis, mancha de la hoja y pudrición de raíz; es así como, al compararse con otras variedades, tiene unos costos de producción inferiores y tiene mayor rendimiento en su producción (Fenalce, 2004; Checa et al., 2009). Mientras la Variedad Uribe Rosado es de tipo arbustivo, es una variedad criolla y susceptible a enfermedades como la antracnosis; sin embargo, es cultivada debido a su versatilidad y preferencia en los mercados. Se cultiva en climas moderados, en monocultivos o asociado con otros cultivos como café y plátano, por lo cual es muy cultivado en la zona cafetera del país (Cano, 2016).

1.4. Mecanismos de defensa y elicitores, como alternativa de control de enfermedades en plantas

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

Es decir que antes que una lesión fúngica se desarrolle exitosamente, un número de eventos tienen que ocurrir en una secuencia determinada. Así, la espora tiene que llegar a la superficie de la hoja y en un sitio donde el ambiente fisiológico sea favorable para su germinación; el tubo germinativo resultante tiene que penetrar la hoja y establecer la nueva infección por crecimiento interno dentro de la planta huésped susceptible; es entonces cuando los síntomas de la enfermedad se hacen evidentes y son seguidos por una reproducción posterior del patógeno.

La planta, sin embargo, puede resistir el ataque del patógeno proporcionando una barrera mecánica en la superficie de la hoja, para que la penetración no ocurra, o generando sustancias químicas antimicrobianas rápidamente y alrededor del sitio de la penetración, para que el hongo no se pueda establecer apropiadamente dentro de los tejidos del huésped. Las barreras mecánicas incluyen la capa de cutícula, la cual es a su vez de naturaleza química, la presencia de vellosidades, el desarrollo de revestimientos de cera, y la disminución del tamaño de los estomas. Sumado a estas barreras mecánicas, aparecen barreras químicas mucho más específicas; sustancias químicas que contribuyen a la modificación de las paredes celulares del huésped, la producción de taninos y

melaninas, o la producción de antibióticos para la defensa. A continuación, se describen con más detalle estas barreras:

La primera barrera química se presenta cuando las paredes celulares de la planta son recubiertas con una serie de polímeros altamente resistentes de cutina, suberina, callosa, celulosa, lignina, proteínas estructurales, etc., que actúan como barreras físicas y químicas para la germinación y penetración de los hongos en las hojas (Diener & Ausubel, 2005). La deposición masiva de estos polímeros y el incremento en el espesor de las paredes se encuentran asociados con la resistencia en algunos sistemas huésped-parásito. Este tipo de polímeros, sin embargo, pueden ser hidrolizados efectivamente por algunas enzimas fúngicas.

Además, las plantas producen enzimas líticas, inhibidores de enzimas proteasas y de virus, y una gran variedad de productos naturales que pueden actuar como antibióticos en la resistencia a patógenos. Las enzimas líticas producidas por las plantas (β -1,3-glucanasas y quitinasas) disuelven las paredes celulares fúngicas, y se ha encontrado que su actividad se incrementa rápidamente y a niveles superiores en las plantas de melón resistentes que en las susceptibles, en respuesta a *Fusarium oxysporum* (Chisholm et al., 2006). Adicionalmente las plantas generan cientos de metabolitos secundarios, muchos de los cuales son característicos de grupos taxonómicos específicos y son tóxicos a las plagas. Así, la planta puede sintetizar un agente antimicrobiano especial, el cual es entonces secretado para prevenir la germinación de la espora o su habilidad para proliferar y penetrar la superficie de la hoja. Estos antibióticos constitutivos son denominados compuestos antifúngicos preformados (ó *fitoanticipinas*), y pueden ser sintetizados completamente y almacenados en depósitos estratégicamente ubicados cuya función es prevenir la colonización de los tejidos (Jones & Dangl, 2006). Estas toxinas pueden ser sintetizadas como parte del metabolismo normal de la planta, permanecer almacenadas en las células como precursores inactivos (frecuentemente como glicósidos), y ser rápidamente convertidas en antibióticos biológicamente activos por enzimas de la planta en respuesta al ataque del patógeno.

Estos mecanismos de defensa preformados son indudablemente importantes en la limitación del desarrollo del patógeno; sin embargo, para el fracaso de la infección, las reacciones bioquímicas dinámicas activadas por la penetración del hongo son probablemente las más significativas. Estas defensas celulares inducidas, se han

denominado mecanismos de defensa inducidos, debido a que son una respuesta a un patógeno invasor. La respuesta más importante a la invasión es la producción de toxinas que matan al patógeno o al menos inhiben su desarrollo en los tejidos del huésped. Esta respuesta a la penetración fúngica involucra la síntesis rápida *de novo* de fungitoxinas, usando materiales de partida disponibles en los tejidos del huésped. En esta respuesta, el patógeno produce o induce la acumulación en el huésped de una molécula elicitora, la cual estimula la síntesis de una serie de enzimas específicas, que catalizan la producción de las fungitoxinas (Medzhitov, 2007). Esta serie de eventos es conocida como la respuesta fitoalexínica y a este tipo de moléculas fungitóxicas, *fitoalexinas*.

1.5. Fitoalexinas producidas en el fríjol (*P. vulgaris* L.)

1.5.1. Definición de fitoalexinas

Las fitoalexinas se han definido como sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular que se producen en las plantas como consecuencia del ataque de microorganismos. Esta definición tiene algunos puntos polémicos, ya que no todas las fitoalexinas tienen la actividad biológica que se les atribuye y, además, no son los microorganismos los únicos agentes inductores de su producción. En un sentido amplio se catalogan como metabolitos de estrés; actualmente se conocen más de trescientas fitoalexinas, que generalmente se producen en cantidades del orden de microgramos y como una compleja mezcla de sustancias químicamente relacionadas. Es posible hallarlas en plantas sanas en concentraciones muy pequeñas, pero dicha concentración se incrementa dramáticamente ante un elicitor adecuado. El estudio de este tipo de compuestos comenzó en 1940 cuando los investigadores alemanes Müller y Borger determinaron que la exposición de rodajas de papa a una raza avirulenta del hongo *Phytophthora infestans* originaba resistencia en esta misma rodaja, al crecimiento de una raza virulenta del mismo hongo (Astrid & Ardila, 2011).

El modo de acción antimicrobiano de las fitoalexinas no se ha aclarado por completo. Su toxicidad no es selectiva y la afinidad química de muchas fitoalexinas por los lípidos sugiere que estos metabolitos se acumulan en las membranas celulares. Se ha sugerido que algunas fitoalexinas, como la phaseollina y kievitona, perturban la membrana y afectan algunos procesos necesarios para la función de la membrana (VanEtten & Bateman, 1971; Singh & Chandrawat, 2017). También se ha demostrado en pruebas *in vivo* e *in vitro* que

concentraciones del orden de microgramos bastan para obtener resultados satisfactorios en la erradicación de hongos, mediante la inhibición del crecimiento (Jeandet, 2015). Inclusive estas concentraciones bastan para dar protección durante períodos de tiempo relativamente largos (Jeandet, 2015).

Puesto que las fitoalexinas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y/o la germinación de esporas de microorganismos, una consecuencia lógica sería su utilización para proteger las plantas contra enfermedades, haciendo uso de su potencial antibiótico directo. No obstante, y si bien inicialmente se podrían obtener buenos resultados en la protección de cosechas con su aplicación, es de esperarse que también se genere a mediano plazo una resistencia microbiana, especialmente por la capacidad del patógeno para metabolizar las fitoalexinas a sustancias inocuas (Pedras & Ahiahonu, 2005). Otra perspectiva que ha llamado la atención es la de usar la estructura de las fitoalexinas como plantilla o modelo para sintetizar análogos más activos mediante modelación molecular. Esta posible aplicación de las fitoalexinas es similar a la metodología actual de búsqueda y desarrollo de los fungicidas. Sin embargo, tiene dos ventajas: de un lado porque se parte de una estructura bioquímicamente involucrada en la relación planta-patógeno, y de otro lado porque hay una acción más específica. Finalmente, dado que existe una íntima relación entre la resistencia a patógenos y la habilidad de una planta para producir fitoalexinas, es posible seleccionar nuevos clones o variedades resistentes a enfermedades fundamentados en la capacidad de un órgano de la planta para responder a un estímulo que induzca la producción de fitoalexinas; lo cual sería altamente deseable en los programas de fitomejoramiento.

1.5.2. Fitoalexinas de frijol

El frijol común produce un gran número de compuestos cuando está sometido a condiciones de estrés, tales como una infección por ciertos hongos, bacterias y virus, y el tratamiento con varias sustancias químicas (elicitors). Perrin & Cruickshank (1969) aislaron e identificaron el pterocarpano phaseollina (**1.8**) como el primer isoflavonoide antifúngico formado post-infección en las cavidades de las vainas de frijol inoculadas con un hongo no patogénico, *M. fructicola*; se considera que este compuesto tiene un papel principal en la defensa de la planta huésped (García & Pérez, 2003). Posteriormente se aislaron varios compuestos relacionados con este pterocarpano, en tejidos inoculados con diversos hongos, bacterias y virus: phaseollidina (**1.9**), kievitona (**1.10**), phaseollinisoflavano (**1.11**),

y coumestrol (1.12), además de sus precursores biosintéticos daidzeína (1.13), genisteína (1.14), 2'-hidroxigenisteína (1.15) y dalbergioidina (1.16) (**Figura 1-4**). Rahe et al. han reportado manchas en los hipocótilos de variedades resistentes entre 60-72 horas después de la inoculación con *Colletotrichum lindemuthianum*. Además, la concentración de phaseollina en los tejidos fue mucho mayor en las variedades resistentes que en las susceptibles inoculadas con el hongo fitopatógeno (Brooks & Watson, 1985). De otro lado, varias rizobacterias también inducen fitoalexinas en frijol, especialmente kievitona en dosis de 83.0-333.0 µg/g de tejido fresco (Grayer & Harborne, 1994). Por su parte, el coumestrol y la genisteína se encuentran presentes de forma natural en algunas leguminosas, sin embargo, su concentración se incrementa significativamente en plántulas de frijol sometidas a una infección. Estos compuestos, excepto el coumestrol, poseen una alta actividad antifúngica; además el phaseollinisoflavano y la kievitona han mostrado actividad bactericida en estudios preliminares *in vitro* (Gnanamanickam & Mansfield, 1981). Estas últimas sin embargo, son metabolizadas rápidamente por el hongo *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Hammerschmidt & Schultz, 1996). Al parecer, existe una clara asociación entre la virulencia de *Fusarium* contra frijol y la producción de enzimas metabolizantes; de otro lado, la capacidad metabolizante de la kievitona es muy importante durante las primeras etapas de colonización de la planta por el patógeno (Smith et al., 1982). También se ha reportado el metabolismo de phaseollina por patógenos y no patógenos (Kistler & VanEtten, 1981). Se ha demostrado que existe una clara asociación entre los niveles de producción de fitoalexinas y la resistencia a patógenos en las variedades de frijol norteamericanas y europeas (Brooks & Watson, 1985). La amplia diversidad estructural de las fitoalexinas de frijol (isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanos, pterocarpanos, coumestanos) puede dificultar los procesos de resistencia desarrollados por los microorganismos. Además, las fitoalexinas de frijol pueden tener un mecanismo de acción diversificado o presentar un efecto sinergista con la asociación de varias fitoalexinas.

Las principales variables que afectan la producción de las fitoalexinas están dadas por, la variedad de frijol, observándose mayor acumulación en variedades resistentes (Morrisey & Osbourn, 1999); el tejido expuesto, se han reportado cambios en los compuestos mayoritarios en hipocótilos y cotiledones (Whitehead et al., 1982); el inductor, el cual puede ser del tipo biótico o abiótico, en el caso de los inductores de tipo bióticos se han realizado estudios con diferentes hongos fitopatógenos, donde compuestos de la pared celular de estos hongos activan la respuesta (Cline, et al., 1978; Garcia-Arenal et al., 1978);

finalmente, el tiempo post-inducción, genera la aparición de diferentes fitoalexinas en concentraciones variables (Soriano-Richards et al., 1998). En la presente tesis se evaluó la producción de fitoalexinas isoflavonoide en dos variedades de frijol con diferente comportamiento fitopatológico (Var. Uribe rosado e ICA Cerinza, susceptible y tolerante a la antracnosis respectivamente), en varios tejidos (hipocótilo/raíz, vainas), y se analizó el efecto del tiempo post-inducción (24, 48, 72, y 96 horas). Adicionalmente, se evaluó la capacidad y mecanismo de detoxificación de la phaseollina (**1.8**) con el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum*.

La activación de la defensa en plantas supone la existencia de mecanismos de reconocimiento mediante los cuales la planta determina la presencia del patógeno. Ciertas sustancias (elicitors) son capaces de actuar como activadores de la defensa.

1.5.3. Elicitors como estrategia de protección de cultivos

Los elicitors se han clasificado en dos grupos: bióticos y abióticos, para describir respectivamente, inductores que son de origen biológico o químico-físico. Los inductores bióticos corresponden a hongos, bacterias, virus y nematodos. También se clasifican en este grupo las moléculas derivadas de los patógenos. Los elicitors abióticos se subdividen en químicos y físicos; entre los primeros están algunas sustancias estructuralmente muy diversas tales como carbohidratos, salicilatos, jasmonatos, benzoatos, sales de metales pesados, etileno, ácido abscísico, entre otros. Estas sustancias probablemente actúan en formas diferentes en cada caso, sin embargo, el resultado es un notable cambio en el metabolismo de la planta que ha sido expuesta. Por su parte los elicitors abióticos físicos incluyen la luz ultravioleta, los cortes y el congelamiento del material vegetal.

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa pasivos y activos; en primer lugar, el mecanismo de defensa pasivo hace referencia a las barreras físico-químicas preexistentes (preformadas) en las plantas. Mientras el mecanismo de defensa activo, se refiere al mecanismo de resistencia sistémico, el cual se genera cuando la planta logra detectar que está sufriendo un ataque por un patógeno u otros. Lo anterior permite que la planta detecte elicitors, como compuestos desprendidos del patógeno (o incluso de las células de la planta), a través de receptores, y de aviso del ataque a otras células adyacentes mediante nuevas señales químicas (mensajeros secundarios) que desencadenan el proceso de resistencia generando metabolitos secundarios claves (Dotor & Cabezas, 2014; Camarena-Gutierrez, 2002). Se han encontrado señales de ataque

(Figura 1-5), que la planta produce endógenamente como jasmonatos (como el metil jasmonato, **1.17**; ácido jasmónico, **1.18**; y jasmonoil-L-isoleucina, **1.19**) u octadecanoides (derivados del ácido graso octadecanoide, ácido α -linolenico), ácido salicílico (**1.20**), ácido benzoico (**1.21**), ácido nicotínico y otros similares. Estos compuestos juegan un papel muy importante en el mecanismo de respuestas defensiva de la planta, al jugar un papel clave en el reconocimiento del ataque y la posterior organización de la defensa y contraataque (Bektas & Eulgem, 2015).

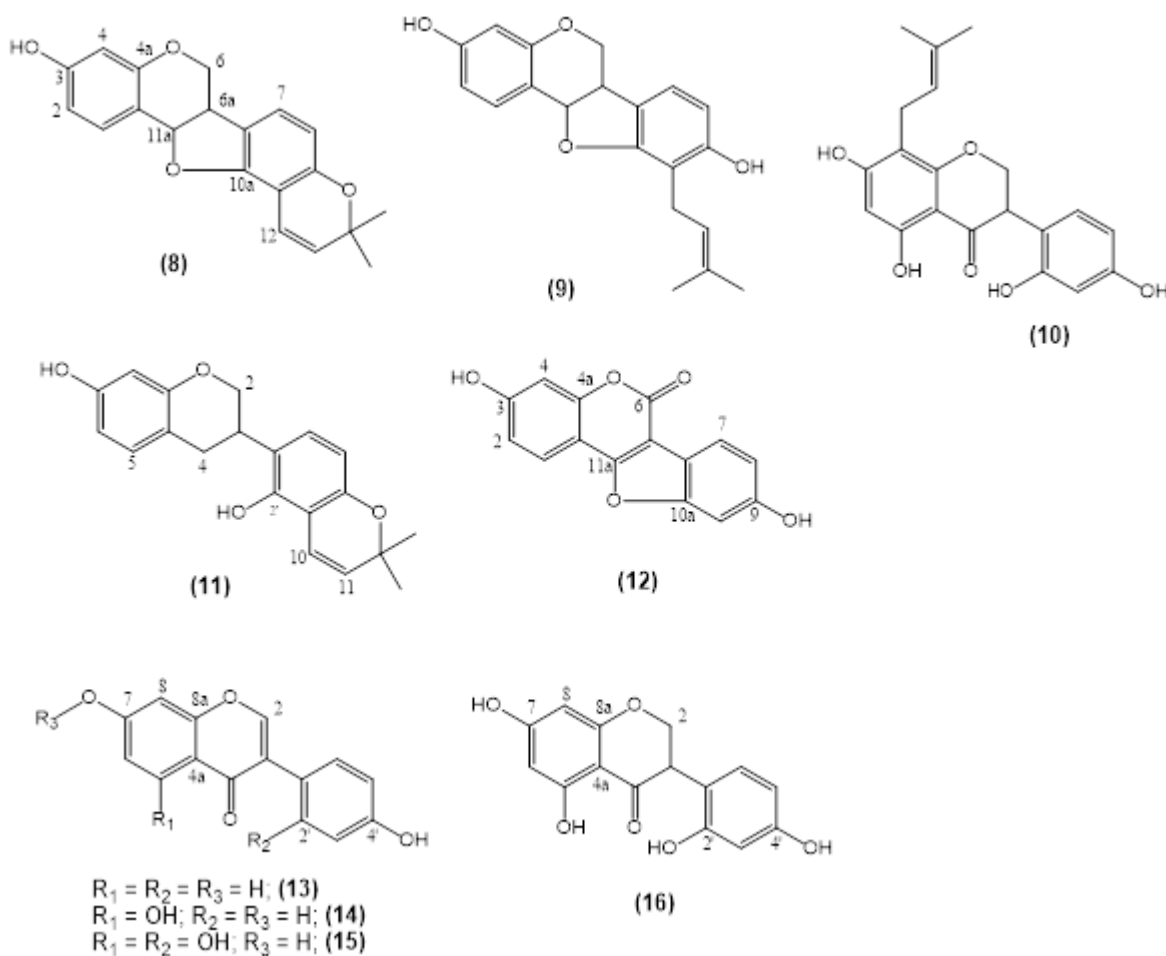


Figura 1-4. Fitoalexinas de frijol

Adicionalmente, en el caso de la aplicación exógena de jasmonatos se genera la acumulación de metabolitos secundarios y ácido jasmónico endógeno, permitiendo la resistencia a patógenos en gran variedad de cultivos. Por otro lado, el ácido salicílico,

participa activamente en el reconocimiento y activación de genes que codifican la producción de enzimas (proteínas relacionadas con la patogénesis ó PR) que atacan a los patógenos y activan la respuesta sistémica de la planta (Rangel-Sánchez et al., 2010). A pesar de la actividad elicitora del ácido salicílico estudios han mostrado efectos fitotóxicos en plántulas de frijol a altas concentraciones, por lo cual es necesario evaluar los efectos fitotóxicos de los derivados preparados del ácido 1-indanona-4-carboxílico (Pancheva et al., 1996).

Sin importar si son producidos por la planta o aplicados exógenamente, los elicitores activan los mecanismos de defensa. Por lo cual, se ha intentado imitar este comportamiento con elicitores sintéticos que se relacionen estructuralmente con los jasmonatos y los salicilatos (Littleson et al., 2018). En este mismo sentido, uno de los compuestos más promisorios es la coronatina (1.22), que ha mostrado mayor actividad como elicitor que referentes como el ácido jasmónico, el ácido salicílico y el etileno. La coronatina se ha aislado de medios de cultivo de *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea*

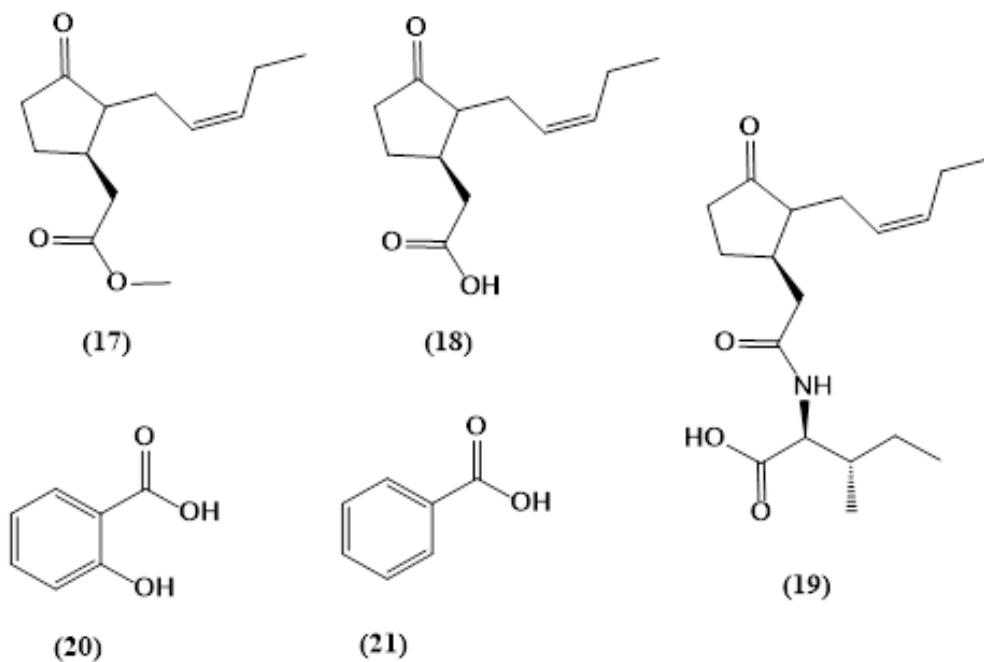


Figura 1-5. Señales químicas en plantas.

(Figura 1-6). Estructuralmente, la coronatina es un conjugado del ácido coronafácico y un aminoácido raro llamado ácido coronámico. Varios patovares de *Pseudomonas syringae*

(pv. *maculicola*, pv. *morsprunorum*, pv. *glycinea*, y pv. *tomato*) y *Xanthomonas campentris* pv. *phormiicola* también producen coronatina junto con análogos que poseen diferentes aminoácidos (ácido norcoronámico, L-isoleucina, L-alloisoleucina, y L-valina) (Littleson et al., 2018). Recientemente, hay un gran interés en la coronatina, la cual exhibe varias actividades biológicas similares a las presentadas por el ácido jasmónico o incluso superiores, en algunos sistemas evaluados. Mientras que el ácido coronafácico presenta una actividad igual o ligeramente inferior (Koda et al., 1996). Por ejemplo, la coronatina posee una actividad entre 100 a 10.000 veces mayor que el ácido jasmónico (Koda et al., 1996). Se ha sugerido que la similitud estructural entre el ácido jasmónico, la coronatina y el ácido coronafácico, particularmente alrededor del anillo ciclopentanona, es responsable por las semejanzas en la actividad biológica (Littleson et al., 2018).

Aunque la coronatina es un potente elicitador, las propuestas sintéticas para su obtención son difíciles y poco prácticas a gran escala (Mithöfer et al., 2004). Desafortunadamente, ni la fermentación de *Pseudomonas* ni las rutas sintéticas han representado aproximaciones prácticas satisfactorias para la obtención en grandes cantidades de coronatina. Por lo anterior, actualmente se buscan simplificaciones que permitan la producción de un relativo buen elicitador relacionado estructuralmente con la coronatina, pero de síntesis fácil.

Recientemente, se ha sintetizado un “imitador” de la coronatina; un conjugado 6-etil indanoil isoleucina (coronalona, **1.23**) (Schuler et al., 2001). Este compuesto, que posee mayores facilidades sintéticas que la coronatina y consecuentemente mejores perspectivas de aplicación en campo, ha demostrado poseer una elevada actividad biológica (aunque inferior a la del ácido jasmónico y la coronatina) estimulando el metabolismo secundario de las plantas (Schüler et al., 2004). Desafortunadamente, la coronalona posee diferencias conformacionales notables con respecto a la coronatina, lo que reduce en gran medida su actividad. De esta manera, queda establecido que es posible a partir del conocimiento de la bioquímica de la interacción planta-patógeno desarrollar sustancias con aplicación agronómica potencial, que permitan reducir el uso de fungicidas sintéticos deletéreos.

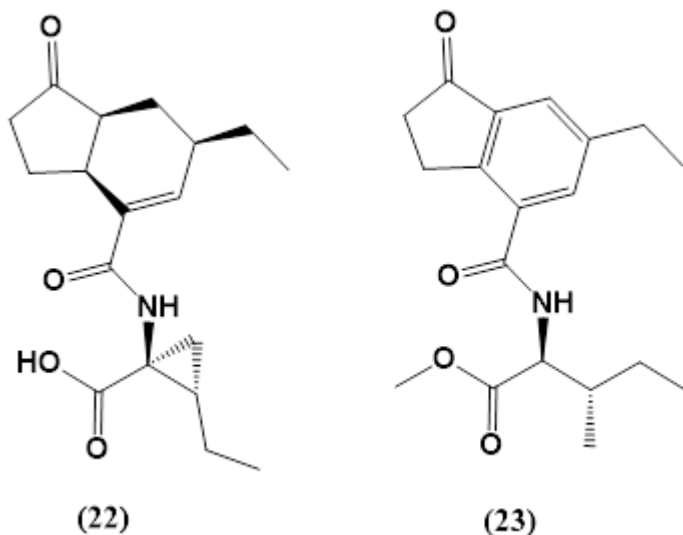


Figura 1-6. Elicitores con mayor potencial.

El empleo de elicitores es una excelente alternativa para el control racional de patógenos, puesto que actuarían de manera similar a una vacuna en mamíferos: induciendo altas concentraciones de sustancias de defensa (fitoalexinas), de tal manera que cuando el microorganismo se presenta, la planta ya tiene niveles elevados de estas defensas químicas. Una vez desaparece el riesgo de infección y termina la aplicación del elicitor, la planta restaura su bioquímica normal y los niveles de fitoalexinas descienden o desaparecen. Este último hecho es muy importante puesto que evita la presencia de fitoalexinas que pueden ser riesgosas para la salud humana (estrogenizantes) o que pueden cambiar las propiedades organolépticas de los vegetales. Se ha comprobado *in vitro* e *in vivo* que varias sustancias protegen cultivos por un mecanismo de acción que no es del tipo biocida sino que involucra la inducción de fitoalexinas, como es el caso del Acylbenzolar (Fahri, 2011; Buonauro et al., 2002). Estas sustancias actúan de manera análoga a los elicitores y se categorizan dentro de los llamados protectantes; son importantes porque tienen un potencial ecotoxicológico que es muy bajo o nulo.

Teniendo en cuenta lo anterior, mediante este trabajo se prepararon derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico por permutación de sustituyentes en la posición 4, modificaciones en el grupo carbonilo (C1), el carbono alfa al grupo carbonilo (C2) y en la posición 6, con el fin de evaluar su actividad elicitora en plántulas de frijol de dos variedades colombianas de gran importancia alimentaria y económica. Estos estudios permitirán obtener información preliminar sobre las relaciones estructura-actividad, evaluando las principales

variables en el proceso de elicitación como la concentración del elicitor, el tejido expuesto y el tiempo post-inducción, permitiendo incrementar los niveles de conocimiento de la activación de los mecanismos de defensa naturales para el diseño de sustancias no biocidas en el control de enfermedades del cultivo, como la antracnosis. De la misma manera permitirá aportar información sobre el comportamiento fitopatológico de dos variedades colombianas de frijol, teniendo en cuenta la acumulación de fitoalexinas. Adicionalmente se evaluó la fitotoxicidad del elicitor más promisorio sobre las plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado, observando su efecto sobre la producción de clorofilas, longitud y número de raíces secundarias, longitud del tallo, germinación de las semillas y dureza del cotiledón.

2. Materiales y métodos

2.1. Métodos generales.

Para el proceso de separación y purificación se empleó cromatografía de columna con sílica gel 60 (0.040-0.063 mm, Merk) y/o Sephadex LH20. Además, el seguimiento de los derivados de síntesis se realizó por medio de cromatografía de capa fina (TLC) en cromatoplasmas de aluminio con fase estacionaria de sílica gel (Si 60 F₂₅₄, 0,25 mm, Merck), empleando mezclas diferentes de *n*-hexano (*n*-hex)/Acetato de etilo (AcOEt) como fase móvil. Adicionalmente, la visualización de los derivados en las placas, en las etapas de síntesis y purificación, se realizó con radiación UV (254 nm y 365 nm) (UVP UVGL-58) y por aspersion con ácido acético (AcOH)-ácido sulfúrico-agua (143:28:30, v/v), seguido de calentamiento.

Por otro lado, la elucidación estructural de los productos de síntesis se realizó empleando métodos espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear mono (¹H-RMN, ¹³C-RMN) y bidimensional (COSY, HMQC y HMBC) en un espectrómetro Bruker AMX 300. Adicionalmente se utilizó cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en un equipo HP1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) acoplado a un detector selectivo de masas HP1100 equipado con una cámara de espectrometría de masas con ionización a presión atmosférica (API-ES), usando modo positivo. Las condiciones del detector de masas se programaron como se describe a continuación: voltaje capilar, 3 kV; presión de nebulización, 60 psi; temperatura del gas secante, 350°C, flujo de gas de secado, 12 L/min. Los espectros UV se tomaron en un equipo UV/VIS Spectrometer Perkin Elmer Lambda 35, y los espectros infrarrojo (IR) en un espectrofotómetro Shimadzu Tracer – 100.

2.2. Síntesis de los derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico

2.2.1. Ácido 2-Carboxi-hidrocinámico (2.1)

El ácido 2-carboxicinámico (Alfa Aesar) se disolvió en ácido acético y se adicionó 10% con respecto a la masa inicial del reactivo de Pd/C (Sigma-Aldrich) como catalizador. La solución resultante se sometió a una atmósfera de hidrógeno durante 24 horas (**Figura 2-1**). Pasado este tiempo se realizó *work up* con agua. Luego el Pd/C se removió por

filtración. El producto se recuperó por cristalización utilizando hielo. Además, se realizó extracción con diclorometano (DCM). La fase orgánica resultante se secó con sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro y el solvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvo como producto de reacción un sólido cristalino blanco con un rendimiento del 99%. Rf 0.46 [*n*-hexano (*n*-hex):AcOEt, 7:3].

Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3200, 3008, 1704, 1691, 1217. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 2.63 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H2'), 3.23 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H1'), 7.23-7.29 (2H, m, H4, H6), 7.39 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H5), 7.90 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H3). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): 29.7 (C1'), 35.6 (C2'), 126.3 (C4), 129.8 (C2), 130.9 (C5), 131.1 (C6), 132.1 (C3), 142.4 (C1), 174.2 (-COOH), 175.8 (C3', -COOH).

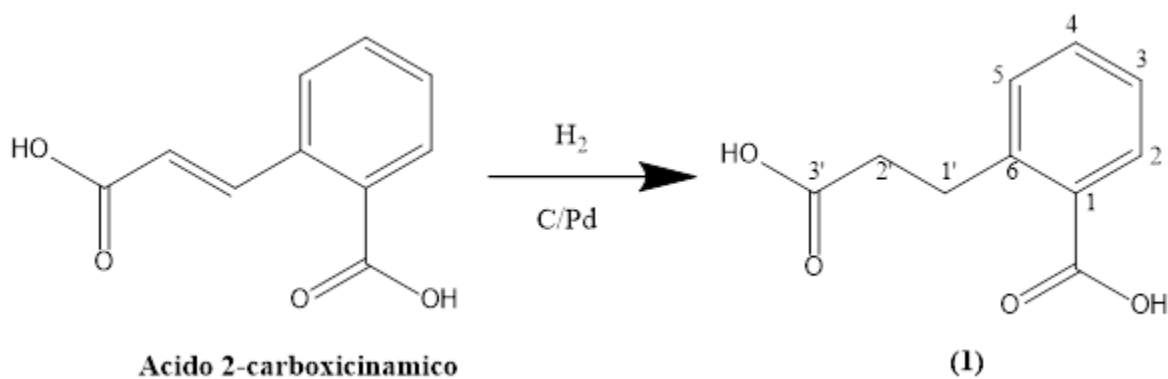


Figura 2-1. Obtención del compuesto 2.1

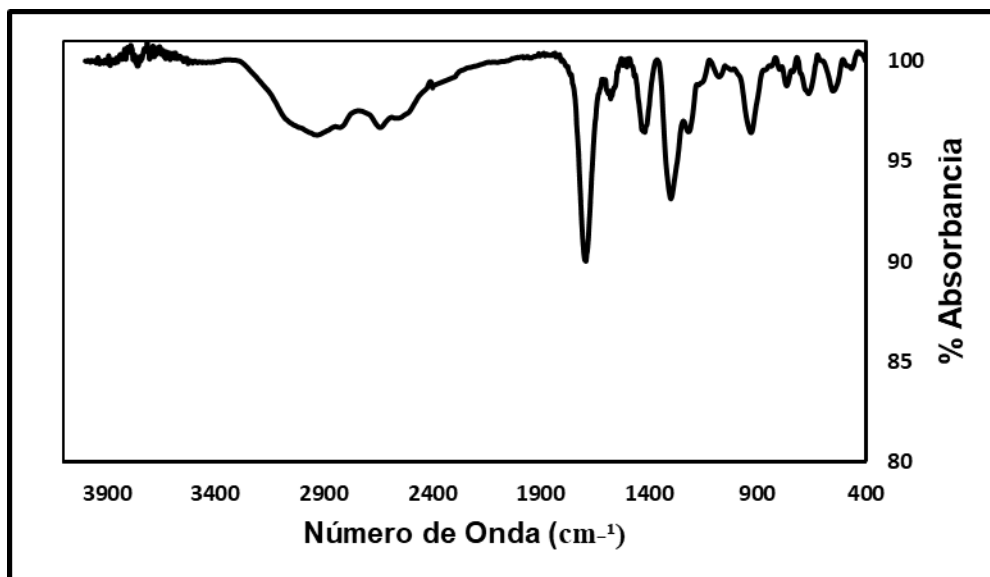


Figura 2-2. Espectro IR del compuesto 2.1

2.2.2. Ácido 1-indanona-4-carboxílico (2.2)

La síntesis del ácido 1-indanona-4-carboxílico se realizó de acuerdo con el método propuesto por Huang et.al., 2012 con algunas modificaciones. El compuesto **2.1** se calentó en una plancha de calentamiento en un recipiente de vidrio plano; a continuación, se agregaron 2.5 equivalentes molares de cloruro de sodio (NaCl), y la mezcla se dejó en calentamiento durante 40 minutos a una temperatura de 250°C. Luego, se agregó 1 equivalente molar de tricloruro de aluminio (AlCl₃) anhidro, y se continuó el calentamiento durante 30 minutos; este proceso se repitió 2 veces más. Posteriormente, se dejó enfriar la mezcla resultante y se efectuó el *work up* con agua-hielo. Además, se agregaron 20 mL de una solución de HCl al 10 % v/v. La mezcla resultante se extrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ anhidro y el solvente se eliminó a presión reducida. La purificación del compuesto se realizó por cristalización con acetona y metanol. El compuesto de interés se obtuvo como un sólido amorfo amarillo pálido con un rendimiento del 65% y un R_f 0.55 (*n*-hex: AcOEt, 1:1). El compuesto reveló con una tonalidad amarilla pálida en TLC haciendo uso del revelador universal, posterior a un leve calentamiento.

Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3150, 1714. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): 2.68 (2H, ddd, *J* = 8.1 Hz, 6.0 Hz, 3.6 Hz, H2), 3.56 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H3), 7.48 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H6), 7.91 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H7), 8.31 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H5). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 27.1 (C3), 35.9 (C2), 127.4 (C6), 127.5 (C7), 128.7 (C7a), 136.9 (C5), 137.9 (C4), 157.3 (C3a), 166.3 (-COOH), 208.1 (C1).

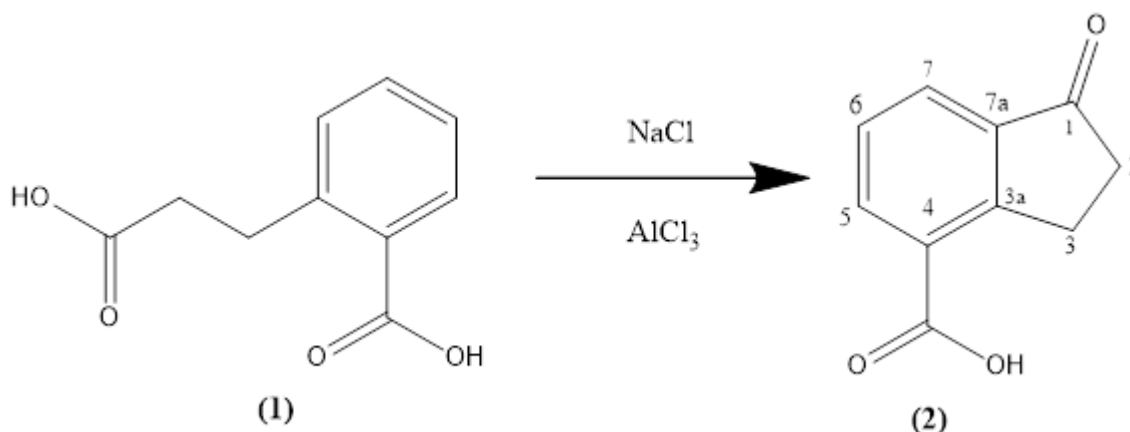


Figura 2-3. Obtención del compuesto 2.2

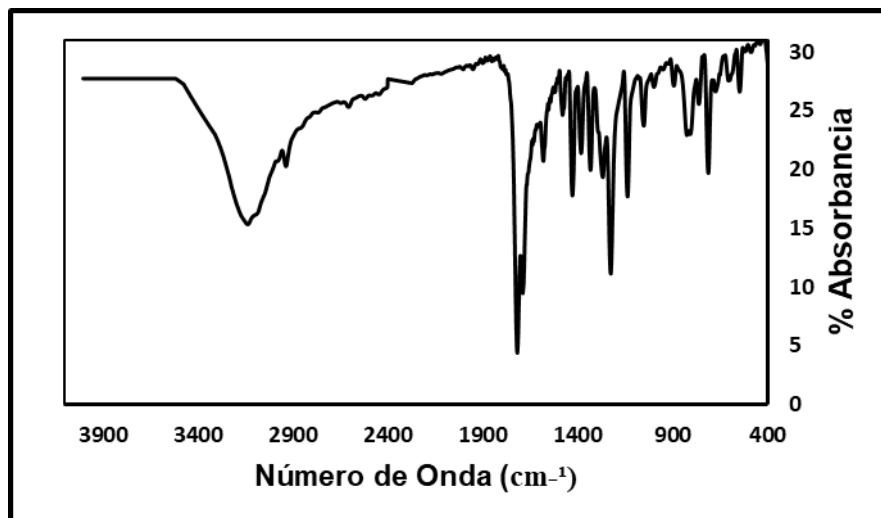


Figura 2-4. Espectro IR del compuesto 2.2

2.2.3. Acoplamiento de aminoácidos (conjugados indanoil-aminoácido; 2.3-2.6)

El compuesto **2.2** se disolvió en diclorometano; se adicionaron 1.5 equivalentes molares de 1- hidroxibenzotriazol (Sigma-Aldrich) y 1 equivalente molar de N, N-Dimetilformamida (Mallinckrodt Bayer) como catalizadores, y 1 equivalente molar de los metil ésteres de los aminoácidos (L-isoleucina (Sigma-Aldrich), L-leucina (Sigma-Aldrich), L-valina (Alfa Aesar), L-glicina (Alfa Aesar)). Posteriormente, la solución se enfrió a 0°C, y se agregó el agente acoplante N,N'- dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (Sigma-Aldrich). La mezcla permaneció en agitación durante 2 horas. Luego, la solución se dejó a temperatura ambiente por dos horas más, y el precipitado se filtró. La solución resultante se neutralizó con una solución acuosa de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), y se realizó la extracción con AcOEt. El solvente se removió a presión reducida en un rotoevaporador. El producto resultante se sometió a purificación mediante cromatografía en columna usando SiO₂ (fase móvil: mezclas de *n*-hex:AcOEt) y/o Sephadex LH-20 por exclusión molecular (fase móvil: mezcla *n*-hex:DCM:MeOH, 2:1:1, v/v). Los rendimientos de reacción variaron de acuerdo con el aminoácido utilizado. Todos los acoplamientos de los aminoácidos revelaron con tonalidad amarilla pálida en TLC haciendo uso de revelador universal, posterior a un leve calentamiento.

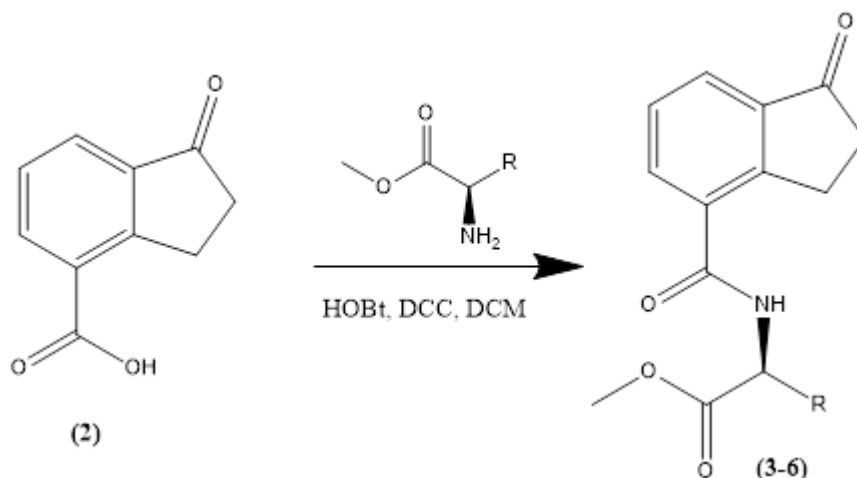


Figura 2-5. Obtención de conjugados indanoil-aminoácido.

2.2.3.1. 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3)

Rendimiento: 55 %. $T_f = 110\text{ }^\circ\text{C}$. Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3500-3180, 1716. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 0.93-1.05 (6H, m, H5', H6'), 1.28-1.36 (1H, m, H4'), 1.52-1.59 (1H, m, H4'), 2.07 (1H, m, H3'), 2.75-2.78 (2H, m, H2), 3.43-3.48 (2H, m, H3), 3.83 (3H, s, -OCH₃), 4.87 (1H, m, H2'), 6.65 (NH), 7.51 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H6), 7.92 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H5 y H7). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): 11.7 (C5'), 15.6 (C6'), 25.4 (C4'), 26.1 (C3), 36.2 (C2), 38.23 (C3'), 52.4 (-OCH₃), 56.8 (C2'), 126.5 (C7), 127.8 (C6), 132.7 (C5), 133.0 (C4), 138.3 (C7a), 154.1 (C3a), 166.7 (-CONH-), 172.5 (-COO-, C1'), 206.5 (C1).

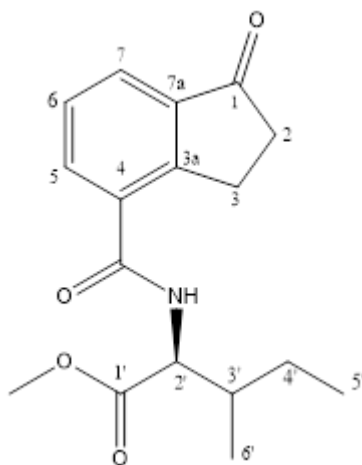


Figura 2-6. Estructura del compuesto 2.3

2.2.3.2. 1-oxo-indanoil-L-Leucina metil éster (2.4)

Rendimiento: 52 %. $T_f = 110$ °C. Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3500-3180, 1716. ¹H RMN (MeOD-d₄, 300 MHz): 0.98 (6H, d, $J = 5.1$ Hz, H5', H6'), 1.60-1.90 (3H, m, H3', H4'), 2.71 (2H, ddd, $J = 7.5$ Hz, 5.4 Hz, 3.6 Hz, H2), 3.37 (2H, t, $J = 5.4$ Hz, H3), 3.77 (3H, s, -OCH₃), 4.73 (1H, t, $J = 5.1$ Hz, H2'), 7.45 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H6), 7.82 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H7), 7.89 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H5). ¹³C RMN (MeOD-d₄, 75 MHz): 21.1 (C5'), 22.5 (C6'), 25.0 (C4'), 25.6 (C3'), 36.0 (C2), 40.1 (C3), 51.2 (C2'), 52.0 (-OCH₃), 125.9 (C7), 127.5 (C6), 133.2 (C5), 133.3 (C4), 137.6 (C7a), 154.6 (C3a), 168.4 (-CONH), 173.6 (-COO-, C1'), 208.0 (C1).

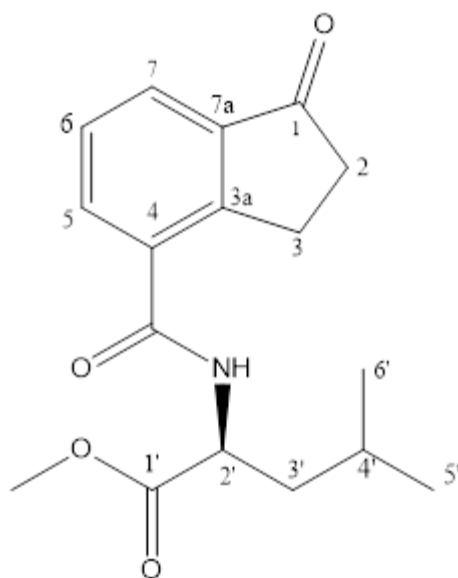


Figura 2-7. Estructura del compuesto 2.4

2.2.3.3. 1-oxo-indanoil-L-Valina metil éster (2.5)

Rendimiento: 32 %. $T_f = 115$ °C. Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3500-3180, 1716. ¹H RMN (MeOD-d₄, 300 MHz): 1.05 (6H, m, H4', H5'), 2.27 (1H, m, H3'), 2.72 (2H, m, $J = 3.6$ Hz, 1.8 Hz, H2), 3.32 (2H, d, $J = 2.7$ Hz, H3), 3.36 (1H, t, $J = 3.3$ Hz, H2'), 3.78 (3H, s, -OCH₃), 7.53 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H6), 7.82 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H7), 7.91 (1H, dd, $J = 0.9$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H5). ¹³C RMN (MeOD-d₄, 75 MHz): 17.5 (C4'), 18.2 (C5'), 25.3 (C2), 30.3 (C3'), 35.6 (C3), 51.2 (-OCH₃), 58.5 (C2'), 125.9 (C7), 127.5 (C6), 133.2 (C5), 133.7 (C4), 137.5 (C7a), 154.1 (C3a), 169.0 (-CONH-), 172.1 (-COO-), 207.5 (C1).

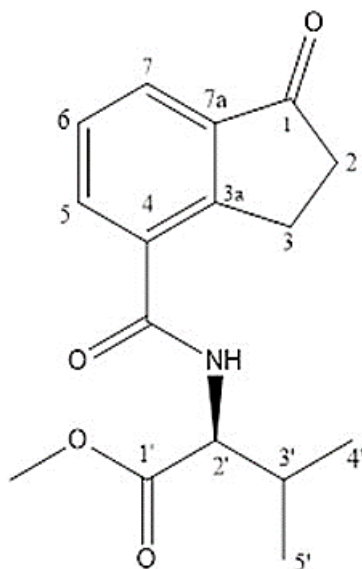


Figura 2-8. Estructura del compuesto 2.5

2.2.3.4. 1-oxo-indanoil-L-Glicina metil éster (2.6)

Rendimiento: 19 %. $T_f = 105$ °C. Señales características: IR $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$: 3500-3180, 1716. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 2.73 (2H, m, H2), 3.45 (2H, t, $J = 5.7$ Hz, H3), 3.84 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.3 (2H, d, $J = 5.1$ Hz, H2'), 6.79 (NH), 7.48 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H6), 7.89 (2H, d, $J_1 = 3.6$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, H7 y H5). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): 26.1 (C3), 36.2 (C2), 41.6 (C2'), 52.65 ($-\text{OCH}_3$), 126.6 (C7), 127.7 (C6), 132.5 (C5), 132.7 (C4), 138.3 (C7a), 154.4 (C3a), 167.1 ($-\text{CONH}$), 170.4 ($-\text{COO}-$), 206.5 (C1).

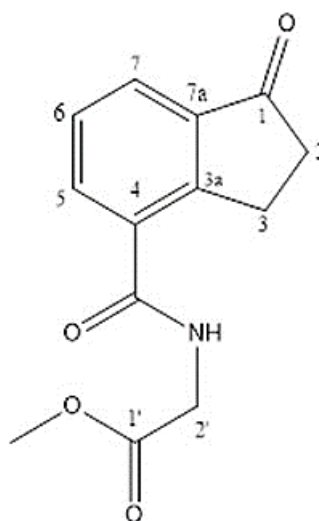


Figura 2-9. Estructura del compuesto 2.6

2.2.4. 1-oxo-indano-4-carboxilato de 3-hidroxi-propilo (2.7).

El compuesto **2.2** se disolvió en acetona y se adicionó carbonato de potasio (K_2CO_3). Pasadas 2 horas, se adicionó 1.5 equivalentes molares de 3-bromo-1-propanol (Sigma-Aldrich). La reacción se realizó en reflujo a 60 °C y con agitación constante. Una vez consumido la mayor parte del reactivo (**2.2**), se realizó *work up* con una solución acuosa de HCl 10%, y se hizo extracción con AcOEt. El solvente se eliminó por rotaevaporación y el sólido amorfo resultante se sometió a purificación por cromatografía en columna usando SiO_2 (fase móvil: mezclas de *n*-hex:AcOEt) y/o Sephadex LH-20 (fase móvil: mezcla *n*-hex:DCM:MeOH, 2:1:1, v/v). El producto resultante reveló con tonalidad amarilla en TLC haciendo uso de revelador universal, posterior a un leve calentamiento.

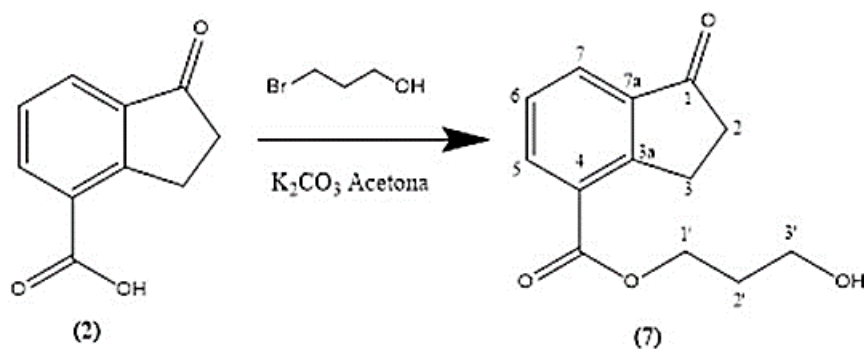


Figura 2-10. Obtención del compuesto **2.7**

Rendimiento: 53 %. $T_f = 150$ °C. Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3500, 1683. 1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): 2.07 (2H, t, $J = 5.7$ Hz, H2'), 2.32 (-OH), 2.74 (2H, m, H2), 3.5 (2H, t, $J = 5.7$ Hz, H3), 3.84 (2H, t, $J = 5.7$ Hz, H3'), 4.55 (2H, t, $J = 5.7$ Hz, H1'), 7.5 (1H, m, H6), 7.97 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H7), 8.31 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H5). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): 27.3 (C3), 31.8 (C2'), 36.1 (C2), 59.1 (C3'), 62.1 (C1'), 127.6 (C6), 128.2 (C4), 128.2 (C7), 136.4 (C5), 138.3 (C7a), 156.7 (C3a), 166.1 (-COO-), 206.7 (C1).

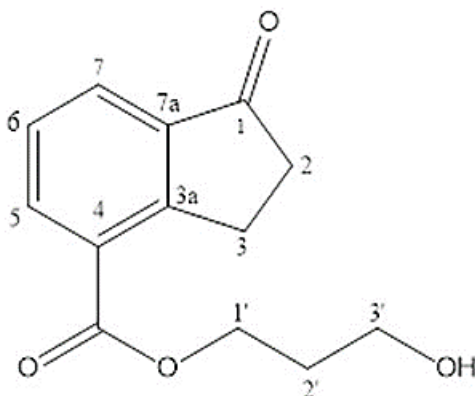


Figura 2-11. Estructura del compuesto **2.7**.

2.2.5. 1-hidroxi-indanol-L-isoleucina metil éster. Reducción del grupo carbonilo (2.8)

El compuesto **2.3** se disolvió en una mezcla de metanol y diclorometano seco, 2:3, v/v. Posteriormente se agregaron 1.5 equivalentes de NaBH_4 , y la mezcla se mantuvo en agitación durante 2 horas. Pasado este tiempo se realizó *work up* con agua acidulada, y se efectuó una extracción con DCM. El solvente se removió a presión reducida en un rotoevaporador. El producto de reducción se obtuvo como un sólido blanco. Los productos resultantes se sometieron a purificación mediante cromatografía en columna usando SiO_2 (fase móvil: mezclas de *n*-hex:AcOEt) y/o Sephadex LH-20 por exclusión molecular (fase móvil: mezcla *n*-hex:DCM:MeOH, 2:1:1, v/v).

Rendimiento: 52 %. $T_f = 80$ °C. Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3313, 3278, 1716, 1633. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 1.0 (6H, m, H5', H6'), 1.25 (1H, m, H4'), 1.52 (1H, m, H4'), 2.03 (2H, m, H2), 2.51 (1H, m, $J = 4.8$ Hz, H3'), 2.69 (-OH), 3.03 (1H, m, H3), 3.26 (1H, m, H3), 3.80 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.82 (1H, m, $J = 4.8$ Hz, H2'), 5.23 (1H, s, H1), 6.59 (NH), 7.30 (1H, t, $J = 6$ Hz, H6), 7.55 (1H, m, $J = 7.5$ Hz, H7), 7.57 (1H, m, $J = 7.5$ Hz, H5). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): 11.6 (C5'), 15.6 (C6'), 25.3 (C4'), 29.9 (C3), 35.8 (C2), 38.2 (C3'), 52.3 ($-\text{OCH}_3$), 56.7 (C2'), 75.7 (C1), 127.14 (C7), 127.17 (C6), 131.5 (C5), 142.0 (C4), 146.8 (C7a), 168.0 ($-\text{COO}-$), 172 (C1').

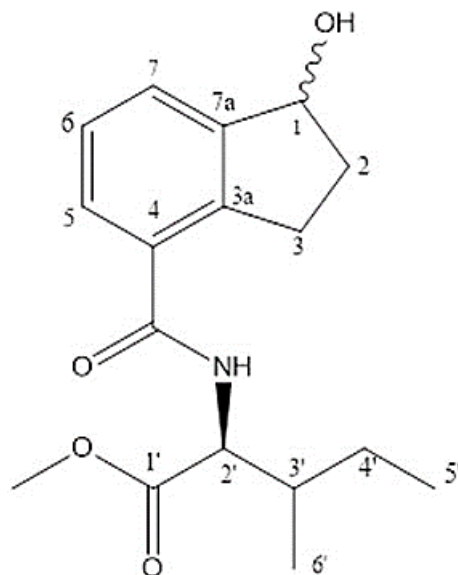


Figura 2-12. Estructura del compuesto **2.8**

2.2.6. Preparación de amidas (2.9-2.10) por sustitución nucleofílica.

El compuesto **2.2** se disolvió en diclorometano; se adicionaron 1.5 equivalentes molares del 1- hidroxibenzotriazol (HOBt) (Sigma-Aldrich) y 1.0 equivalente molar de N, N-Dimetilformamida como catalizadores, y 1.0 equivalente molar de la alquil amina [3-(dimetilamino)-1-propilamina (Sigma-Aldrich), 3-(dietilamino)-1-propilamina] (Sigma-Aldrich). Posteriormente, la solución se enfrió a 0°C, y se agregó el agente acoplante N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Sigma-Aldrich). Luego, la mezcla permaneció en agitación durante 2 horas. Seguidamente, la solución permaneció a temperatura ambiente por dos horas más, y el precipitado se filtró. La solución resultante se neutralizó con una solución acuosa de NaHCO₃, y se realizó extracción con AcOEt. El solvente se removió a presión reducida en un rotoevaporador, y se obtuvo un aceite de tonalidad granate. El producto resultante se sometió a purificación mediante cromatografía en columna usando SiO₂ (fase móvil: mezclas de *n*-hex:AcOEt) y/o Sephadex LH-20 por exclusión molecular (fase móvil: mezcla *n*-hex:DCM:MeOH, 2:1:1, v/v). Los rendimientos de la reacción variaron de acuerdo a la amina utilizada. Todos los acoplamientos de las aminas revelaron con tonalidad roja en TLC haciendo uso del revelador de Dragendorff, posterior a un leve calentamiento. Y revelaron con tonalidad amarilla usando revelador universal.

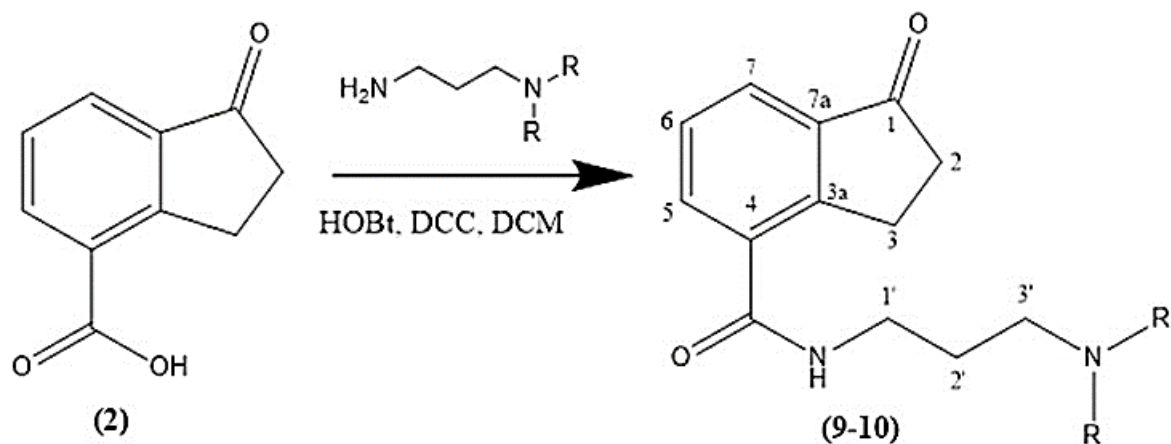


Figura 2-13. Obtención de amidas.

2.2.6.1. N-(3-(dimetilamino)propil)-1-oxo-indano-4-carboxamida (2.9)

Rendimiento: 22 %. $T_f = 218$ °C. Señales características: ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): 1.93 (2H, m, H2'), 2.42 (6H, s, H4', H5'), 2.67 (2H, m, H3'), 2.75 (2H, m, $J = 4.2$ Hz, H3), 3.52 (2H, t, $J = 6$ Hz, H2), 3.62 (2H, m, $J = 5.1$ Hz, H1'), 7.48 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H6), 7.88 (2H, t, $J = 8.1$ Hz, H5, H7), 8.39 (-NH). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 26.32 (C2), 34.0 (C2'), 36.3 (C3), 39.8 (C1'), 45.0 (C4', C5'), 58.6 (C3'), 126.1 (C7), 127.6 (C6), 132.4 (C5), 133.3 (C4), 138.3 (C7a), 154.7 (C3a), 167.0 (-CONH-), 207.0 (C1).

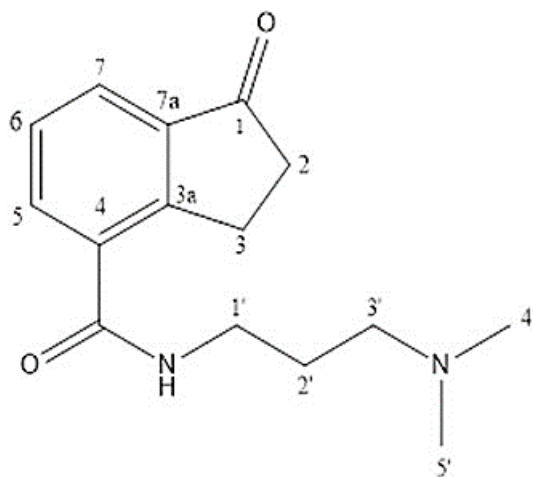


Figura 2-14. Estructura del compuesto 2.9

2.2.6.2. N-(3-(diethylamino)propil)-1-oxo-indano-4-carboxamida (2.10)

Rendimiento: 35 %. Señales características: ¹H RMN (MeOD-d₄, 300 MHz): 1.09 (6H, m, H5', H7'), 1.84 (2H, m, H2'), 2.62-2.66 (4H, m, H4', H6'), 2.69 (2H, m, H2), 3.32 (2H, t, $J =$

1.5 Hz, H3'), 3.37 (2H, s, H3), 3.44 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H1'), 7.52 (1H, s, H6), 7.86 (2H, t, $J = 9.3$ Hz, H5, H7). ^{13}C RMN (MeOD- d_4 , 75 MHz): 9.7 (C5', C7'), 25.2 (C2', C3'), 25.5 (C3), 37.9 (C1'), 46.32 (C4', C6'), 49.9 (C2), 125.3 (C7), 127.4 (C6), 132.7 (C5), 133.9 (C4), 137.7 (C7a), 154.3 (C3a), 168.6 (-CONH), 207.7 (C1).

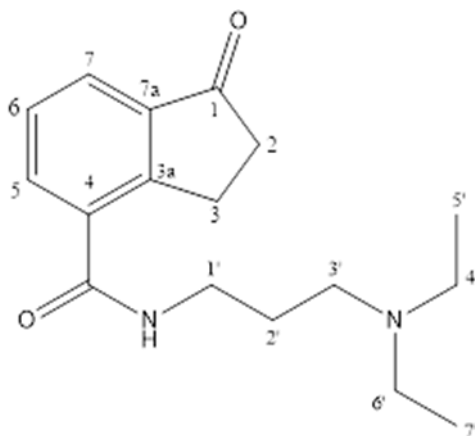


Figura 2-15. Estructura del compuesto **2.10**

2.2.7. 2-(3'-bromobencilideno)-1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.11)

El compuesto **2.3** se disolvió en unas gotas de piperidina. La mezcla anterior se agitó manualmente durante 1 minuto, luego de lo cual se agregó 1.5 equivalentes del aldehído aromático correspondiente (3-Bromobenzaldehído) (Acros Organics). La reacción se agitó manualmente de manera periódica a temperatura ambiente durante 12 h. El producto se obtuvo como un sólido insoluble; se recrystalizó con una mezcla *n*-hex-DCM-MeOH, 2:1:1, v/v y se filtró.

Rendimiento: 33 %. $T_f = 198$ °C (descomposición). Señales características: ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 1.05 (6H, t, H5', H6), 1.10 (1H, m, H4'), 1.98 (1H, m, H4'), 3.51 (1H, t, H3'), 3.89 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.36 (2H, s, H3), 4.92 (1H, m, H2'), 6.73 (1H, -NH), 7.41 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H7), 7.56 (1H, m, H2''), 7.61 (1H, m, H6''), 7.64 (1H, s, Ha), 7.71 (1H, d, H5''), 7.84 (1H, s, H5), 7.95 (1H, t, H4''), 8.07 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H6). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): 11.7 (C5'), 15.7 (C6'), 33.9 (C3), 35.6 (C4'), 49.2 (C3'), 53.0 ($-\text{OCH}_3$), 56.9 (C2'), 123.1 (C3''), 127.3 (C6), 128.2 (C6''), 128.9 (C5''), 130.5 (C7), 132.3 (C4), 132.5 (C4''), 132.7 (C2''), 133.1 (Ca), 133.8 (C5), 135.4 (C4), 137.2 (C1''), 148.9 (C7a), 156.8 (C3a), 166.6 (-CONH-), 172.5 ($-\text{COO}-$), 193.5 (C1).

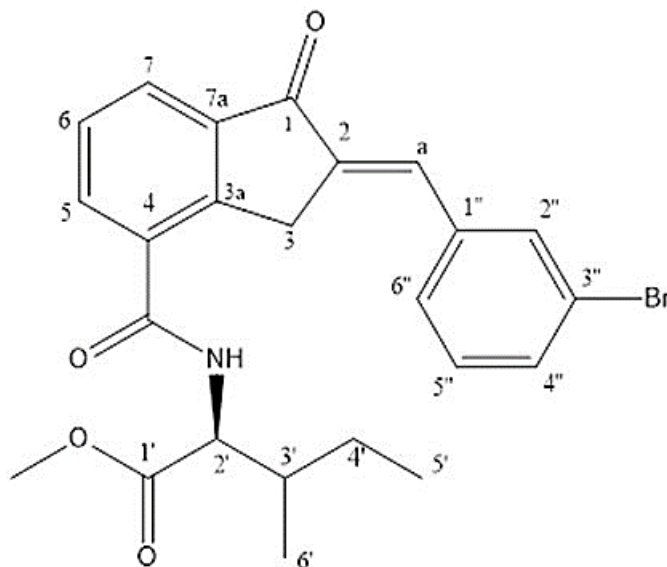


Figura 2-16. Estructura del compuesto 2.11

2.2.8. 1-bencilhidrazono-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.12)

El compuesto 2.3 se disolvió en etanol, y a la solución se agregó 1.5 equivalentes de bencilhidracina (Alfa Aesar). La reacción se mantuvo en agitación en reflujo durante 24 horas. El producto resultante se sometió a purificación mediante cromatografía en columna usando SiO_2 (fase móvil: mezclas de *n*-hex:AcOEt) y/o Sephadex LH-20 por exclusión molecular (fase móvil: mezcla *n*-hex:DCM:MeOH, 2:1:1, v/v).

Rendimiento: 37 %. $T_f = 65\text{ }^\circ\text{C}$. Señales características: ^1H RMN (MeOD- d_4 , 300 MHz): 1.05 (6H, m, H5', H6'), 1.31-1.39 (1H, m, H4'), 1.55-1.61 (1H, m, H4'), 2.00-2.05 (1H, m, H3'), 3.03-3.07 (2H, m, H2), 3.32 (2H, t, H3), 3.36 (2H, s, Ha), 3.78 (-OCH₃), 4.58 (1H, m, H2'), 7.43 (1H, m, H6), 7.48-7.56 (2H, m, H3'' y H5''), 7.60 (1H, m, H4''), 7.68 (1H, m, H5), 7.91 (2H, d, H2'' y H6''), 8.14 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H7). ^{13}C RMN (MeOD- d_4 , 75 MHz): 10.2 (C5'), 14.7 (C6'), 25.3 (C4'), 27.0 (C2), 28.1 (C3), 36.7 (C3'), 48.5 (Ca), 51.2 (-OCH₃), 57.4 (C2'), 124.8 (C7), 127.2 (C6), 127.5 (C3'' y C5''), 128.3 (C2'' y C6''), 129.7 (C5), 131.8 (C4''), 132.5 (C4), 133.1 (C3a), 138.6 (C7a), 147.9 (C1''), 164.7 (C1), 169.6 (-CONH-), 172.4 (-COO-).

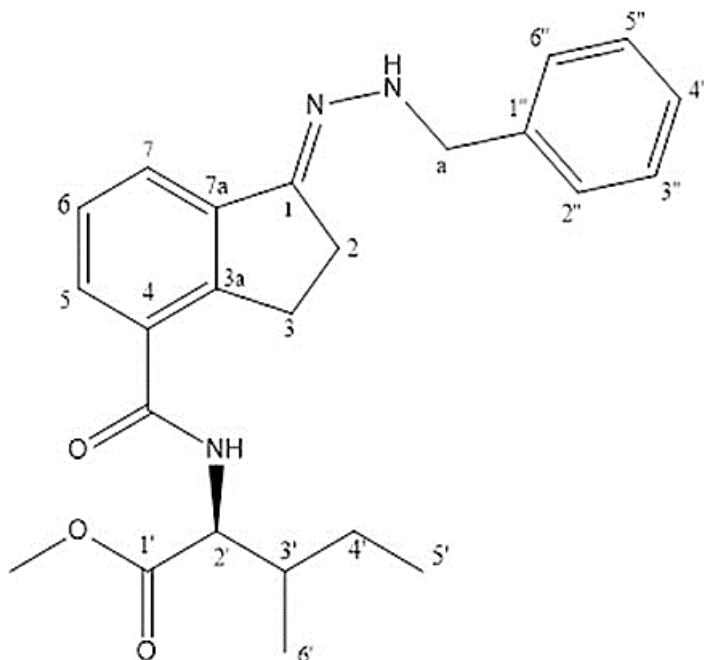


Figura 2-17. Estructura del compuesto **2.12**

2.2.9. Ácido 6-bromo-2-Carboxihidrocinámico (2.13)

El compuesto **2.1** se disolvió en ácido acético al 65%; luego se adicionó 1.0 equivalente de Br_2 . La solución resultante se dejó en agitación durante 7 días en ausencia de luz (**Figura 2-15**). Pasado este tiempo se agregó una solución de MeOH-NaOH 1.0 M-THF (**2:2:1, v/v**) y la mezcla resultante se dejó en agitación durante 24 h. Posteriormente, se agregó HCl 6 M y se agitó durante 6 h. A continuación, se realizó extracción con AcOEt. La fase orgánica resultante se secó con Na_2SO_4 anhidro y el solvente se eliminó a presión reducida. El producto resultante se sometió a purificación mediante cromatografía en columna usando SiO_2 (fase móvil: mezclas de *n*-hex:AcOEt) y/o Sephadex LH-20 por exclusión molecular (fase móvil: mezcla *n*-hex:DCM:MeOH, 2:1:1.5, v/v). Se obtuvo como producto de reacción un sólido amorfo amarillo con un rendimiento del 20 % y R_f 0.67 (*n*-hex:AcOEt, 7:3).

Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3200, 3008, 1704, 1691, 1217. ^1H RMN (MeOD- d_4 , 300 MHz): 2.63 (2H, m, $J = 7.5$ Hz, H_2'), 3.31 (2H, m, $J = 7.5$ Hz, H_1'), 7.26-7.29 (1H, m, H_5), 7.59-7.62 (1H, m, $J = 2.4$ Hz, H_4), 8.04 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H_2). ^{13}C RMN (MeOD- d_4 , 75 MHz): 28.9 (C_1'), 34.9 (C_2'), 119.4 (C_3), 131.9 (C_1), 132.1 (C_5), 133.3 (C_2), 134.5 (C_4), 140.1 (C_6), 167.7 (-COOH), 175.2 (C_3' , -COOH).

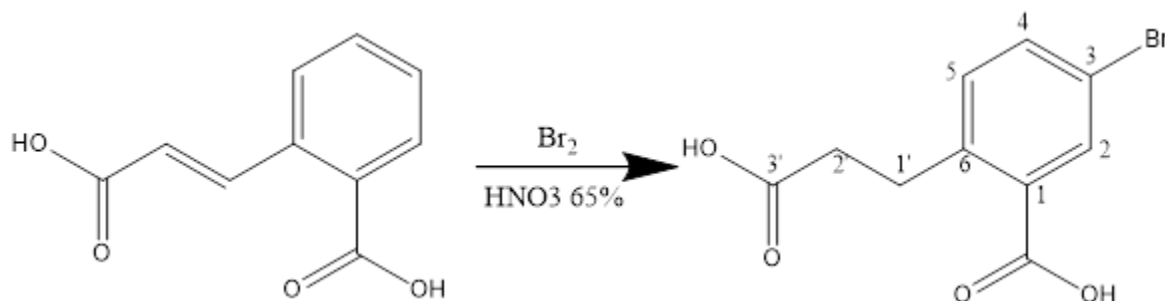


Figura 2-18. Obtención del compuesto **2.13**

2.2.10. 6-bromo-Ácido 1-oxo-indano-4-carboxílico (2.14)

El compuesto **2.13** se calentó en un recipiente de vidrio plano. A continuación, se agregaron 2.5 equivalentes molares de NaCl, y la mezcla se calentó durante 40 minutos a una temperatura de 250°C. Luego se agregó 1 equivalente molar de AlCl₃ anhidro, y se continuó el calentamiento durante 30 minutos; este proceso se repitió 2 veces más. Luego, se dejó enfriar la mezcla resultante y se efectuó el *work up* con agua-hielo. Posteriormente, se agregan 20 mL de una solución de HCl al 10 % v/v. La mezcla resultante se extrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ anhidro y el solvente se eliminó a presión reducida. El compuesto de interés se obtuvo como un sólido amorfo amarillo pálido con un rendimiento del 100 % y un R_f 0.60 (*n*-hex: AcOEt, 7:3). El compuesto reveló con una tonalidad amarilla pálida en TLC haciendo uso de revelador universal, posterior a un leve calentamiento.

Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3150, 1714. ¹H RMN (MeOD-d₄, 300 MHz): 2.72-2.76 (2H, m, H2), 3.43-3.47 (2H, m, H3), 8.01 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H7), 8.36 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H5)¹³C RMN (MeOD-d₄, 75 MHz): 26.6 (C3), 35.6 (C2), 120.8 (C6), 129.7 (C7), 138.5 (C5), 138.5 (C7a), 139.9 (C3a), 155.6 (C4), 205.8 (C1).

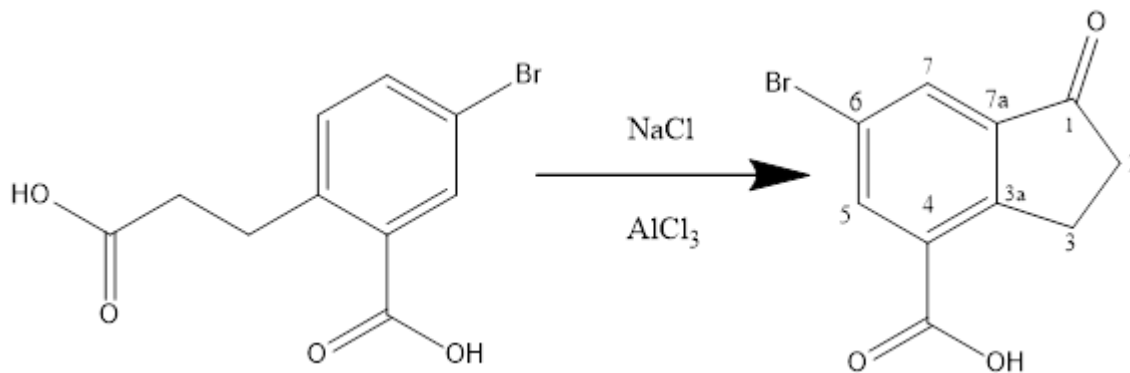


Figura 2-19. Obtención del compuesto **2.14**

2.2.11. 6-Bromo-1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.15).

El compuesto **2.14** se disolvió en diclorometano; se adicionó 1.5 equivalentes molares de 1- hidroxibenzotriazol (HOBt) (Sigma-Aldrich) y 1.0 equivalente molar de N,N-Dimetilformamida como catalizadores, y 1 equivalente molar de metil éster L-isoleucina (Sigma-Aldrich). Posteriormente, la solución se enfrió a 0°C, y se agregó el agente acoplante N,N'- dicianhexilcarbodiimida (DCC) (Sigma-Aldrich). La mezcla permaneció en agitación durante 2 horas. A continuación, la solución resultante se llevó a temperatura ambiente por dos horas más, y el precipitado se filtró. La solución resultante se neutralizó con una solución acuosa de NaHCO₃, y se realizó extracción con DCM. El solvente se removió a presión reducida en un rotoevaporador. El producto resultante se sometió a purificación mediante cromatografía en columna usando SiO₂ (fase móvil: mezclas de *n*-hex:AcOEt) y/o Sephadex LH-20 por exclusión molecular (fase móvil: mezcla *n*-hex:DCM:MeOH, 2:1:1, v/v). Se obtuvo un sólido fino de color blanco; éste reveló con tonalidad amarilla pálida en TLC haciendo uso de revelador universal, posterior a un leve calentamiento.

Rendimiento: 59 %. Señales características: IR $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3280, 1708. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): 0.93-1.05 (6H, m, H5', H6'), 1.26-1.36 (1H, m, H4'), 1.50-1.61 (1H, m, H4'), 2.04-2.12 (1H, m, H3'), 2.76-2.80 (2H, t, H2), 3.36-3.41 (2H, m, H3), 3.84 (3H, s, -OCH₃), 4.85-4.90 (1H, d, H2'), 6.65 (NH), 7.98 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H7), 8.02 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H5). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 11.7 (C5'), 15.6 (C6'), 25.4 (C4'), 25.8 (C3), 36.2 (C2), 38.2 (C3'), 52.5 (O-CH₃), 56.9 (C2'), 121.7 (C6), 129.3 (C5), 134.6 (C4), 135.5 (C7), 140.1 (C3a), 152.4 (C7a), 165.3 (-CONH-), 172.4 -(COO-), 204.81 (C1).

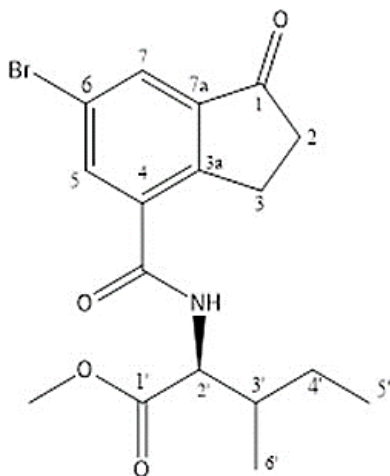


Figura 2-20. Estructura del compuesto **2.15**

2.3. Aislamiento, purificación e identificación de fitoalexinas

Para la purificación e identificación de las fitoalexinas se realizó inducción con una solución de CuCl_2 de plántulas de frijol obtenidas a partir de 2.5 kg de semillas de la variedad ICA Cerinza. Inicialmente las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos. A continuación, las semillas se germinaron en ausencia de luz y durante siete días en un lecho vermiculita (arenilla) previamente lavado y desinfectado con hipoclorito de sodio al 5%. Luego, las plántulas se sumergieron en una solución de CuCl_2 (un potente elicitor) a una concentración de 1000 mg/L durante 4 h. A continuación, las plántulas se dejaron incubar en bandejas plásticas previamente esterilizadas, durante 48 h y a temperatura ambiente. Plántulas tratadas con agua destilada en lugar de la solución de CuCl_2 se usaron como control negativo. Posteriormente, las plántulas se picaron y licuaron con etanol al 95%. El material resultante se filtró a través de papel filtro (Whatman No.1) y se centrifugó (3400 rpm durante 6 min). El sobrenadante se concentró al vacío hasta un cuarto de su volumen original en un evaporador rotatorio a presión reducida (a 40°C). El residuo resultante se fraccionó mediante extracción repetida con AcOEt (3x100 mL), y el extracto orgánico se evaporó a sequedad a presión reducida (Rotavapor Buchi R-210 con controlador de vacío V-850).

Del extracto en AcOEt se aislaron y purificaron las sustancias cuya concentración se incrementó dramáticamente como resultado de la inducción. Con el fin de eliminar ceras, clorofilas y grasas; en primer lugar, se realizó una cromatografía en columna sobre Sephadex LH-20 eluyendo con *n*-hex-DCM-MeOH (2:1:1, v/v); se descartaron las fracciones con los pigmentos verdes. Luego se eluyó con metanol puro. Esta fracción metanólica se concentró, y los componentes mayoritarios se purificaron por cromatografía de columna empleando sílica gel 60 y eluyendo con gradientes de polaridad creciente de *n*-hex-AcOEt hasta AcOEt; en algunos casos fue necesario utilizar cromatografía de capa fina preparativa (DCM:acetone, 4:1; éter etílico (Et_2O): *n*-hex, 3:1).

Los compuestos aislados se identificaron mediante métodos espectroscópicos modernos, tales como espectroscopia ultravioleta y de resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C mono- y bidimensional), y espectrometría de masas. Las fitoalexinas obtenidas se emplearon como estándares para el desarrollo del método de detección y cuantificación por cromatografía líquida. A continuación, se presentan los datos espectroscópicos de los compuestos aislados:

2.3.1. Genisteína

Señales características: FAB-MS de alta resolución en modo ion positivo: calculado para $C_{15}H_{10}O_5$ [M^+]: 270.05689 u.m.a. Encontrado: 270.05689 u.m.a. FAB-MS de baja resolución (ion positive FAB, 3-nitrobelcicalcohol, m/z), [$M+H$] $^+$: 271. UV λ_{max} (MeOH-AcOH 0.05%, nm): 211, 259. 1H RMN (MeOH- d_4 , 300 MHz): 6.23 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H6), 6.35 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H8), 6.84 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H3', H5'), 7.36 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H2', H6'), 8.06 (1H, s, H2). ^{13}C RMN (MeOH- d_4 , 75 MHz): 93.4 (C8), 98.7 (C6), 104.8 (C4a), 114.9 (C5', C3'), 121.9 (C1'), 123.3 (C3), 130.0 (C2', C6'), 153.4 (C2), 157.8 (C8a), 158.0 (C4'), 162.0 (C5), 164.0 (C7), 180.0 (C4).

2.3.2. Daidzeína

Señales características: FAB-MS de alta resolución en modo ion positivo: calculado para $C_{15}H_{10}O_4$ [M^+]: 254.05791 u.m.a. Encontrado: 254.06368 u.m.a. FAB-MS de baja resolución (ion positive FAB, 3-nitrobelcicalcohol, m/z), [$M+H$] $^+$: 255. UV λ_{max} (MeOH-AcOH 0.05%, nm): 211, 248, 301. 1H RMN (MeOH- d_4 , 300 MHz): 6.85-6.87 (3H, m, H8, H3', H5'), 6.94 (1H, dd, $J = 8.7$ Hz, 2.1 Hz, H6), 7.37 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H2', H6'), 8.05 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H5), 8.15 (1H, s, H2). ^{13}C RMN (MeOH- d_4 , 75 MHz): 101.8 (C8), 114.8 (C3', C5'), 115.1 (C6), 116.7 (C4a), 122.7 (C3), 123.9 (C1'), 130.0 (C2', C6'), 153.3 (C2), 157.3 (C7, 4'), 158.4 (C8a), 163.3 (C5), 178.6 (C4).

2.3.3. 2'-Hidroxigenisteína:

Señales características: UV λ_{max} (MeOH-AcOH 0.05%, nm): 204, 228 y 278. 1H RMN (MeOH- d_4 , 300 MHz): 6.25 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H6), 6.30-6.40 (3H, m, H8, H3', H5'), 7.05 (1H, d, $J = 7.8$, H6'), 8.03 (1H, s, H2). ^{13}C RMN (MeOH- d_4 , 75 MHz): 93.4 (C8), 98.8 (C6), 102.8 (C3'), 104.8 (C4a), 106.7 (C5'), 109.4 (C1'), 121.2 (C3), 131.8 (C6'), 155.3 (C2), 156.4 (C2'), 158.4 (C8a), 158.8 (C4'), 162.3 (C5), 164.6 (C7), 181.3 (C4).

2.3.4. Dalbergioidina

Señales características: FAB-MS de alta resolución en modo ion positivo: calculado para $C_{15}H_{12}O_6$ [M^+]: 288.06339 u.m.a. Encontrado: 288.05814 u.m.a. FAB-MS de baja resolución (ion positive FAB, 3-nitrobelcicalcohol, m/z), [$M+H$] $^+$: 289. UV λ_{max} (MeOH-AcOH 0.05%, nm): 265, 290, 344. 1H RMN (MeOH- d_4 , 300 MHz): 4.27 (1H, m, H3), 4.60-4.44 (1H, m, H2), 5.97 (2H, m, H6, H8), 6.35 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, 2.4 Hz, H5'), 6.45 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H3'), 6.95 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H6'). ^{13}C RMN (MeOH- d_4 , 75 MHz): 47.7 (C3), 71.5 (C2), 96.1

(C8), 97.3 (C6), 104.1 (C4a), 104.3 (C3'), 108.3 (C5'), 114.3 (C1'), 132.2 (C6'), 157.5 (C4'), 159.3 (C2'), 165.0 (C8a), 166.1 (C5), 167.5 (C7), 198.9 (C4).

2.3.5. Coumestrol

Señales características: FAB-MS de alta resolución en modo ion positivo: calculado para $C_{15}H_8O_5$ $[M^+]$: 268.03717 u.m.a. Encontrado: 268.03689 u.m.a. FAB-MS de baja resolución (ion positive FAB, 3-nitrobelcicalcohol, m/z), $[M+H]^+$: 269. UV λ_{max} (MeOH-AcOH 0.05%, nm): 244, 303, 343. 1H RMN (MeOH- d_4 , 300 MHz): 6.95 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H4), 7.0-7.1 (2H, m, H2, H8), 7.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H10), 7.78 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H7), 7.88 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H1). ^{13}C RMN (MeOH- d_4 , 75 MHz): 99.9 (C10), 103.7 (C6a), 104.6 (C4), 106.2 (C11b), 114.9 (C8), 115.2 (C2), 116.5 (C6b), 122.1 (C7), 123.8 (C1), 156.5 (C4a), 157.9 (C11a), 158.6 (C3), 161.9 (C9), 162.5 (C10a), 162.9 (C6).

2.3.6. Phaseollina

Señales características: FAB-MS de alta resolución en modo ion positivo: calculado para $C_{20}H_{19}O_4$ $[M+H]^+$: 323.13616 u.m.a. Encontrado: 323.13419 u.m.a. FAB-MS de baja resolución (ion positive FAB, 3-nitrobelcicalcohol, m/z), $[M+H]^+$: 323. UV λ_{max} (MeOH-AcOH 0.05%, nm): 240, 279, 287 (inflexión suave), 310. 1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): 1.37 y 1.40 (s, 2xMe), 3.36 (1H, m, H6a), 3.50 (1H, dd, $J = 11.1$ Hz, 10.8 Hz, H6ax) y 4.22 (1H, dd, $J = 10.8$ Hz, 4.8 Hz, H6ec), 5.49 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H11a), 5.62 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H13), 6.28 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H8), 6.32 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H4), 6.49 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H12), 6.53 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, 2.4 Hz, H2), 6.99 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H7), 7.32 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H1). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): 26.5 y 26.7 (2xMe), 39.6 (C6a), 66.2 (C6), 75.6 (C14), 79.1 (C11a), 102.7 (C4), 105.8 (C8), 108.1 (C2), 109.3 (C10), 111.3 (C12), 116.0 (C11b), 119.5 (C7), 123.7 (C6b), 129.3 (C1), 131.9 (C13), 153.7 (C4a), 156.7 (C9), 156.9 (C10a), 158.8 (C3).

2.3.7. Phaseollidina

Señales características: FAB-MS de alta resolución en modo ion positivo: calculado para $C_{20}H_{20}O_4$ $[M^+]$: 324.13616 u.m.a. FAB-MS de baja resolución (ion positive FAB, 3-nitrobelcicalcohol, m/z): 324. Encontrado: 324.14439 u.m.a. UV λ_{max} (MeOH-AcOH 0.05%, nm): 235, 282, 310. 1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): 1.85 y 1.80 (s, 2xMe), 3.42 (1H, m, H12), 3.59 (1H, m, H6a), 4.27 y 3.69 (1H, m, H6), 5.32 (1H, m, H13), 5.51 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H11a), 6.42 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H8), 6.47 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H4), 6.59 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, 2.5 Hz, H2), 7.02 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H7), 7.45 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H1). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75

MHz): 23.6 (Me), 26.2 (C12), 40.5 (C6a), 67.1 (C6), 78.6 (C11a), 104.1 (C4), 108.6 (C8), 110.1 (C2), 110.8 (C10), 113.4 (C13), 119.1 (C11b), 121.8 (C7), 122.7 (C6b), 132.8 (C1), 135.4 (C14), 156.3 (C4a), 157.0 (C9), 157.1 (C10a), 157.4 (C3).

2.3.8. Phaseollinisoflavano

Señales características: FAB-MS de alta resolución en modo ion positivo: calculado para $C_{20}H_{20}O_4$ $[M^+]$: 324.13616 u.m.a. Encontrado: 324.13155 u.m. FAB-MS de baja resolución (ion positivo FAB, 3-nitrobelcicalcohol, m/z): 324. UV λ_{max} (MeOH-AcOH 0.05%, nm): 246, 278, 342. 1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): 1.35 (s, 2xMe), 2.7-2.9 (2H, m, H4eq y ax), 3.3 (1H, m, H3), 3.91 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, 10.0 Hz, H2ax), 4.23 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, 4.0 Hz, H2eq), 5.59 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H13), 6.3-6.4 (3H, m, H5', 6, 8), 6.51 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H12), 6.83 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H6'), 6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H5). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): 28.1 (2xMe), 31.1 (C3), 32.4 (C4), 70.5 (C2), 76.1 (C12), 103.7 (C8), 108.6 (C5'), 109.9 (C3', 6), 115.0 (C11), 116.2 (C1'), 120.0 (C10), 127.3 (C12), 130.9 (C6', C5), 149.4 (C2', C9), 152.9 (C4'), 155.4 (C7).

La kievitona no pudo ser purificada, pero fue detectada e identificada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de baja resolución y detector de arreglo de diodos. Señales características: UV λ_{max} (MeOH-AcOH 0.05%, nm): 255, 280, y 334 nm. El espectro de masas (ESI-MS ionización por electrospray, mostró el ion $[M + H]^+$, el cual presentó una masa de 357 uma.

2.4. Proceso de elicitación y preparación de muestras para análisis.

Todas las semillas de frijol empleadas en este trabajo son certificadas y/o seleccionadas. La variedad seleccionada ICA Cerinza se obtuvo del distribuidor Semicol S.A.S. (Santa Fe de Bogotá) y la variedad Uribe Rosado proviene de Semillas & Semillas Ltda. (Medellín). Se utilizaron plántulas de frijol de ambas variedades, con un crecimiento de 4 a 5 días (entre 4 y 6 cm de altura) en vermiculita (arenilla). Las plántulas se trataron con soluciones de los elicitores con concentraciones entre 0.044 mM y 4,44 mM, mediante aspersion o inmersión de las plántulas durante 3 horas. Luego, las plántulas fueron retiradas de la arenilla y puestas en vasos plásticos de 13 onzas con una pequeña capa de algodón humedecido con agua, que garantice las necesidades de agua de las plántulas. Estas permanecieron bajo condiciones ambientales durante un tiempo mínimo de 24 horas y máximo de 96 h, en ausencia de luz solar. El proceso de elicitación se realizó sobre el tallo-raíz, y los cotiledones fueron descartados. Posteriormente se procedió con la extracción

del material; los tejidos se maceraron manualmente en presencia de etanol (20 mL) y las soluciones resultantes se filtraron a través de papel. El etanol se eliminó rotoevaporando a presión reducida. En los experimentos en el curso del tiempo, efecto de la concentración, se emplearon plántulas tratadas con agua e incubadas por 96 h como control y 72 h en el caso del efecto de la estructura del elicitor. A continuación, se realizó a la fracción acuosa un proceso de extracción líquido-líquido con AcOEt (20 mL, 3 veces). La solución obtenida se secó con Na_2SO_4 anhidro y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió con metanol grado HPLC (5.0 mL); las muestras resultantes fueron almacenadas a 4°C, hasta que se realizaron los análisis de la producción de fitoalexinas (Durango, 2013).

2.5. Análisis contenido de fitoalexinas.

Se empleó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en un equipo Shimadzu, Prominence 20A con Software LabSolutions Lite versión 5.71 SP2 y usando una columna RP - C18 Luna (150 mm x 4,6 mm – 5 μm) Phenomenex Technologies. Como fase móvil se empleó agua acidulada (0.05 % con AcOH) (A) y metanol (B); la evolución del gradiente fue: de 10 hasta 70% de B en 40 min, luego de 70 hasta 90% de B en 20 min, seguido por 100% de B en 3 min. Luego, la concentración de B de nuevo inicia en 10% y se conserva por 8 min para equilibrar la columna para la siguiente inyección. Se inyectaron 20 μL de muestra

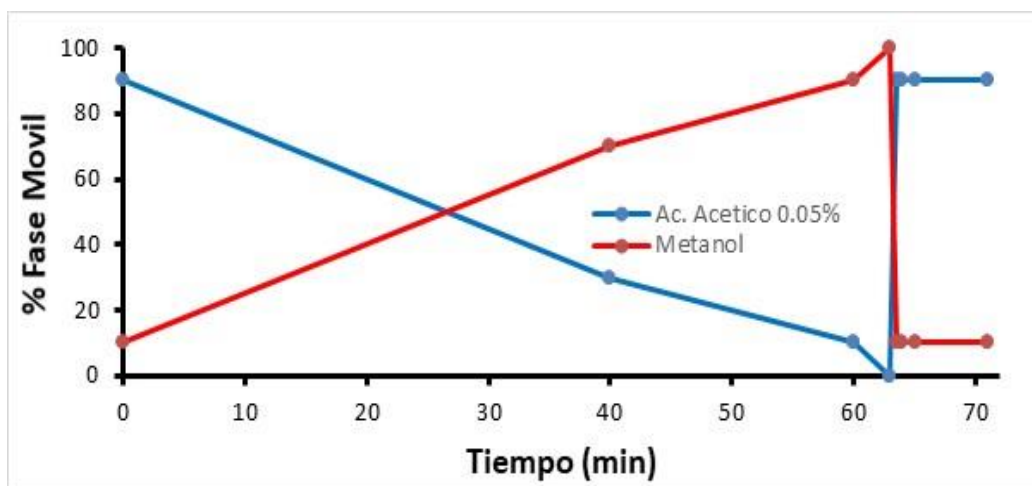


Figura 2-21 Sistema de elución por gradiente empleado en el análisis por HPLC

Para la cuantificación de las fitoalexinas se construyeron curvas de calibración, para este fin se prepararon 5 soluciones (1, 10, 25, 50, 100 mg/L) de cada estándar en metanol utilizando dalbergioidina, 2'-hidroxigenisteina, daidzeina, genisteína, coumestrol y phaseollina. Para determinar las concentraciones de las fitoalexinas para las cuales no se obtuvo un estándar puro, como phaseollinisoflavano, phaseollidina y kievitona, se utilizaron las curvas de calibración de la phaseollina y dalbergioidina. A partir de los estándares de las fitoalexinas purificadas, se identificaron los tiempos de retención y espectros UV de las señales características de estas fitoalexinas, además los tiempos de retención en los extractos de las plántulas sometidas al proceso de elicitación, se confirmaron enriqueciéndolos con cada uno de los estándares, los cuales fueron Dalbergioidina (34 min), 2'-Hidroxigenisteina (35 min), Daidzeina (36 min), Genisteína (39 min), Coumestrol (43 min), Kievitona (46 min), Phaseollinisoflavano (49 min), Phaseollidina (51 min) y Phaseollina (53 min). Se utilizaron 5 longitudes de onda diferentes para la cuantificación de las fitoalexinas como, 278, 248, 259, 343 y 286 nm, las cuales fueron escogidas por los máximos de absorción de los espectros UV. Las concentraciones de cada una de las fitoalexinas se obtuvieron como $\mu\text{g/g}$ de material fresco y mostrados como los valores promedios \pm desviación estándar.

2.6. Pruebas de fitotoxicidad.

Se evaluó el efecto fitotóxico sobre las plántulas de frijol del elicitor que generó la mayor acumulación de fitoalexinas, el 1-oxo-indanoil-L-isoileucina metil éster, a una concentración de 1.0 mM. Además, se utilizó el metil jasmonato (1.0 mM) como control positivo y agua como control negativo, para efectos de comparación. Las pruebas se realizaron sobre la variedad Uribe Rosado, analizándose la germinación de las semillas, dureza de los cotiledones, crecimiento de las plántulas y raíces, luego de la aspersión con el elicitor de manera regular y periódica. Para el análisis estadístico y comparación de los tratamientos, se utilizó la prueba LSD de Fisher con $p = 0.05$.

2.6.1. Germinación de semillas

En cajas Petri (60x15 mm) se depositaron ocho (8) semillas de tamaño similar, sobre un disco de papel filtro impregnado con la sustancia evaluada (derivado indanoilo, metil jasmonato y agua). Las cajas Petri se pusieron en oscuridad a una temperatura de 24 °C y 80% de humedad. Cada 24 horas, las semillas se asperjan con una cantidad similar de las soluciones elicitoras o agua, durante 5 días consecutivos. Al quinto día, se retiró de

manera cuidadosa el tegumento a las plántulas que aún lo tenían adherido. Se midió la longitud de las radículas y la presencia o no de raíces secundarias. Los cotiledones fueron utilizados para medir la dureza de estos.

2.6.2. Dureza de cotiledones de frijol

Los cotiledones, provenientes de las plántulas asperjadas durante cinco días con las soluciones elicitoras o agua, se sometieron a pruebas de dureza (punción y compresión), utilizando un analizador de texturas modelo TA.XTplus. Para la prueba de punción, se utilizó un accesorio cilíndrico de 2 mm de diámetro para evaluar la dureza del tejido cutáneo; la punción se realizó a una velocidad de 1 mm/s y con un máximo de distancia de punción de 3.5 mm (Chu, 2014). Las pruebas se realizaron con 10 réplicas por cada tratamiento de frijol. Para la prueba de compresión se tomó uno de los cotiledones y se utilizó un accesorio cilíndrico de 35 mm de diámetro, para evaluar la dureza del cotiledón; la prueba de compresión se realizó a una velocidad de 1 mm/s y con un máximo de distancia de 3.5 mm (Chu, 2014).

2.6.3. Efecto sobre el crecimiento de la plántula.

Se utilizaron plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado, con un crecimiento de 5 días en vermiculita (arenilla). Las semillas se sembraron dejando una distancia entre 7 a 10 cm aproximadamente. Pasados cinco (5) días de germinación, las plántulas se asperjaron con los diferentes tratamientos (derivado indanoilo ó metil jasmonato) a concentración 1.0 mM ó agua. Este proceso se repitió a los 7, 9 y 11 días de germinación. Los otros días se realizó aspersion con agua para evitar el marchitamiento de las plántulas de frijol. Para el análisis se utilizaron cinco (5) plántulas, las cuales fueron retiradas los días 7, 9, 11 y 13, y se midieron el tallo, las hojas y la coloración de las hojas. Las plántulas permanecieron expuestas a luz difusa a temperatura ambiente y humedad relativa de 80 %. Las hojas se emplearon para el análisis del contenido de clorofilas.

2.6.4. Contenido de clorofilas

Las hojas (200 mg) frescas se maceraron en 5.0 mL de etanol 80%. La mezcla se filtró y la solución etanólica resultante se calentó en un baño de agua a 80°C durante 20 minutos. Posteriormente, la solución se centrifugó a 9000 rpm, y el precipitado se eliminó. El contenido total de clorofilas (mg/g m.f.) se evaluó a partir de lecturas de absorbancia del

sobrenadante a 654 nm, utilizando la ecuación $1000A_{654}/(39.8m_{hojas}(g))$ (Tetley & Thimann, 1974).

2.6.5. Efecto sobre las raíces de la plántula.

Se utilizaron plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado, con un crecimiento de 5 días en vermiculita (arenilla). Las semillas se sembraron dejando una distancia entre 7 a 10 cm aproximadamente. En el día 5, las plántulas se retiraron de la arenilla y se depositaron en vasos plásticos de 13 onzas con una pequeña capa de algodón humedecida con agua. Para el análisis se utilizaron cinco (5) raíces de las plántulas, estas se asperjaron con los diferentes tratamientos (1.0 mM del derivado indanoilo y metil jasmonato, ó agua) a los días 5, 7, 9 y 11; los otros días se realizó aspersion con agua para evitar el marchitamiento de las plántulas de frijol. El tamaño de la raíz y la cantidad de raíces secundarias se determinó para los días 7, 9, 11, y 13. Las plántulas permanecieron expuestas a luz difusa a temperatura ambiente y humedad relativa de 80 %.

2.7. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos provenientes de plántulas elicidadas

La actividad antifúngica se evaluó sobre el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (causante de la antracnosis). La evaluación se realizó con el extracto en AcOEt proveniente de plántulas de frijol de las variedades ICA Cerinza y Uribe Rosado elicidadas con 1.0 mM del derivado del ácido 1-indanona-4-carboxílico más activo, y a 72 h post-inducción. Se determinó la inhibición del crecimiento micelial y la esporulación.

2.7.1. Microorganismo

En el estudio se utilizó un aislamiento monoespórico (Cepa 22) del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, proporcionado por el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. El hongo se aisló a partir del tallo de plántulas de frijol común tipo Cargamanto Blanco del oriente antioqueño. La identificación morfológica se hizo a partir de características macroscópicas y microscópicas de las colonias del hongo crecidas en el medio de cultivo PDA (papa, 200 gr/L; dextrosa, 20 gr/L, y agar 18 gr/L) (Merck S.A.). La identificación molecular se basó en el análisis de las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal (cebadores ITS1 – ITS4 White et al., 1990), comparando las secuencias obtenidas con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (National

Center for Biotechnology Information) (Afanador-Kafuri et al., 2014). El hongo se conservó en medio PDA a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, y se subcultivó quincenalmente en cajas Petri.

2.7.2. Inhibición del crecimiento micelial

Los extractos en AcOEt de las plántulas elicitadas con 1.0 mM del derivado más activo se disolvieron en etanol (0.3 %), hasta una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además, como control negativo se usó una disolución en 0.3 % etanol del extracto en AcOEt (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de plántulas de frijol tratadas con agua, y como control positivo una disolución etanólica del extracto en AcOEt de plántulas elicitadas con 1.0 mM metil jasmonato. Además, se evaluó la actividad antifúngica de phaseollina (una fitoalexina tipo-pterocarpano de frijol) a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las evaluaciones se realizaron en cajas Petri usando el medio de cultivo PDA (Alzate et al., 2009). Las mediciones del crecimiento micelial se realizaron cada 48 horas, hasta completar 16 días. Los resultados se calcularon como valores medios de tres réplicas del % de inhibición del crecimiento micelial con sus respectivas barras de desviación estándar.

$$\% IC = \frac{D_{abs} - D_{Tratamiento}}{D_{abs} - C}$$

Donde D_{abs} corresponde al diámetro del micelio en cada replica (mm) sin adicción de sustancias al medio del cultivo (blanco absoluto); $D_{tratamiento}$ corresponde al diámetro del micelio en cada replica (mm) con la adicción del extracto evaluado al medio del cultivo; C corresponde a un valor constante del diámetro inicial del hongo en el tiempo 0 con un valor de 6 mm.

2.7.3. Inhibición de la esporulación

Adicionalmente, se evaluó la esporulación del hongo expuesto a los diferentes extractos en AcOEt de las plántulas de las dos variedades de frijol elicitadas (derivado indanoilo, metil jasmonato) y no elicitadas, y phaseollina. Las mediciones se realizaron el día 16 de crecimiento del hongo. Se removieron las esporas con la ayuda de una espátula, preparándose soluciones con un volumen de 500 μL . A partir de las soluciones preparadas se determinó la concentración de esporas, tomando 10 μL con una micropipeta depositándose en la placa de la cámara de Neubauer, observándola al microscopio (10X). El recuento de esporas se realizó tres veces y se obtuvo el promedio, transformándose

con el factor de conversión que permita conocer la concentración de esporas en cada caja Petri analizada.

2.7.4. Metabolismo de phaseollina por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*

En el proceso de biotransformación se utilizaron 120 mL de medio de cultivo líquido Czapeck-Dox, dicho proceso se realizó en 3 erlenmeyer de base ancha de 250 mL conteniendo 40 mL de medio cada uno. La inoculación se realizó con trozos de siembra en placa por extendido provenientes de cajas con edad de 15 días; se utilizó una caja de cultivo por 40 mL de medio. Los erlenmeyers se cerraron con algodón estéril; para la preincubación del hongo se emplearon las colonias de un aislado monospórico de *C. lindemuthianum* cultivadas durante 15 días, en un agitador orbital tipo shaker a 120 rpm. Terminado el periodo de preincubación se retiró asépticamente la biomasa, mediante filtración con un lienzo de nylon estéril, y se transfirió a un nuevo medio de cultivo fresco; sobre este material se adicionó phaseollina, ajustándose una concentración de 200 mg/L. El proceso de biotransformación se extendió por un periodo de tiempo de 120 h. Se realizó muestreo del proceso del metabolismo a las 24, 48 y 120 h y el proceso de extracción se realizó con AcOEt, el extracto obtenido se secó en un rotoevaporador a presión reducida y el residuo se disolvió en metanol y se analizó mediante HPLC. Los resultados fueron expresados mediante abundancia relativa. Los productos obtenidos del metabolismo fueron aislados mediante técnicas cromatográficas y fue identificados por métodos espectroscópicos.

3. Resultados y discusión.

3.1. Derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico

La síntesis de los derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico se realizó partiendo del ácido 2-carboxicinámico. Inicialmente, la hidrogenación del ácido 2-carboxicinámico se llevó a cabo en diferentes solventes (MeOH, DCM, AcOEt y AcOH) bajo atmosfera de hidrógeno y con catalizador de paladio (C/Pd, 10%). El general, cuando la reacción se llevó a cabo en MeOH se produjo varios productos, mientras que en DCM y AcOEt quedó reactivo en gran proporción. En AcOH, el ácido 2-carboxicinámico se consumió casi completamente, y adicionalmente, sólo se formó el ácido 2-carboxihidrocinámico (**2.1**). Krumm et al. (1995) llevó a cabo esta misma reacción, pero empleando una solución del ácido 2-carboxicinámico en 0.6 N NaOH. Posteriormente, el ácido dicarboxílico saturado (**2.1**) resultante se cicló por acilación intramolecular de Friedel-Crafts. Entre las metodologías evaluadas, con cloruro de tionilo (SOCl_2), cloruro de oxalilo (COCl_2), y $\text{AlCl}_3/\text{NaCl}$ a 150°C , fue esta última la que arrojó los mejores resultados con un rendimiento del 65%. Krumm et al. (1995) reporta un rendimiento global para la hidrogenación y acilación del 90%, muy superior al encontrado en el presente trabajo. Esta diferencia puede estar asociada a las condiciones de la reacción de acilación, la cual demanda AlCl_3 anhidro; en nuestro caso este reactivo pudo tener algo de humedad, lo que redujo considerablemente el rendimiento de la reacción. Entre los derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico, se prepararon conjugados con aminoácidos, amidas y esteres, como resultado de modificar la posición 4 del ácido 1-indanona-4-carboxílico. Los conjugados indanoilo-aminoácido y las amidas se sintetizaron por reacción entre el ácido 1-indanona-4-carboxílico con ésteres metílicos de aminoácidos y aminas respectivamente, y empleando DCC y el aditivo 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). Lauchli et al. (2002) reportan que es posible mejorar el rendimiento de esta reacción usando *sym*-colidina y HATU (*O*-(7-aza-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluroniumfluorofosfato) en *N,N*-dimetilformamida. El acoplamiento de aminoácidos mostró su mayor rendimiento con el éster metílico de la *L*-isoleucina. Adicionalmente, se sintetizaron derivados por modificaciones en las posiciones 1 (grupo carbonilo) y 2 (carbono α a grupo carbonilo), obteniéndose derivados hidroxilados (por reducción de grupo carbonilo con NaBH_4) e iminas (por reacción con hidrazida), y 2-bencilidenos (por condensación aldólica), respectivamente. A continuación, se describe la asignación estructural de los elicitors sintetizados derivados del ácido 1-indanona-4-

carboxílico, la cual se basó principalmente en espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C mono - y bidimensional.

3.1.1. 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.3)

Este compuesto se aisló como un sólido fino de color blanco, con un rendimiento en la etapa de acoplamiento del aminoácido del 55%, y un R_f 0.45 (*n*-hex:AcOEt, 7:3); el compuesto reveló como una banda de color amarillo luego de la aspersion de la cromatoplaqueta con revelador universal. El espectro IR del compuesto mostró la banda en $3500\text{-}3180\text{ cm}^{-1}$ característica de la tensión N-H y la banda en 1716 cm^{-1} de la tensión del enlace C=O. El derivado sintetizado se confirmó en ^1H RMN por la presencia de los protones H5' y H6', que aparecen como un multiplete intenso a δ 0.93-1.05 ppm que integra para 6 hidrógenos; entre δ 1.28 – 1.59 ppm aparecen los protones diasterotópicos (confirmados con el espectro ^1H - ^{13}C HMQC, **Figura 3-7**) en C4' (-CH₂-), una de las señales en δ 1.28 ppm y otra en δ 1.59 ppm. En δ 2.07 ppm aparece el protón H3' (CH)'; entre δ 2.74 – 3.48 ppm aparecen los protones en los carbonos C3 y C2 (-CH₂) de la ciclopentanona, los cuales son confirmados por el acoplamiento observado en el experimento de correlación ^1H - ^1H COSY (**Figura 3-6**). Adicionalmente en δ 3.83 ppm aparece el grupo -OCH₃ como un singlete intenso y en δ 4.87 se observa el protón H2' acoplado al protón del grupo amida que aparece en 6.65 ppm, lo anterior se observa en el experimento ^1H - ^1H COSY. En cuanto a la región aromática se observaron señales que integraron para tres protones (**Figura 3-3**). El anillo se encuentra trisustituido y se observa un sistema AB₂ (δ 7.51, J = 7.5 Hz para H6 y δ 7.92, J = 7.2 Hz para H5 y H7), y el patrón de sustitución del anillo se confirmó por el experimento de correlación ^1H - ^1H COSY. El espectro ^{13}C RMN (**Figura 3-4**, **Figura 3-5**) reveló la presencia de diecisiete señales asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC y DEPT: δ 11.7 (CH₃, C5'), 15.6 4 (CH₃, C6'), 25.3 (CH₂, C4'), 26.1 (CH₂, C3), 36.2 (CH₂, C2), 38.2 (CH, C3'), 52.4 (O-CH₃), 56.80 (CH, C2'). En la zona aromática se observan 3 carbonos -CH a δ 126.5 (CH, C7), 127.7 (CH, C6), 132.7 (CH, C5), y a campos más bajos se observan 3 carbonos cuaternarios a δ 133.0 (C4), 138.3 (C7a), 154.1 (C3a). Asimismo, se observan las señales de los grupos carbonilos en δ 166.7 perteneciente al grupo amida (-CONH-), en δ 172.5 correspondiente al grupo éster (-O-C=O, C1') y en δ 206.5 (C=O, C1) correspondiente al grupo oxo de la ciclopentanona. Mientras el espectro ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 3-8**) muestra una correlación a larga distancia entre el protón en C7 y el carbono carbonílico de la ciclopentanona δ 206.5 ppm, y correlaciones entre H2 con C3a.

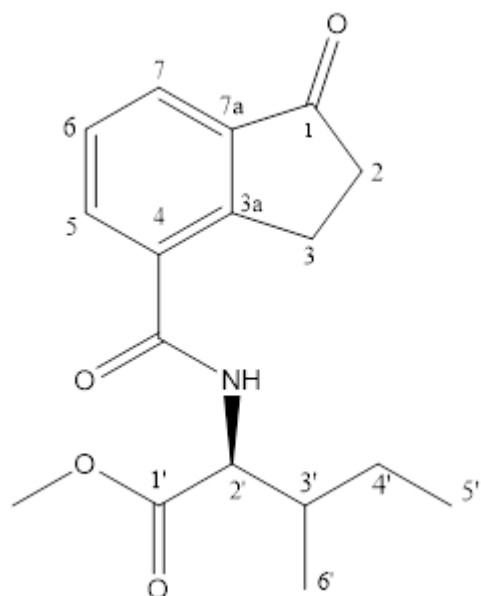


Figura 3-1. Estructura del compuesto 2.3

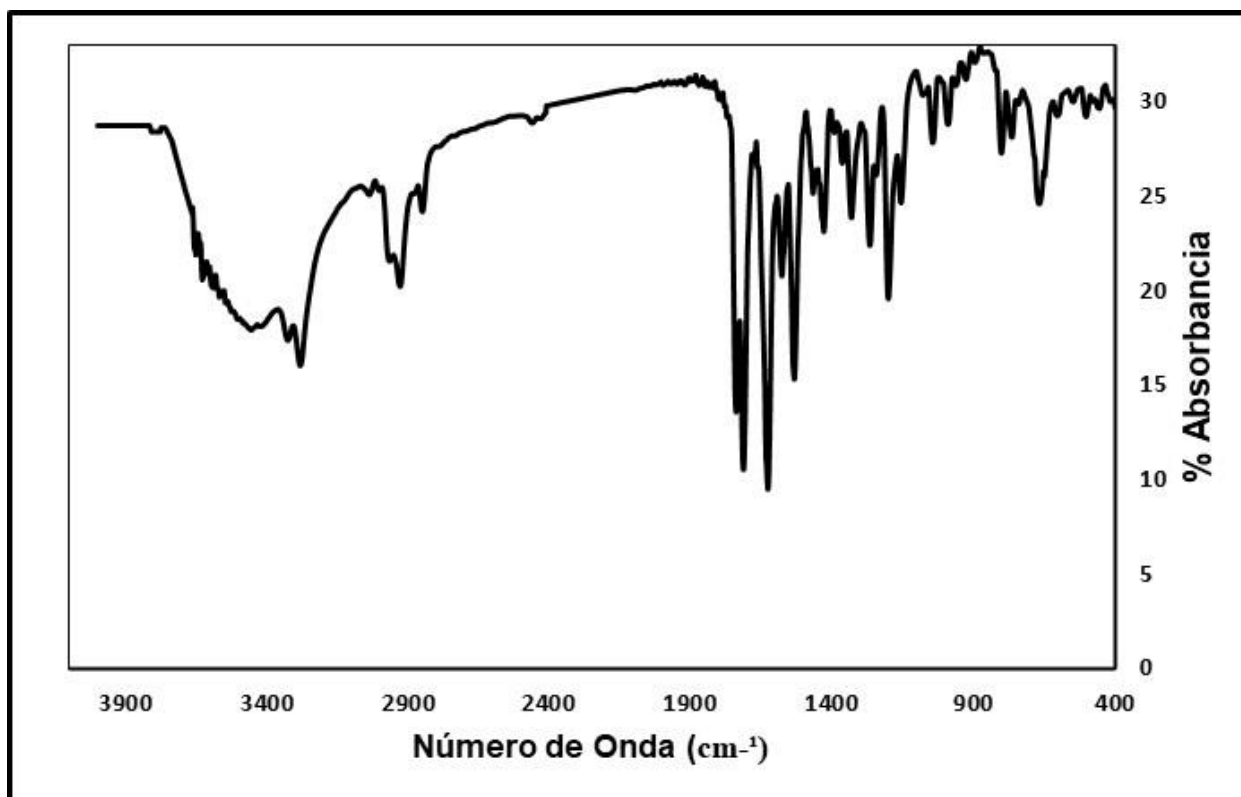


Figura 3-2. Espectro IR del compuesto 2.3

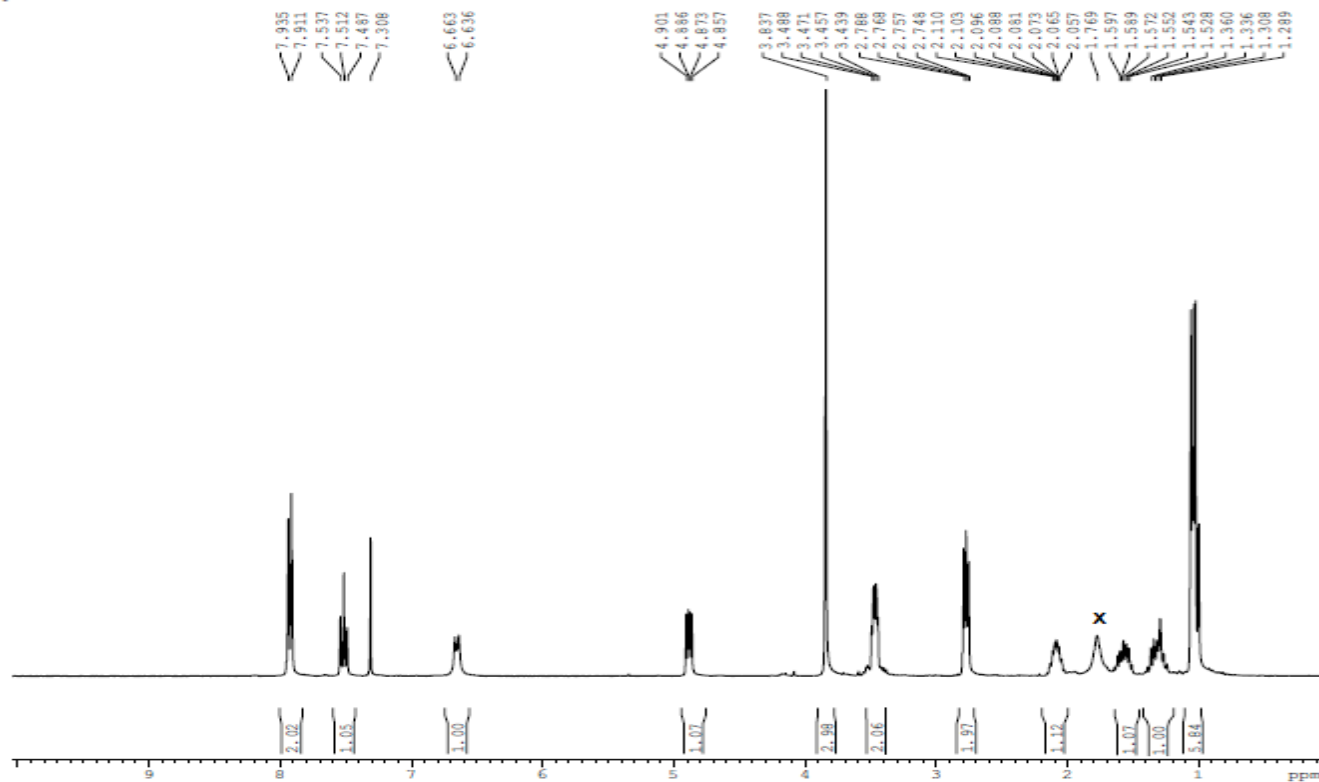


Figura 3-3. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.3

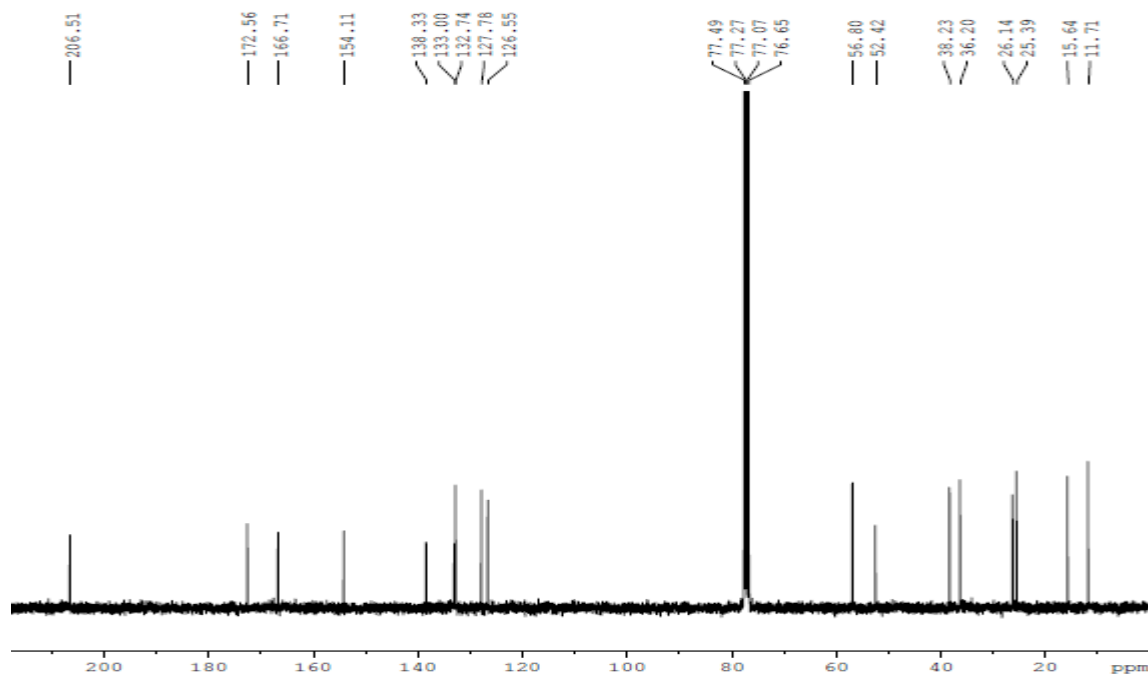


Figura 3-4. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.3

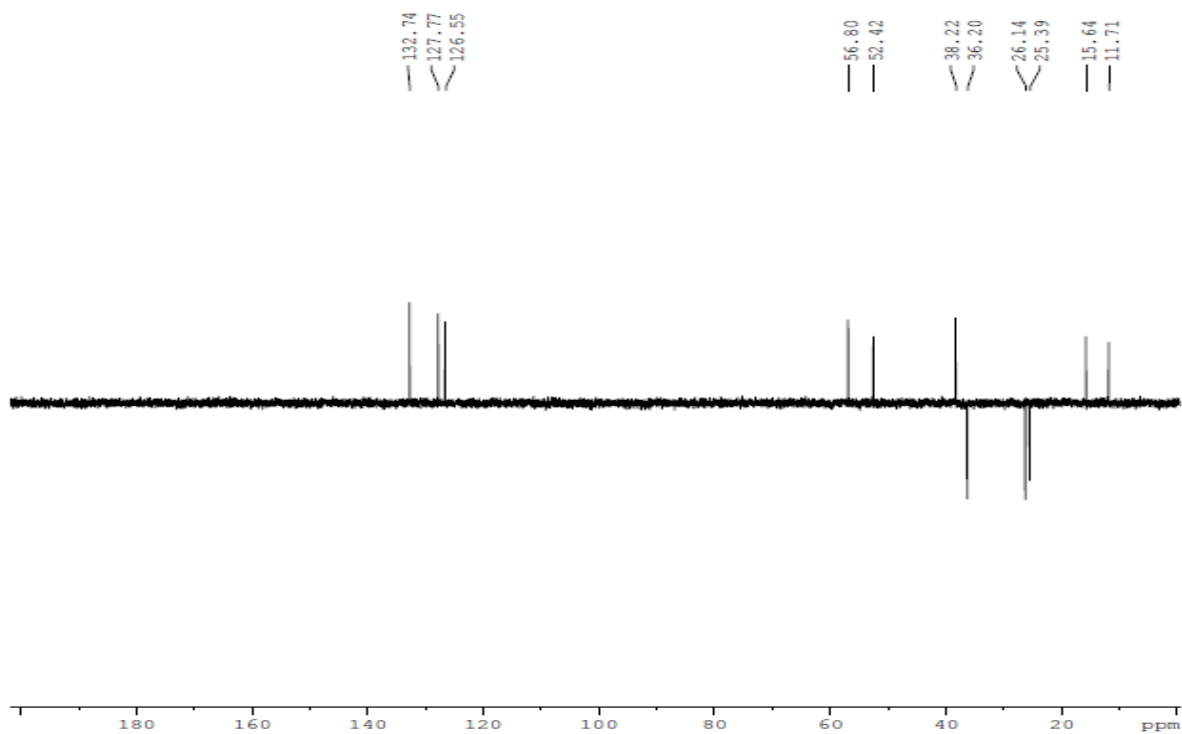


Figura 3-5. Espectro Dept del compuesto 2.3

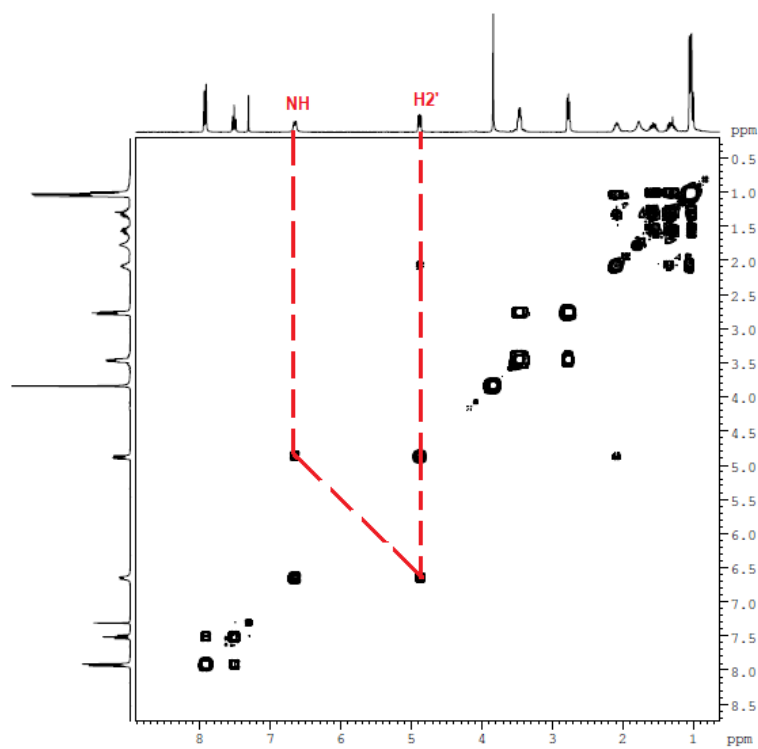


Figura 3-6. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.3

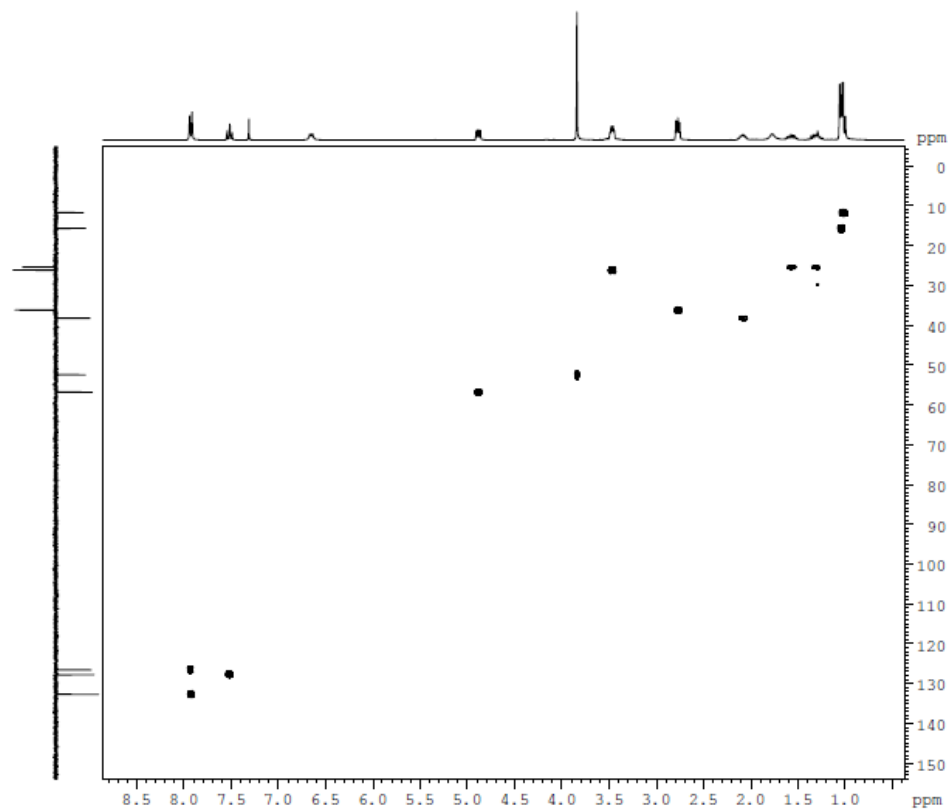


Figura 3-7. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.3

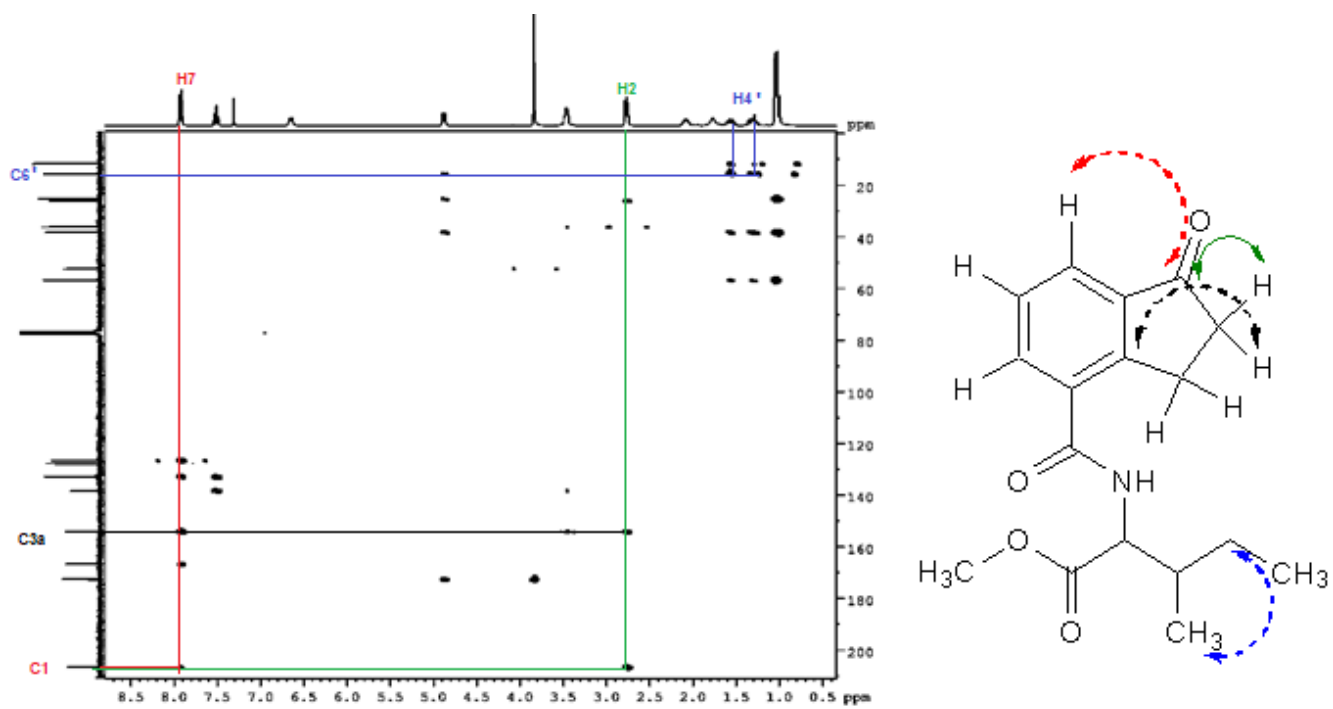


Figura 3-8. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.3

3.1.1. 1-oxo-indanoil-L-leucina metil éster (2.4)

Este compuesto se aisló como un sólido fino de color amarillo con un rendimiento en la etapa de acoplamiento del aminoácido del 52% y un R_f 0.45 (*n*-hex:AcOEt, 7:3), y reveló como una banda de color amarillo luego de la aspersion de la cromatoplaaca con revelador universal. El espectro IR del compuesto mostró la banda 3500-3180 cm^{-1} característica de la tensión N-H y la banda 1716 cm^{-1} de la tensión del enlace C=O. El derivado sintetizado se confirmó en ^1H RMN (**Figura 3-9**) por la presencia de los protones H5' y H6', que aparecen como un multiplete intenso a δ 0.98 ppm que integra para 6 hidrógenos; entre δ 1.60-1.90 ppm aparecen los protones en C3' (-CH₂-) y C4' (CH) solapados en un pico que integra para tres protones; a campos más bajos, en δ 2.71 y 3.37 ppm aparecen los protones en C2 y C3 (-CH₂-) de la ciclopentanona, acoplados, lo cual se confirmó en el experimento de correlación ^1H - ^1H COSY (**Figura 3-13**). Adicionalmente, en δ 3.77 ppm aparece el grupo -OCH₃ como un singlete intenso y en δ 4.73 se observa el protón H2' acoplado con el protón H3', confirmado en el experimento COSY (**Figura 3-13**). A campos bajos, en la región aromática, se observaron señales (un sistema ABC: δ 7.45, J = 7.8 Hz para H6, δ 7.82, J = 7.5 Hz para H7 y δ 7.89, J = 7.5 Hz para H5) que integraron para tres protones (**Figura 3-10**), indicando un anillo aromático trisustituido, el cual se confirmó por el experimento de correlación ^1H - ^1H COSY (**Figura 3-13**). El espectro ^{13}C RMN (**Figura 3-11**, **Figura 3-12**) reveló la presencia de diecisiete señales asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC y DEPT: δ 21.1 (C5'), 22.5 (C6'), 25.0 (C4'), 25.6 (C3'), 36.0 (C2), 40.1 (C3), 51.2 (C2'), 52.0 (-OCH₃). En la zona aromática se observan 3 carbonos metínicos (-CH) a δ 125.9 (CH, C7), 127.5 (CH, C6), y 133.2 (CH, C5). A campos más bajos, se observan 3 carbonos cuaternarios con los siguientes desplazamientos δ 133.3 (C4), 137.6 (C7a), y 154.6 (C3a). Asimismo, se observan las señales de los grupos carbonilos en δ 168.4 perteneciente al grupo amida, en δ 173.6 correspondiente al grupo éster (-O-C=O, C1') y en δ 208.0 (C=O, C1) correspondiente a la ciclopentanona. El espectro ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 3-15**) muestra una correlación a larga distancia entre el protón en C7 y el carbono carbonílico de la ciclopentanona δ 208.0 ppm, y correlaciones entre H2 y H3 con C3a. Adicionalmente se observa una correlación a larga distancia entre el protón H2' y el carbono del grupo amida.

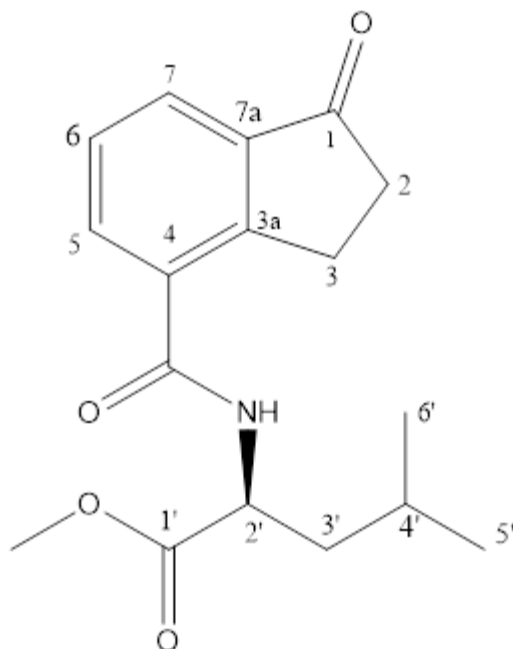


Figura 3-9. Estructura del compuesto 2.4

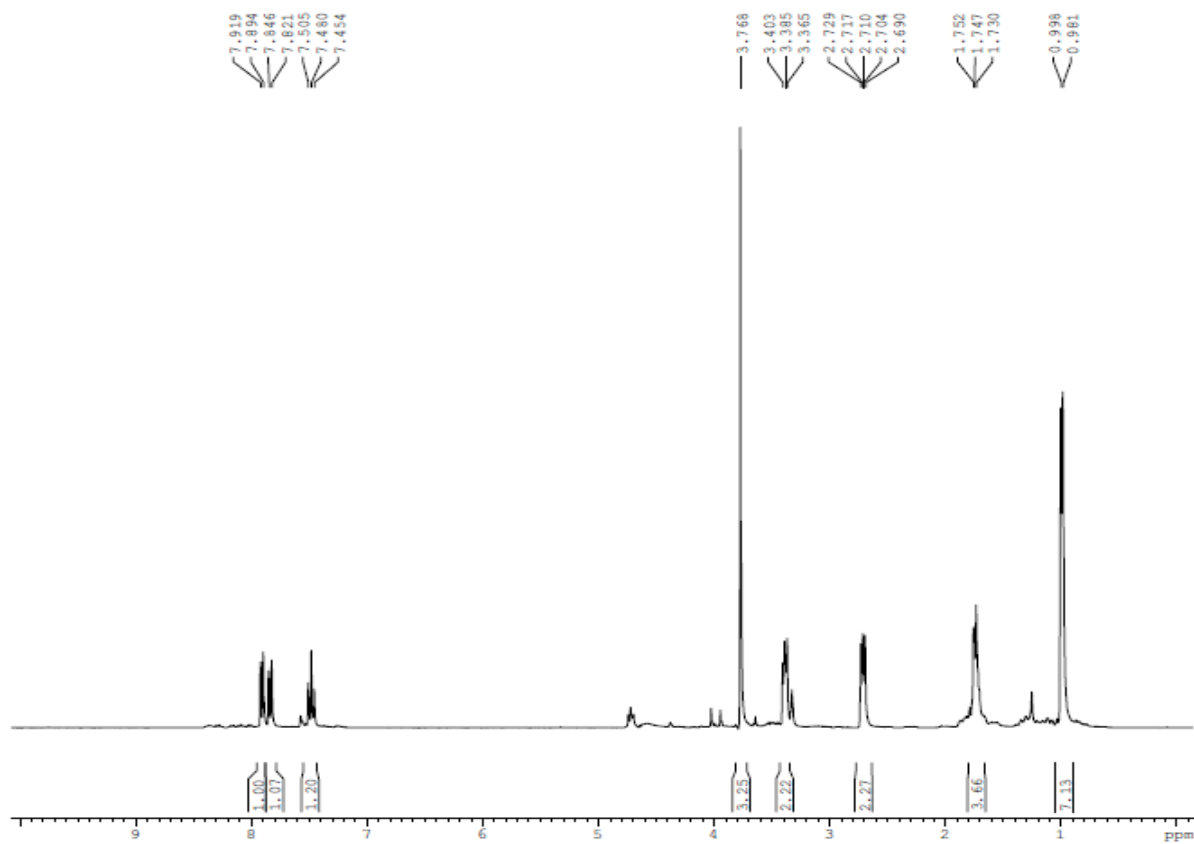


Figura 3-10. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.4

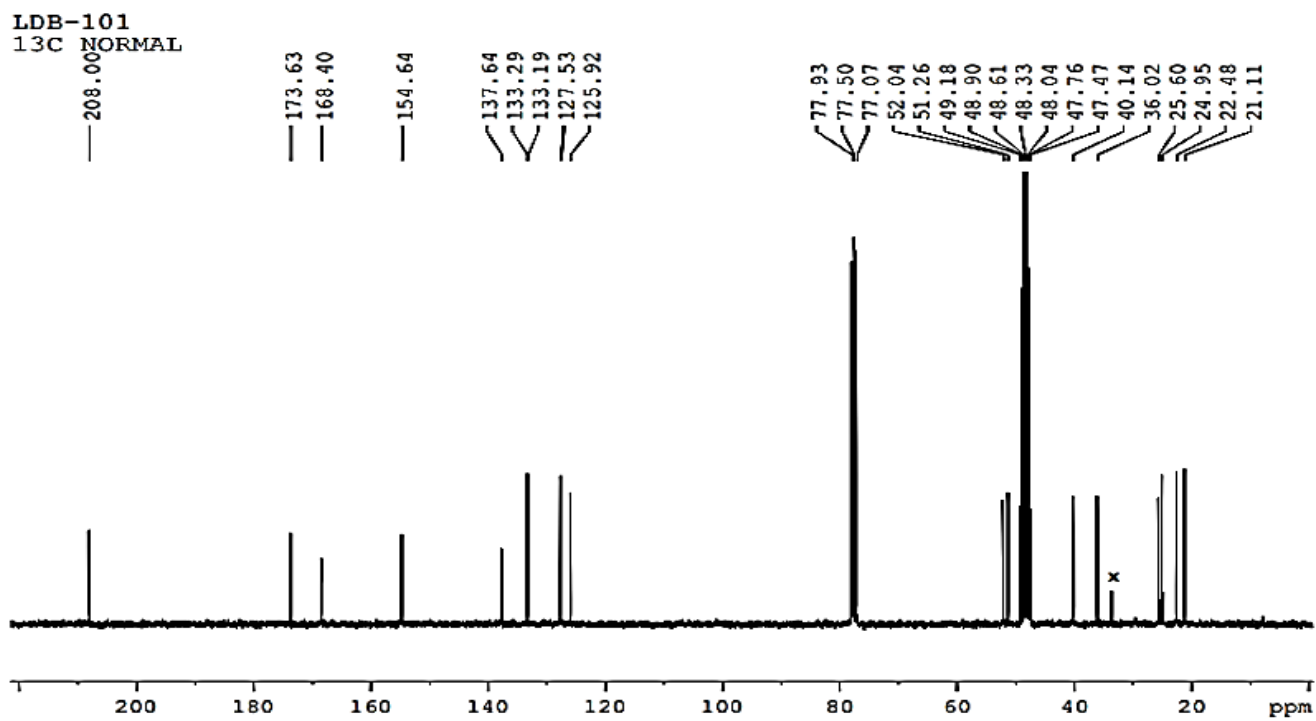


Figura 3-11. Espectro de ¹³C RMN del compuesto 2.4

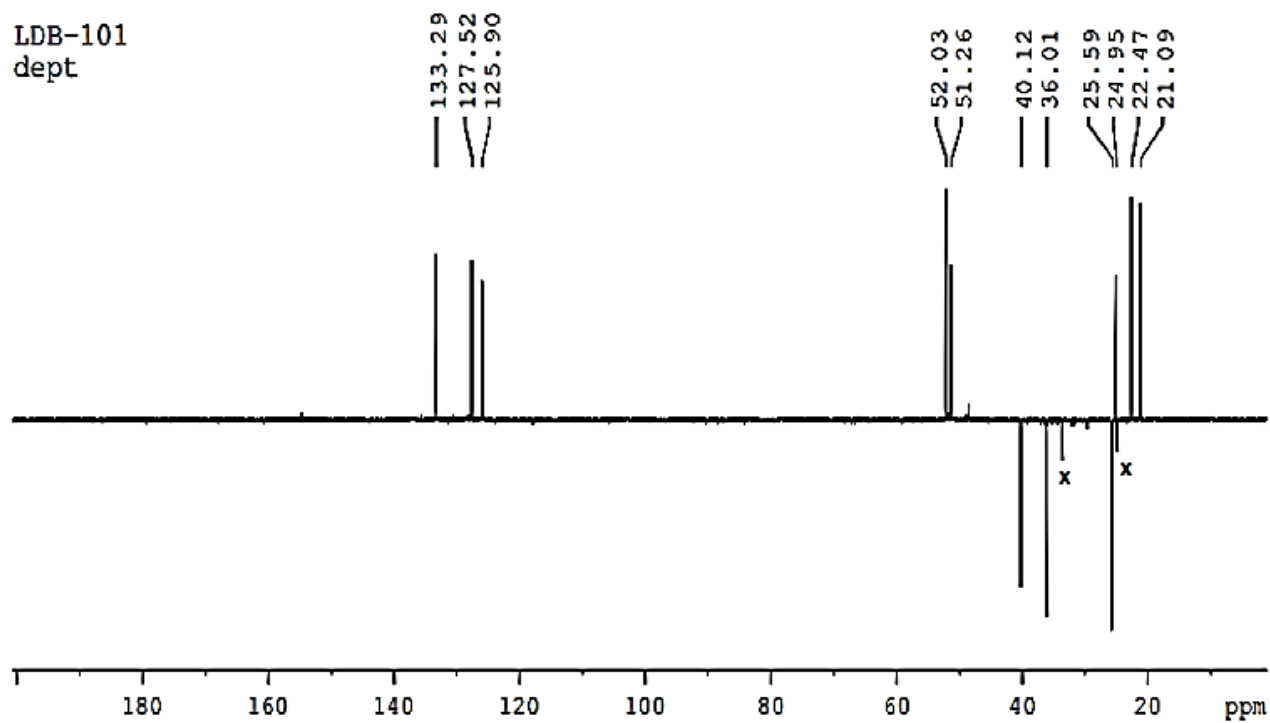


Figura 3-12. Espectro DEPT del compuesto 2.4

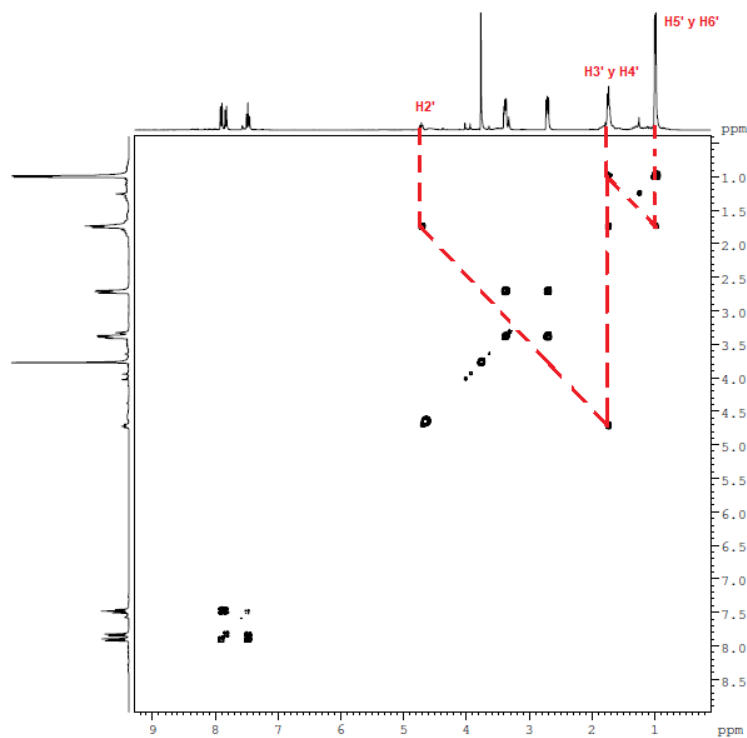


Figura 3-13. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.4

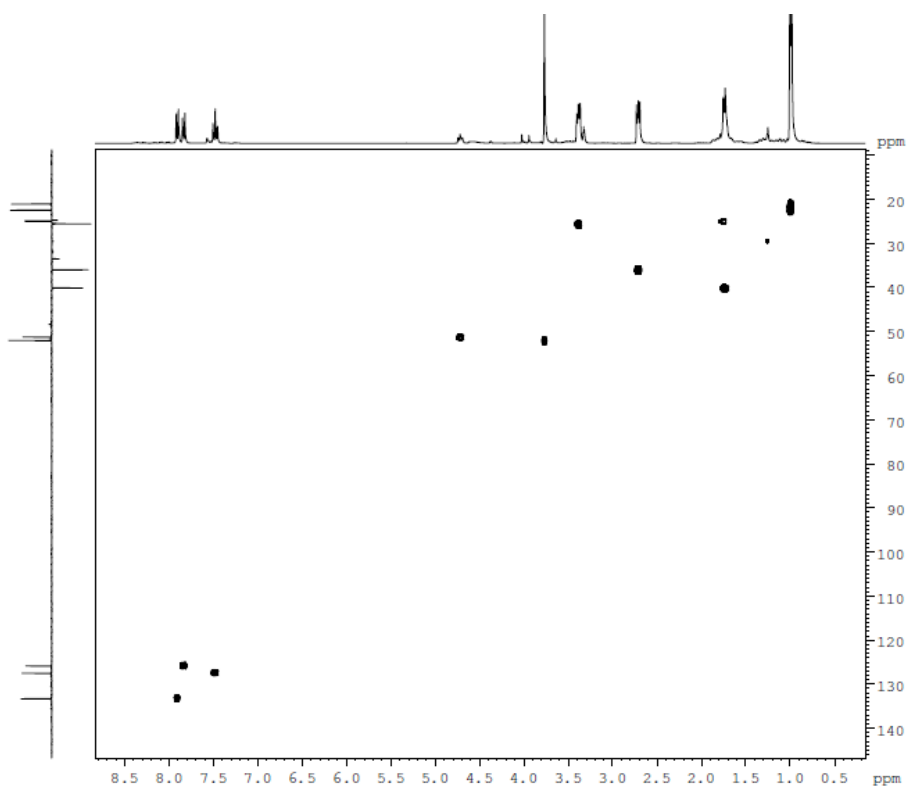


Figura 3-14. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.4

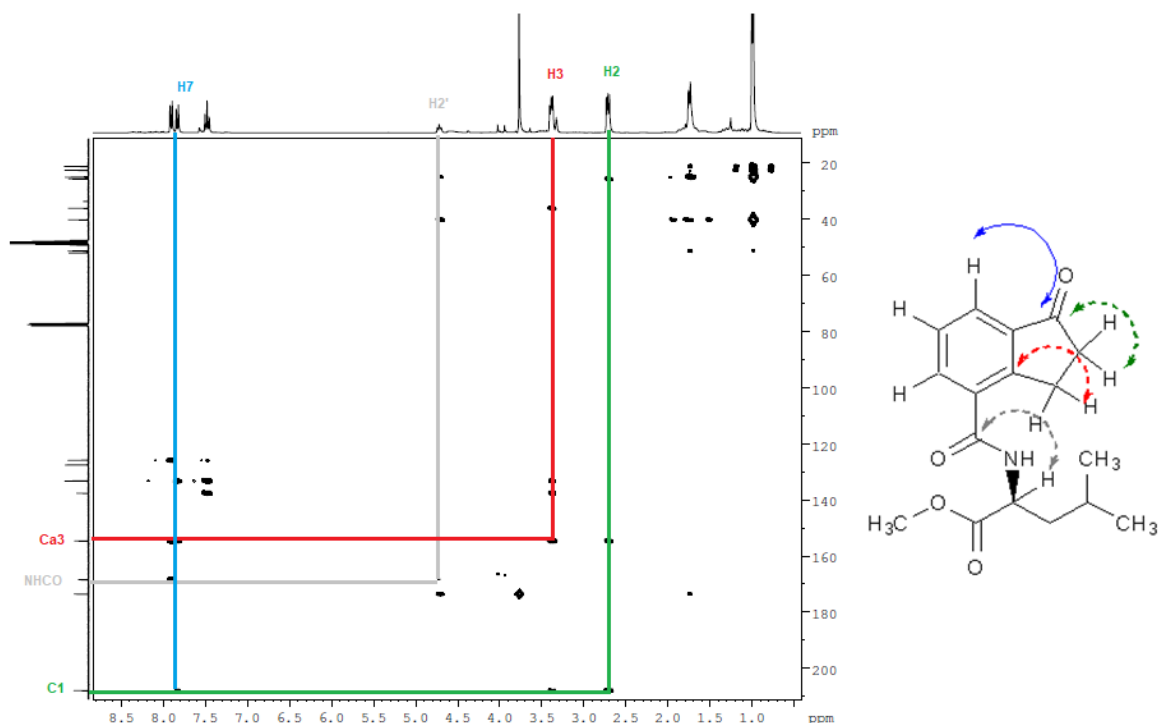


Figura 3-15. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.4

3.1.2. 1-oxo-indanoil-L-valina metil éster (2.5)

Este compuesto se aisló como un sólido fino de color blanco, con un rendimiento en la etapa de acoplamiento del aminoácido del 32 %. El compuesto tiene un R_f 0.30 (n -hex:AcOEt, 7:3), y reveló como una banda de color amarillo luego de la aspersion de la cromatoplaaca con revelador universal. El espectro IR del compuesto mostró la banda 3500-3180 cm^{-1} característica de la tensión N-H y la banda 1716 cm^{-1} de la tensión del enlace C=O. El derivado sintetizado se confirmó en ^1H RMN (**Figura 3-17**) por la presencia de los protones H4' y H5', que aparecen como un multiplete intenso a δ 1.05 ppm que integra para 6 hidrógenos; a campo más bajo, en δ 2.27, se encuentra una señal que integra para 1 protón y corresponde a H3'; en δ 2.72 y 3.32 ppm aparecen los protones en C2 y C3 (-CH₂-) de la ciclopentanona; en δ 3.36 ppm se observa el protón H2'; adicionalmente en δ 3.78 ppm aparece el grupo -OCH₃ como un singlete intenso. En la región aromática se observaron señales que integraron para tres protones (un sistema ABC (δ 7.53, J = 7.5 Hz para H6, δ 7.85, J = 7.5 Hz para H7 y δ 7.91, J_1 = 0.9 Hz, J_2 = 7.5 Hz para H5)(**Figura 3-17**), confirmando el anillo trisustituido. El espectro ^{13}C RMN (**Figura 3-18**, **Figura 3-19**) reveló la presencia de dieciséis señales asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC y DEPT: 17.5 (C4'), 18.2 (C5'), 25.3 (C2),

30.3 (C3'), 35.6 (C3), 51.2 (-OCH₃), 58.5 (C2'). A campos más bajos, en la zona aromática, se observan 3 carbonos metínicos (-CH-) a δ 125.9 (CH, C7), 127.5 (CH, C6), y 133.2 (CH, C5), y 3 carbonos cuaternarios a δ 133.7 (C4), 137.5 (C7a), y 154.1 (C3a). Asimismo, se observan las señales de los grupos carbonilos en δ 169.0 (-CONH-), en δ 172.2 correspondiente al grupo éster (-O-C=O, C1') y en δ 207.48 (C=O, C1) correspondiente a la ciclopentanona.

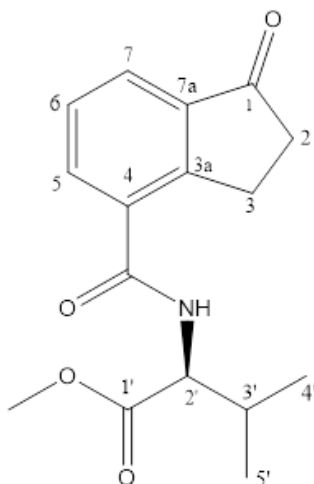


Figura 3-16. Estructura del compuesto 2.5

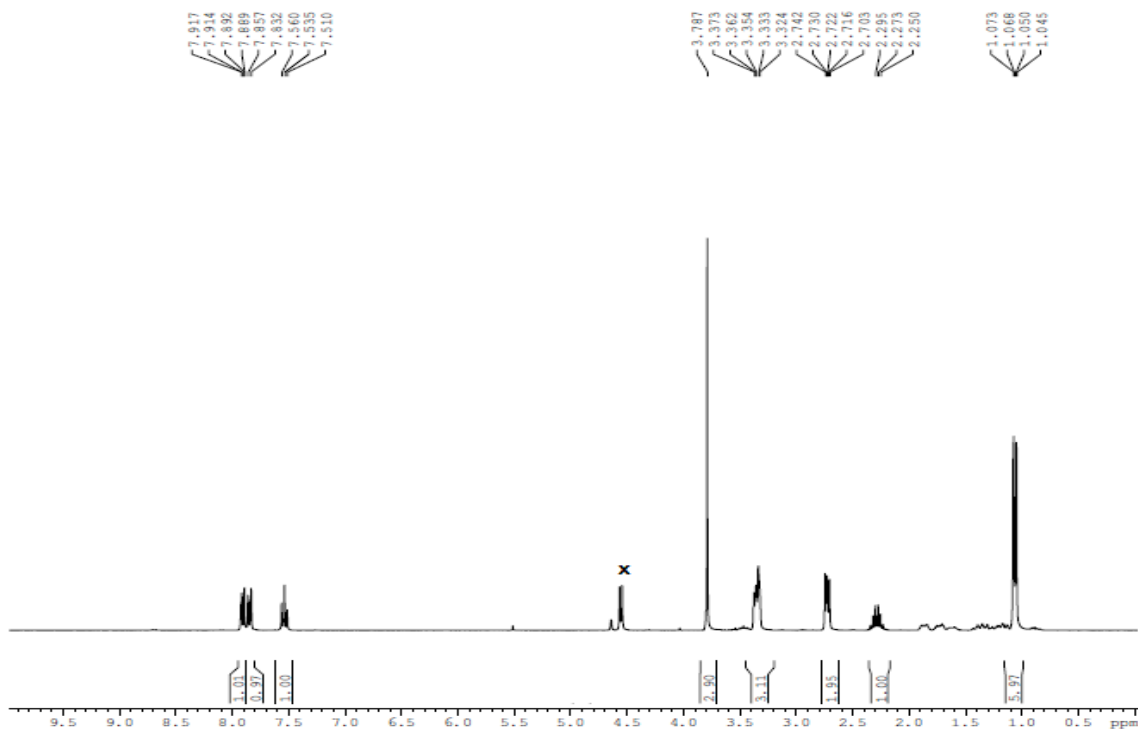


Figura 3-17. Espectro de ¹H RMN del compuesto 2.5

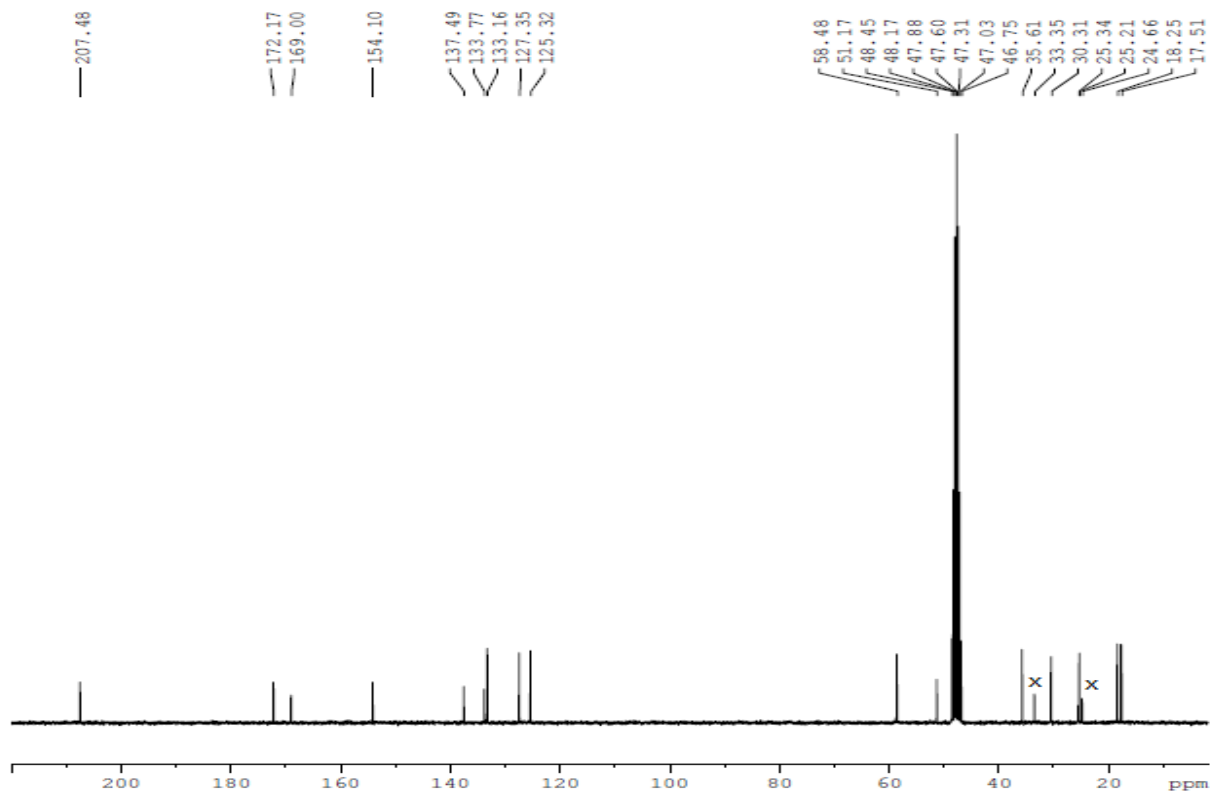


Figura 3-18. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.5

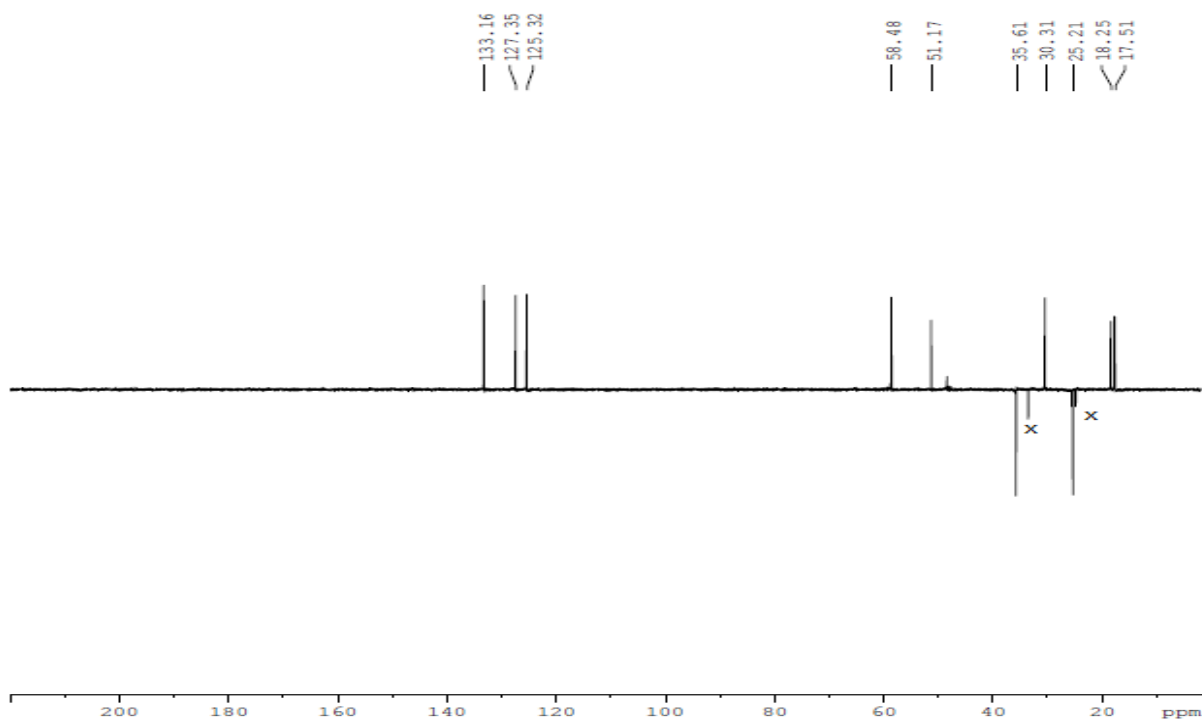


Figura 3-19. Espectro DEPT del compuesto 2.5

3.1.3. 1-oxo-indanoil-L-glicina metil éster (2.6)

Este compuesto se aisló como un sólido fino de color amarillo, con un rendimiento en la etapa de acoplamiento del aminoácido del 19 %. El compuesto tiene un Rf 0.17 (*n*-hex: AcOEt, 7:3), y reveló como una banda de color amarillo luego de la aspersion de la cromatoplaaca con revelador universal. El espectro IR del compuesto mostró la banda 3500-3180 cm⁻¹ característica de la tensión N-H y la banda 1716 cm⁻¹ de la tensión del enlace C=O. El derivado sintetizado se confirmó en ¹H RMN (**Figura 3-21**) por la presencia de los protones en C3 y C2 (-CH₂-) en δ 2.73 y 3.45 ppm de la ciclopentanona; asimismo, en δ 3.84 ppm aparece el grupo -OCH₃ como un singlete intenso; en δ 4.3 ppm se observa el protón H2'; adicionalmente el protón del grupo amino se observa en δ 6.79 ppm (-NH). En cuanto a la región aromática se observaron señales que integraron para tres protones un sistema AB₂ (δ 7.48, J = 7.5 Hz para H6, δ 7.89, J₁ = 3.6 Hz, J₂ = 7.5 Hz para H5 y H7), indicando un anillo trisustituido. El espectro ¹³C RMN (**Figura 3-22**, **Figura 3-23**) reveló la presencia de trece señales asignadas con base en los espectros ¹H-¹³C HSQC y DEPT: 26.1 (C3), 36.2 (C2), 41.6 (C2'), 52.65 (-OCH₃). En la zona aromática se observan 3 carbonos metínicos (-CH-) a δ 126.6 (C7), 127.7 (C6), 132.5 (C5), y a campos más bajos 3 carbonos cuaternarios a δ 132.7 (C4), 138.3 (C7a), 154.4 (C3a). Asimismo, se observaron señales para los carbonos carbonílicos, en δ 167.1 (-CONH-), 170.4 correspondiente al grupo éster (-O-C=O), C1') y 206.5 (C=O, C1) correspondiente al grupo oxo de la ciclopentanona.

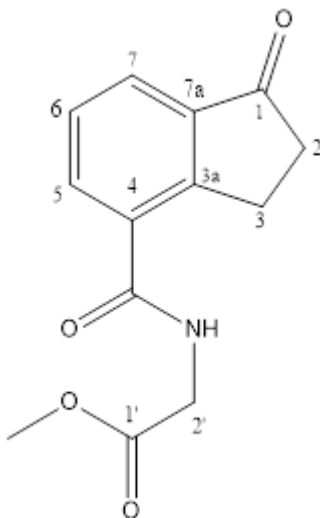


Figura 3-20. Estructura del compuesto **2.6**

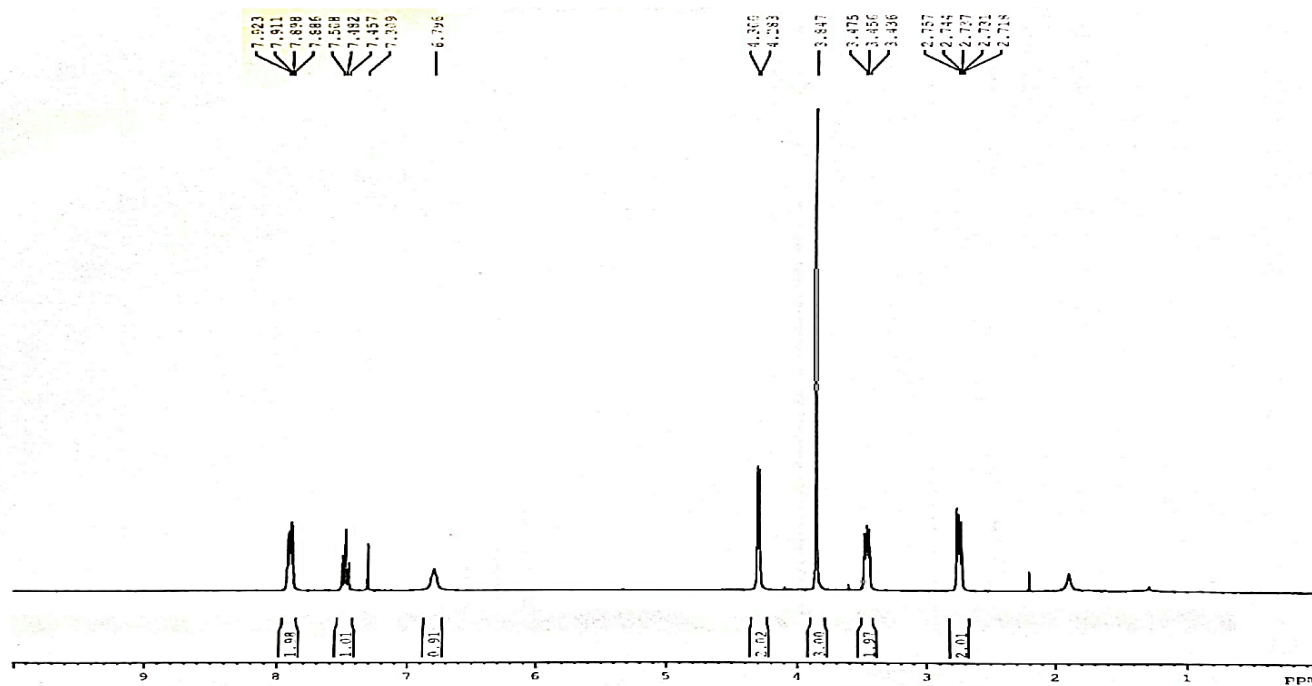


Figura 3-21. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.6

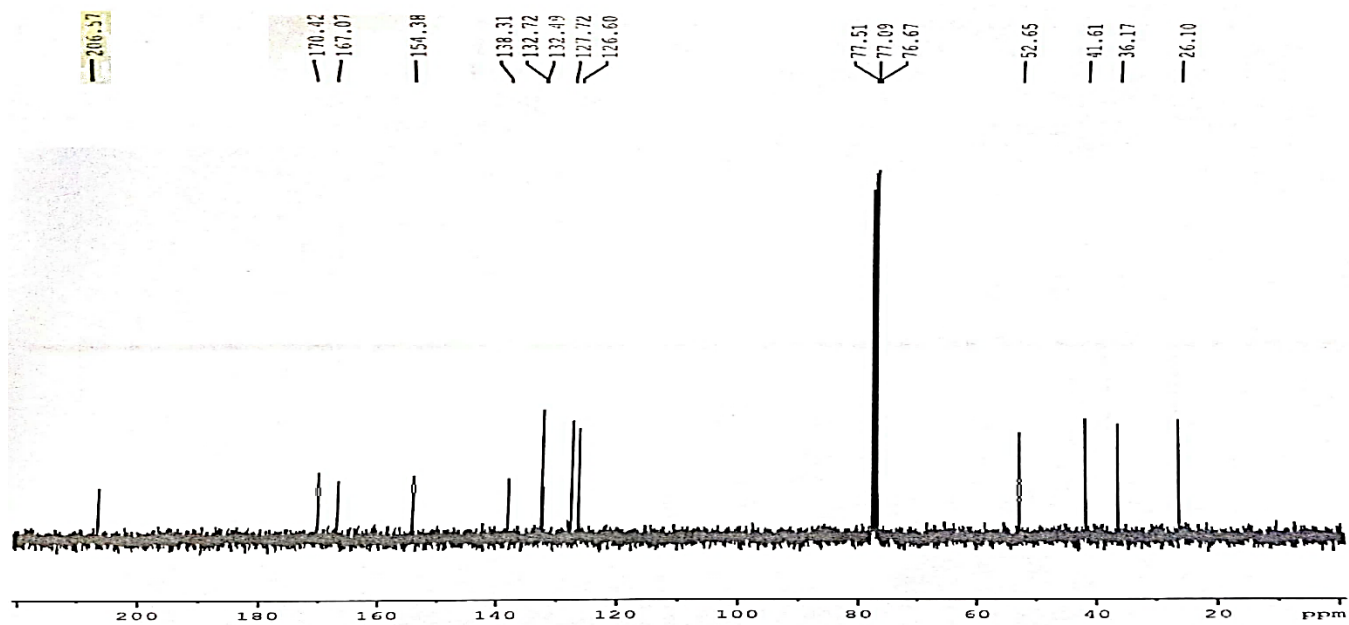


Figura 3-22. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.6

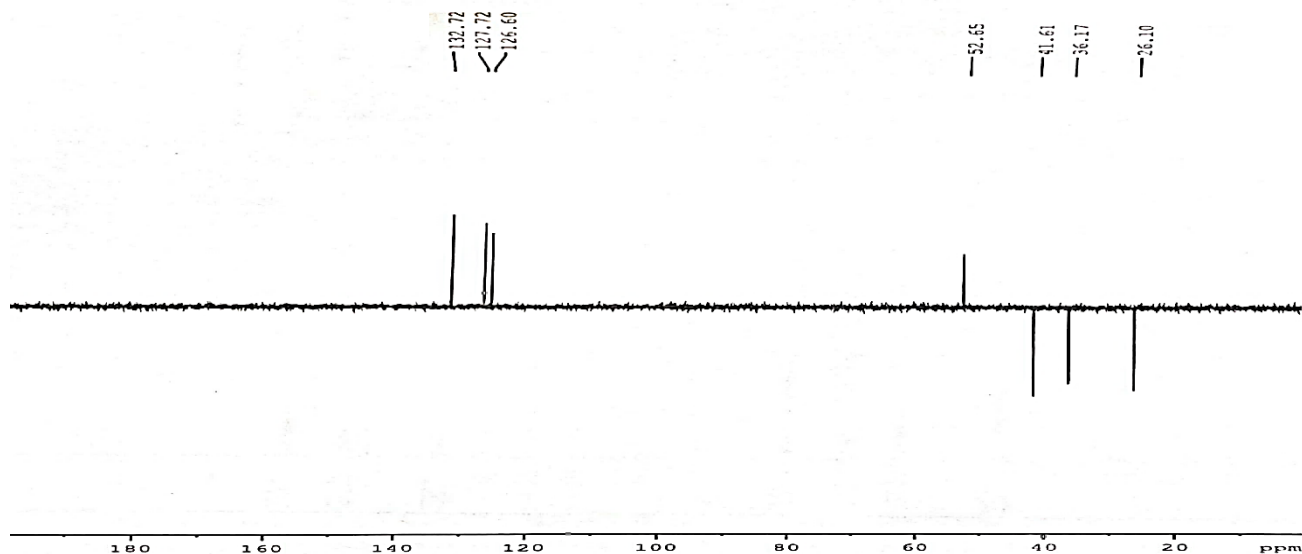


Figura 3-23. Espectro DEPT del compuesto **2.6**

3.1.4. 1-oxo-indano-4-carboxilato de 3-hidroxi-propilo (2.7)

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo de color amarillo, con un rendimiento en la etapa de esterificación del 53 % y un R_f 0.19 (n -hex:AcOEt, 7:3). El compuesto reveló con tonalidad amarilla pálida en TLC haciendo uso de revelador universal, posterior a un leve calentamiento. El espectro IR (**Figura 3-25**) del compuesto mostró la banda a 3500 cm^{-1} ancha característica del estiramiento O-H y la banda en 1682 cm^{-1} correspondiente a la tensión C=O del grupo carbonilo de la ciclopentanona y el éster. El derivado sintetizado se confirmó en ^1H RMN (**Figura 3-26**) por la presencia de los protones de la cadena alquílica que se encuentra enlazada al grupo éster; en primer lugar, aparecen los protones en C2' como un multiplete a δ 2.07 ppm que integra para 2 hidrógenos, a δ 3.84 ppm aparecen los protones en C3' como un triplete que integra para 2 hidrógenos y por último aparecen los protones en C1', que aparece como un triplete a δ 4.55 ppm. Asimismo, se observan los protones en C2 y C3 del anillo ciclopentanona a δ 2.74 y 3.5 ppm integrando para 2 protones cada una; en δ 2.32 ppm aparece la señal para el grupo hidroxilo (-OH). A campos más bajos, en la región aromática, se observaron señales que integraron para tres protones (un sistema ABC (δ 7.50, $J = 7.5$ Hz para H6, δ 7.97, $J = 7.5$ Hz para H7, δ 8.31, $J = 7.8$ Hz para H5), confirmando el anillo trisustituido. El espectro ^{13}C RMN (**Figura 3-27**, **Figura 3-28**) reveló la presencia de trece señales asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC (**Figura 3-30**) y DEPT: δ 27.3 (CH_2 , C3), 31.8 (CH_2 , C2'), 36.1 (CH_2 , C2), 59.1 (CH_2 , C3'), 62.07 (CH_2 , C1'). En la zona aromática se observan 3 carbonos metínicos (-CH-) a δ 127.6 (C6), 128.23 (C7), 136.4 (C5),

y a campos más bajos 3 carbonos cuaternarios a δ 128.20 (C4), 138.3 (C7a), y 156.7 (C3a). Asimismo, se observan las señales de los grupos carbonilos en δ 166.1 (-O-CO-) perteneciente al grupo éster y en δ 206.7 correspondiente al grupo carbonilo de la ciclopentanona (C=O, C1). Mientras el espectro ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 3-32**) muestra una correlación a larga distancia entre el protón en C2 y C3 y el carbono carbonílico de la ciclopentanona δ 206.7 ppm, y correlaciones entre H7 con C1 del grupo carbonilo. Adicionalmente se observa una correlación de larga distancia entre los protones de C1' y el carbono del grupo éster δ 166.1 ppm.

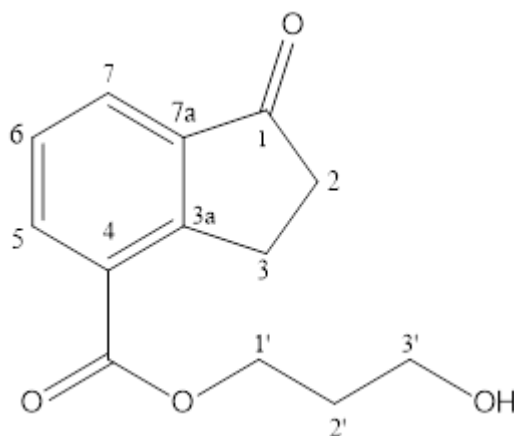


Figura 3-24. Estructura del compuesto 2.7

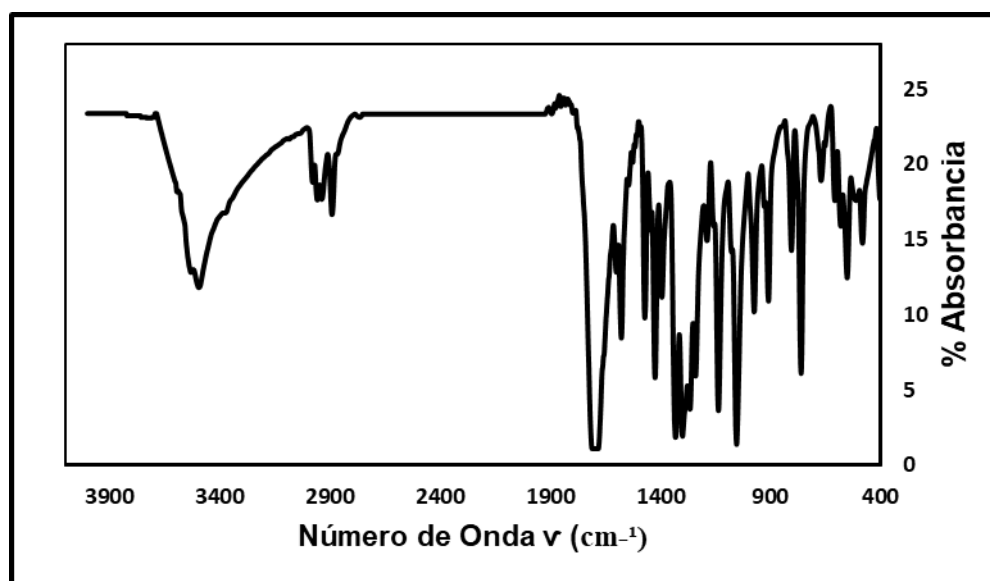
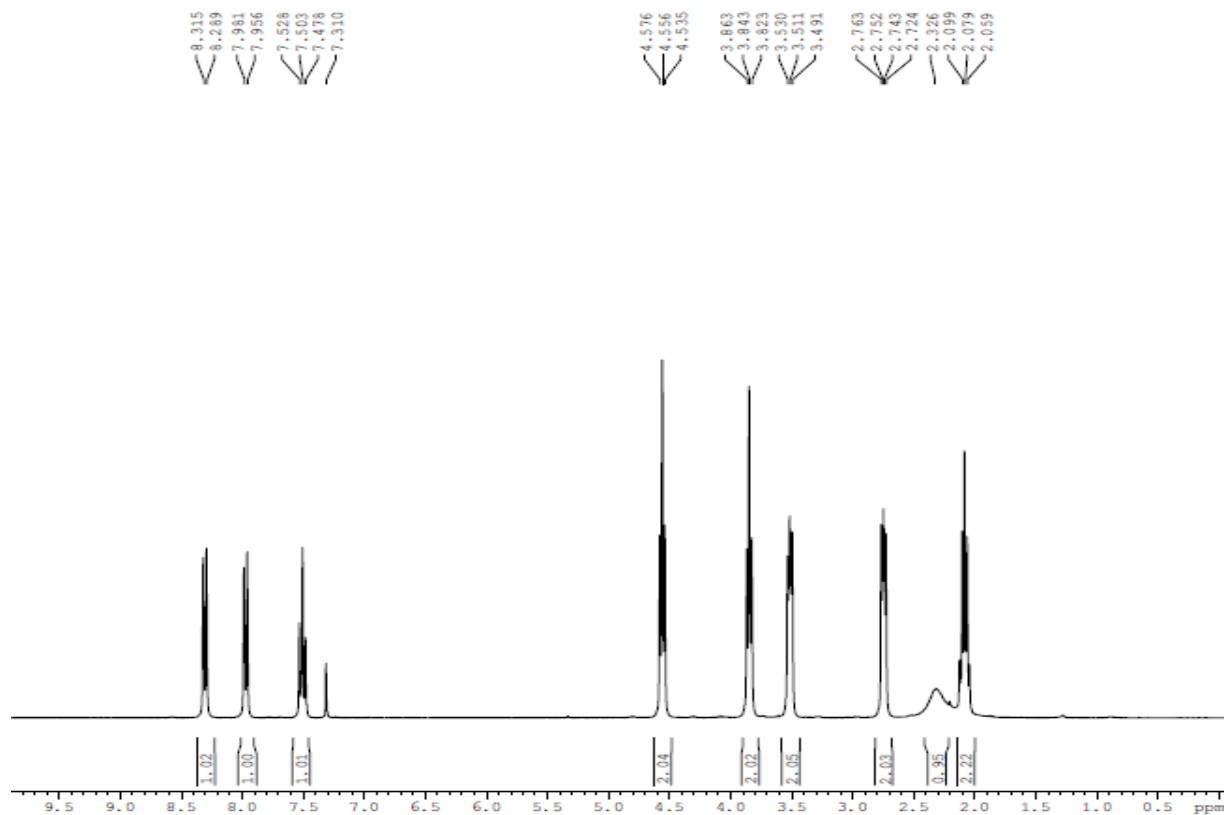
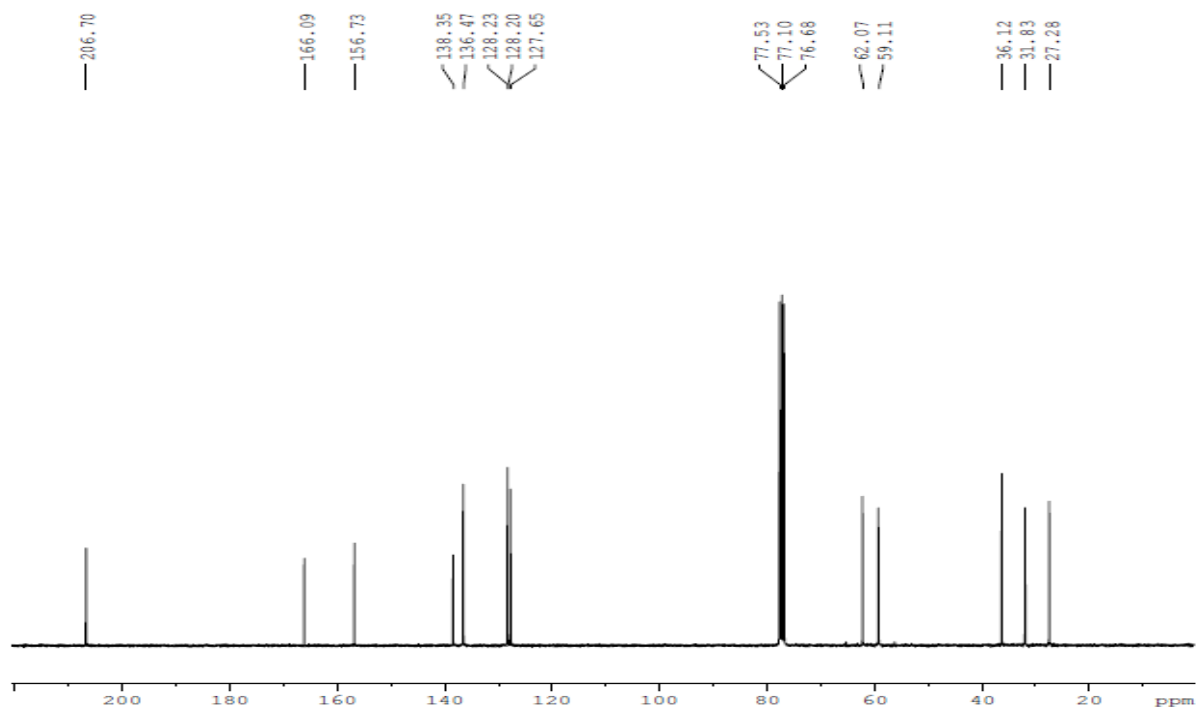


Figura 3-25. Espectro IR del compuesto 2.7

Figura 3-26. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.7Figura 3-27. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.7

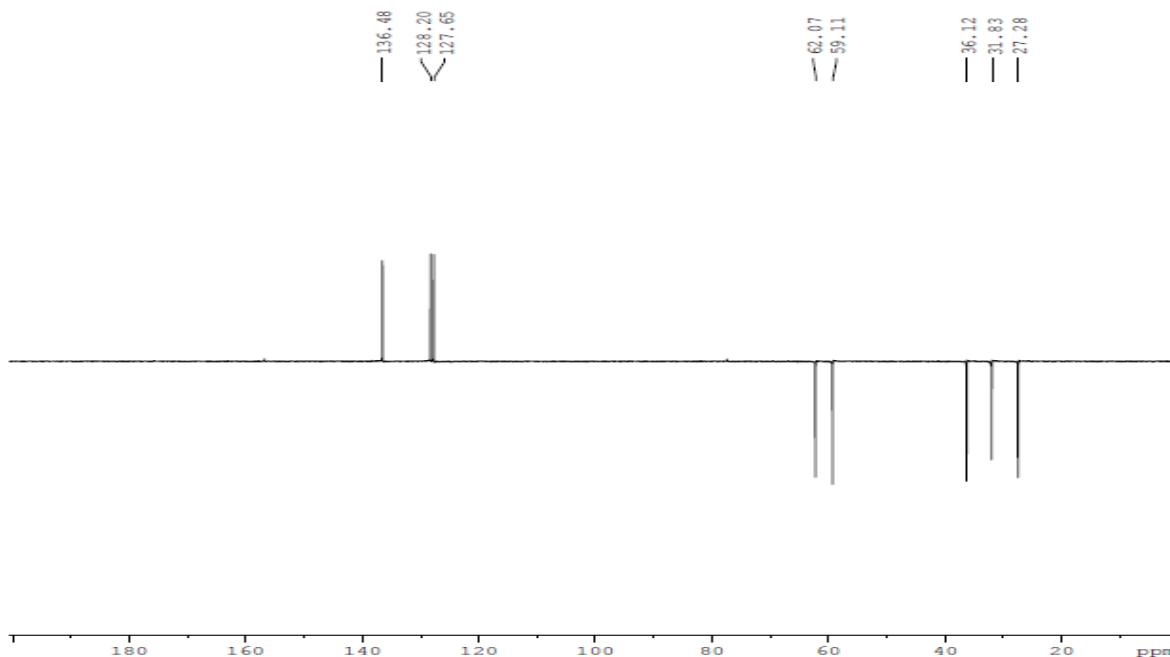


Figura 3-28. Espectro DEPT del compuesto 2.7

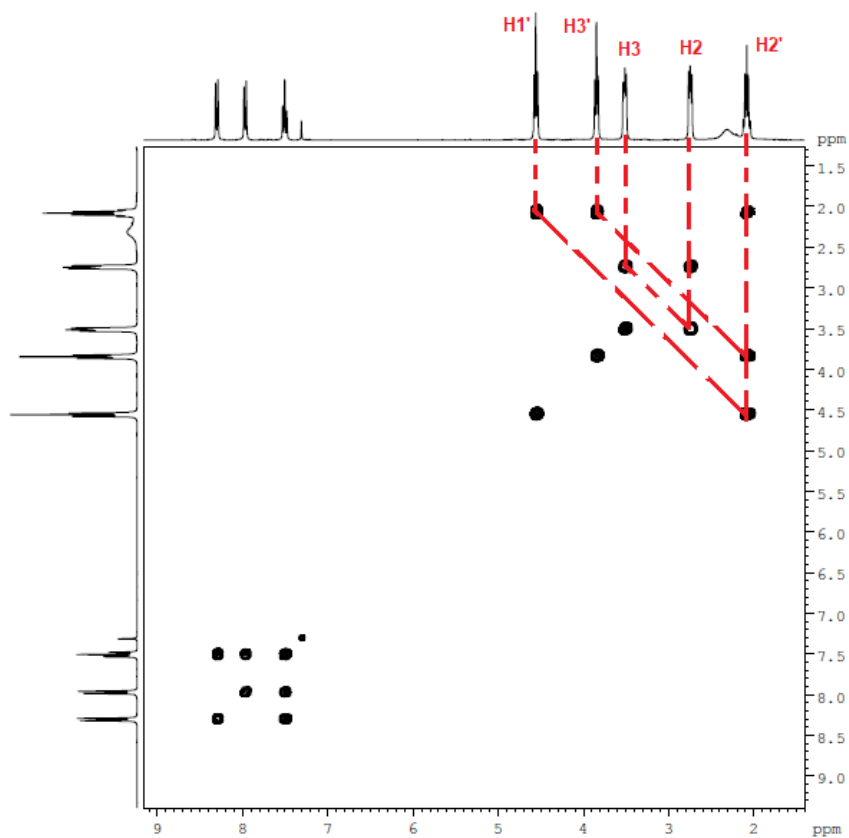


Figura 3-29. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.7

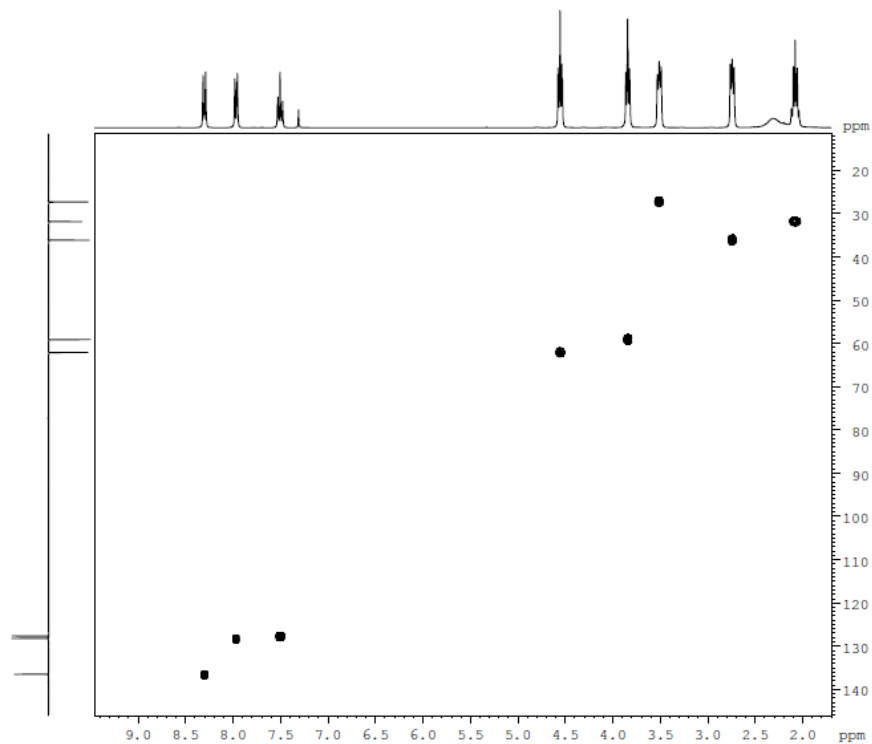


Figura 3-30. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.7

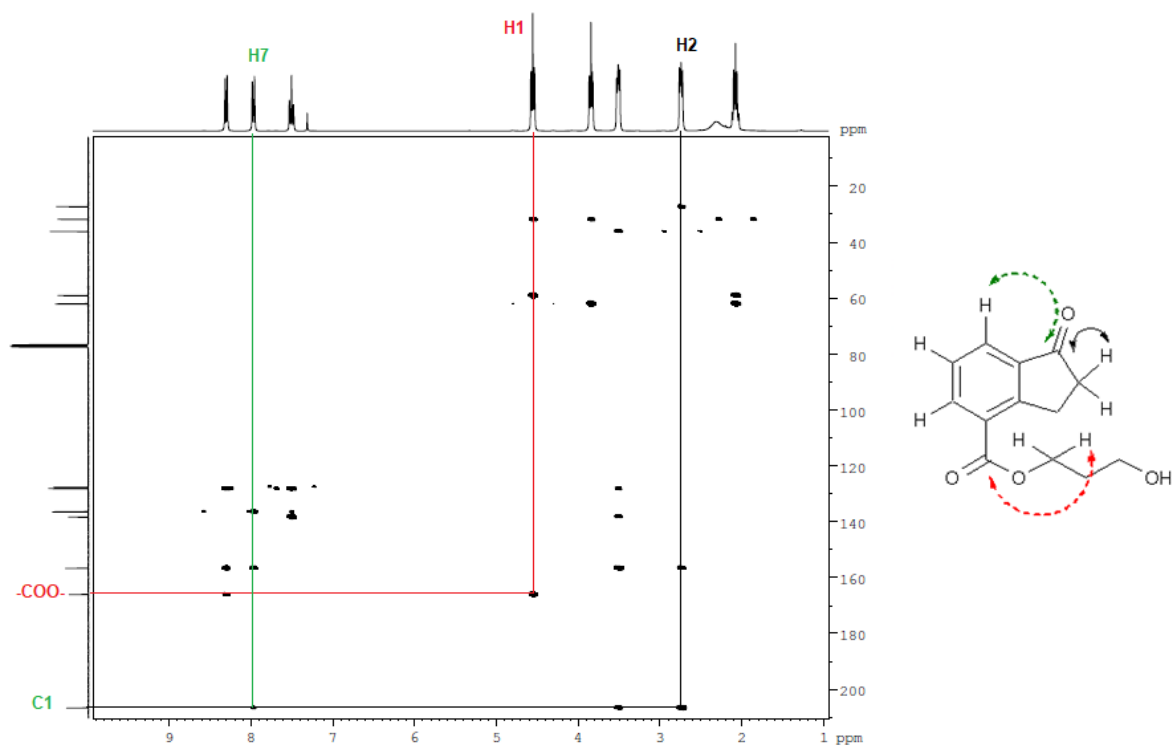


Figura 3-31. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.7

3.1.5. 1-hidroxi-indanol-L-isoleucina metil éster (2.8)

Este compuesto se aisló como un sólido fino de color blanco, con un rendimiento del 52 % y un R_f 0.38 (*n*-hex:AcOEt, 7:3). El compuesto reveló con tonalidad amarilla pálida en TLC haciendo uso de revelador universal, posterior a un leve calentamiento. El espectro IR (**Figura 3-33**) del compuesto mostró la banda 3313 cm^{-1} característica del estiramiento O-H, la cual se solapa con la banda a 3278 cm^{-1} característica de la tensión N-H. También se observó la banda en 1633 cm^{-1} correspondiente a la tensión C=O del carbonilo del grupo amida, y la banda en 1716 cm^{-1} de la tensión del enlace C=O del grupo éster. El derivado sintetizado se confirmó en ^1H RMN (**Figura 3-34**) por la presencia de los protones H5' y H6', que aparecen como un multiplete intenso a δ 1.0 ppm integrando para 6 hidrógenos; entre δ 1.25-1.52 ppm aparecen los protones en C4' (-CH₂-), los cuales son diasterotópicos, desdoblándose en dos señales; en δ 2.51 ppm aparece el protón H3' (CH) y en δ 2.69 ppm la señal para el grupo hidroxilo (-OH); por otro lado, en δ 2.03 ppm aparecen los protones en C2 (-CH₂-), mientras en δ 3.03 y 3.26 ppm aparecen los protones en C3 (-CH₂-); adicionalmente en δ 3.80 ppm aparece el grupo -OCH₃ como un singlete intenso y en δ 4.82 ppm se resonó el protón H2', mientras el protón H1 se observó en δ 5.23 ppm como un singlete. El protón del grupo amino se detectó en δ 6.59 ppm (-NH). A campo bajo, en la región aromática, se observaron señales que integraron para tres protones (un sistema ABC (δ 7.30, $J = 6\text{ Hz}$ para H6, δ 7.55, $J = 7.5\text{ Hz}$ para H7, δ 7.57, $J = 7.5\text{ Hz}$ para H5) confirmando el anillo trisustituido. El espectro ^{13}C RMN (**Figura 3-35**, **Figura 3-36**) reveló la presencia de diecisiete señales asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC y DEPT: δ 11.6 (CH₃, C5'), 15.6 (CH₃, C6'), 25.3 (CH₂, C4'), 29.9 (CH₂, C3), 35.8 (CH₂, C2), 38.2 (CH, C3'), 52.3 (-OCH₃), 56.7 (CH, C2'), 75.7 (CH, C1). A campo bajo se observan 3 carbonos metínicos (-CH-) a δ 127.14 (CH, C7), 127.17 (CH, C6), 131.5 (CH, C5), y 2 carbonos cuaternarios a δ 142.1 (C4), 146.8 (C3a). Asimismo, se observan las señales de los grupos carbonilos en δ 168.0 y 172.7 correspondientes al grupo éster amida y éster (-O-C=O, C1').

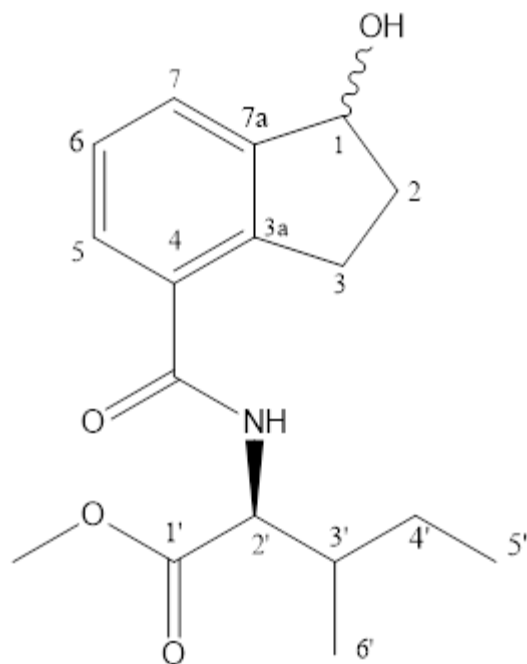


Figura 3-32. Estructura del compuesto 2.8

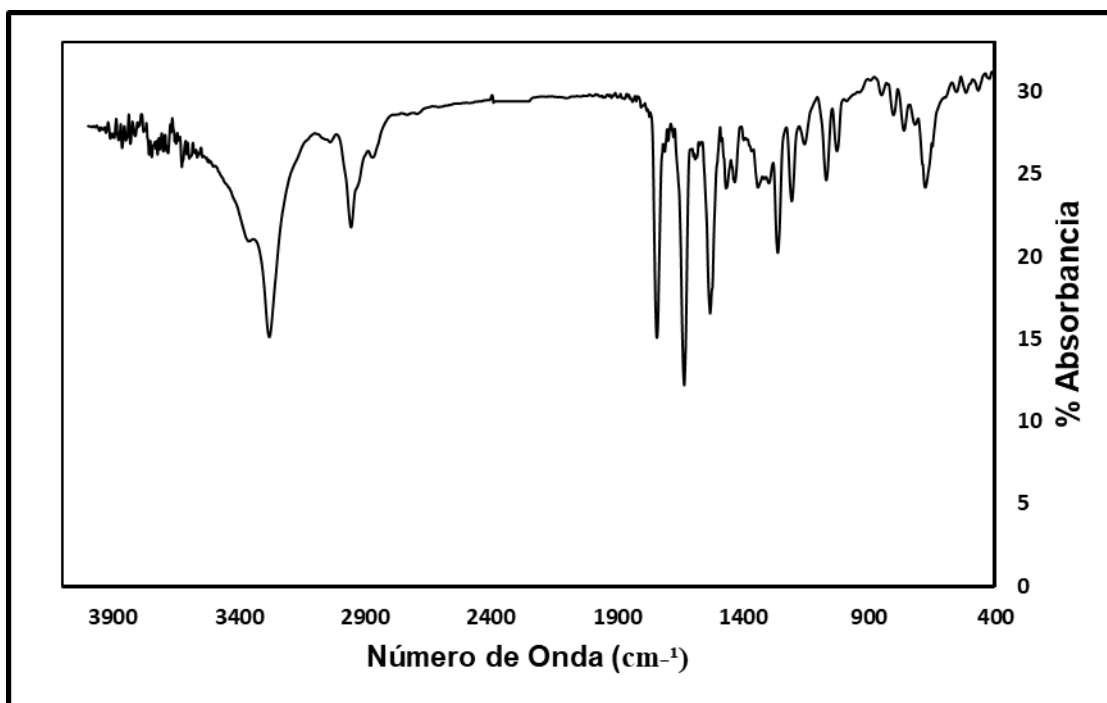


Figura 3-33. Espectro IR del compuesto 2.8

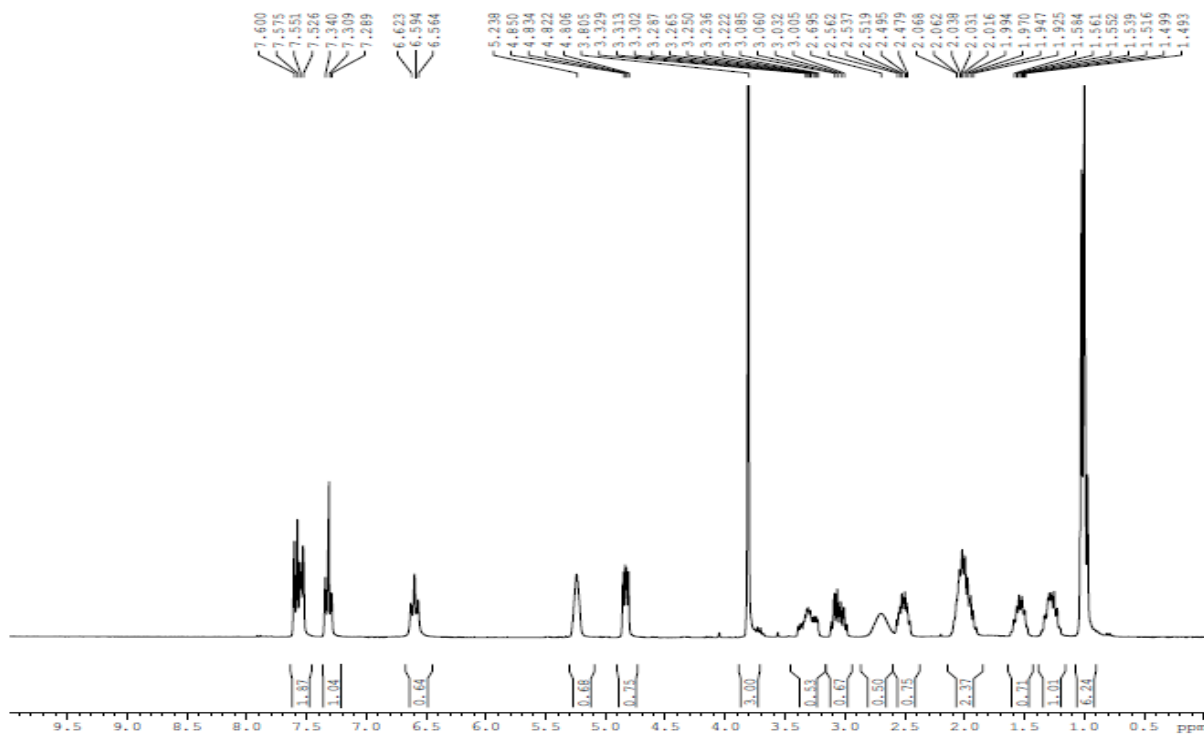


Figura 3-34. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.8

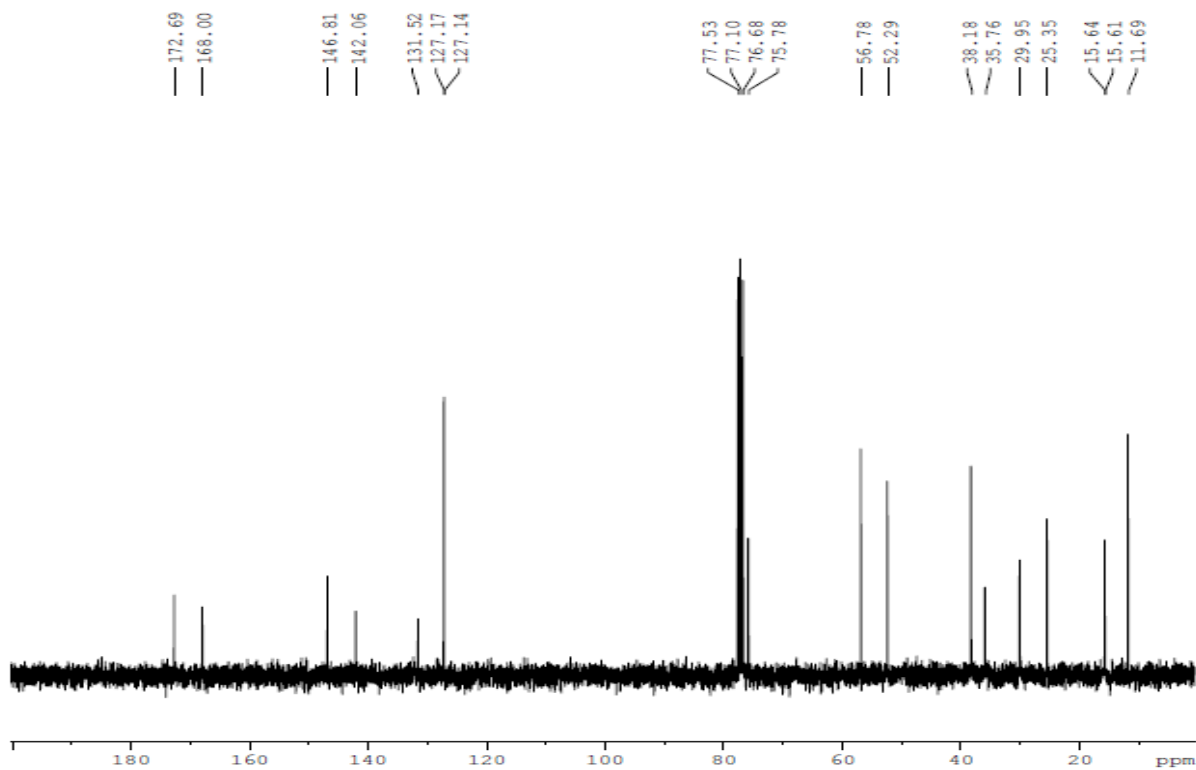


Figura 3-35. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.8

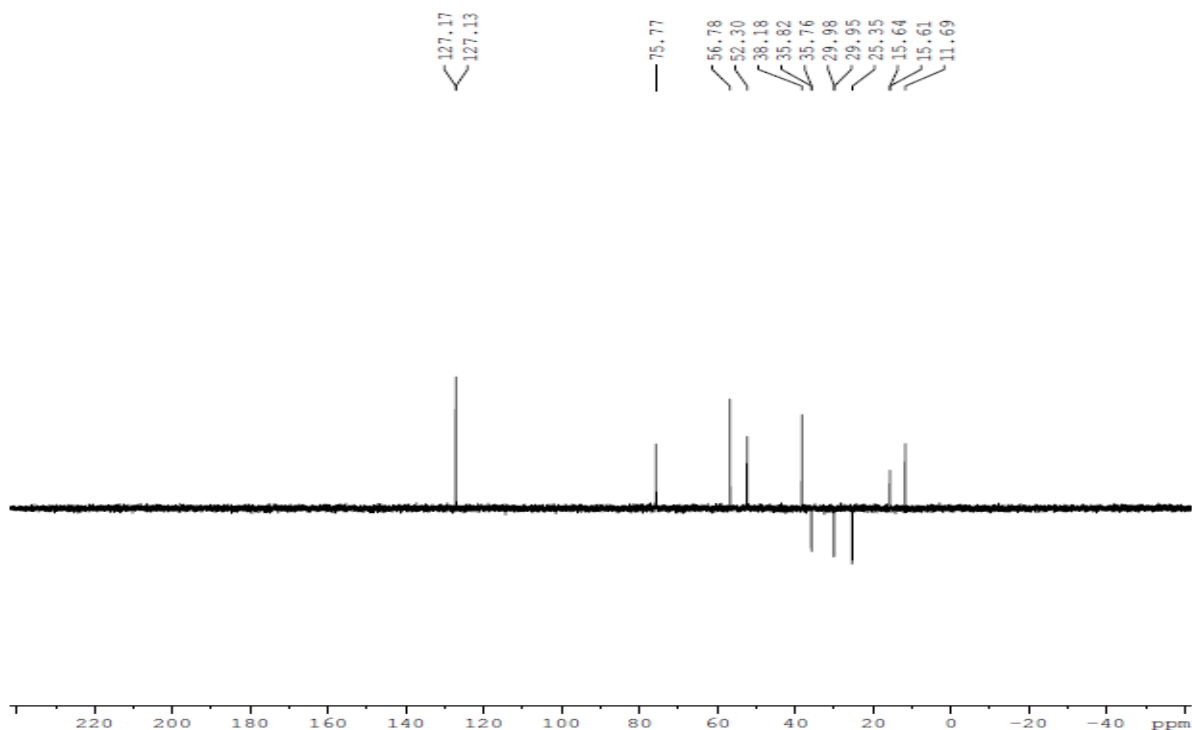


Figura 3-36. Espectro DEPT del compuesto **2.8**

3.1.6. N-(3-(dimetilamino)propil)-1-oxo-indano-4-carboxamida (**2.9**)

Este compuesto se aisló como un sólido transparente de tonalidad morada con un rendimiento en la reacción de condensación de la amina del 22 % y un Rf 0.29 (DCM: MeOH, 8:2). El compuesto reveló en TLC con tonalidad roja con el revelador de Dragendorff y amarilla con el revelador universal, posterior a un leve calentamiento. El derivado sintetizado se confirmó en ^1H RMN (**Figura 3-38**) por la presencia de los protones H4' y H5', que aparecen como un singlete intenso en δ 2.42 ppm que integra para 6 hidrógenos enlazados a los carbonos sustituyentes de la amina alquílica; a desplazamientos químicos mayores se observan los protones H2', H3' y H1' de la cadena alquílica que aparecen en δ 1.93, 2.67 y 3.62 ppm como un multiplete, triplete y doblete, respectivamente. Asimismo, los protones de la ciclopentanona H3 y H2 aparecen como un multiplete en δ 2.75 ppm y 3.52 ppm, cada uno integrando para 2 hidrógenos; adicionalmente en δ 8.39 ppm aparece la señal para el protón del grupo amida (-NHCO-). En la región aromática se observaron señales que integraron para tres protones (sistema AB₂: δ 7.48, J = 7.5 Hz para H6, δ 7.88, J = 8.1 Hz para H7 y H5), confirmando el anillo trisustituido. El espectro ^{13}C RMN (**Figura 3-39**, **Figura 3-40**) reveló la presencia de quince señales asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC (**Figura 3-42**) y DEPT: δ 26.32 (CH₂, C2), 34.0 (CH₂, C2'), 36.3 (CH₂, C3), 39.8 (CH₂, C1'), 45.0 (2 CH₃, C4' y C5'), 58.6

(CH₂, C3'), 126.1 (CH, C7), 127.6 (CH, C6), 132.4 (CH, C5), 133.3 (C4), 138.3 (C7a) y 154.7 (C3a). Asimismo, se observan las señales de los grupos carbonilos en δ 167.0 (-NHCO-) y δ 207.0 (C=O, C1). Mientras el espectro ¹H-¹³C HMBC (**Figura 3-44**) muestra una correlación a larga distancia entre el protón del C1' y el carbono carbonílico de la amida; además, se observa la correlación a larga distancia entre los protones C2 y C3 con el carbono del grupo carbonílico de la ciclopentanona.

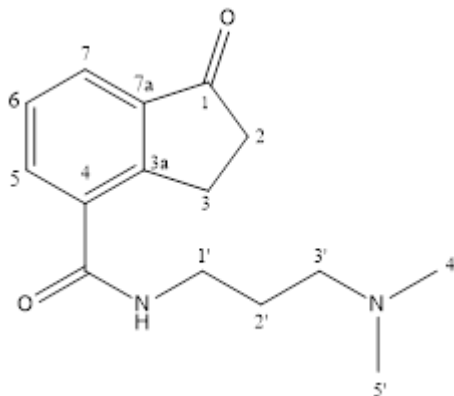


Figura 3-37. Estructura del compuesto **2.9**

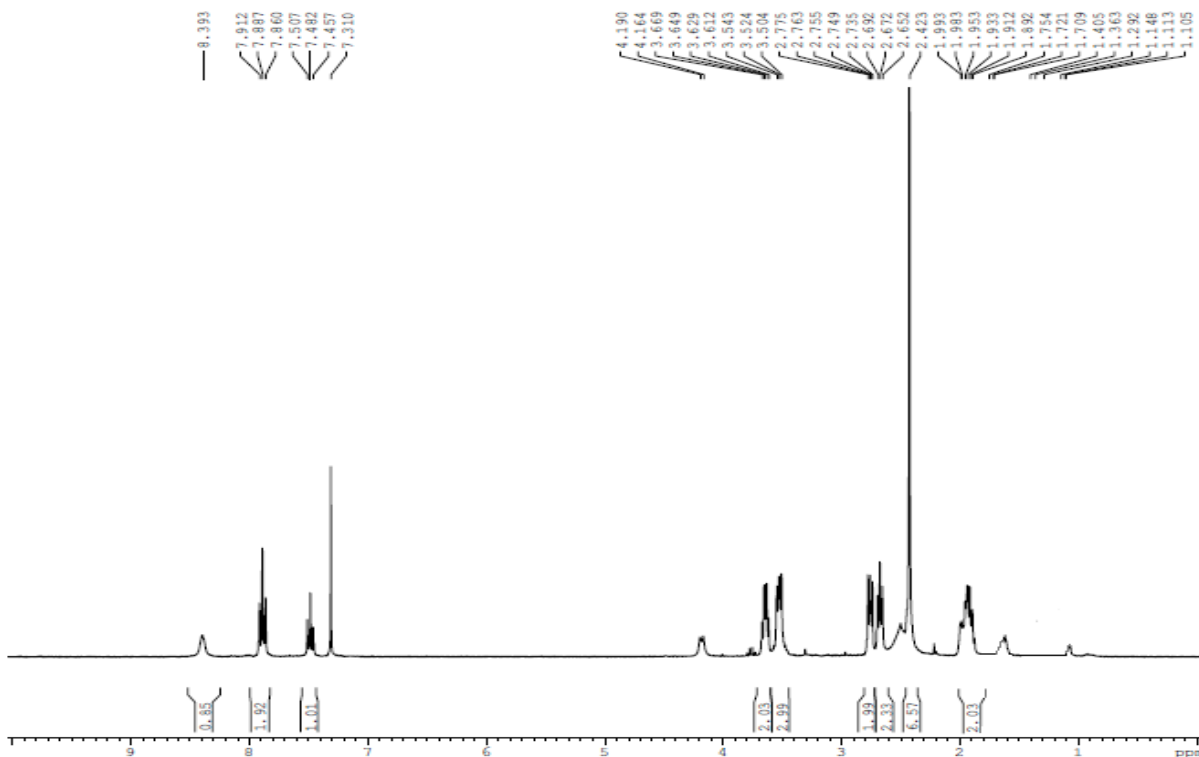


Figura 3-38. Espectro de ¹H RMN del compuesto **2.9**

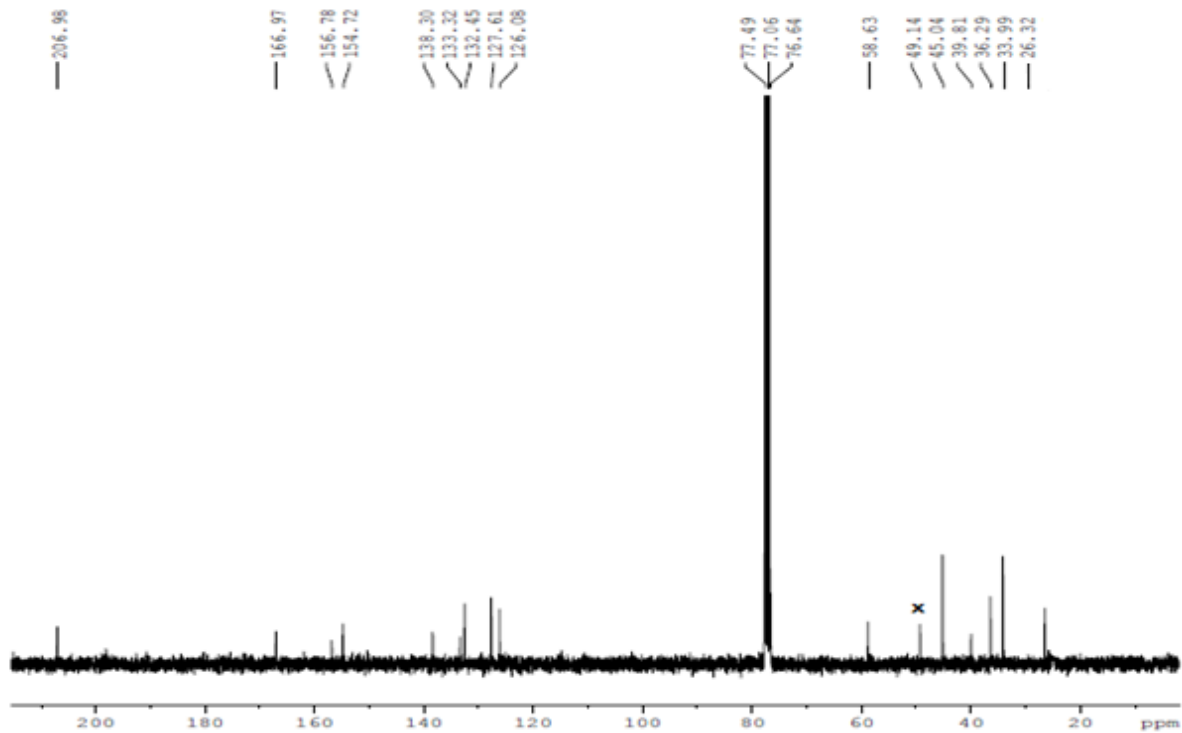


Figura 3-39. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.9

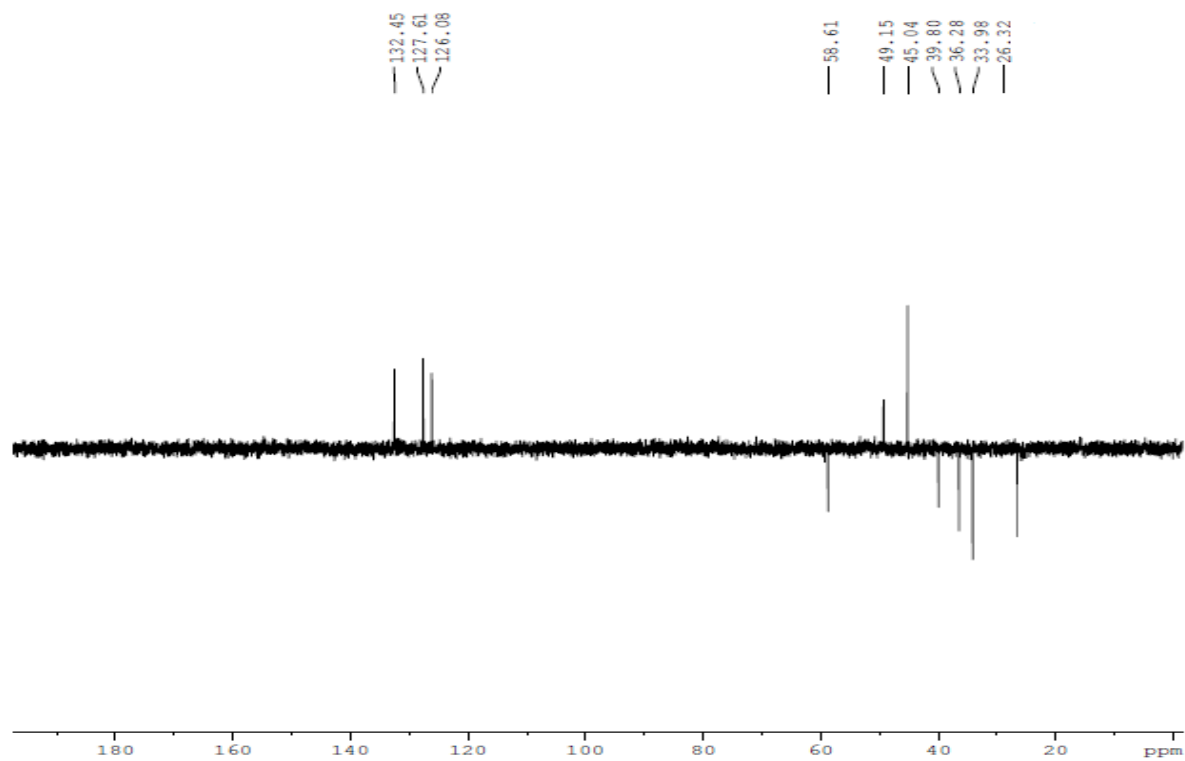


Figura 3-40. Espectro DEPT del compuesto 2.9

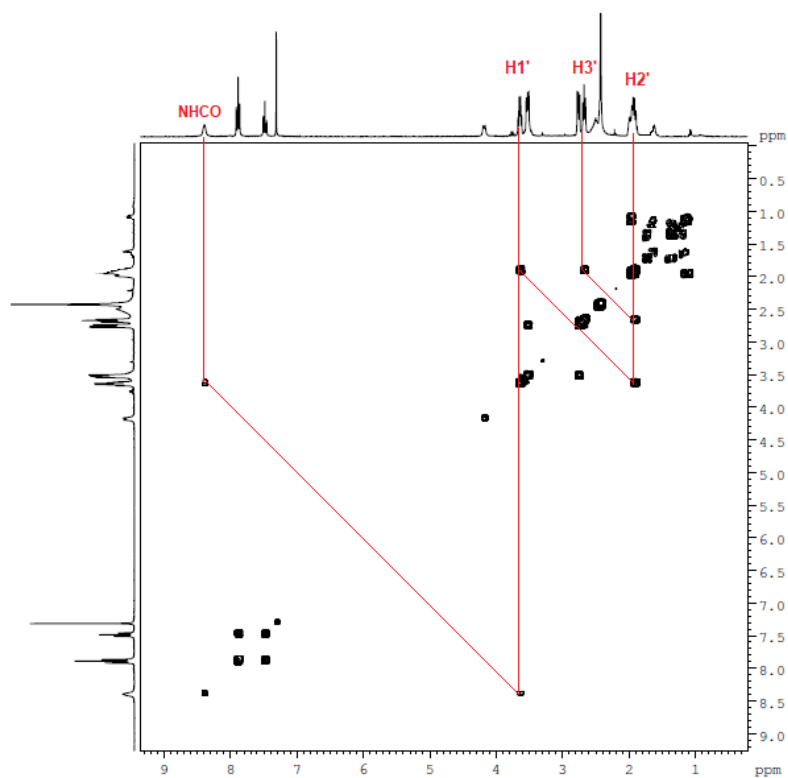


Figura 3-41. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.9

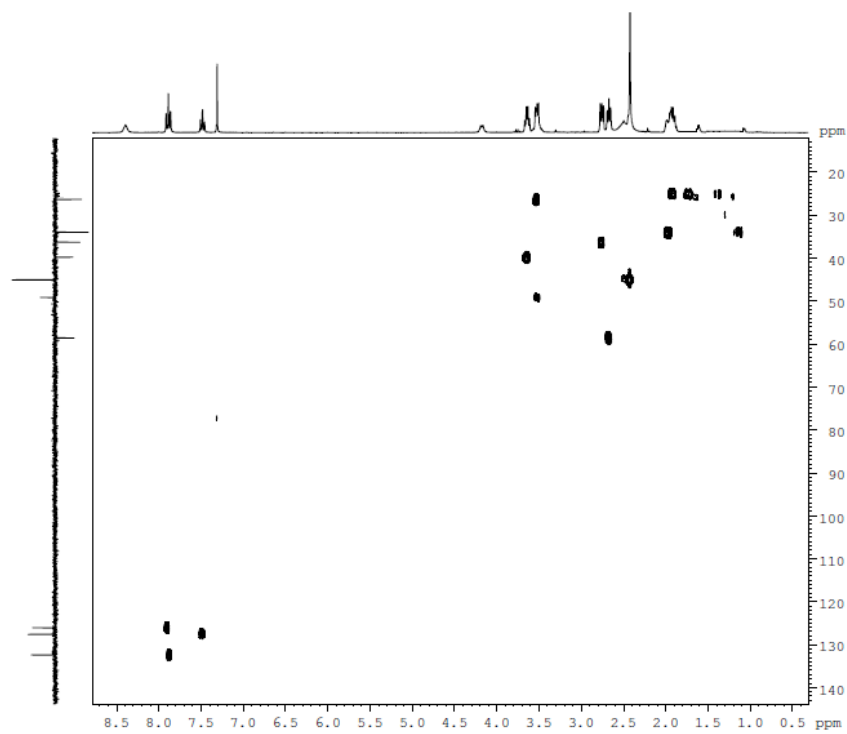


Figura 3-42. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC del compuesto 2.9

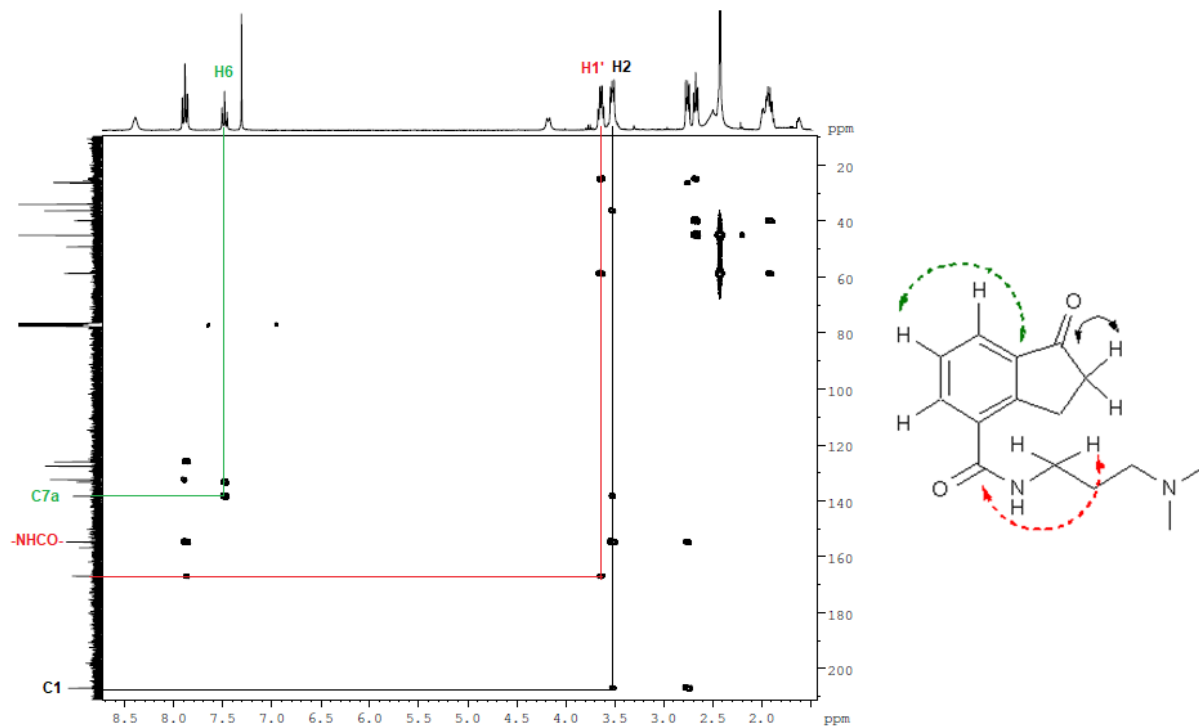


Figura 3-43. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto **2.9**

3.1.7. N-(3-(dietilamino)propil)-1-oxo-indano-4-carboxamida (**2.10**)

El compuesto se aisló como un sólido transparente de tonalidad morada con un rendimiento en la reacción de condensación de la amina del 35 % y un R_f 0.37 (DCM:MeOH, 8:2). El compuesto reveló en TLC con tonalidad roja con revelador de Dragendorff, y amarilla con revelador universal posterior a un leve calentamiento. El derivado sintetizado se confirmó en ^1H RMN (**Figura 3-45**) por la presencia de los protones $\text{H}5'$ y $\text{H}7'$, que aparecen como un triplete en δ 1.09 ppm que integra para 6 hidrógenos enlazados a la cadena de carbonos sustituyentes de la amina alquílica; luego se observan los protones en $\text{C}4'$ y $\text{C}6'$ (CH_2) enlazados a los carbonos sustituyentes de la amina alquílica que aparecen entre δ 2.62 y 2.66 ppm. Los protones en $\text{C}2$ y $\text{C}3$ en el anillo ciclopentanona aparecen en δ 2.69 ppm y 3.37 ppm, respectivamente. Los protones $\text{H}2'$ de la cadena alquílica aparecen en δ 1.84 ppm y a campos más bajos, por su cercanía con un átomo de nitrógeno, los protones $\text{H}3'$ y $\text{H}1'$ en δ 3.32 y 3.44 ppm, respectivamente. A campos bajos, en la región aromática, se observaron señales que integraron para tres protones confirmando el anillo trisustituido. El espectro ^{13}C RMN (**Figura 3-46**, **Figura 3-47**) reveló la presencia de diecisiete señales asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC y DEPT: δ 9.7 (CH_3 , $\text{C}5'$ y $\text{C}7'$), 25.2 (CH_2 , $\text{C}2'$, $\text{C}3'$), 25.5 (CH_2 , $\text{C}3$), 37.9 (CH_2 , $\text{C}1'$), 46.32 (CH_2 , $\text{C}4'$ y $\text{C}6'$), 49.9 (CH_2 , $\text{C}2$), 125.3 (CH , $\text{C}7$), 127.4 (CH ,

C6), 132.7 (CH, C5), 133.9 (C4), 137.7 (C7a), 154.3 (C3a), 168.6 (-NHCO-) y 207.7 (C=O, C1). Mientras el espectro ^1H - ^{13}C HMBC (Figura 3-50) muestra una correlación a larga distancia entre el protón en C1' y el carbono carbonílico de la amida; además, se observa la correlación a larga distancia entre los protones en C3 con el carbono del grupo carbonilo del anillo ciclopentanona.

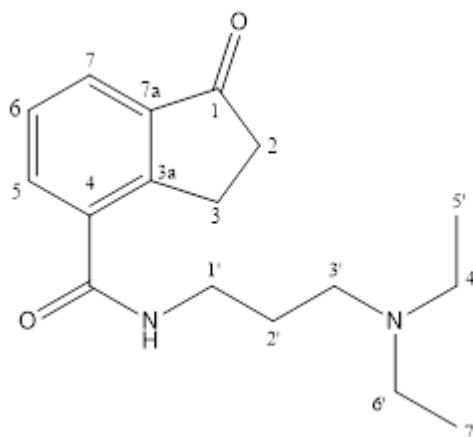


Figura 3.44. Estructura del compuesto 2.10

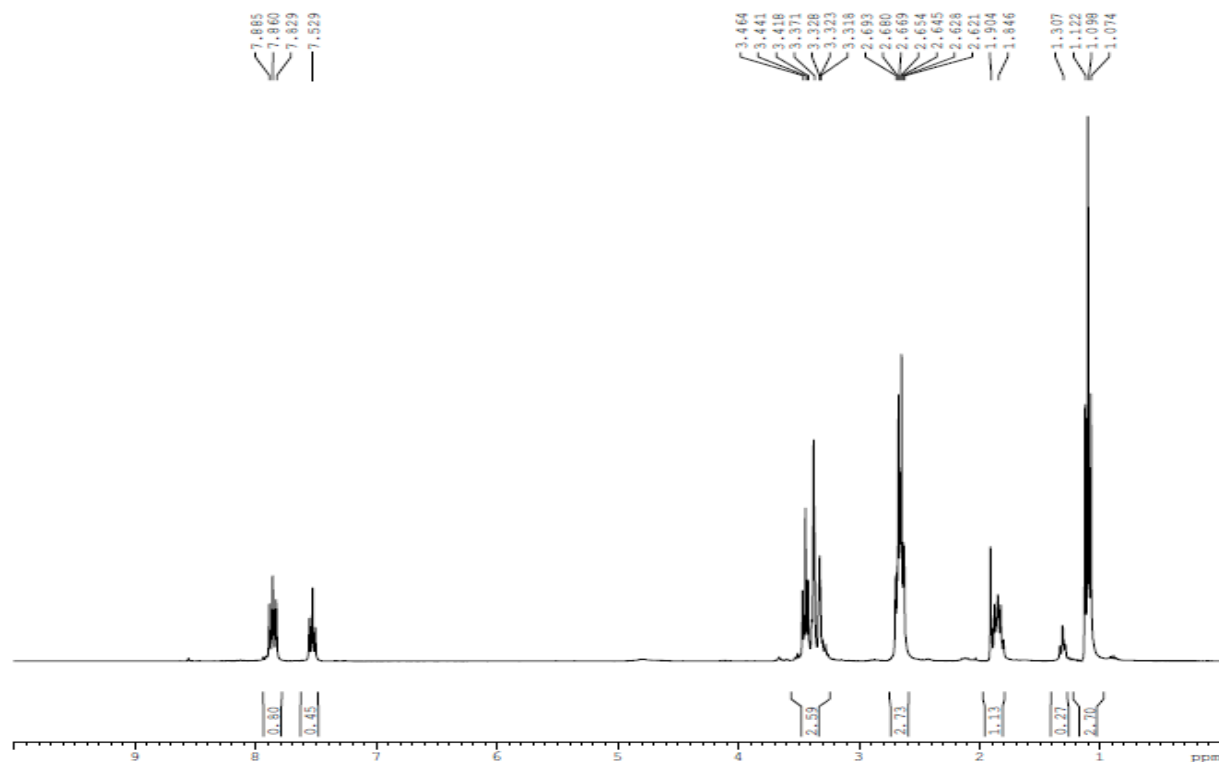


Figura 3-45. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.10

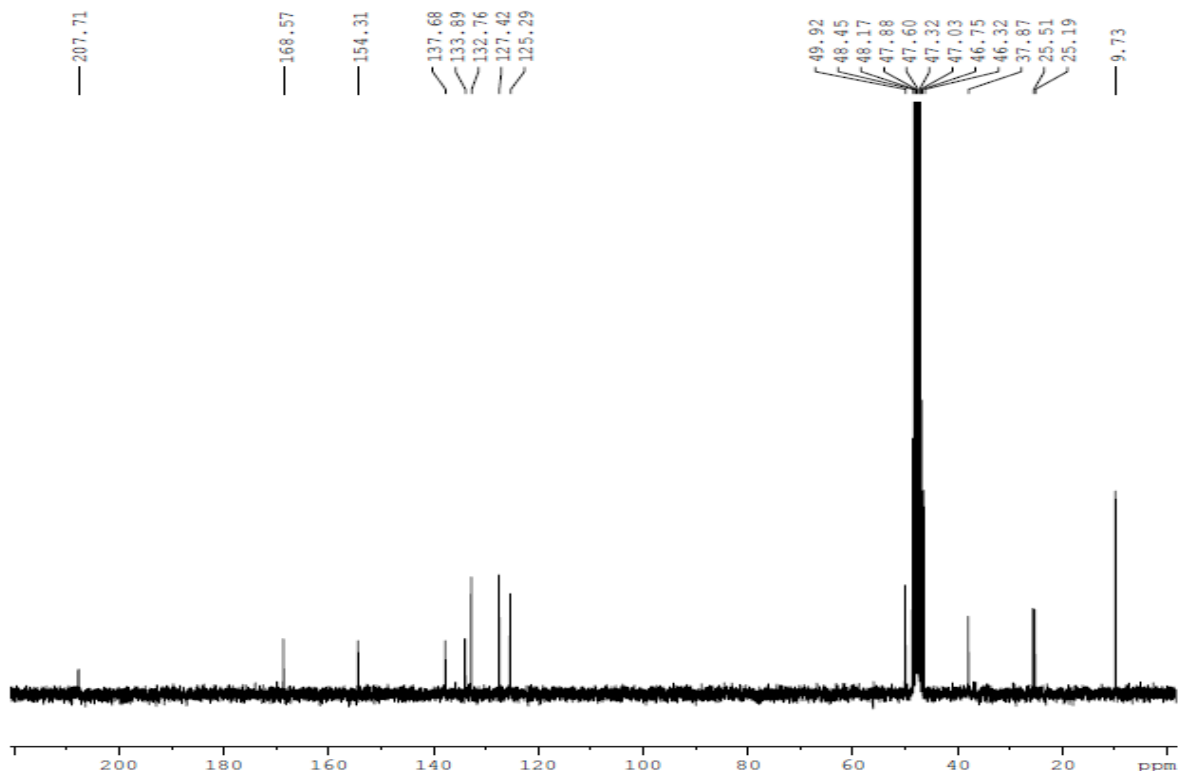


Figura 3-46. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.10

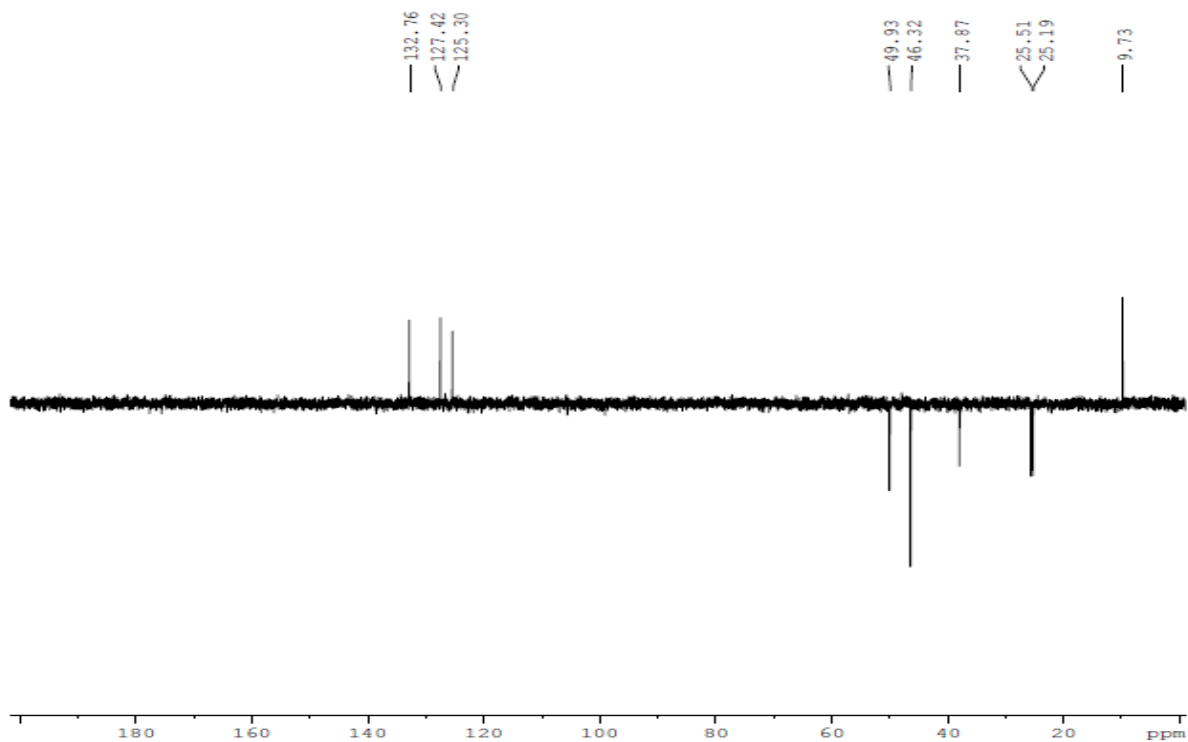


Figura 3-47. Espectro DEPT del compuesto 2.10

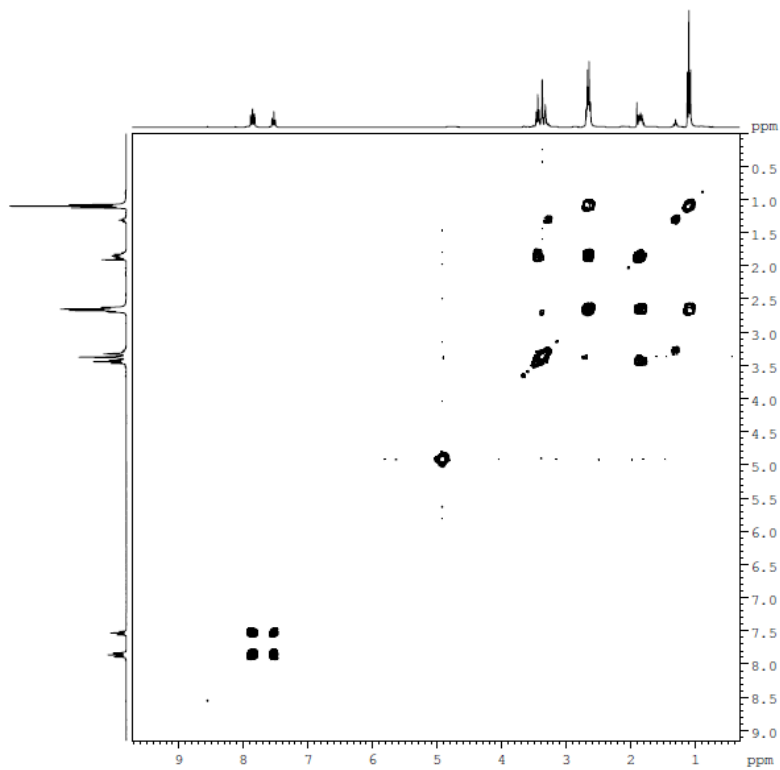


Figura 3-48. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.10

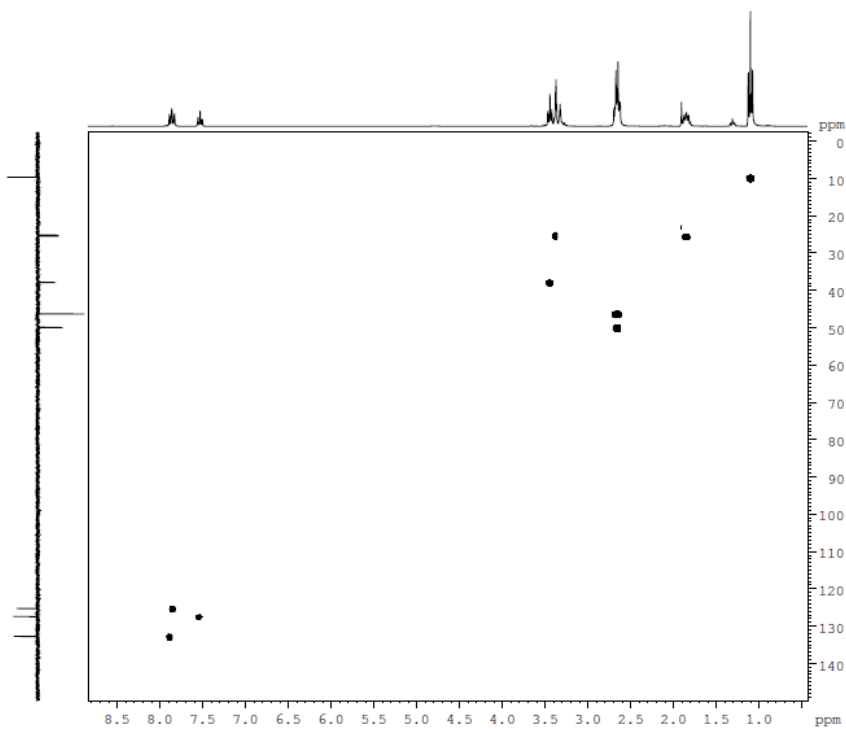


Figura 3-49. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC del compuesto 2.10

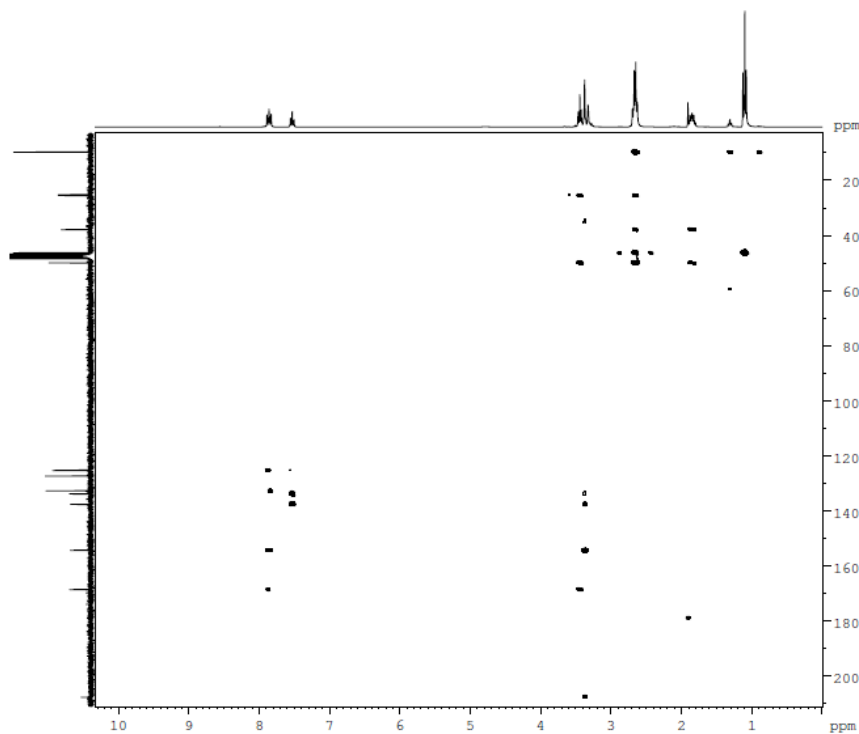


Figura 3-50. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto **2.10**

3.1.8. 2-(3'-bromobencilideno)-1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (**2.11**)

El compuesto se aisló como un sólido fino de color blanco con un rendimiento en la condensación aldólica de 33.2 % y un R_f 0.46 (n -hex:AcOEt, 7:3). Reveló como una banda de color amarillo por aspersion de la cromatoplaca con revelador universal. El derivado se confirmó en ^1H RMN (**Figura 3.52**): los protones $\text{H}5'$ y $\text{H}6'$, aparecen como un multiplete intenso a δ 1.05 ppm que integra para 6 hidrógenos; entre δ 1-10 y 1.98 ppm aparecen los protones diasterotópicos en $\text{C}4'$; en δ 3.51 ppm se observan la señal del protón $\text{H}3'$. El grupo $-\text{OCH}_3$ del éster del aminoácido, aparece como un singlete intenso en δ 3.89 ppm. Los protones en $\text{C}3$ se observan en δ 4.36 ppm como un multiplete que integra para 2 hidrógenos, mientras, los protones $\text{H}2'$ aparecen en δ 4.92 ppm; asimismo el protón del grupo amino se observa en δ 6.73 ppm. El experimento de correlación ^1H - ^1H COSY (**Figura 3-55**) muestra el acoplamiento entre el protón del grupo amino y $\text{H}2'$. Los protones del anillo aromático de la indanona muestran el sistema trisustituido (δ 7.41, $J = 8.1$ Hz para $\text{H}7$, δ 7.84, para $\text{H}5$ y δ 8.07, $J = 7.5$ Hz para $\text{H}6$). Este patrón de sustitución se confirmó por los experimentos de correlación ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC (**Figura 3-56**) y ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 3-57**). El anillo bencilideno mostró un patrón de *meta*-disustitución, observándose los protones $\text{H}2''$ en δ 7.56

ppm, H6'' en δ 7.61 ppm, H5'' en δ 7.71 ppm, y H4'' en δ 7.95 ppm. Es importante mencionar que el desplazamiento químico del protón Ha que aparece en δ 7.64 ppm, permitió deducir que configuración del doble enlace C-C en el derivado como *E*, ya que el protón Ha al estar cercano al grupo carbonilo presenta un desplazamiento a campos más bajos, resonando en la zona aromática, lejos de la zona a la que normalmente absorben los protones vinílicos. El espectro ^{13}C RMN (**Figura 3-53**, **Figura 3-54**) reveló la presencia de 24 señales asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC y DEPT: δ 11.7 (CH₃, C5'), 15.7(CH₃, C6'), 33.9 (CH₂, C3), 35.6 (CH₂, C4'), 49.2 (CH, C3'), 53.0 (-OCH₃), 56.9 (CH, C2'), 127.3 (CH, C6), 128.2 (CH, C6''), 128.9 (CH, C5''), 130.5 (CH, C7), 132.5 (CH, C4''), 132.7 (CH, C2''), 133.8 (CH, C5), 133.1 (=CH, Ca), 123.1 (C3''), 135.4 (C4), 137.2 (C1''), 148.9 (C7a), 156.8 (C3a), 166.6 (-CONH), 172.5 (-COO-, C1') y δ 193.5 (C=O, C1). Igualmente, en el espectro ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 3-58**) se muestra una correlación a larga distancia entre el protón en Ca y el carbono carbonílico de la ciclopentanona y correlaciones entre H3 con C7a y C4.

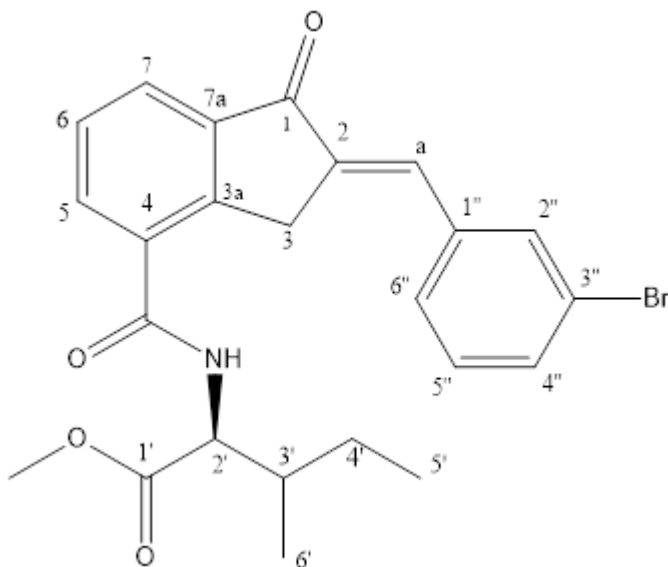
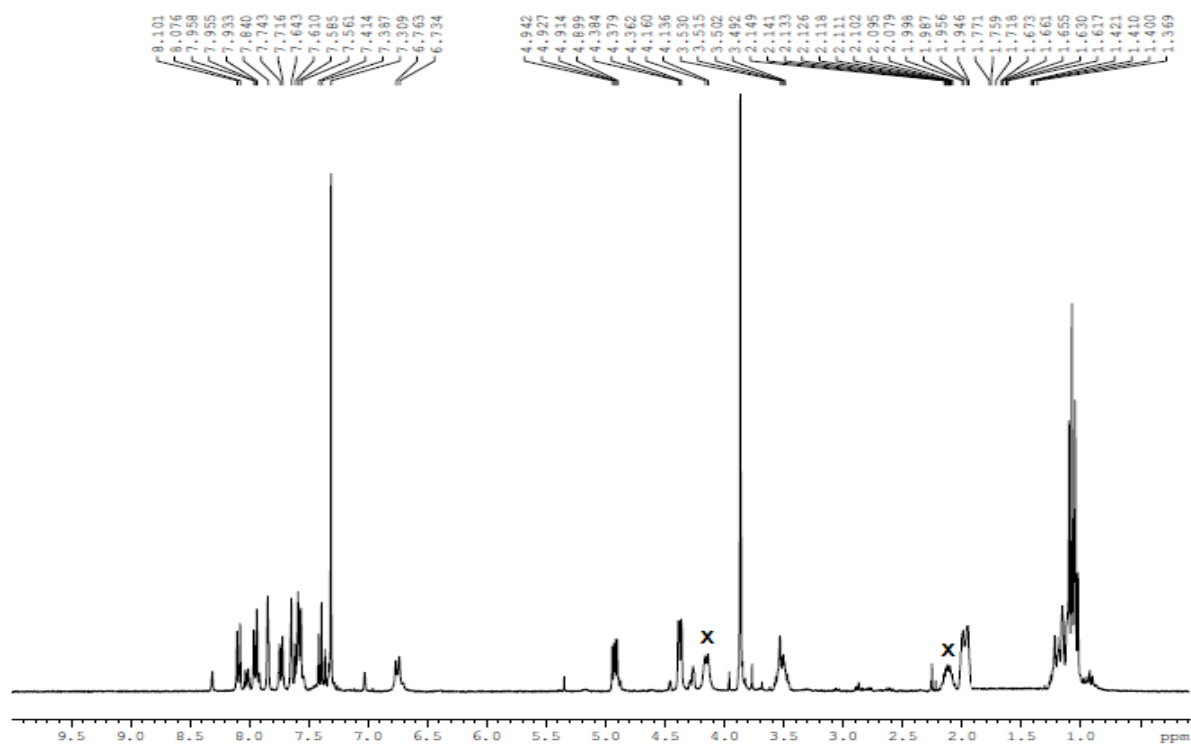
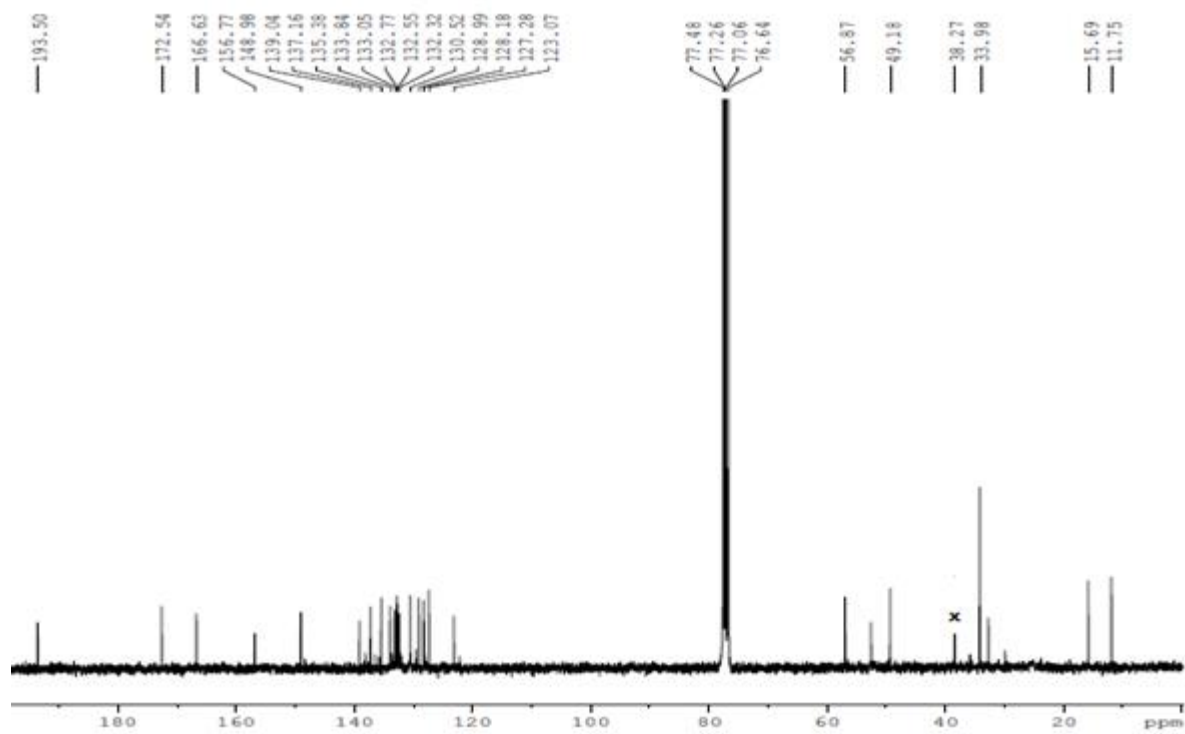


Figura 3-51. Estructura del compuesto **2.11**

Figura 3-52. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.11Figura 3-53. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.11

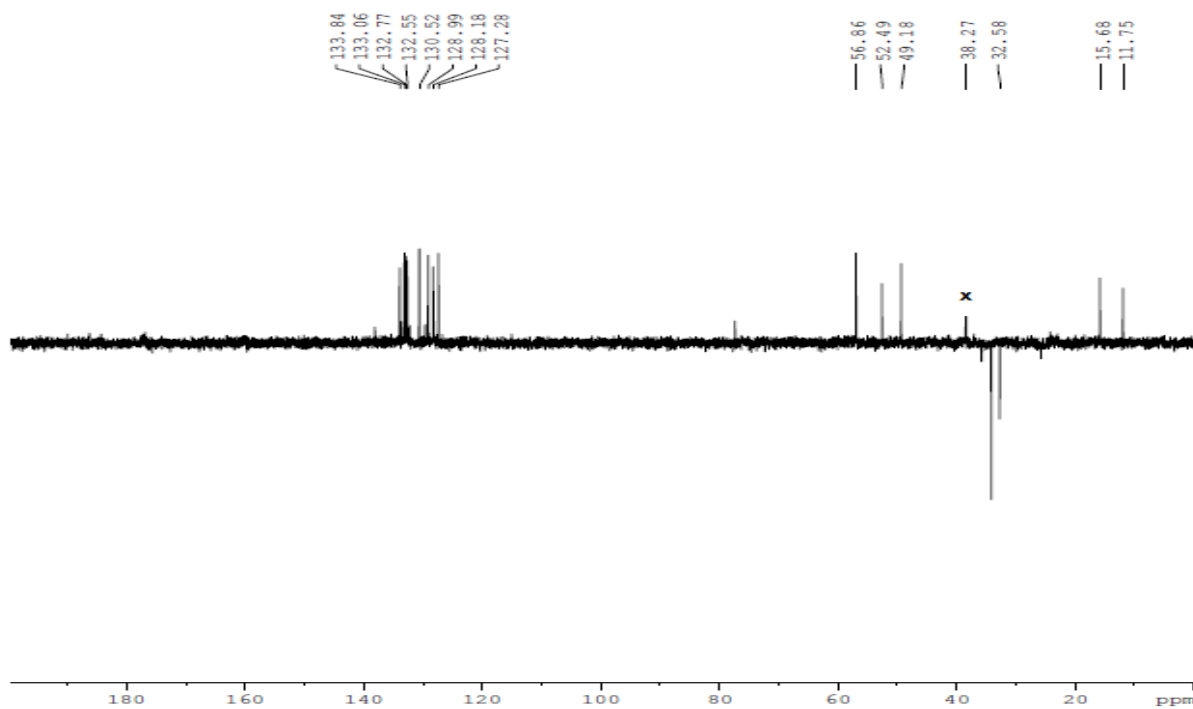


Figura 3-54. Espectro DEPT del compuesto 2.11

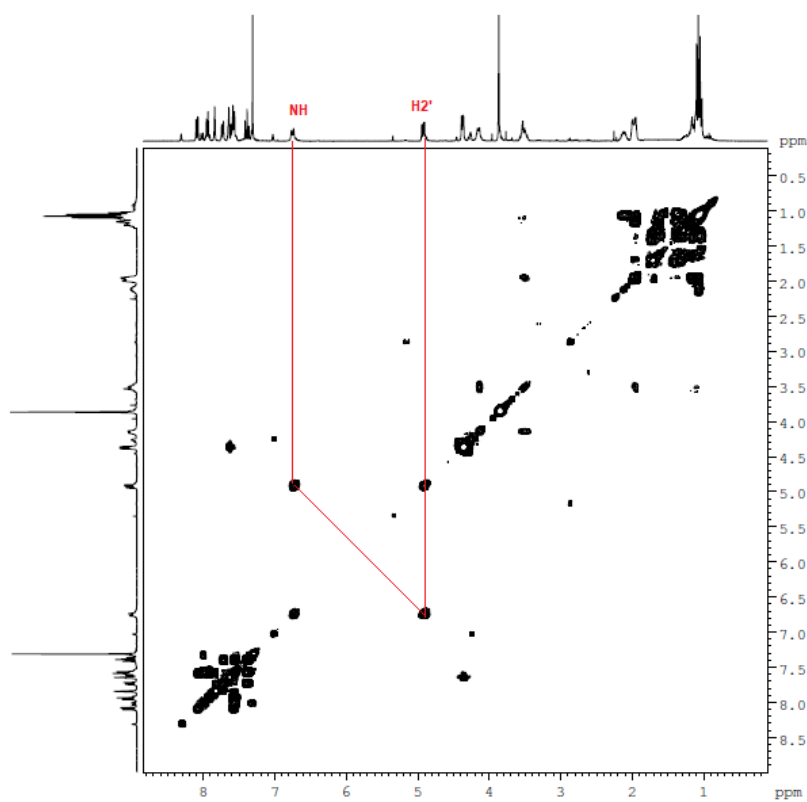


Figura 3-55. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.11

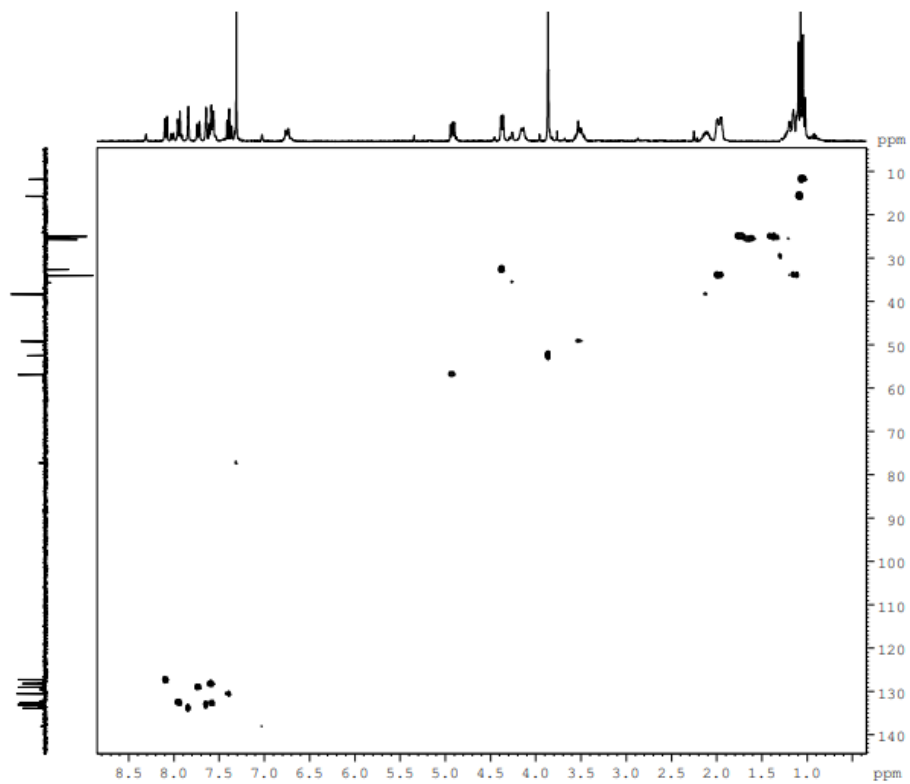


Figura 3-56. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.11

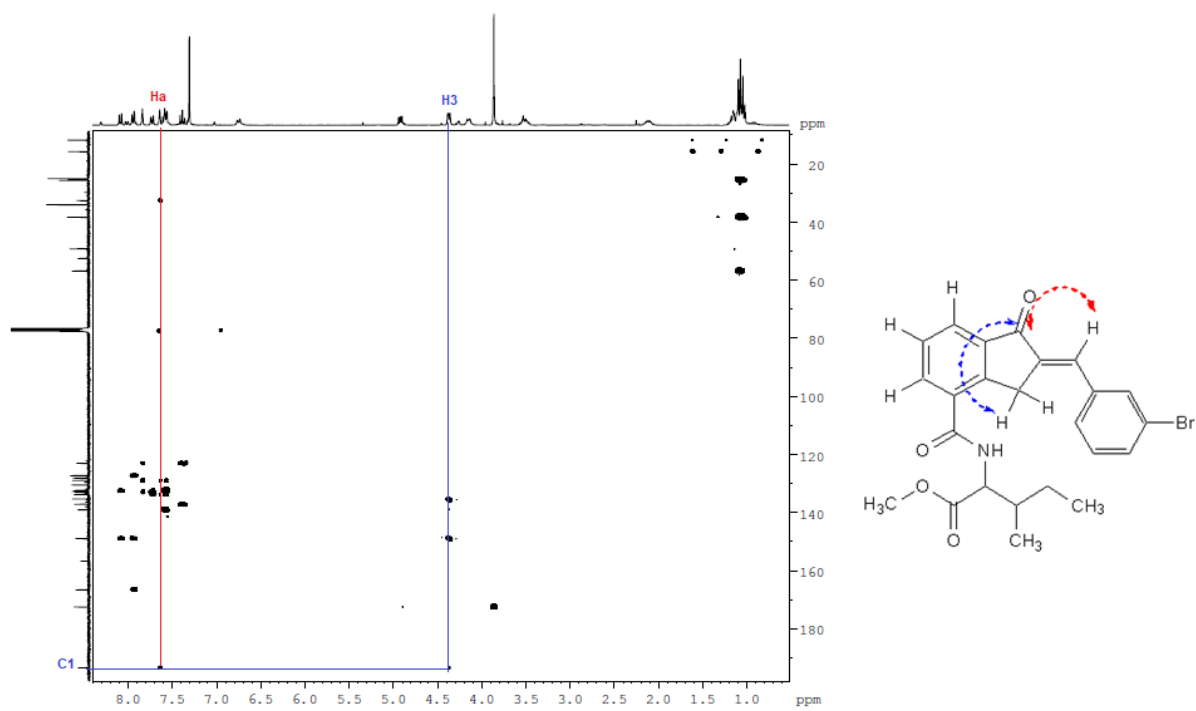


Figura 3-57. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.11

3.1.9. 1-bencilhidrazono-indanoil-L-isoileucina metil éster (2.12)

El compuesto se aisló como un sólido fino de color blanco con un rendimiento en la reacción de adición nucleofílica de 37 % y un R_f 0.39 (*n*-hex:AcOEt, 7:3). El producto reveló como una banda de color amarillo luego de la aspersion de la cromatoplaça con revelador universal. El derivado sintetizado se confirmó en ^1H RMN (**Figura 3-59**) por la presencia de los protones H5' y H6', que aparece como un multiplete intenso a δ 1.05 ppm que integra para 6 hidrógenos; entre δ 1.31 y 1.61 ppm aparecen los protones diasterotópicos en C4'; en δ 2.0-2.05 ppm se observa el protón H3'. A campos más bajos, aparecen los protones H2 y H3 en δ 3.03-3.07 ppm; en δ 3.36 ppm aparece el protón Ha como un singlete intenso. Asimismo, en δ 3.78 ppm aparece un singlete intenso característico del grupo $-\text{OCH}_3$ del éster de los aminoácidos; los protones H2' aparecen en δ 4.58 ppm. En la región aromática se observan las señales de los protones aromáticos (δ 7.43, $J = 7.5$ Hz para H6, δ 7.68, $J = 7.5$ Hz, para H5 y δ 8.14, $J = 7.8$ Hz para H6) del núcleo indanoil. El patrón de sustitución trisustituido se confirmó por los experimentos de correlación ^1H - ^1H COSY (**Figura 3-62**), ^1H - ^{13}C HSQC (**Figura 3-63**) y ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 3-64**). El anillo proveniente de la bencil hidrazina, monosustituido, se determinó por los protones H3'' y H5'' entre δ 7.48-7.56 ppm, H4'' en δ 7.60 ppm, H2'' y H6'' en δ 7.91 ppm. El espectro ^{13}C RMN (**Figura 3-61**, **Figura 3-62**) reveló la presencia de 24 señales asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC y DEPT: δ 10.2 (CH_3 , C5'), 14.7 (CH_3 , C6'), 25.3 (CH_2 , C4'), 27.0 (CH_2 , C2), 28.1 (CH_2 , C3), 36.7 (CH , C3'), 48.5 (CH_2 , Ca), 51.2 ($-\text{OCH}_3$), 57.4 (CH , C2'), 124.8 (CH , C7), 127.2 (CH , C6), 127.5 (2 CH , C3'' y C5''), 128.3 (2 CH , C2'' y C6''), 129.7 (CH , C5), 131.8 (CH , C4''), 132.5 (C4), 133.1 (C3a), 138.6 (C7a), 147.9 (C1''), 164.7 (C=N), 169.6 ($-\text{CONH}$), y 172.4 ($-\text{O}-\text{C}=\text{O}$, C1'). El espectro ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 3-65**) muestra una correlación a larga distancia entre el protón en H2 y C1; además, correlaciones entre H7 con C5, H6 con C7a, Ha con C1'', H2'' y H6'' con C4 y H3'' y H5'' con C4''. Adicionalmente se observa una correlación a la larga distancia entre H2' y el carbono del grupo amida.

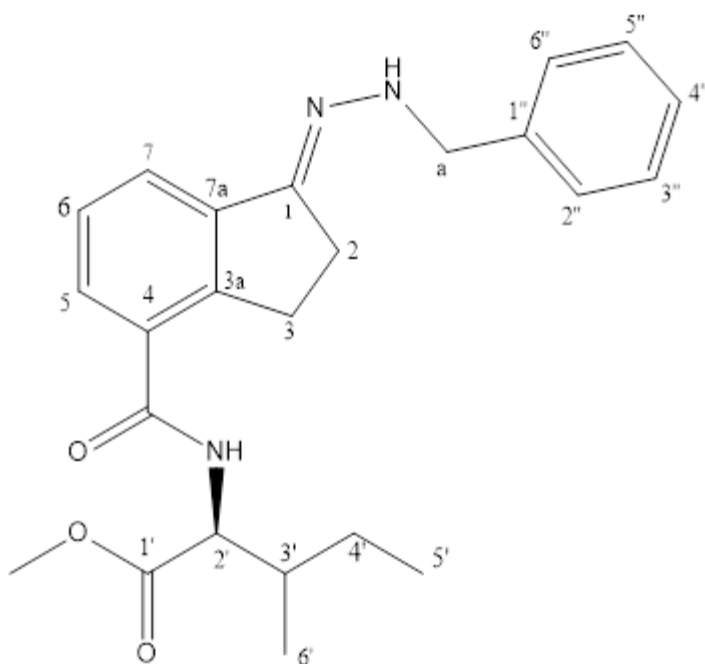


Figura 3-58. Estructura del compuesto 2.12

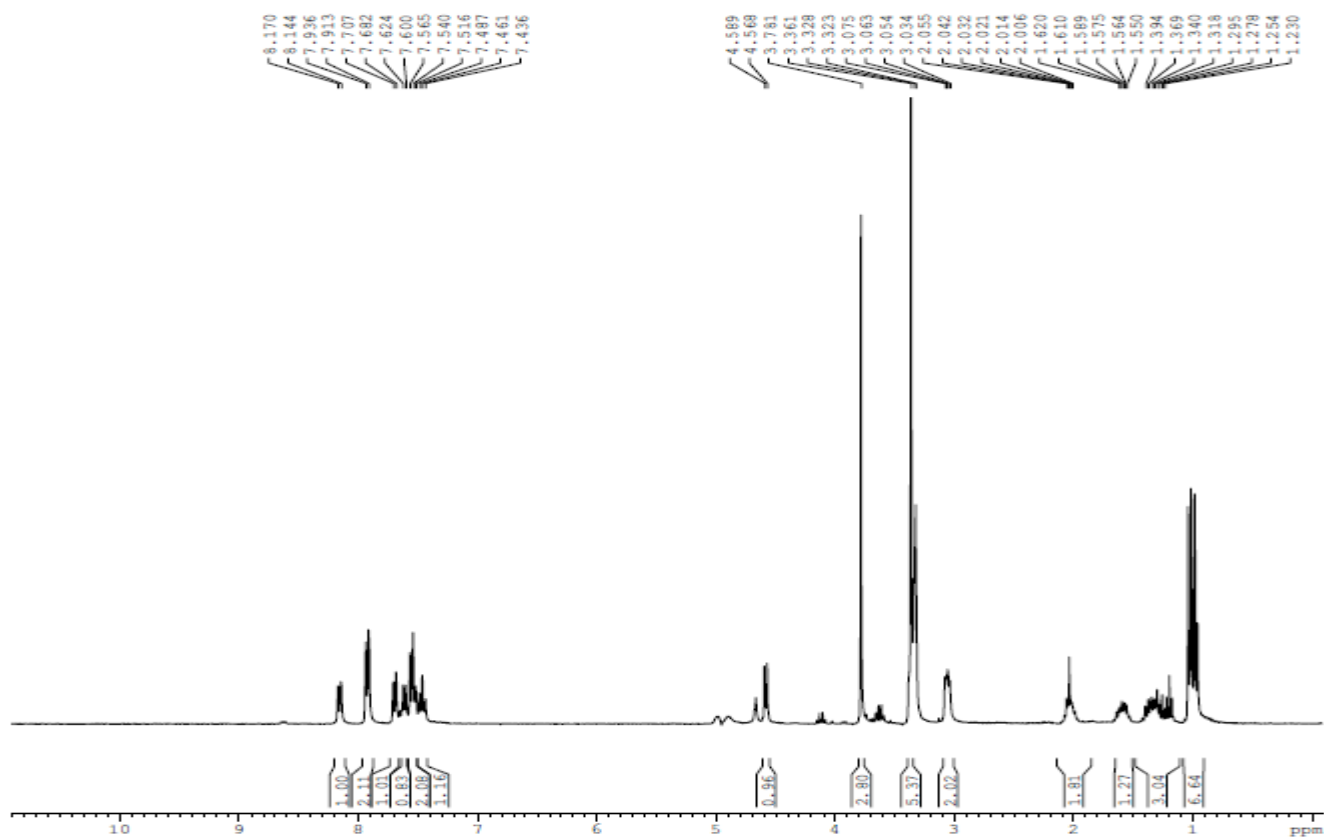


Figura 3-59. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.12

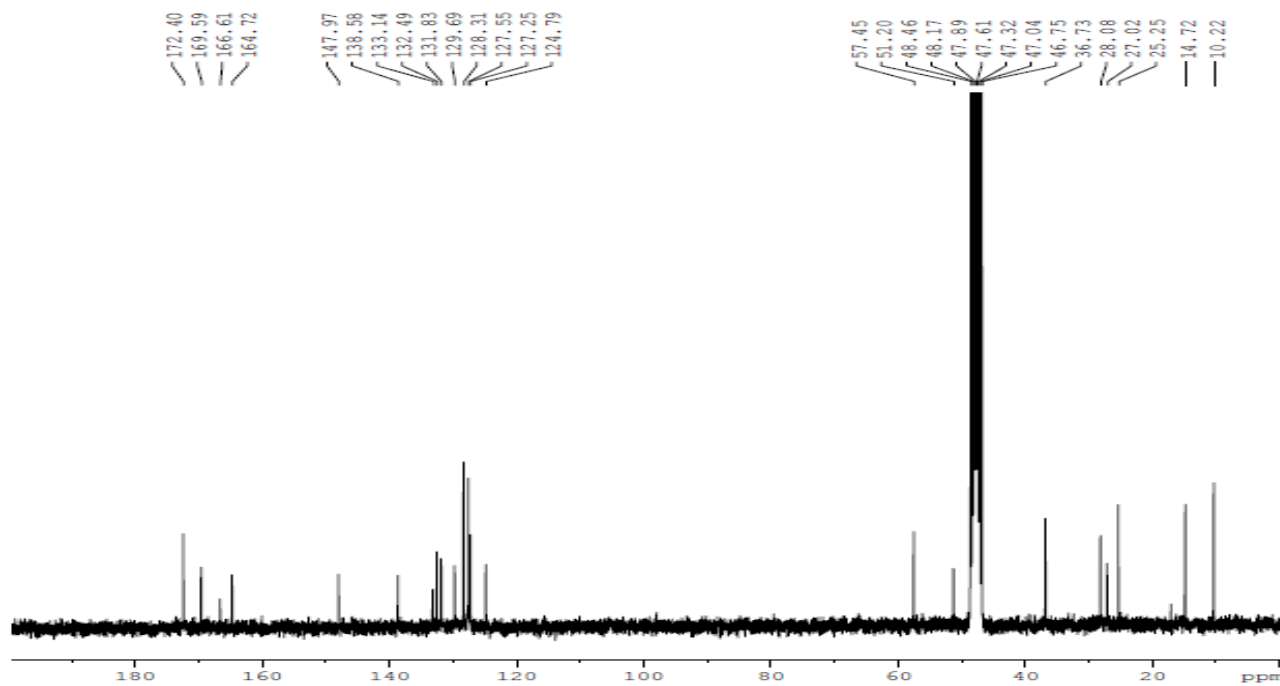


Figura 3-60. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.12

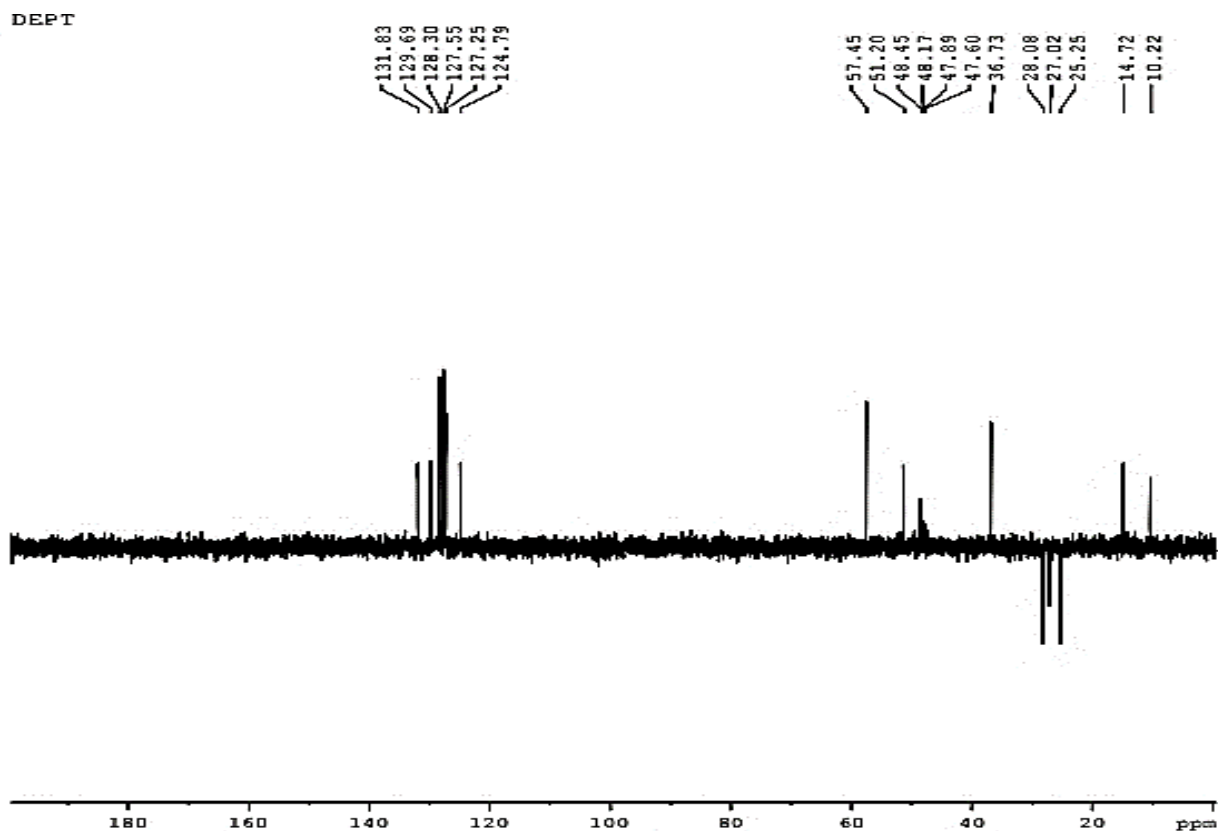


Figura 3-61. Espectro DEPT del compuesto 2.12

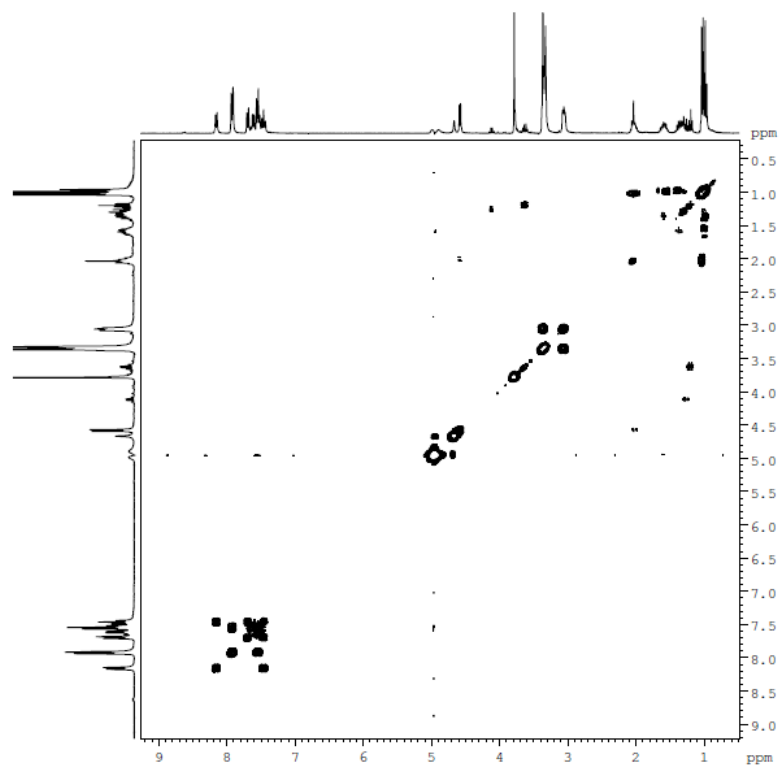


Figura 3-62. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.12

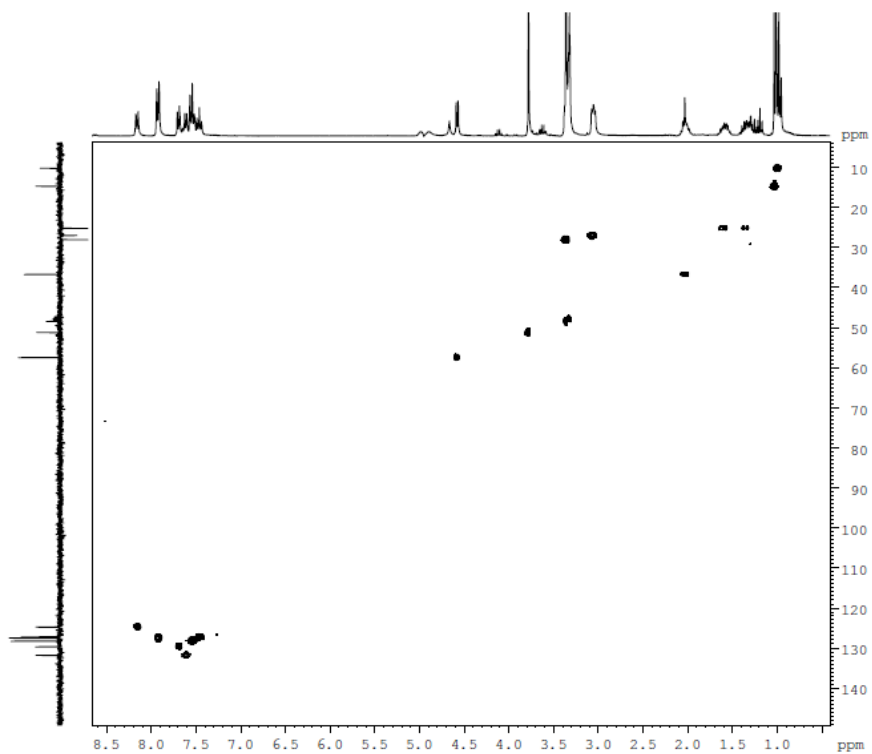


Figura 3-63. Espectro ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto 2.12

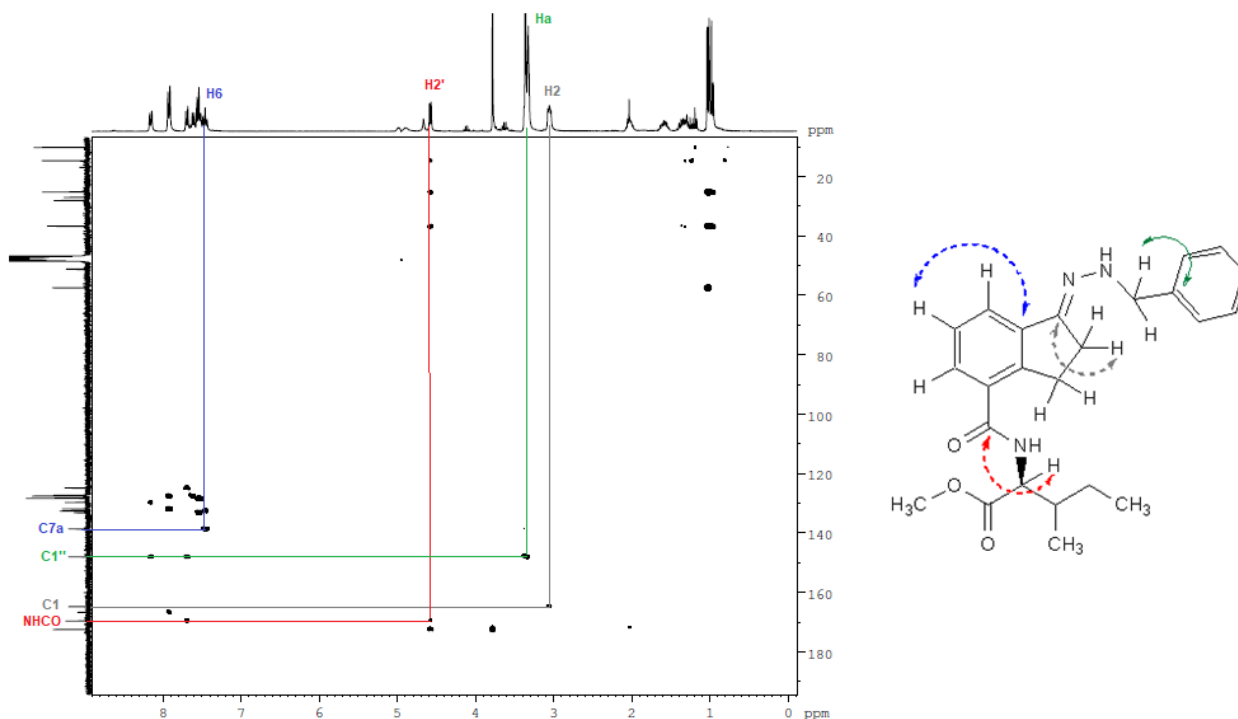


Figura 3-64. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto 2.12

3.1.10. 6-Bromo-1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.15)

El compuesto se aisló como un sólido fino de color blanco con un rendimiento en la etapa de la conjugación con el aminoácido de 59 % y un R_f 0.41 (n -hex:AcOEt, 7:3). El compuesto reveló como una banda de color amarillo luego de la aspersion de la cromatoplaque con revelador universal. El espectro IR del compuesto mostró la banda $3500\text{-}3180\text{ cm}^{-1}$ característica de la tensión N-H y la banda 1716 cm^{-1} de la tensión del enlace C=O. El derivado sintetizado se confirmó en ^1H RMN (Figura 3-66) por la presencia de los protones H5' y H6', como un multiplete intenso a δ 0.93-1.05 ppm; entre δ 1.26 – 1.61 ppm aparecen los protones diastereotópicos en C4'; en δ 2.04 – 2.12 ppm aparece H3'; entre δ 2.76 – 3.41 ppm aparecen los protones en C3 y C2 mutuamente acoplados y observados en el experimento de correlación ^1H - ^1H COSY (Figura 3-69); en δ 3.84 ppm aparece el grupo -OCH₃ como un singlete intenso y en δ 4.85-4.90 ppm se observa el protón H2' acoplado al protón del grupo amida que aparece en 6.65 ppm, lo anterior se observa en el experimento COSY. A campos bajos, en la región aromática, se observaron señales (un sistema AB, δ 7.98, $J = 1.5\text{ Hz}$, H7 y 8.02, $J = 1.2\text{ Hz}$, H5) que integraron para dos protones y confirman un sistema cuatrisustituido. El espectro ^{13}C RMN (Figura 3-67, Figura 3-68) reveló la presencia de diecisiete señales

asignadas con base en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC (**Figura 3-70**), ^1H - ^{13}C HMBC y DEPT.: δ 11.7 (CH_3 , $\text{C}5'$), 15.6 (CH_3 , $\text{C}6'$), 25.4 (CH_2 , $\text{C}4'$), 25.8 (CH_2 , $\text{C}3$), 36.2 (CH_2 , $\text{C}2$), 38.2 (CH , $\text{C}3'$), 52.5 (O-CH_3), 56.9 (CH , $\text{C}2'$), 129.3 (CH , $\text{C}5$), 135.5 (CH , $\text{C}7$), 121.7 ($\text{C}6$), 134.6 ($\text{C}4$), 140.1 ($\text{C}3\text{a}$), 152.4 ($\text{C}7\text{a}$), 165.3 ($-\text{CONH}$), 172.4 ($-\text{O-C=O}$, $\text{C}1'$) y 204.8 (C=O , $\text{C}1$). El espectro ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 3-71**) muestra una correlación a larga distancia entre el protón en $\text{H}2$ y el carbono carbonílico, y correlaciones entre $\text{H}7$ con $\text{C}6$, y $\text{C}5$ y $\text{H}3$ con $\text{C}7\text{a}$.

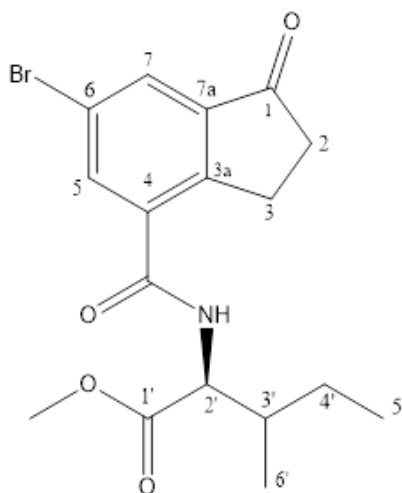


Figura 3-65. Estructura del compuesto 2.15

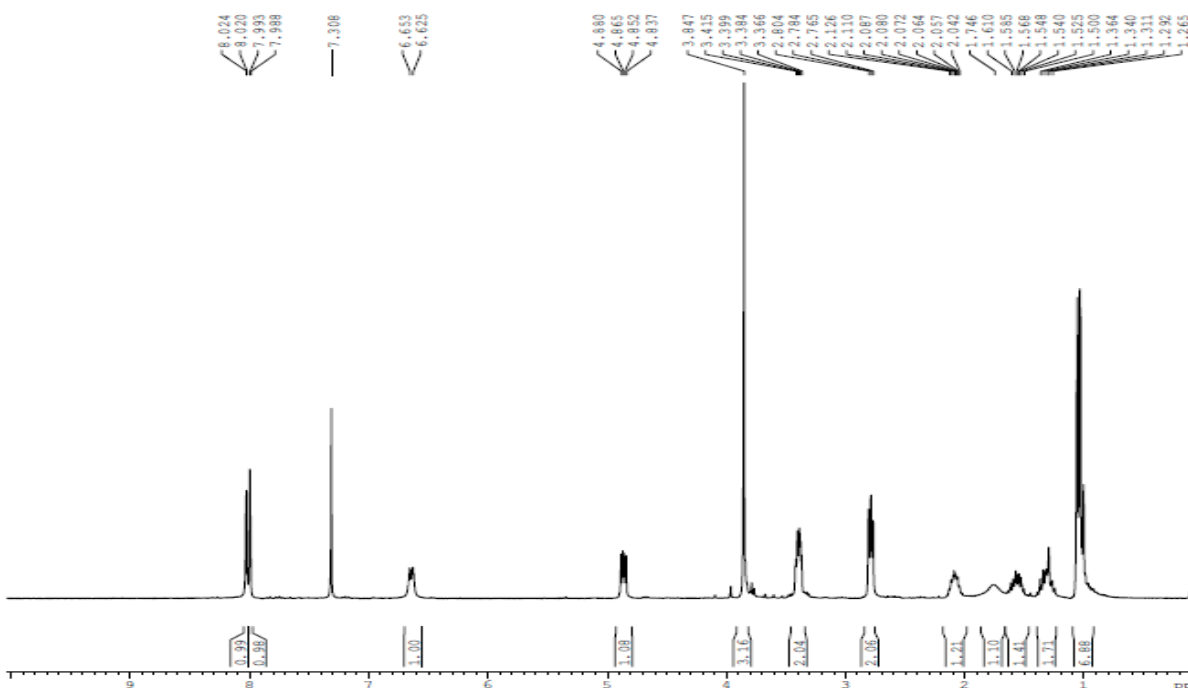


Figura 3-66. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2.15

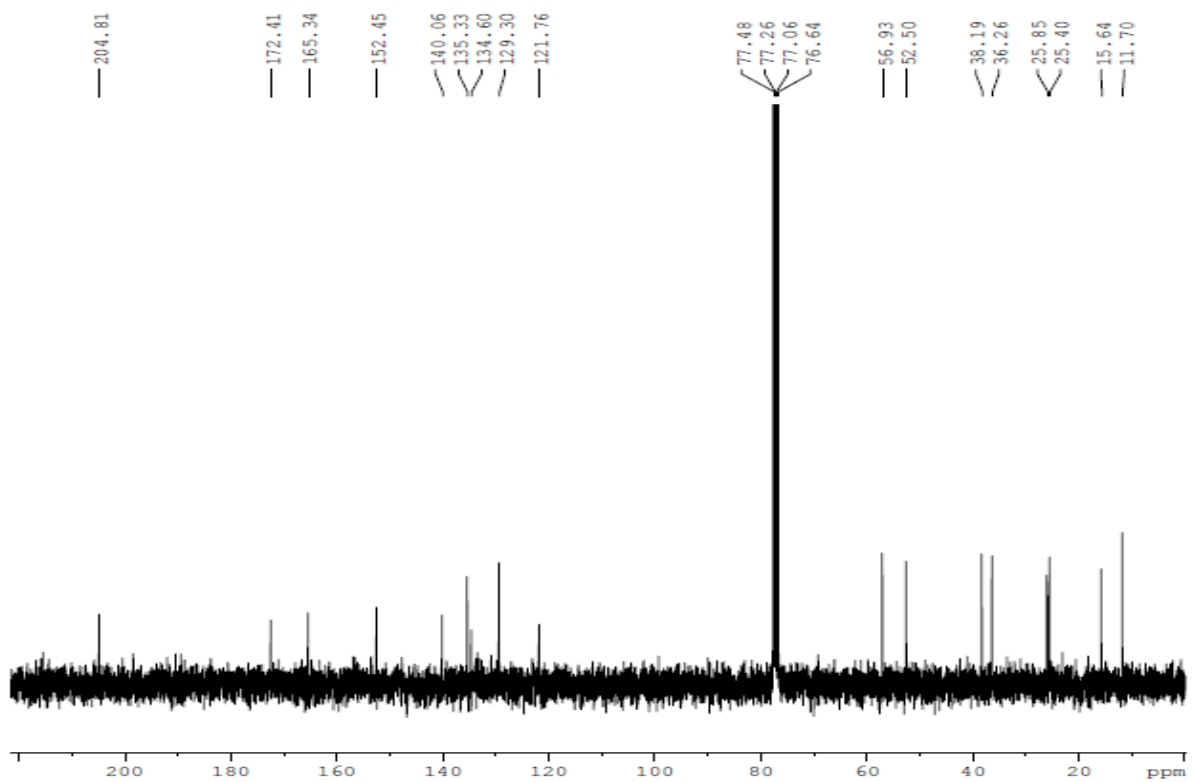


Figura 3-67. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2.15

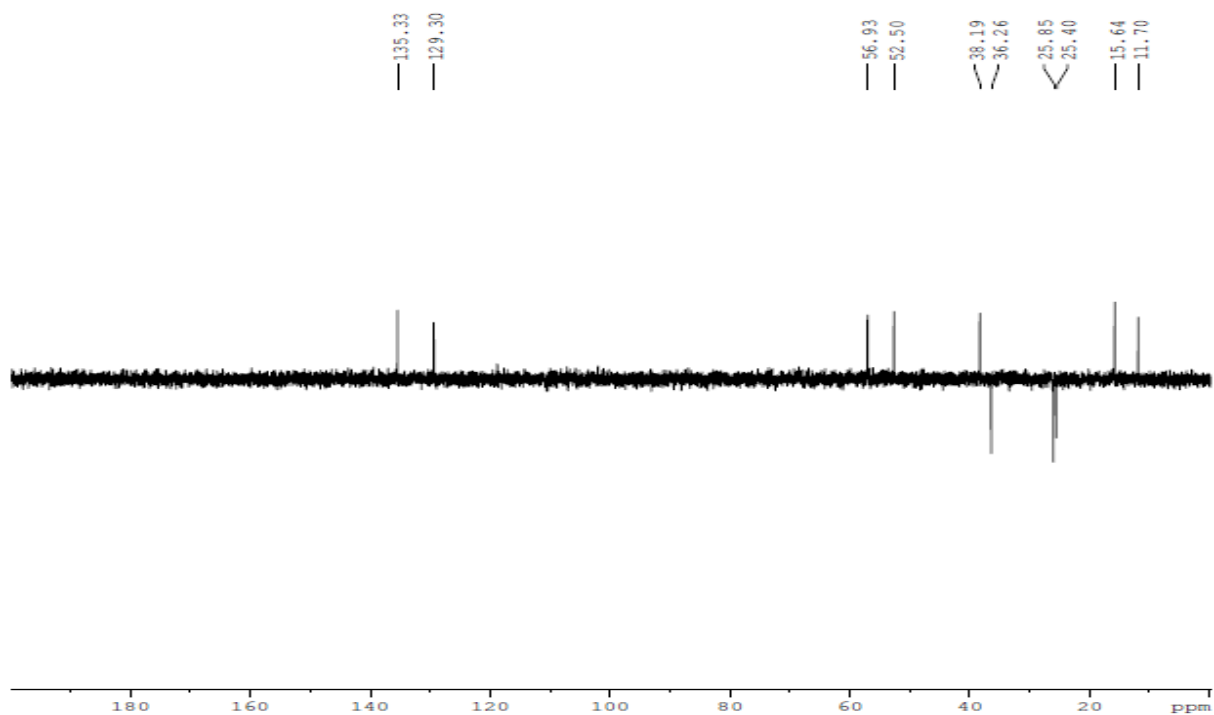


Figura 3-68. Espectro DEPT del compuesto 2.15

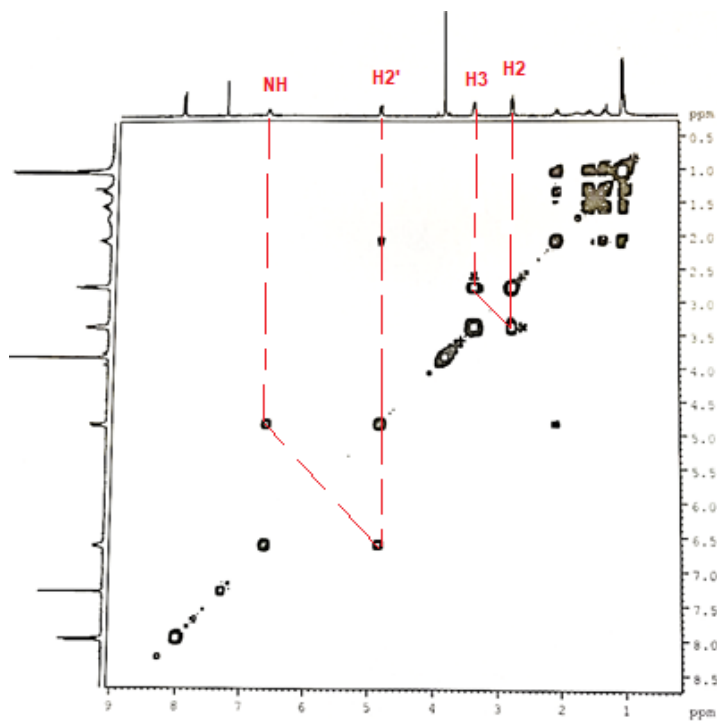


Figura 3-69. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto 2.15

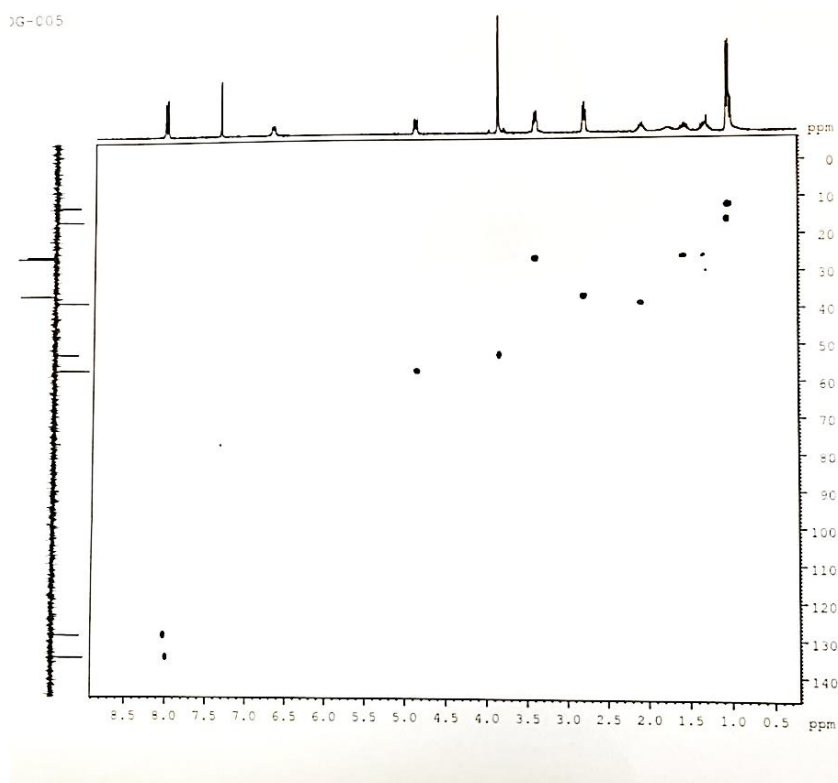


Figura 3-70. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC del compuesto 2.15

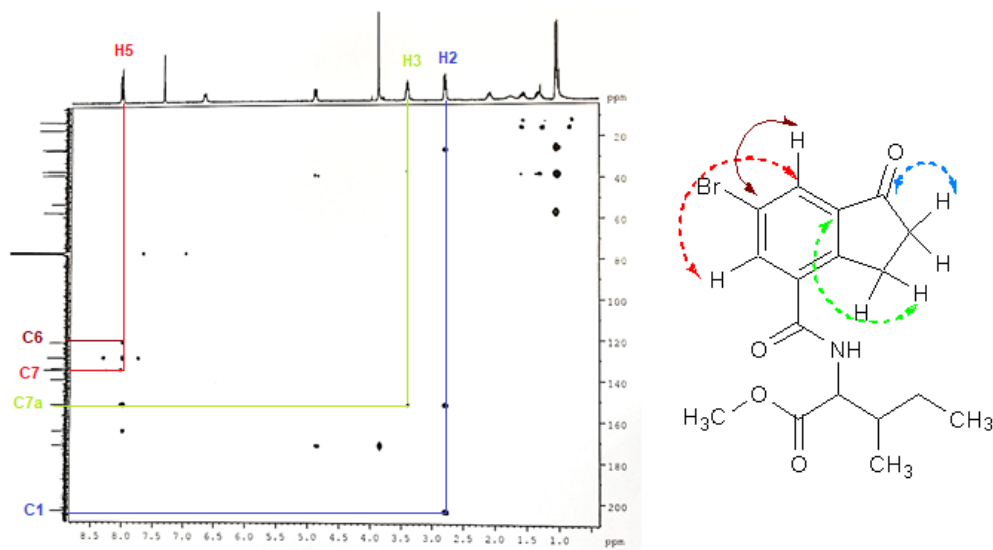


Figura 3-71. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del compuesto **2.15**

En la **Figura 3-72** se muestran los derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico sintetizados en el presente trabajo.

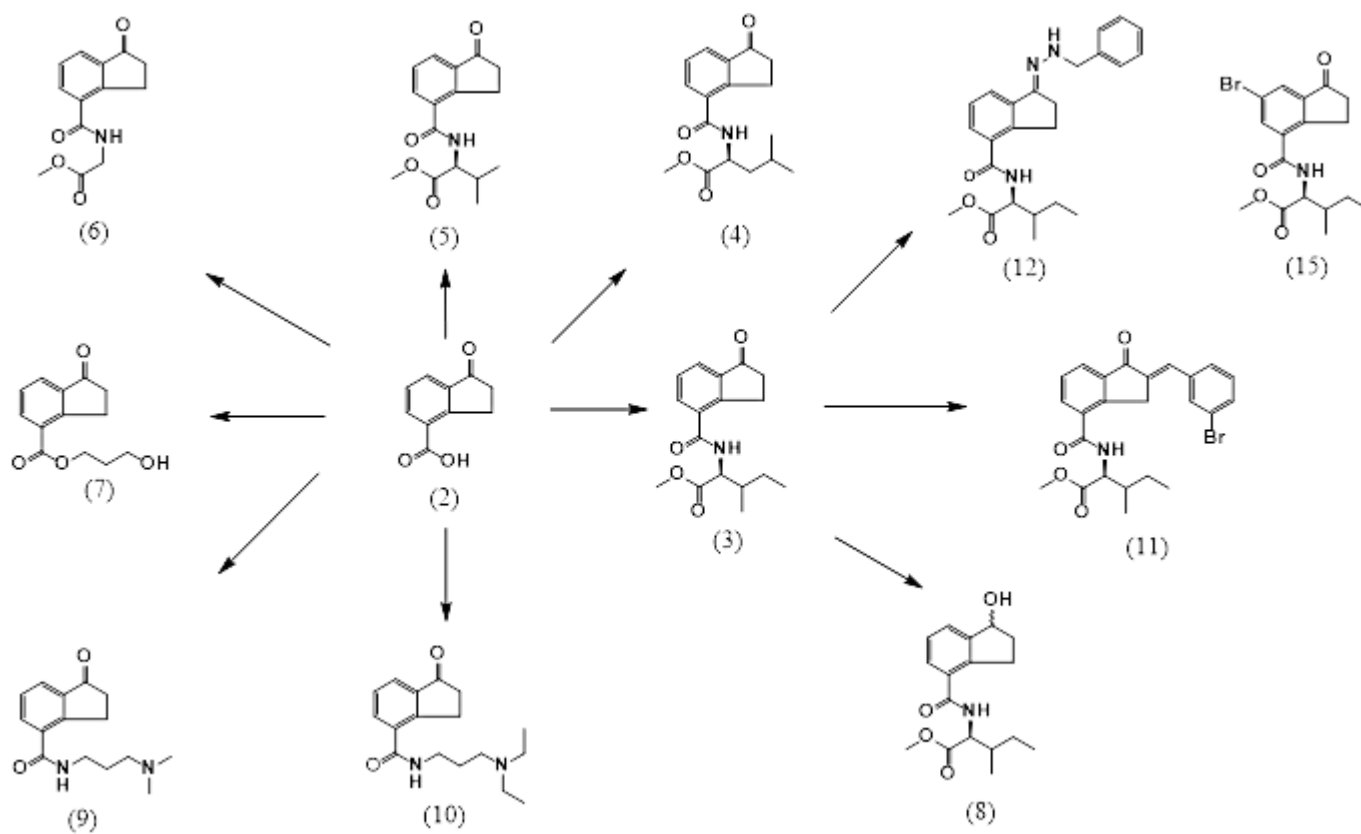


Figura 3-72. Estructuras de los derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico sintetizados

3.2. Identificación de las fitoalexinas del frijol

Luego del proceso de inducción y extracción, para la detección de las fitoalexinas se empleó cromatografía de capa fina (**Figura 3-73**), para determinar diferencias en la composición relativa de los extractos de plántulas tratadas con el inductor CuCl_2 de tres variedades de frijol, lo cual permitió identificar diferentes fuentes para la purificación e identificación de las fitoalexinas. Al tratar la placa con el revelador, se observó la presencia de nuevos compuestos ausentes en las plántulas tratadas con agua. Estos compuestos pasaron a ser purificados por técnicas cromatográficas convencionales. La fitoalexina mayoritaria correspondió a la phaseollina, de la cual se obtuvieron 26 mg; para las demás fitoalexinas las cantidades obtenidas variaron entre 6 mg y 14 mg.

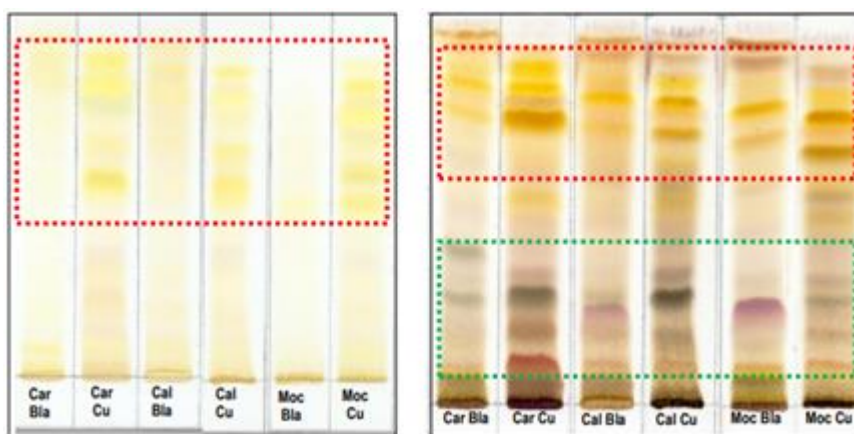


Figura 3-73. Cromatografía de capa fina de extractos de frijol, codificados de la siguiente manera: Car: Variedad Cargamanto Blanco, Cal: Variedad Calima, Moc: Variedad Cargamanto Mocho. Bla: Extracto blanco (control; plántulas no tratadas con inductor), Cu: Extracto de plántulas inducidas con solución de CuCl_2 . Se señalan las áreas donde se aprecia mayor cambio en la composición. El sistema de elución utilizado fue CHCl_3 :acetona, 80:20; a la izquierda se aprecia la placa sin revelar y a la derecha aparece la placa tratada con revelador universal.

A continuación, se describe la asignación estructural de las fitoalexinas aisladas de las variedades de frijol, la cual se basó principalmente en espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C mono - y bidimensional.

3.2.1. Genisteína

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo de color blanco. Presentó R_f de 0.59 en TLC (*n*-hex-Et₂O, 1:3), y reveló como una banda de color amarillo luego de la aspersion de la cromatoplaaca con revelador universal. En el sistema empleado en HPLC (**Figura 2-21**), el compuesto presentó un tiempo de retención, T_R , de 39.0 min. El espectro de absorción UV mostró dos bandas de absorción máxima a 211 y 259 nm, bajo las condiciones empleadas en HPLC (**Figura 3-74**). El espectro de masas (FAB-MS de ion positivo, **Figura 3-75**) de baja resolución mostró un ion cuasimolecular $[M+H]^+$ a 271 uma, y el de alta resolución presentó una masa de 270.05689 uma, concordante con una fórmula molecular C₁₅H₁₀O₅. El esqueleto isoflavona se confirmó en ¹HRMN por la presencia del protón H₂, que aparece como un singlete intenso a δ 8.06 ppm; adicionalmente se observaron señales en la región aromática que integraron para seis protones (**Figura 3-76**). El patrón de sustitución del anillo B (*para*-sustituido; 4'-hidroxi) se dedujo del sistema AA'XX' (δ 7.36, J = 8.7 Hz para H₂', H₆' y δ 6.84, J = 8.7 Hz para H₃', H₅'), y el patrón de sustitución del anillo A, se dedujo a partir de consideraciones biosintéticas y por la presencia de dos protones a campo mayor que las anteriores (δ 6.35 y 6.23 ppm) con una constante de acoplamiento de 2.1 Hz, indicando una posición relativa *meta* y que se asignan a los hidrógenos 6 y 8; este patrón de sustitución se confirmó por el experimento de correlación ¹H-¹H COSY (**Figura 3-79**). El espectro ¹³C RMN (**Figura 3-77**, **Figura 3-78**) reveló la presencia de quince señales (característico del sistema C₆C₃C₆ de isoflavonoides), asignadas con base en los espectros ¹³C RMN, DEPT, ¹H-¹³C HMBC: δ 153.4 (CH \uparrow , C₂), 121.9 (C₃), 180.0 (C₄), 162.0 (C₅), 98.7 (CH \uparrow , C₆), 164.0 (C₇), 93.4 (CH \uparrow , C₈), 157.8 (C₉), 104.5 (C₁₀), 121.5 (C₁'), 130.0 (C₂'), 114.9 (CH \uparrow , C₃'), 158.0 (C₄'), 114.9 (CH \uparrow , C₅'), 130.0 (CH \uparrow , C₆'). Igualmente, el espectro ¹H-¹³C HMBC (**Figura 3-79**) muestra una correlación a larga distancia entre el protón en C₂ característico de la isoflavona, y el carbono carbonílico a δ 180.0 ppm, y correlaciones entre H₆ con C₈ y H₈ con C₆. La identidad de esta isoflavona se confirmó por comparación de los espectros de ¹H y ¹³C RMN, con los obtenidos a partir de una muestra autentica de Genisteína.

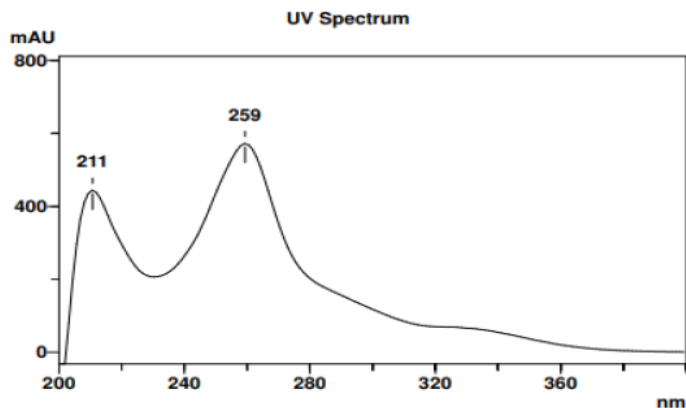


Figura 3-74. Espectro de absorción UV de la Genisteína

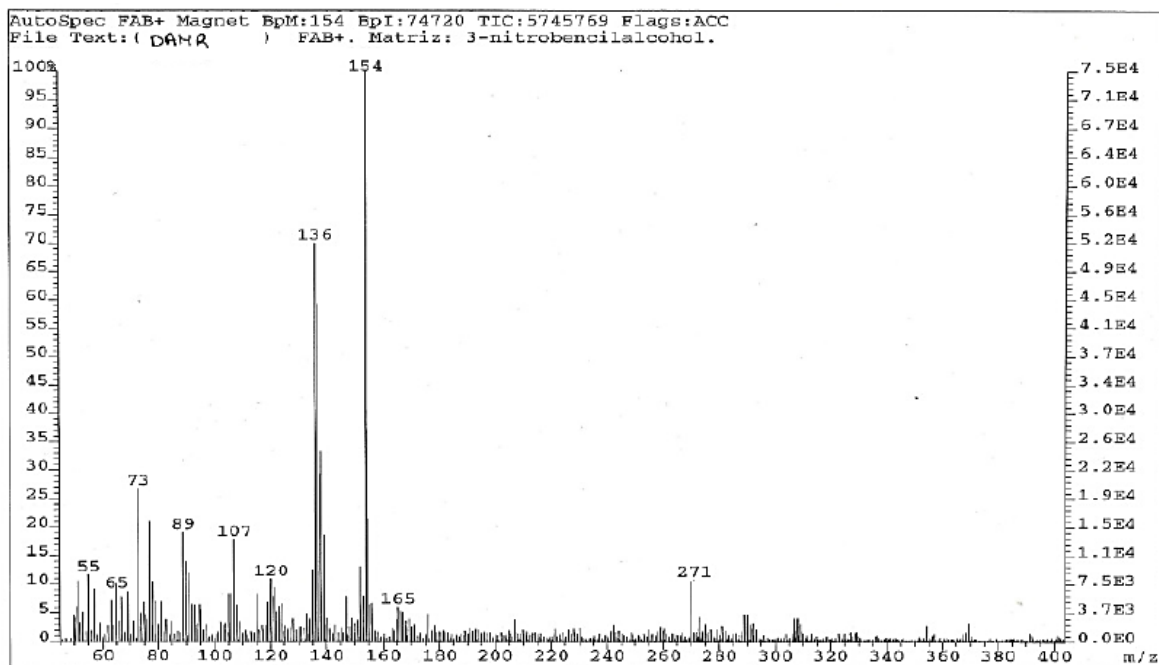


Figura 3-75. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Genisteína

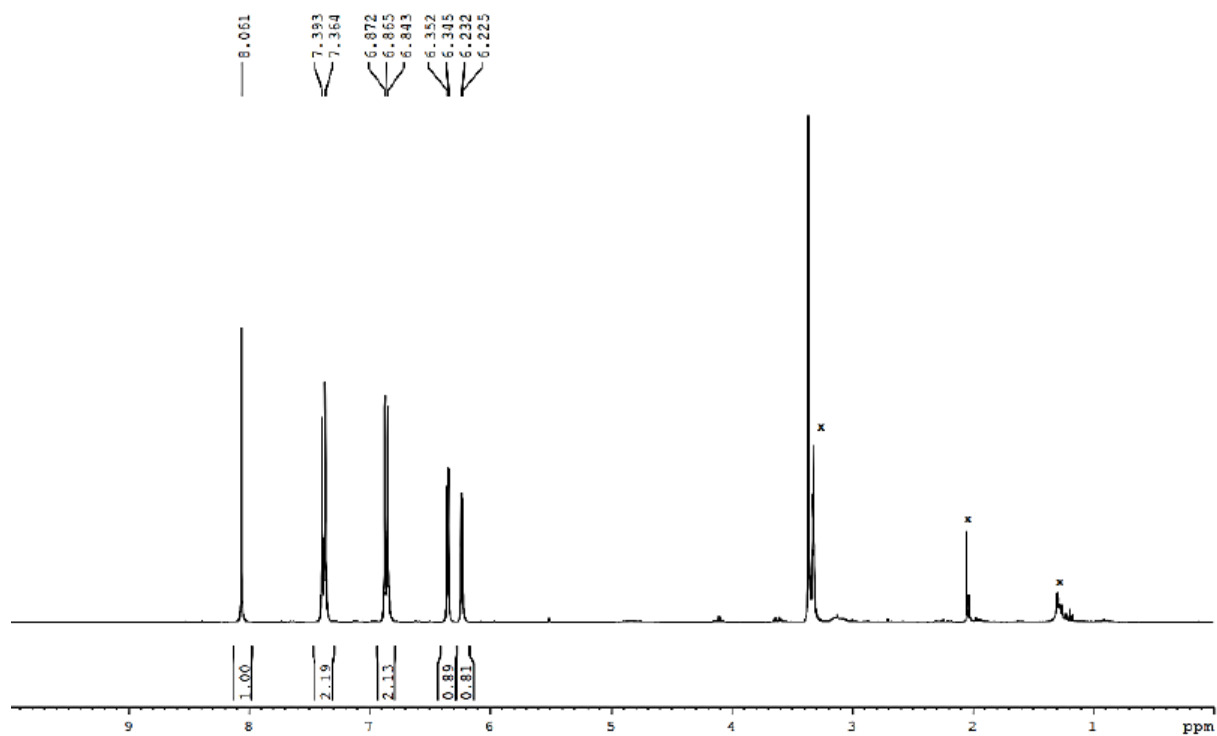


Figura 3-76. Espectro de ¹H RMN de la Genisteína

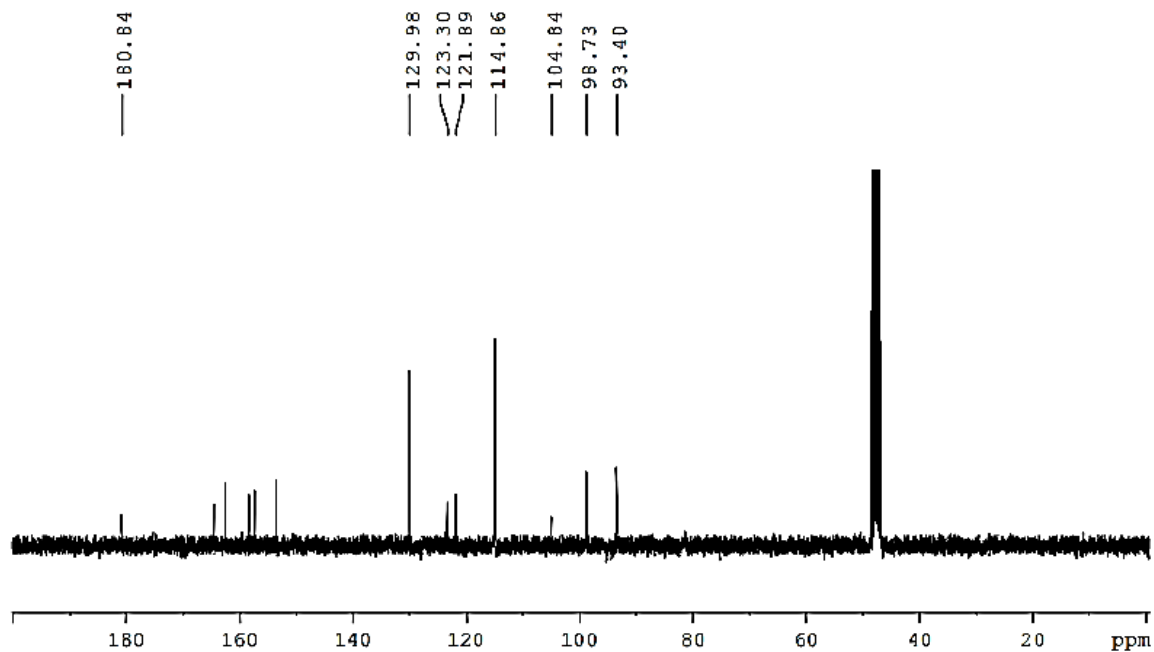


Figura 3-77. Espectro de ¹³C RMN de la Genisteína

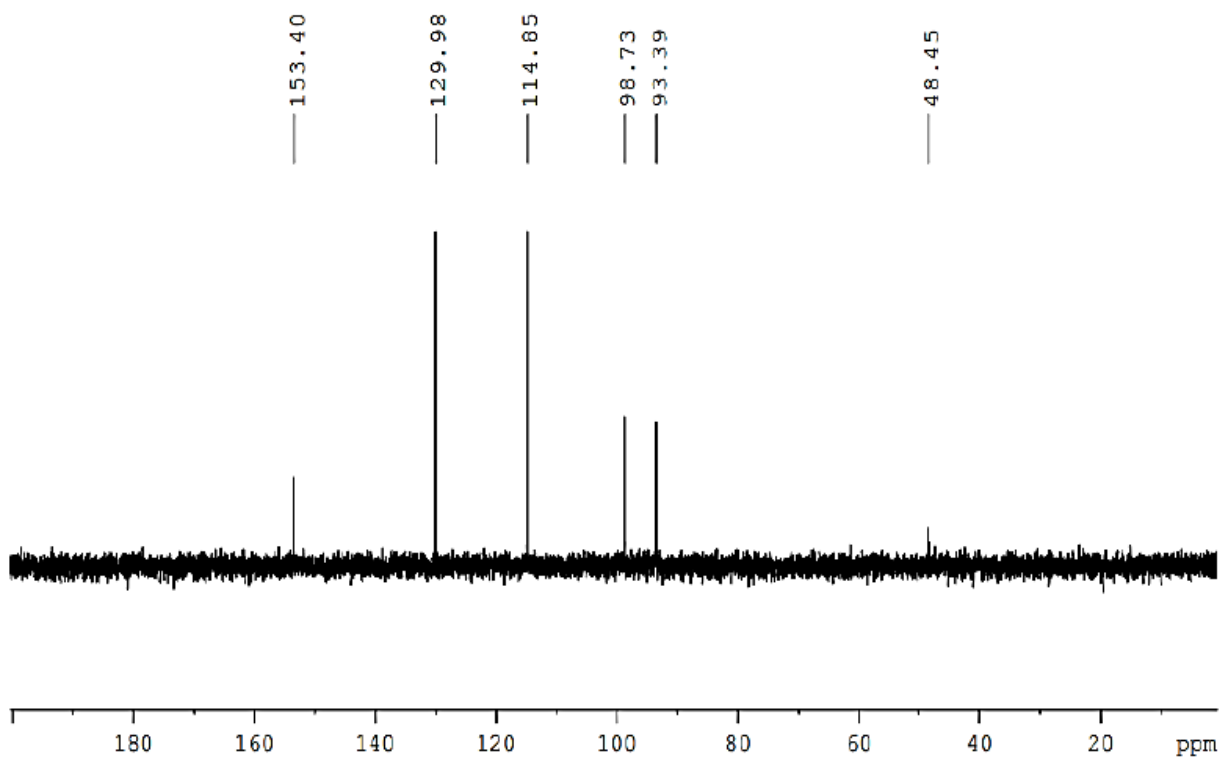


Figura 3-78. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) de la Genisteína

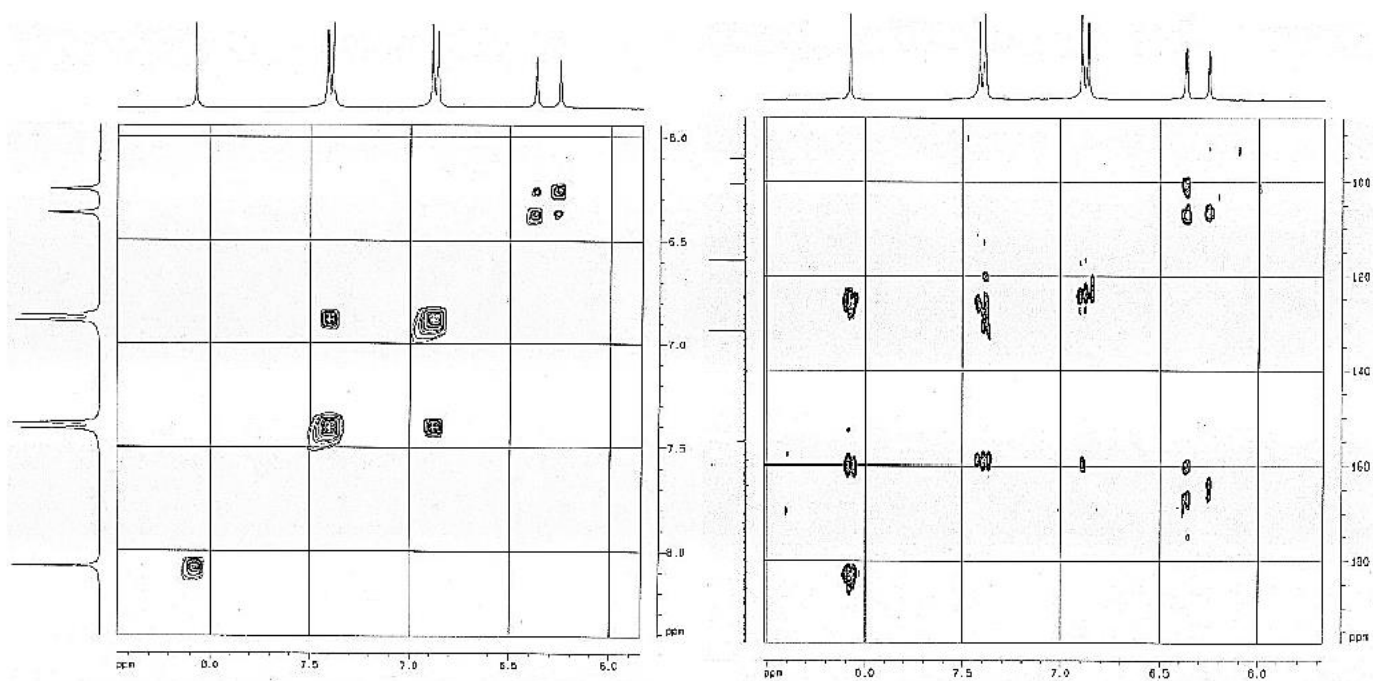


Figura 3-79. Espectros ^1H - ^1H COSY (izq.) y ^1H - ^{13}C HMBC (der.) de la Genisteína

3.2.2. Daidzeina

Esta fitoalexina se aisló como un sólido amorfo de color blanco. En cromatografía de capa fina presentó un R_f de 0.41 (*n*-hex-Et₂O, 1:3); reveló de color amarillo con revelador universal, y posterior calentamiento. Presentó en HPLC un T_R de 36.0 min (**Figura 2-21**). La daidzeina mostró una banda de absorción UV máxima a 248 nm, y varios picos de inflexión a 211 y 301 (**Figura 3-80**), bajo las condiciones empleadas en HPLC. El espectro de masas (FAB-MS de ion positivo, **Figura 3-81**) de baja resolución mostró un ion cuasimolecular $[M+H]^+$ a 255 uma, y el de alta resolución presentó una masa de 254.06368 uma, correspondiente con una fórmula molecular C₁₅H₁₀O₄. En ¹H RMN (**Figura 3-82**), la daidzeina presentó un protón H2 característico de las isoflavonas a δ 8.15 ppm, y siete protones aromáticos formando un sistema AMX y AA'XX' a δ 8.05 (d, H5), 6.94 (dd, H6) y 6.85 (d, H8), y a δ 6.85 (2H, d, H3' y 5') y 7.37 (2H, d, H2' y 6'), respectivamente. Para el primer sistema y que corresponde al anillo A, se confirma un sustituyente hidroxí en C7. El patrón de sustitución 4'-hidroxí en el anillo B se deduce del sistema AA'XX'. La identidad de esta isoflavona se confirmó por comparación de los espectros de ¹H y ¹³C RMN (**Figura 3-82**, **Figura 3-83**, **Figura 3-84**) del material, con los obtenidos a partir de una muestra autentica de daidzeina.

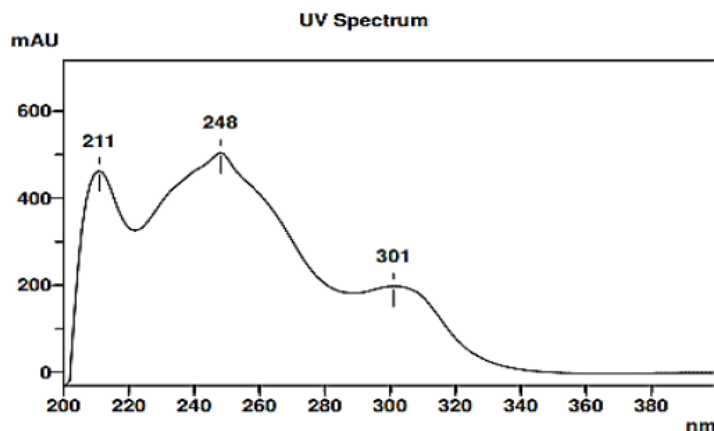


Figura 3-80. Espectro de absorción UV de la Daidzeína

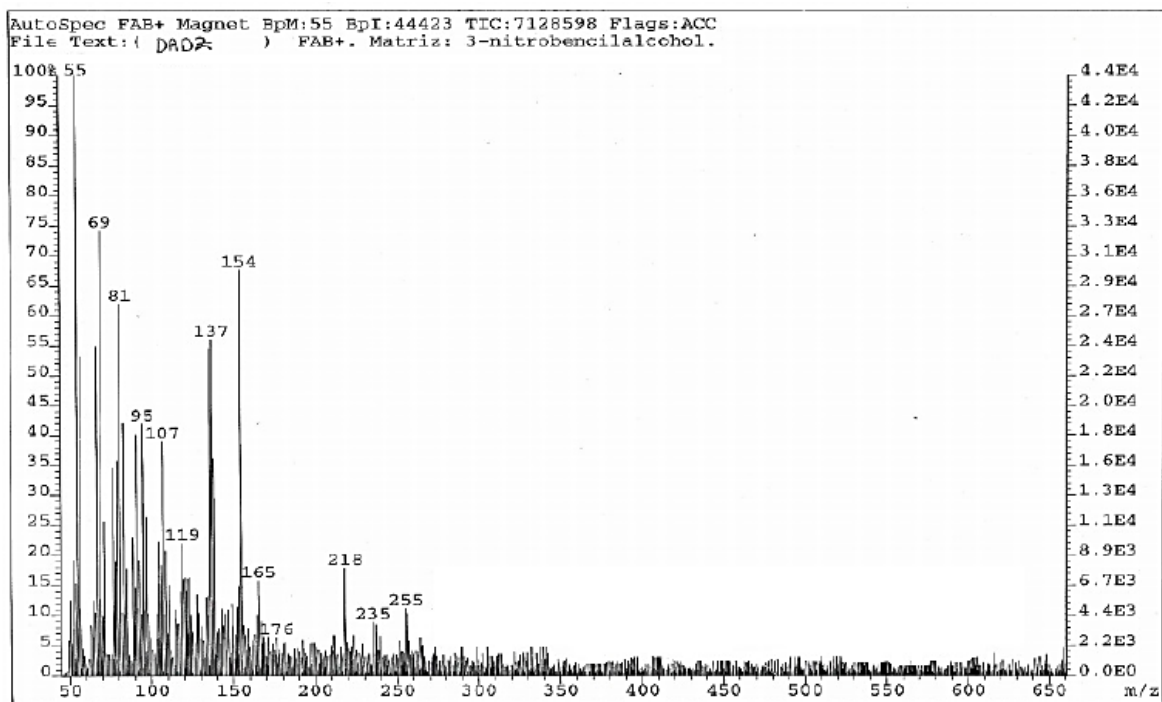


Figura 3-81. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Daidzeína

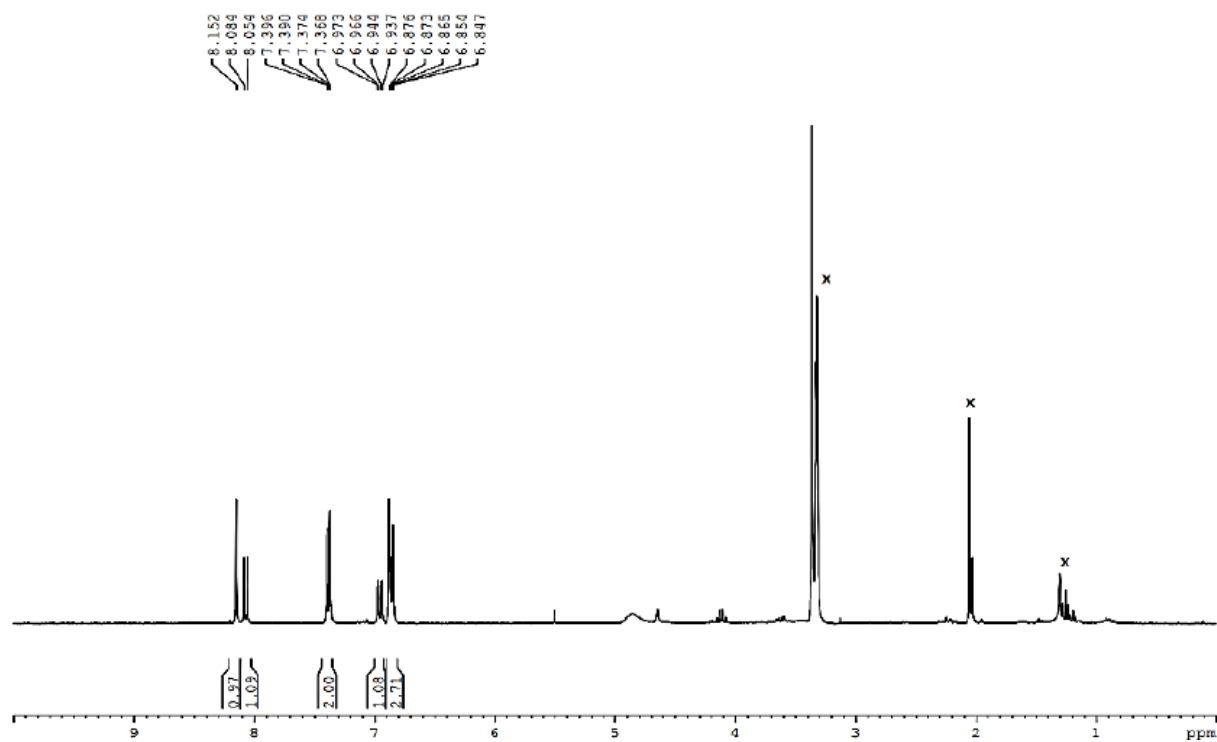


Figura 3-82. Espectro de ^1H RMN de la Daidzeína

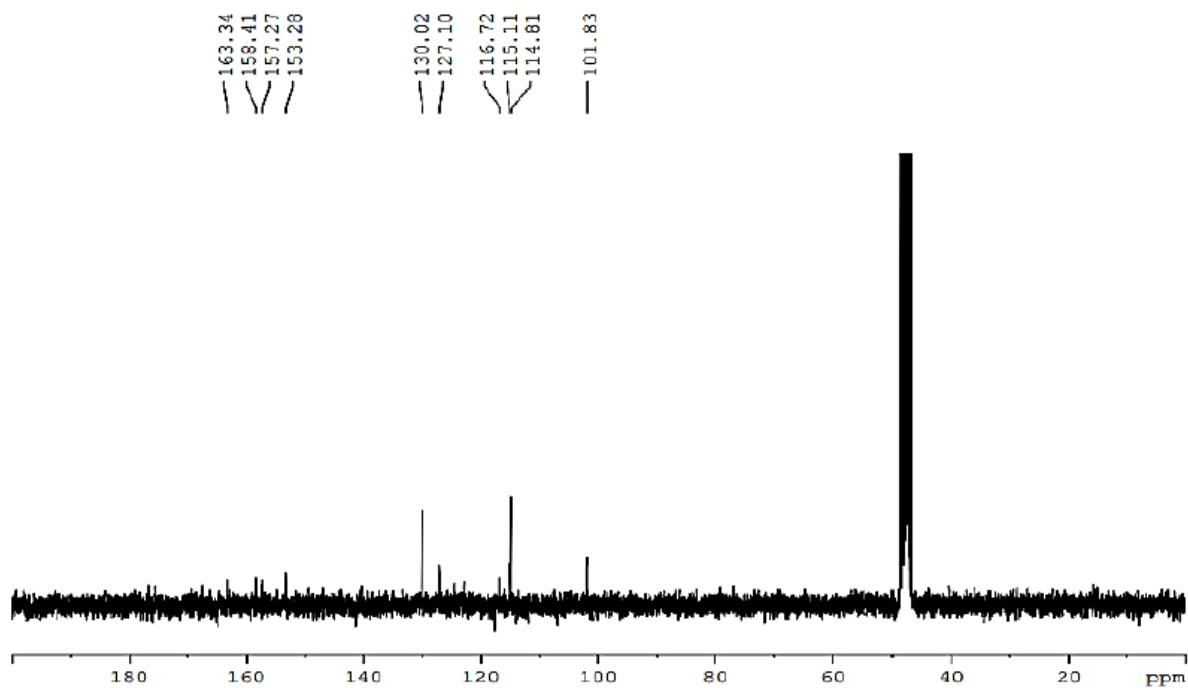


Figura 3-83. Espectro de ^{13}C RMN de la Daidzeína

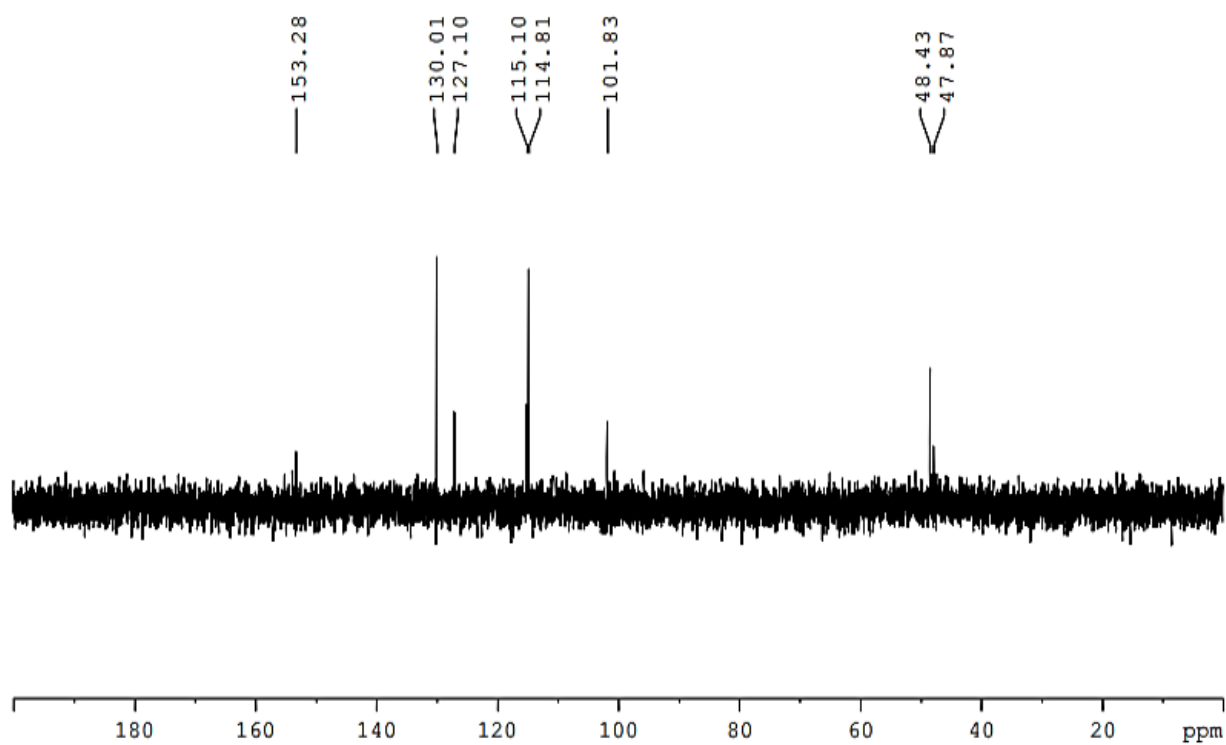


Figura 3-84. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) de la Daidzeína

3.2.3. 2'-Hidroxigenisteina

El compuesto se aisló como un sólido amorfo blanco. En cromatografía de capa fina presentó R_f de 0.36 (*n*-hex-Et₂O, 1:3); se apreció como una mancha de color pardo con revelador universal, seguido de un calentamiento breve. Presentó un T_R de 35.0 min en el sistema empleado en HPLC. En el espectro de absorción UV/VIS (**Figura 3-85**), el compuesto presentó bandas de absorción máxima a 204, 228 y 278 nm en el sistema de elución empleado en HPLC. El espectro de ¹H RMN (**Figura 3-86**) reveló un patrón de sustitución para el anillo A (sistema 5,7-dihidroxi) igual que el de la genisteina, presentando señales similares para H6 y H8 (δ 6.25 y 6.40 ppm, respectivamente); el protón H2 común de la isoflavona se aprecia como un singlete a δ 8.03 ppm. El patrón de sustitución 2',4'-dihidroxi del anillo B se dedujo a partir de las señales de protón formando un sistema AMX: el protón H6' aparece como un doblete ($J = 7.8$ Hz) a δ 7.05 ppm debido al acoplamiento *orto*- con H5'; la señal de este último protón se superpone con la correspondiente al doblete de H3', y aparecen como un multiplete en δ 6.30-6.40 ppm. Las asignaciones para todos los protones y carbonos (**Figura 3-86**, **Figura 3-87**) se realizaron con base en los espectros de correlación ¹H-¹H COSY (**Figura 3-89**), ¹H-¹³C HSQC (**Figura 3-89**) y correlación a larga distancia ¹H-¹³C HMBC (**Figura 3-89**). Comparando con los datos reportados en la literatura para la 2'-hidroxigenisteina estos coinciden con los datos espectroscópicos reportados en nuestro estudio.

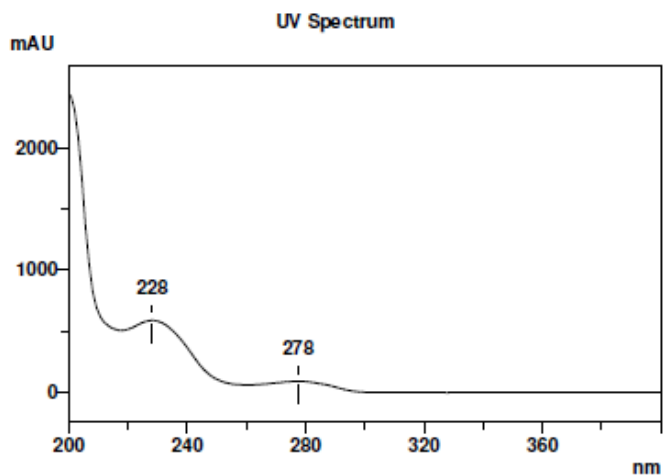


Figura 3-85. Espectro de absorción UV de la 2'-Hidroxigenisteina

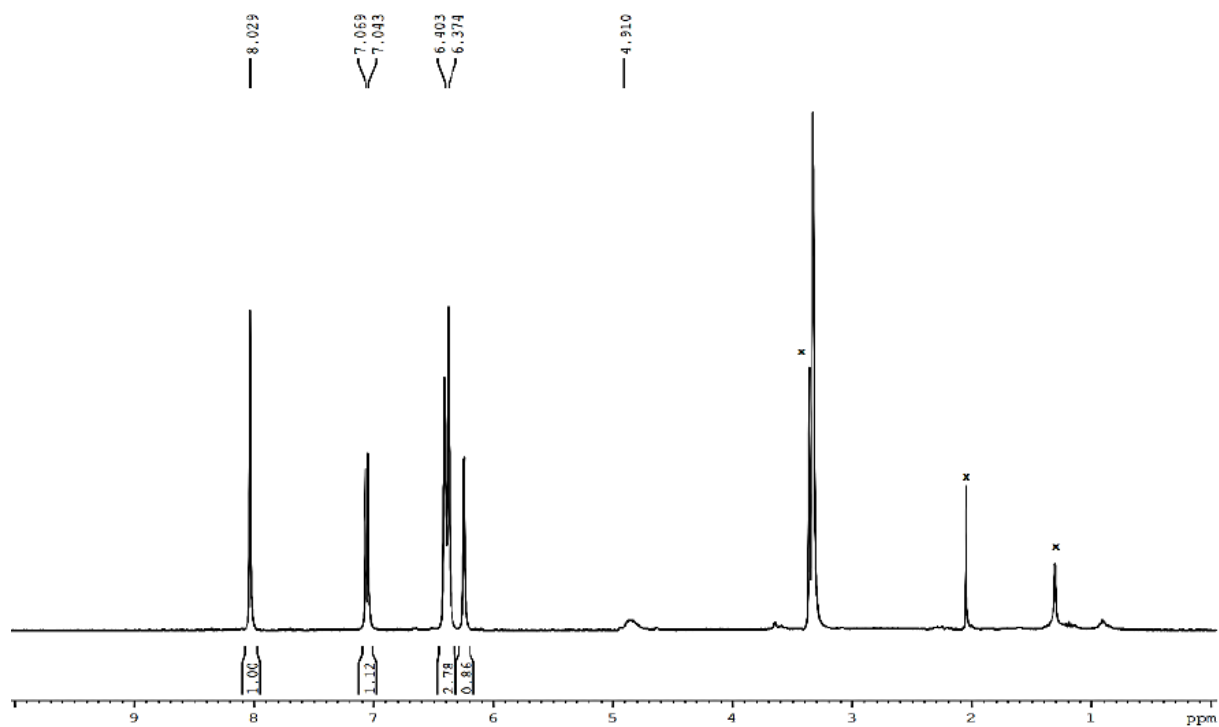


Figura 3-86. Espectro de ^1H RMN de la 2'-Hidroxisenisteína

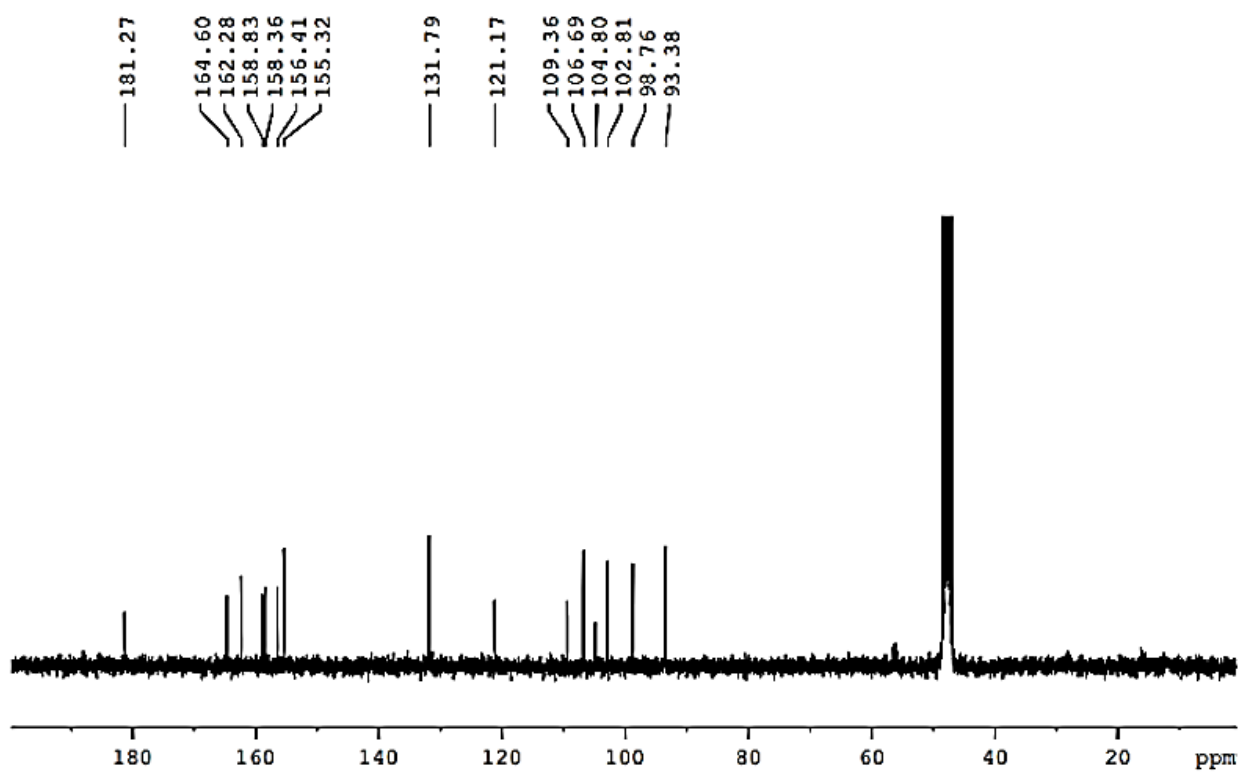


Figura 3-87. Espectro de ^{13}C RMN de la 2'-Hidroxisenisteína

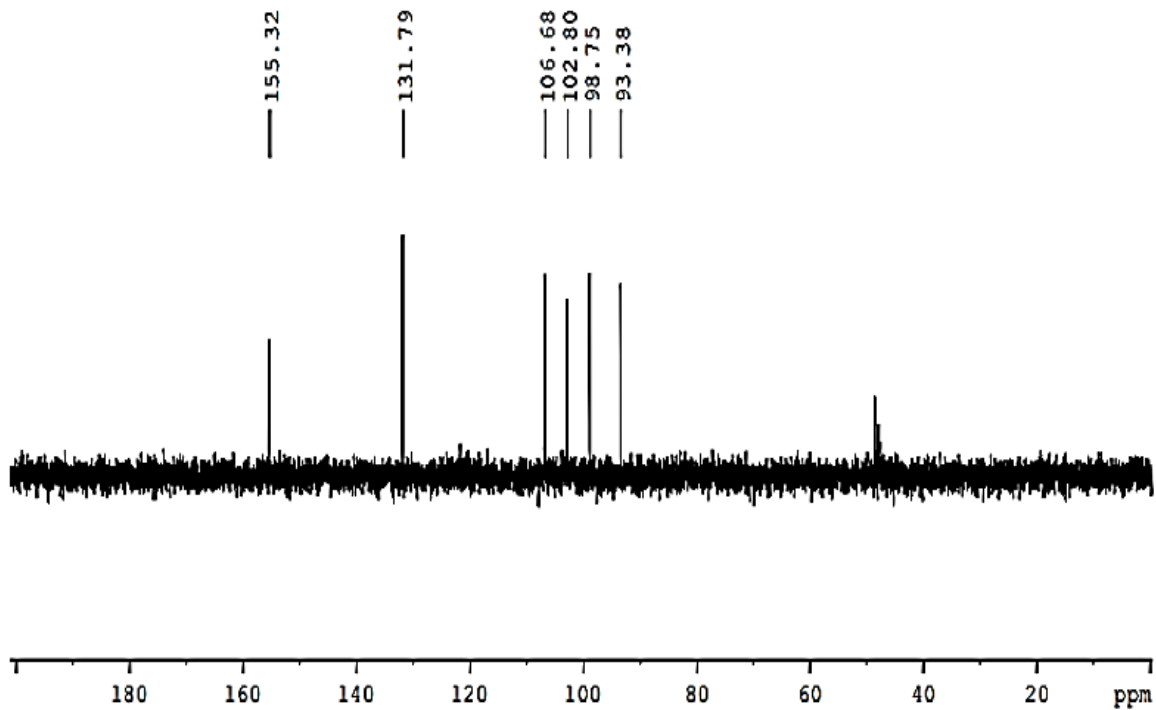
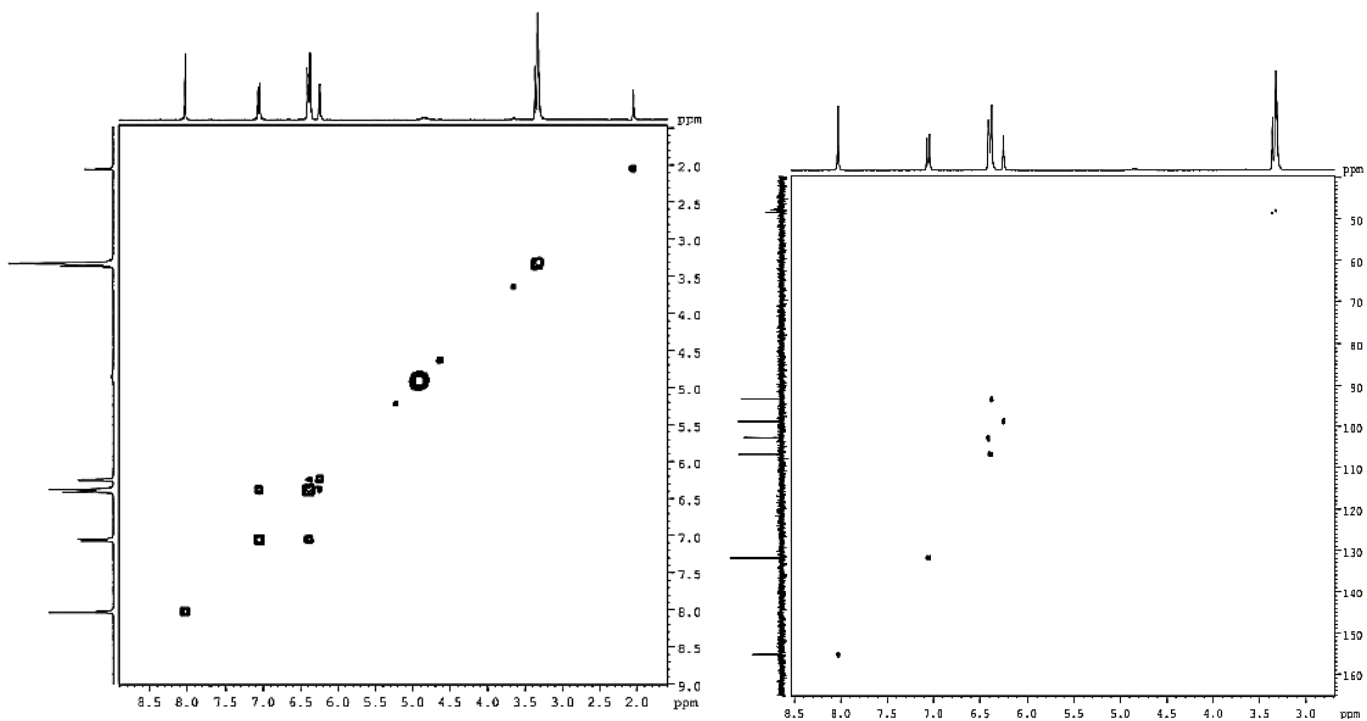


Figura 3-88. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) de la 2'-Hidroxigenisteína



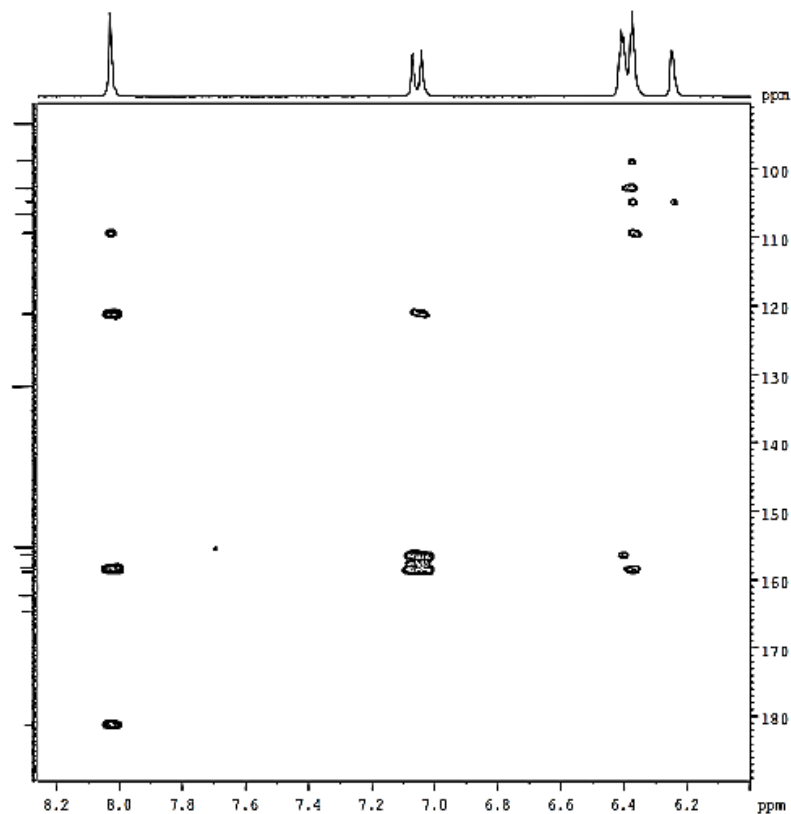


Figura 3-89. Espectro ^1H - ^1H COSY (superior izquierdo), ^1H - ^{13}C HSQC (superior derecho), ^1H - ^{13}C HMBC (inferior) de la 2'-Hidroxigenisteína

3.2.4. Dalbergioidina

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo incoloro. En TLC presentó R_f de 0.33 (*n*-hex-Et₂O, 1:3); reveló de color negro con revelador universal seguido de calentamiento. Posee un T_R de 34.0 min en el sistema empleado en HPLC (**Figura 2-21**). El espectro de absorción UV de la dalbergioidina presentó bandas de absorción máxima a 265, 290 y 344 nm, en el sistema de elución en HPLC. El espectro de masas (FAB-MS de ion positivo, **Figura 3-91**) de alta resolución presentó una masa de 288.05814 uma, concordante con una fórmula molecular C₁₅H₁₂O₆. En ^1H RMN (**Figura 3-92**), los protones aromáticos se observan como un sistema AMX (para el anillo B) y uno AX (para el anillo A), éste último revelando un patrón de sustitución 5,7-dihidroxi. El primer sistema está integrado por las siguientes señales: δ 6.95 (H6', d, J = 8.0 Hz), 6.45 (H3', d, J = 2.3 Hz) y 6.35 (H5', dd, J = 8.0 y 2.3 Hz), que definen el patrón de sustitución 2',4'-dihidroxi del anillo B. La naturaleza isoflavanona del compuesto se confirmó a partir de un grupo de señales mutuamente acopladas que conforman un sistema ABX, para

los tres protones del anillo heterocíclico en δ 4.60, 4.44 y 4.27 ppm, y que a su vez demuestran la no equivalencia de los protones en C2. Estos acoplamientos se confirmaron con los espectros de correlación ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HSQC (Figura 3-95).

Por otro lado, el espectro de ^{13}C RMN (Figura 3-93) permitió establecer las multiplicidades de los carbonos; donde aparecieron quince señales correspondientes a seis grupos metinos, cinco de los cuales son aromáticos: δ 132.2, 108.3, 104.3, 97.3 y 96.1 ppm, y uno no aromático a δ 47.7 ppm; un grupo metileno desplazado a campo bajo δ 71.5 ppm correspondiente a C2, un carbono carbonílico a δ 198.9 ppm y siete carbonos cuaternarios aromáticos, cuatro de ellos oxigenados y que resuenan a δ 167.5, 166.1, 165.0, 159.3, 157.5 y dos no oxigenados a 114.3 y 104.1 ppm. Las asignaciones para todos los protones y carbonos se realizaron con base en los espectros de correlación ^1H - ^1H COSY (Figura 3-95) y correlación a larga distancia ^1H - ^{13}C HMBC (Figura 3-95). En este último, aparecieron conectividades entre los dos protones no equivalentes H2 y la señal del carbono carbonílico en δ 198.9 ppm, así como también entre H5' y el carbono metínico C3 no aromático a δ 47.4 ppm. Estas asignaciones para la isoflavanona dalbergioidina concuerdan con las citadas en reportes previos.

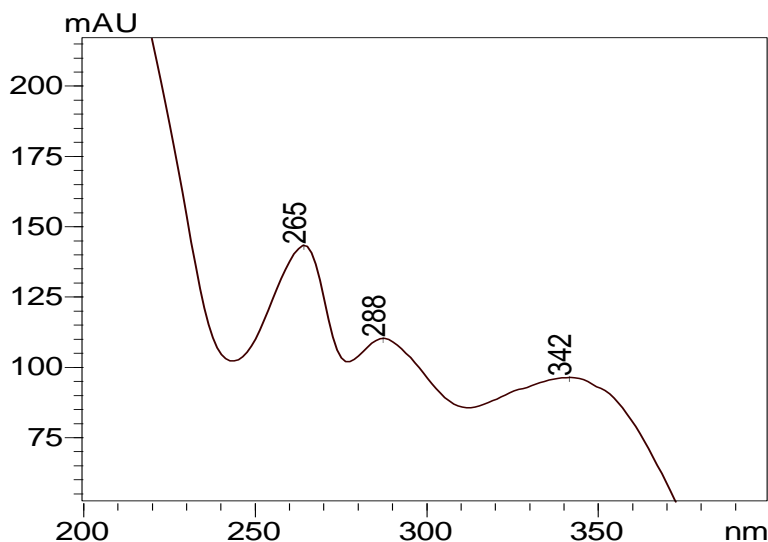


Figura 3-90. Espectro de absorción UV de la Dalbergioidina

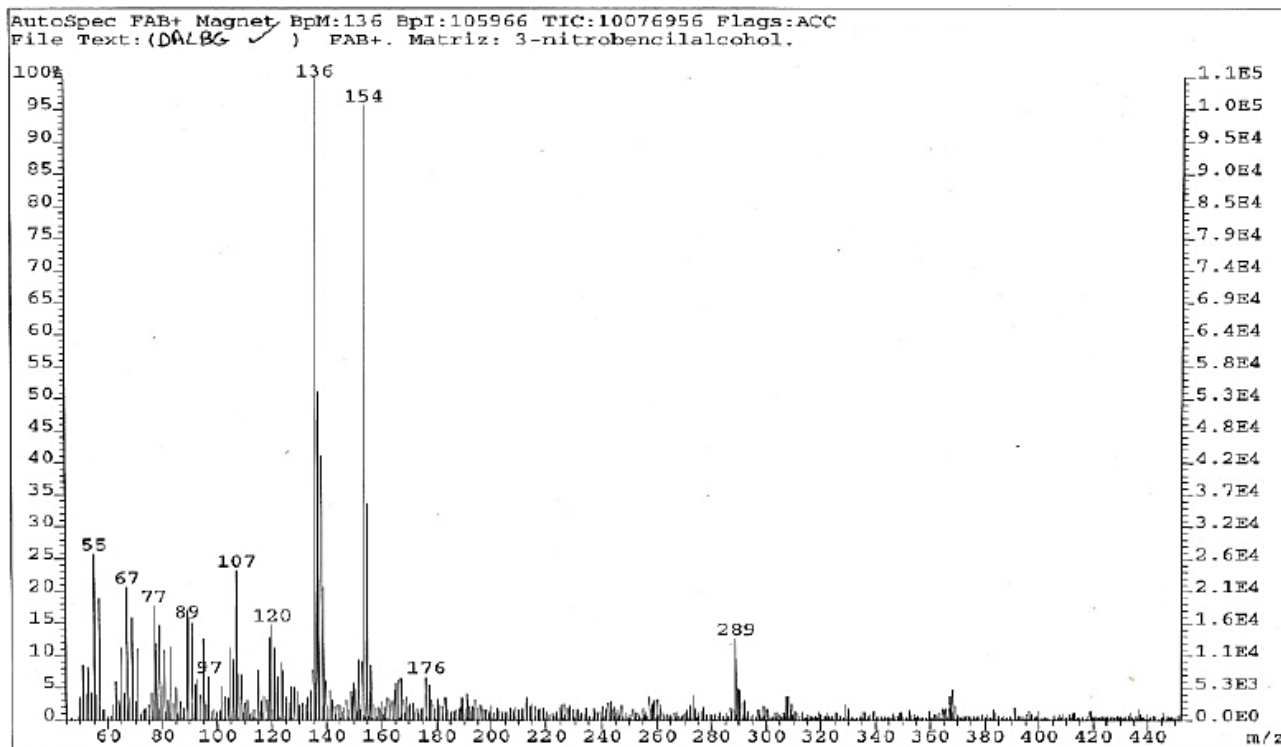


Figura 3-91. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Dalbergioidina

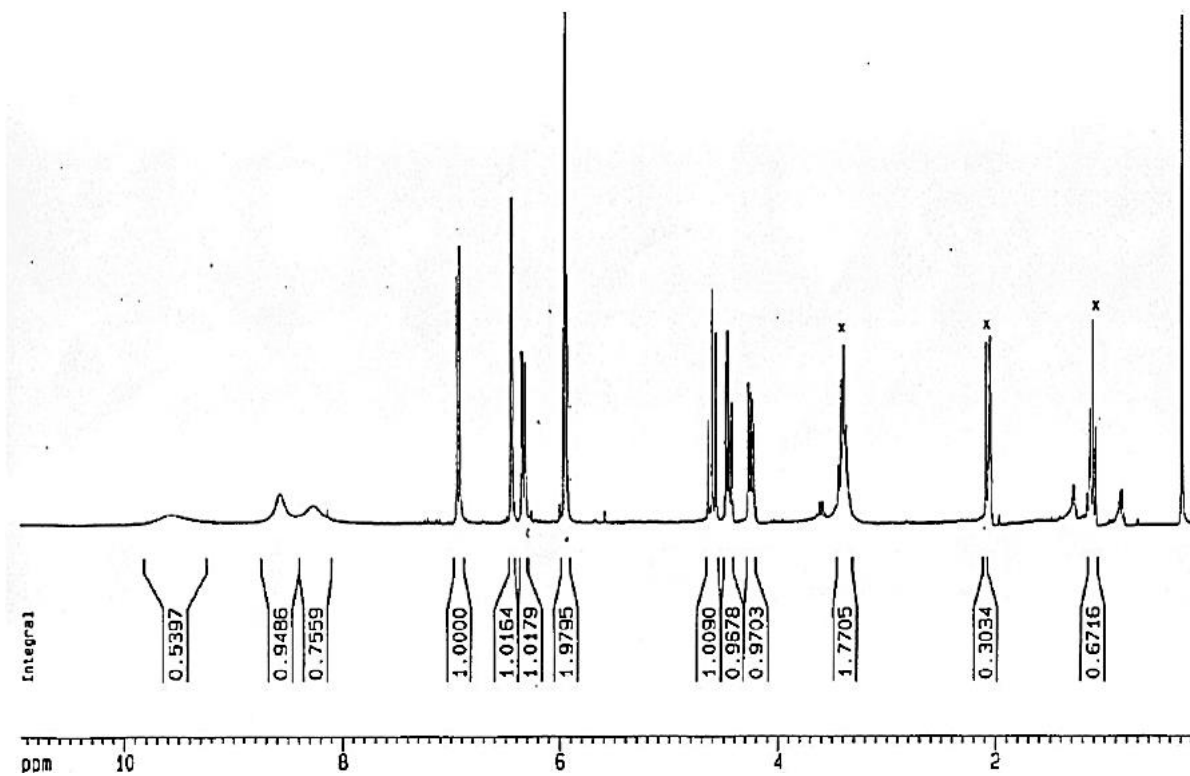
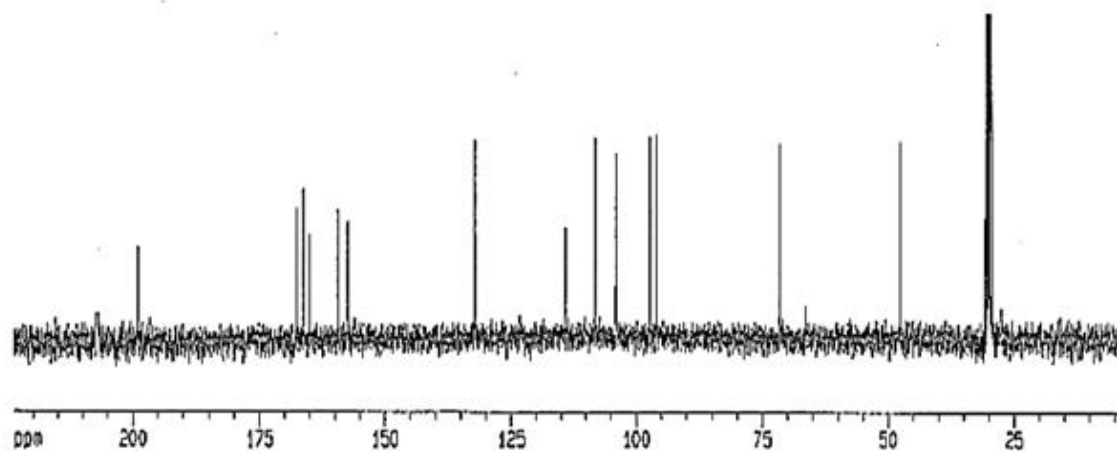
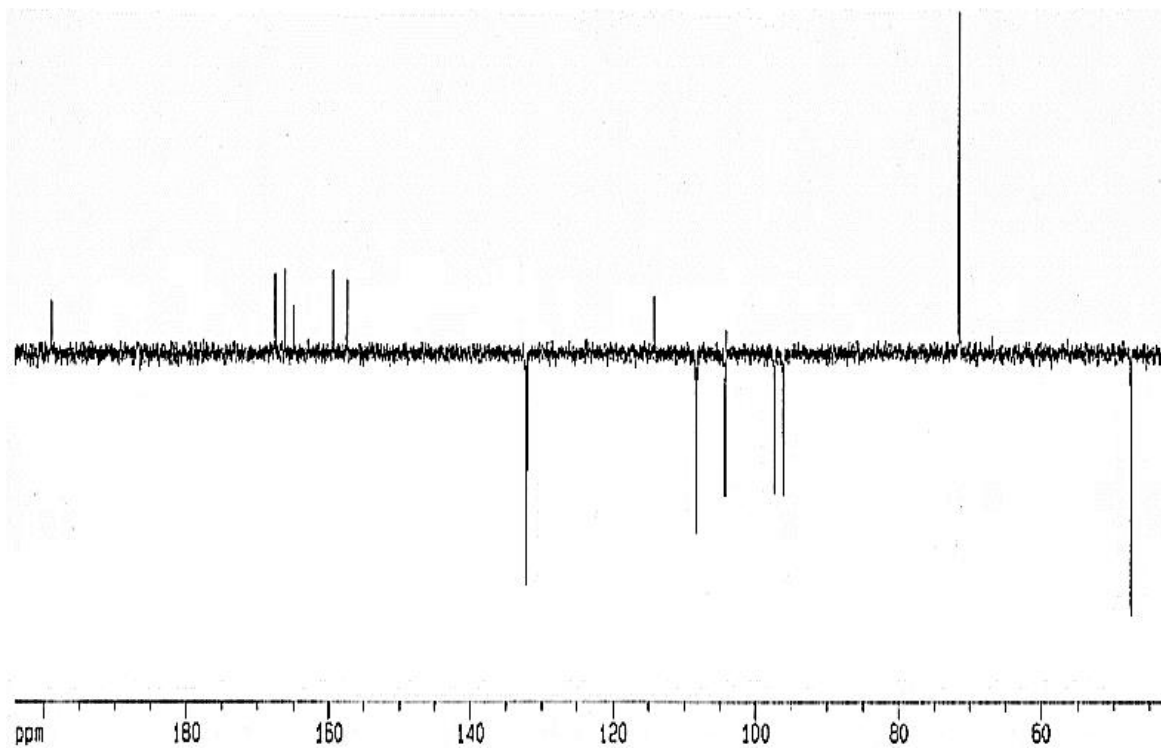


Figura 3-92. Espectro de ^1H RMN de la Dalbergioidina**Figura 3-93.** Espectro de ^{13}C RMN de la Dalbergioidina**Figura 3-94.** Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) de la Dalbergioidina

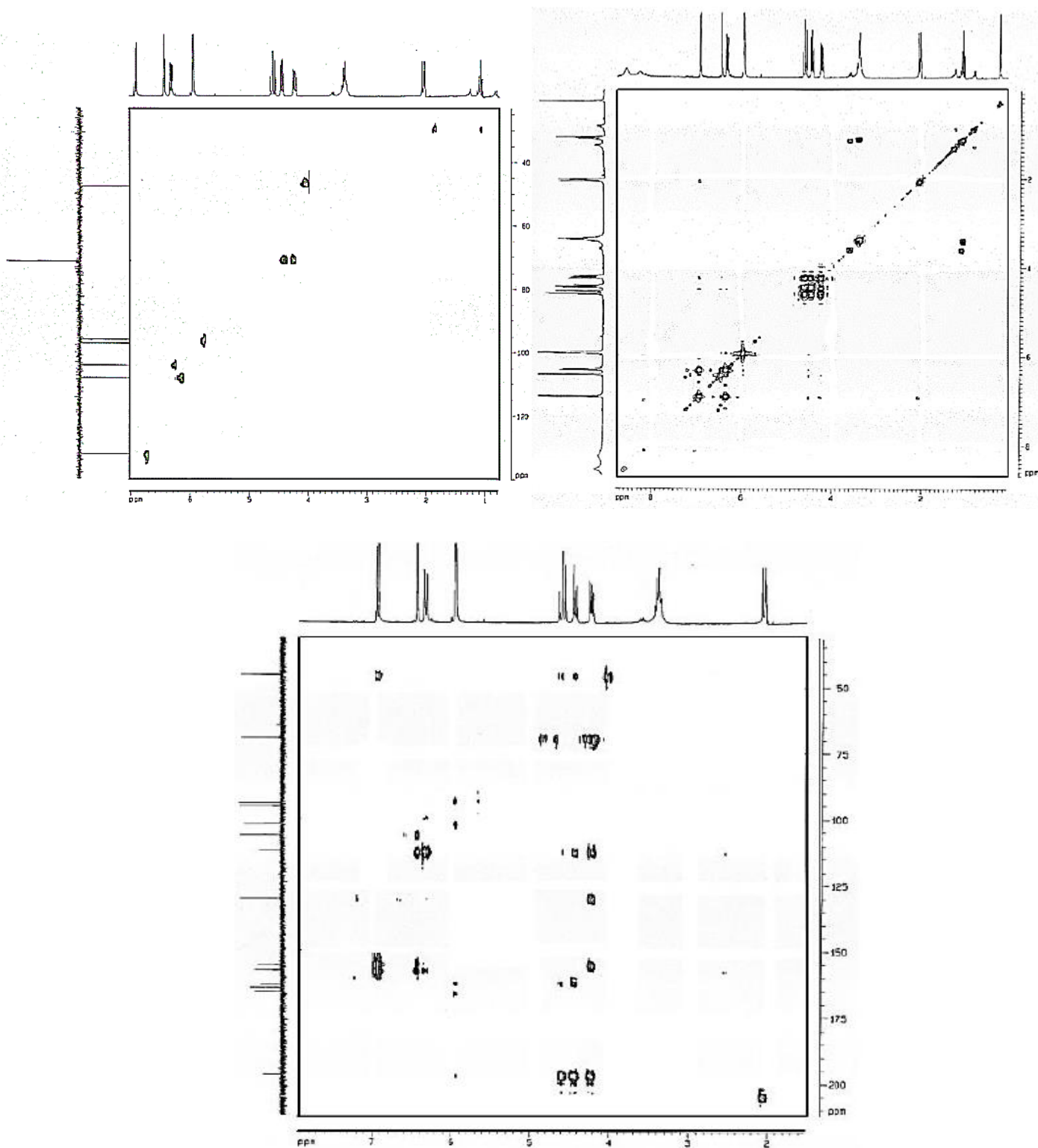


Figura 3-95. Espectros ^1H - ^1H COSY (superior izquierda), ^1H - ^{13}C HSQC (superior derecha) y ^1H - ^{13}C HMBC (inferior) de la Dalbergioidina

3.2.5. Coumestrol

El compuesto se aisló como un sólido amorfo blanco. En TLC presentó un R_f de 0.54 (*n*-hex-Et₂O, 1:3). Reveló como una banda de color amarillo con revelador universal seguido de calentamiento; se observa como una banda fluorescente azul en UV de onda corta y larga. Tiene un T_R de 43.0 min en el sistema empleado en HPLC (**Figura 2-21**). El espectro de absorción UV (**Figura 3-96**) presentó tres bandas intensas a 343 nm (longitud de onda de máxima absorción), 303 y 244 nm. El espectro de masas (FAB-MS de ion positivo) (**Figura 3-97**) de baja resolución mostró una masa de 268 y el de alta resolución 268.03689 uma, que concuerda con una fórmula molecular C₁₅H₈O₅. En ¹H RMN (**Figura 3-98**), se observaron seis protones aromáticos como dos sistemas ABX. El patrón de sustitución en el anillo A se dedujo de las señales protónicas, puesto que H1 da lugar a un doblete ($J = 8.6$ Hz) acoplado a H2 en el carbono adyacente, el cual muestra un doble de dobletes debido al acoplamiento adicional *meta*- con H4 ($J = 2.0$ Hz); la multiplicidad de H4 por su parte, es un doblete estrecho ($J = 2.0$ Hz). El patrón de sustitución 9-hidroxi del anillo B se dedujo del sistema ABX. La correlación entre los protones en ambos sistemas de espín se confirmó por espectroscopia de correlación (**Figura 3-100**). Adicionalmente, el espectro de ¹³C RMN mostró señales para quince carbonos, seis de los cuales son aromáticos no sustituidos a δ 123.8 (C1), 115.2 (C2), 104.6 (C4), 122.1 (C7), 114.9 (C8), 99.9 ppm (C10), así como una señal a campo bajo en δ 162.9 ppm correspondiente al carbono carbonilo (de éster) α,β -insaturado, el cual se asignó al C6 de un esqueleto coumestano. La estructura de este coumestano se corroboró por comparación de los espectros de RMN del material, con los obtenidos a partir de una muestra auténtica de coumestrol.

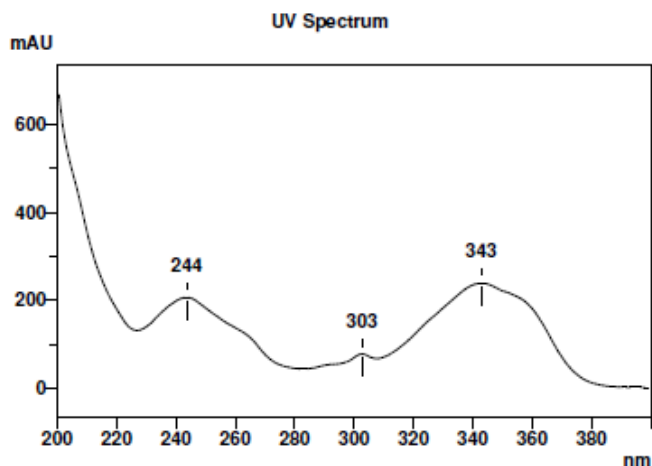


Figura 3-96. Espectro de absorción UV del Coumestrol

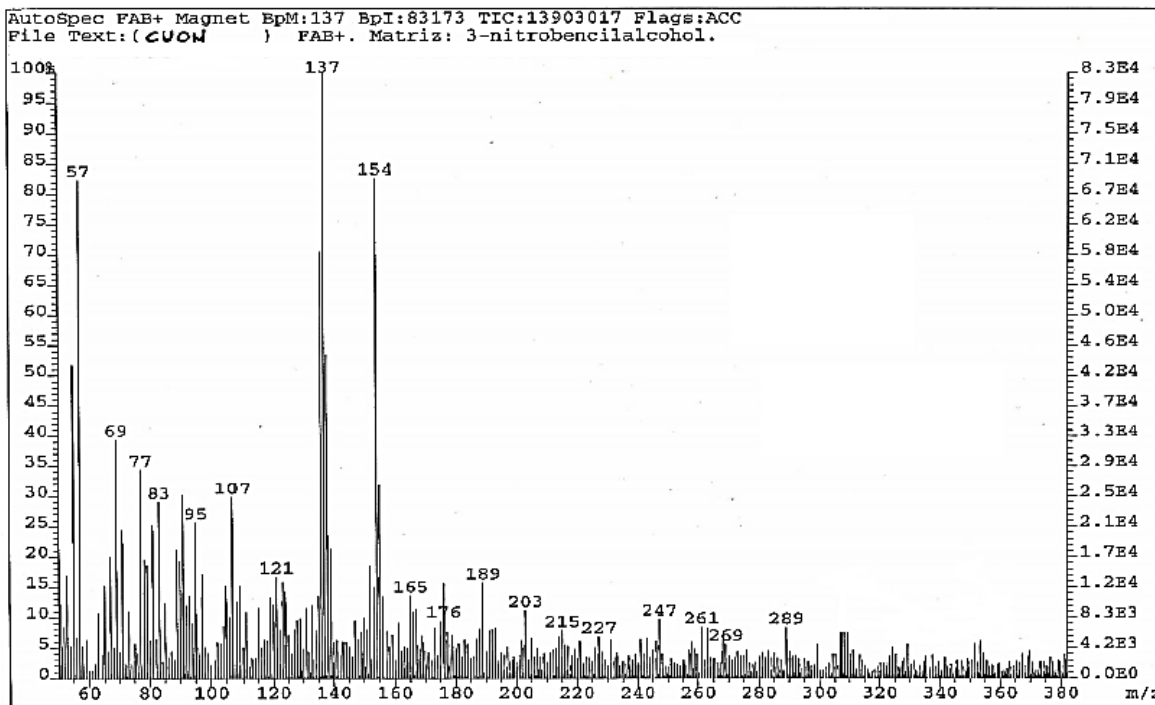


Figura 3-97. Espectro de masas (FAB de ion positivo) del Coumestrol

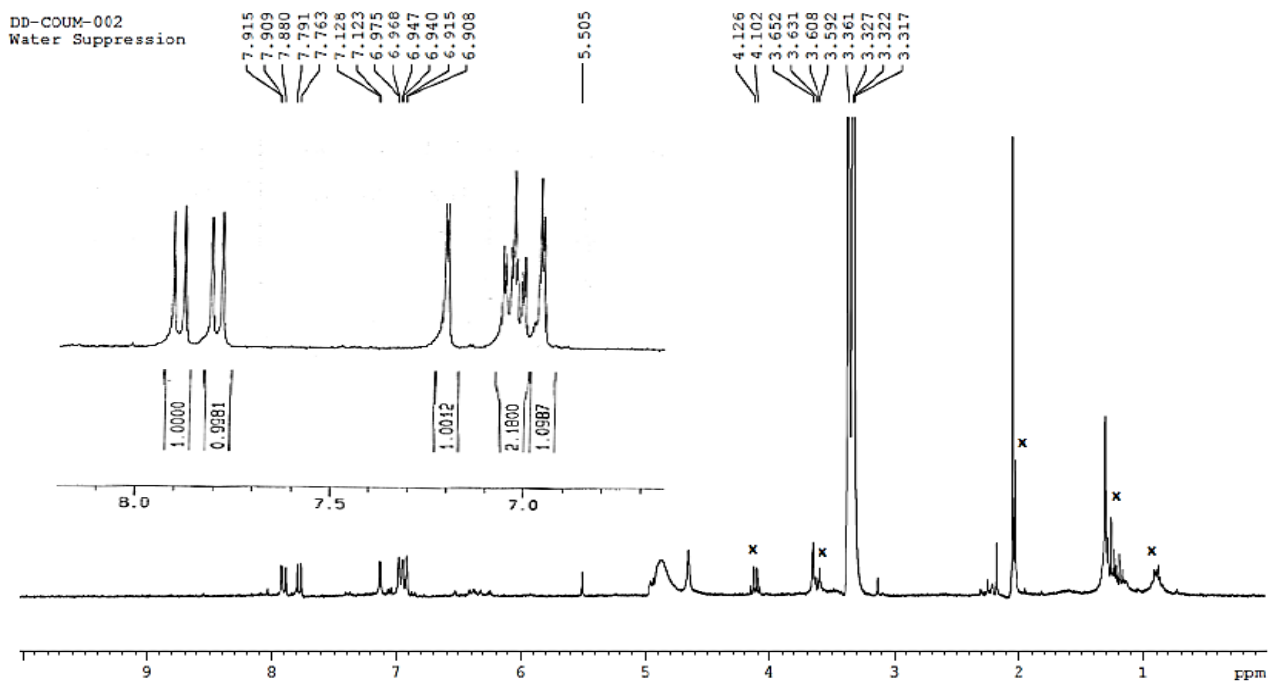


Figura 3-98. Espectro de ¹H RMN del Coumestrol

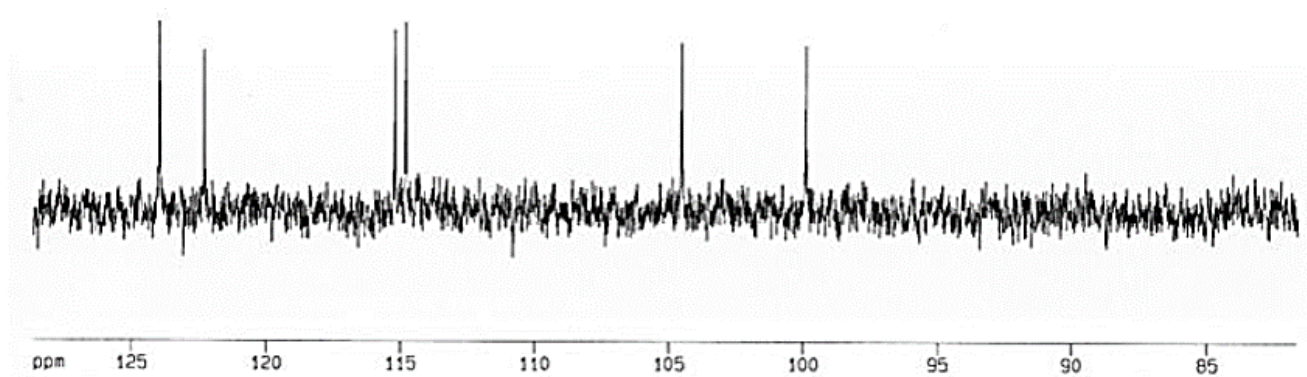


Figura 3-99. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT) del Coumestrol

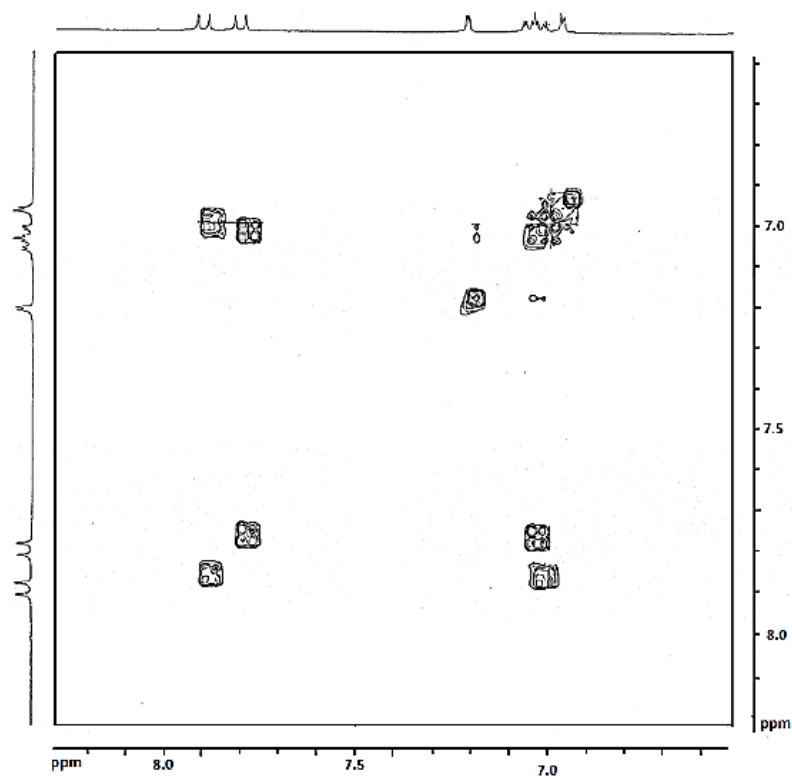


Figura 3-100. Espectro ^1H - ^1H COSY del Coumestrol

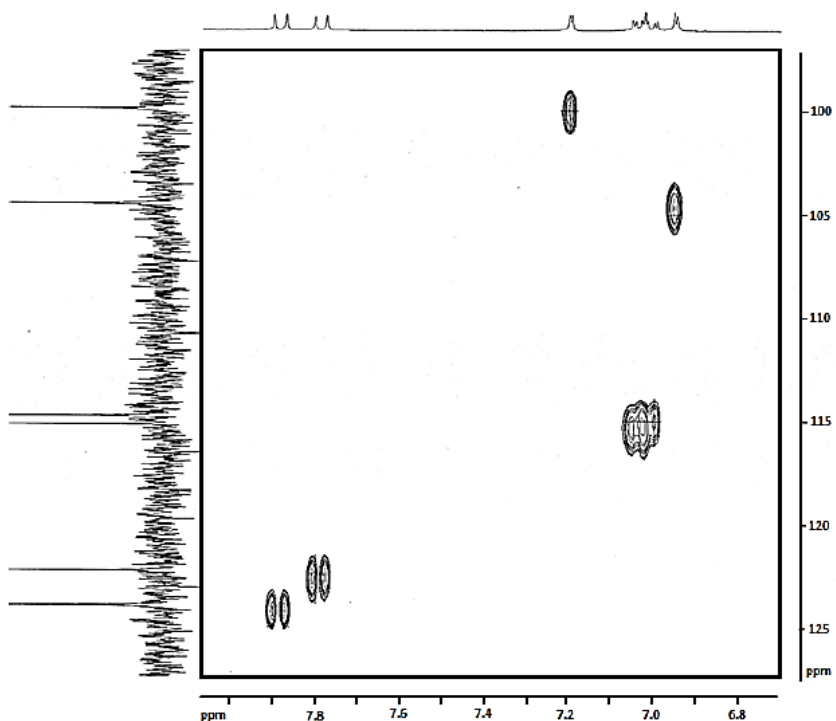


Figura 3-101. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC del Coumestrol

3.2.6. Phaseollinisoflavano

El compuesto se aisló como un aceite de color ámbar. En TLC presentó un R_f de 0.76 (n -hex- Et_2O , 1:3); reveló de color naranja con revelador universal seguido de un calentamiento. Presentó un T_R de 49.0 min en el sistema empleado en HPLC. En espectroscopia de absorción UV, el compuesto presentó bandas de absorción en 246, 278 y 342 nm. El espectro de masas (FAB- MS de ion positivo)(**Figura 3-102**) de bala resolución presentó una masa de 324 y el de alta resolución de 324.1315 uma, concordante con una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$. En los espectros de ^1H RMN (**Figura 3-103**) y ^1H - ^1H COSY (**Figura 3-105**), se observó un grupo de cinco protones mutuamente acoplados (ABMXY), asignados a H4 en δ 2.7-2.9 (m, H4eq y ax), H2ax en δ 3.91 ppm, H2 eq en δ 4.23 ppm, y H3 en δ 3.3 ppm, de un esqueleto isoflavano. Para el anillo A se observa un sistema AMX correspondiente a los protones H5, H6 y H8. En el espectro ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 3-106**) se observó que el protón vinílico H10 correlaciona simultáneamente a tres enlaces con dos carbonos aromáticos oxigenados sobre el anillo C, C2' a δ 149.4 ppm y C4' a δ 152.9 ppm, y con el carbono cuaternario alifático oxigenado C12 a δ 76.1 ppm, confirmando las sustituciones en esta porción de la molécula. Igualmente se puede apreciar que los protones sobre C2 y C4 además de correlacionar entre sí con sus

respectivos carbonos, lo hacen a tres enlaces con C1', confirmando la naturaleza isoflavano. Los datos espectroscópicos concuerdan con lo reportado en la literatura (Higgins *et al.*, 1973).

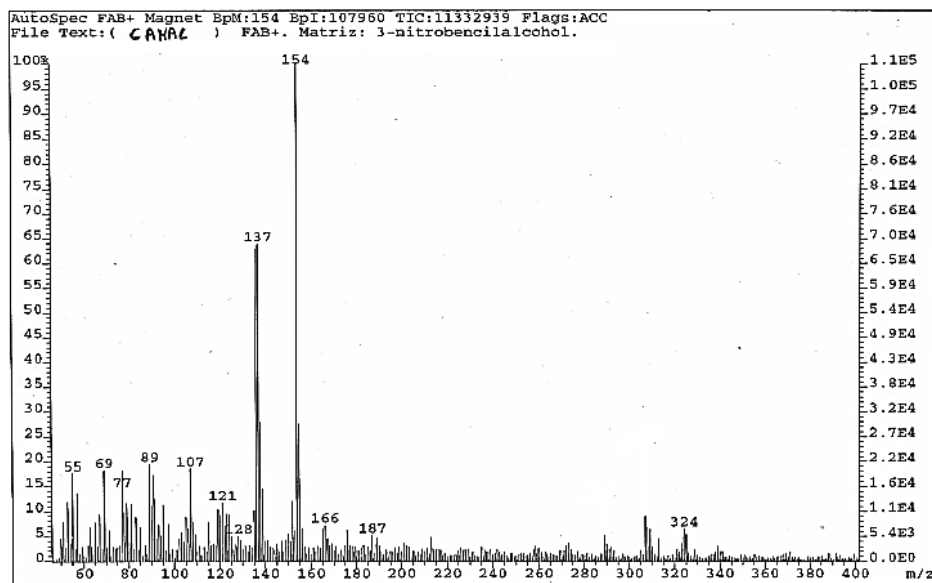


Figura 3-102. Espectro de masas (FAB de ion positivo) del Phaseollinisoflavano

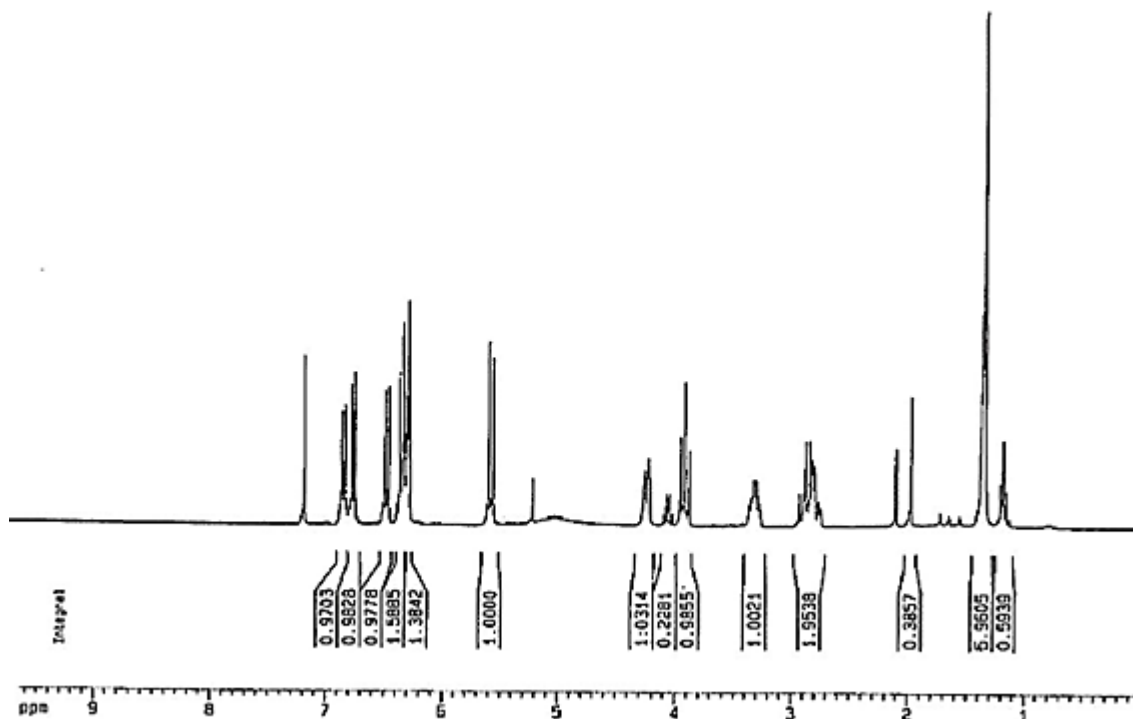


Figura 3-103. Espectro de ^1H RMN de la Phaseollinisoflavano

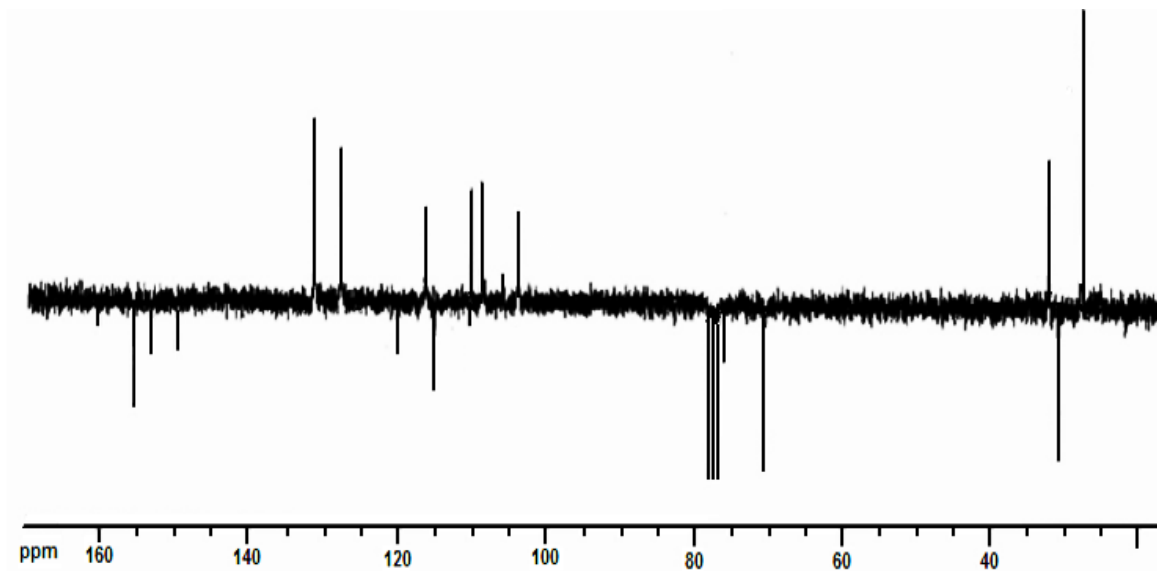


Figura 3-104. Espectro de ^{13}C RMN (JMOD) de la Phaseollinisoflavano

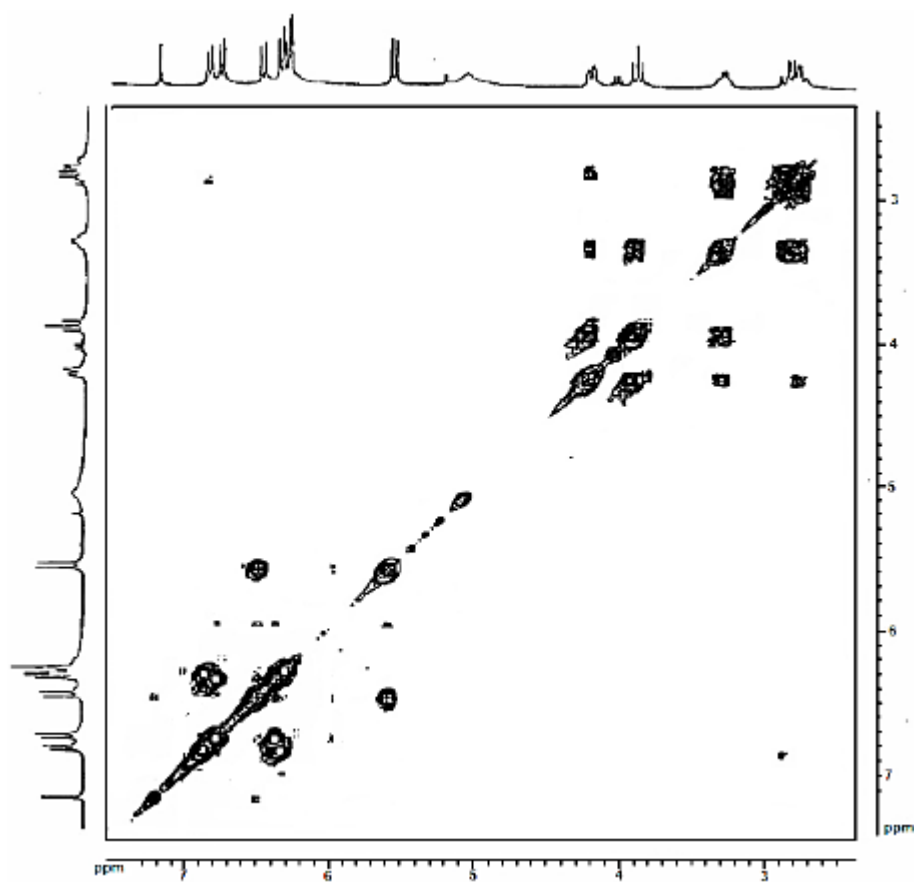


Figura 3-105. Espectro ^1H - ^1H COSY RMN de la Phaseollinisoflavano

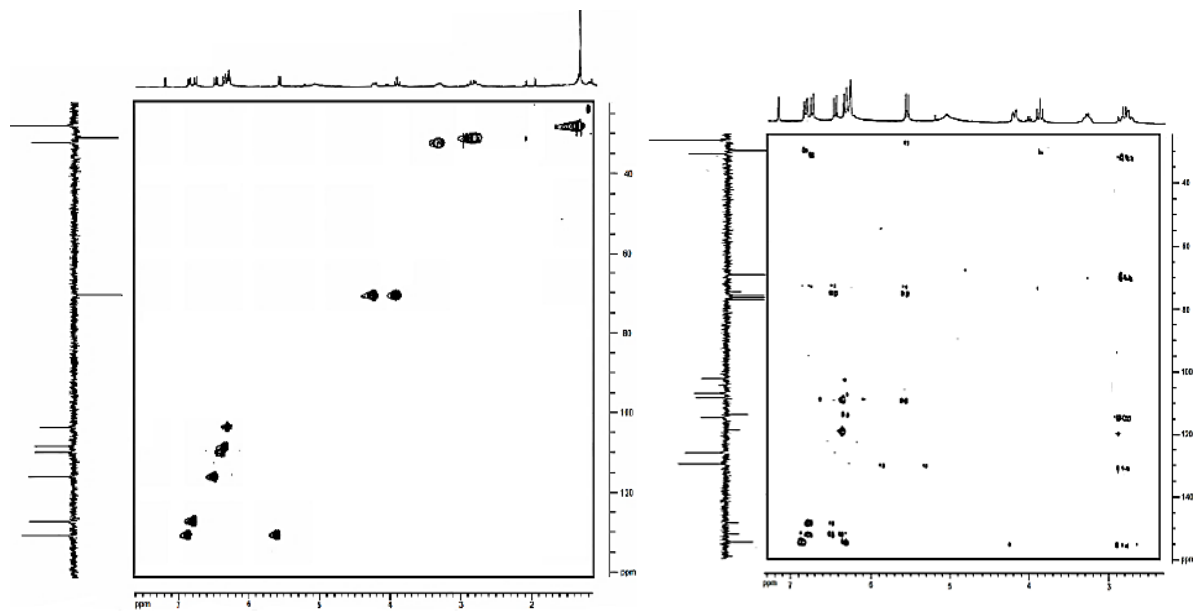


Figura 3-106. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC del Phaseollinisoflavano

3.2.7. Phaseollidina

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo blanco. En TLC presentó un R_f de 0.78 (n -hex- Et_2O , 1:3); reveló de color naranja con revelador universal seguido de calentamiento. Tiene un T_R de 51.0 min en el sistema empleado en HPLC. El espectro de masas de baja resolución (FAB-MS de ion positivo) (**Figura 3-107**) dio una masa de 324 uma y en el de alta resolución de 324.14439 uma, correspondiente a una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$. El espectro UV de la phaseollidina presentó bandas de absorción en 235, 282 y 310 nm. En ^1H RMN (**Figura 3-108**), los protones de los anillos aromáticos y el sistema heterocíclico central son muy similares a los descritos para la phaseollina. Sin embargo, en la cadena lateral isopentenil de la phaseollidina, los grupos metilo alílicos resuenan a campos más bajos, δ 1.80 y 1.85 ppm, que aquellos del anillo 3,3-dimetilcromeno. Los protones restantes $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ forman un sistema ABX, en donde el grupo metileno aparece como un doblete y el protón metínico como un singlete ancho. Las propiedades espectroscópicas coinciden con las reportadas previamente para la phaseollidina (Perrin et al., 1972).

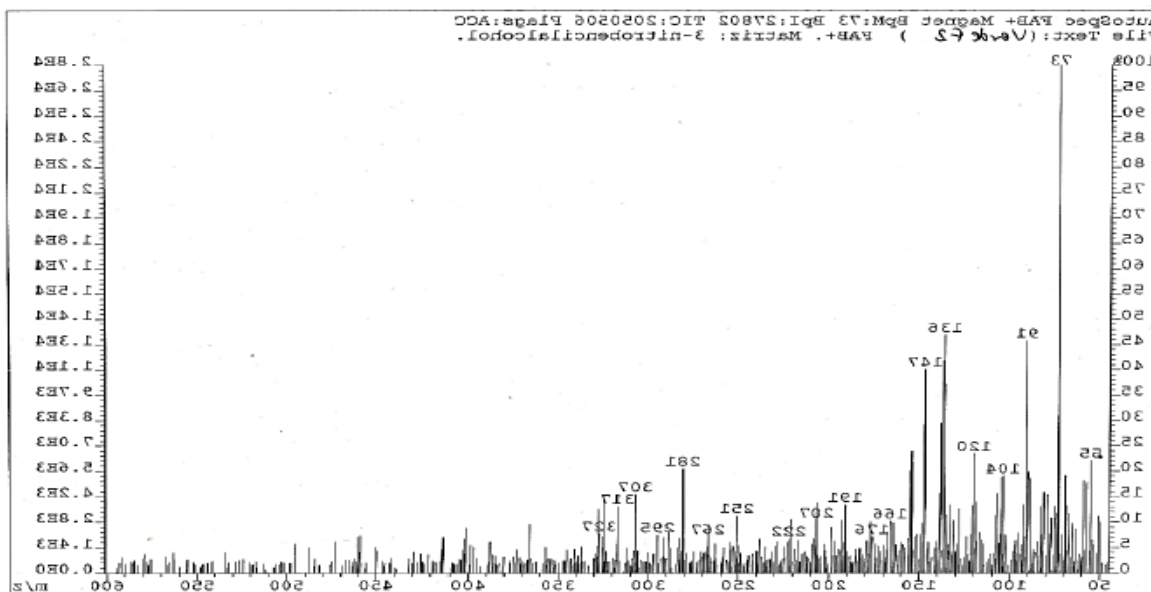


Figura 3-107. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Phaseollidina

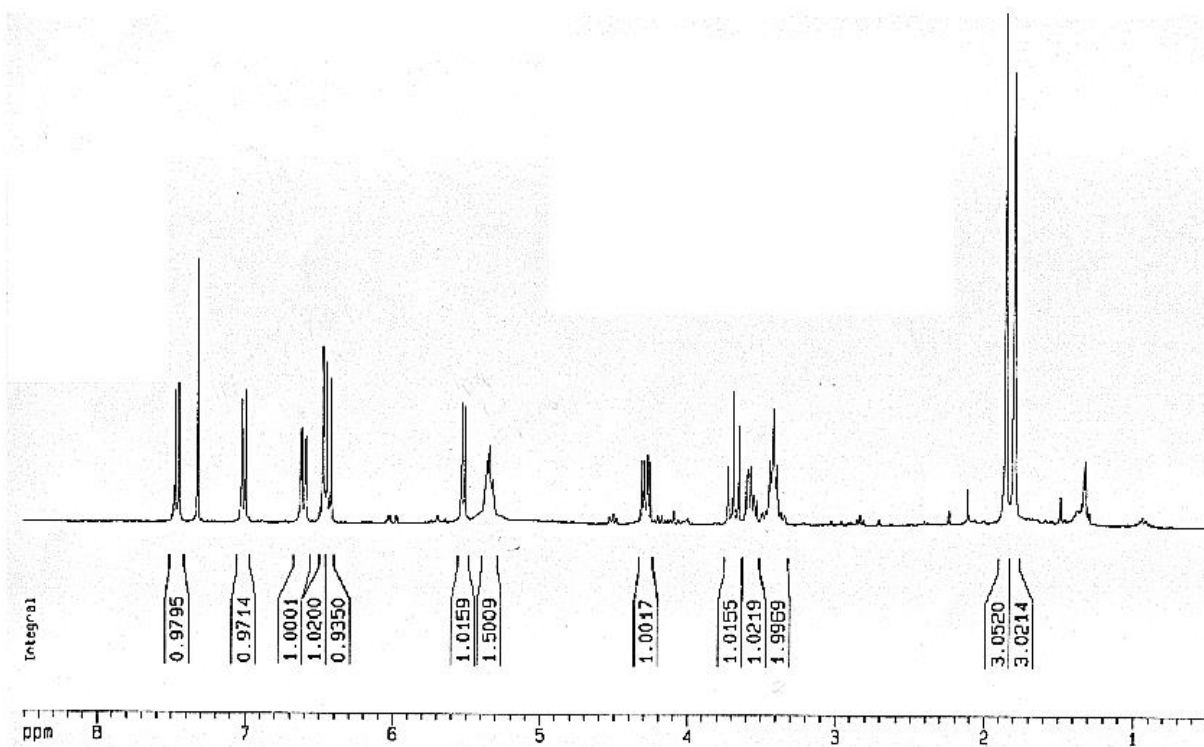


Figura 3-108. Espectro de ¹H RMN de la Phaseollidina

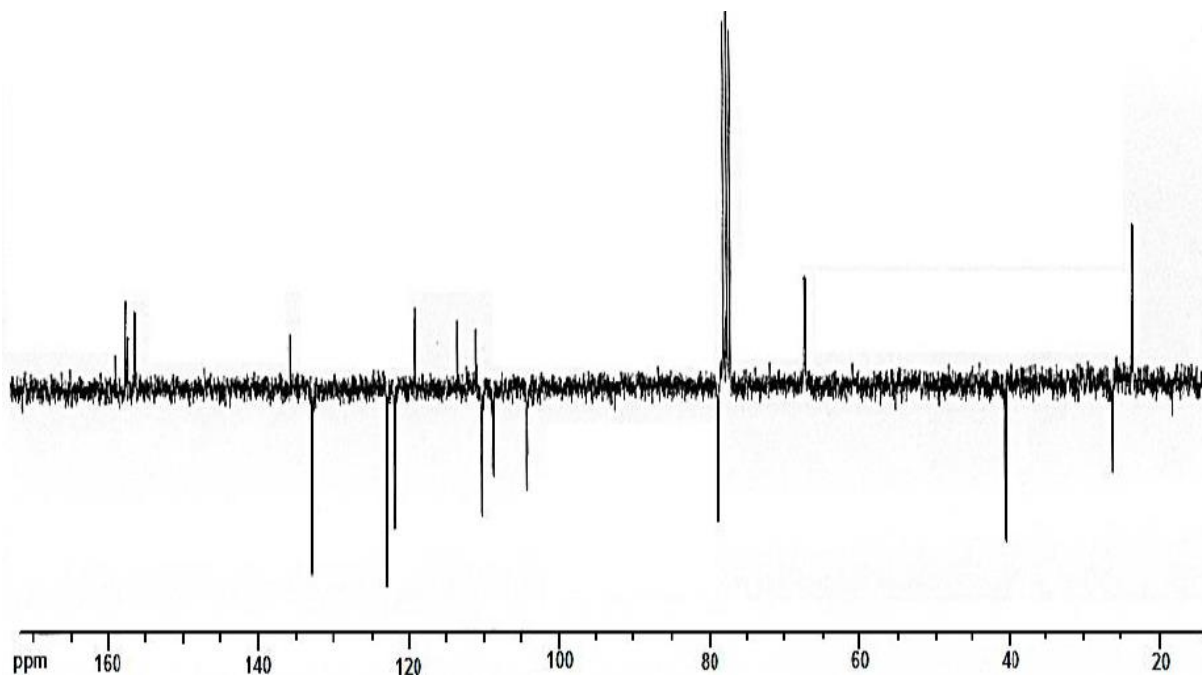
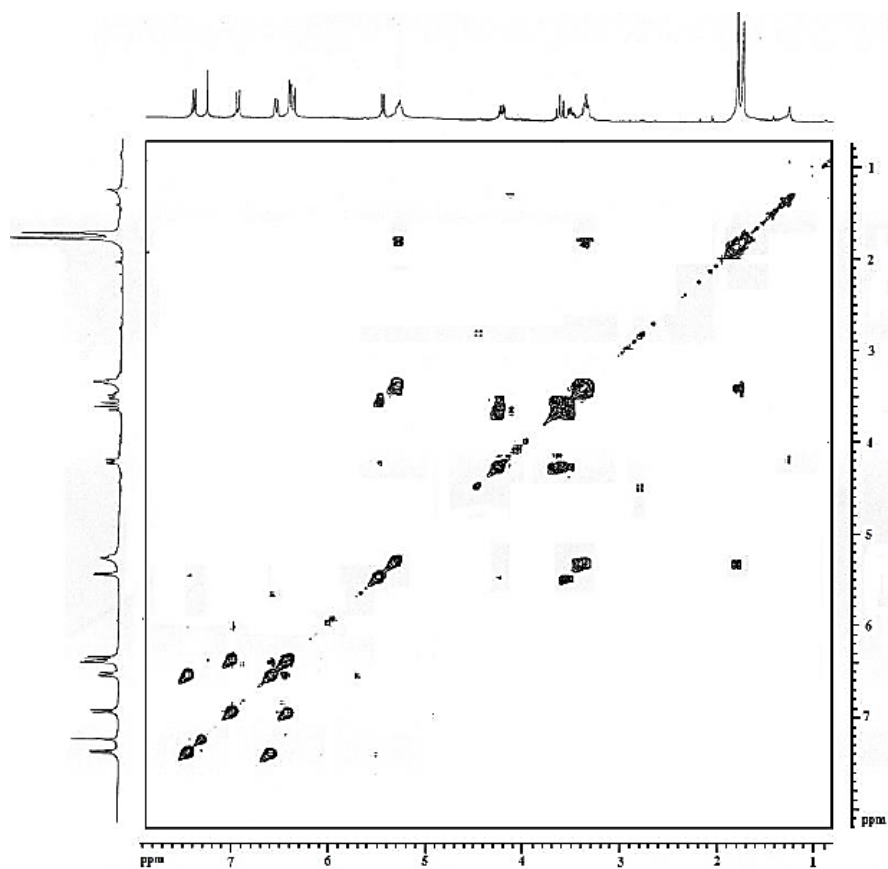


Figura 3-109. Espectro de ^{13}C RMN (JMOD) de la Phaseollidina



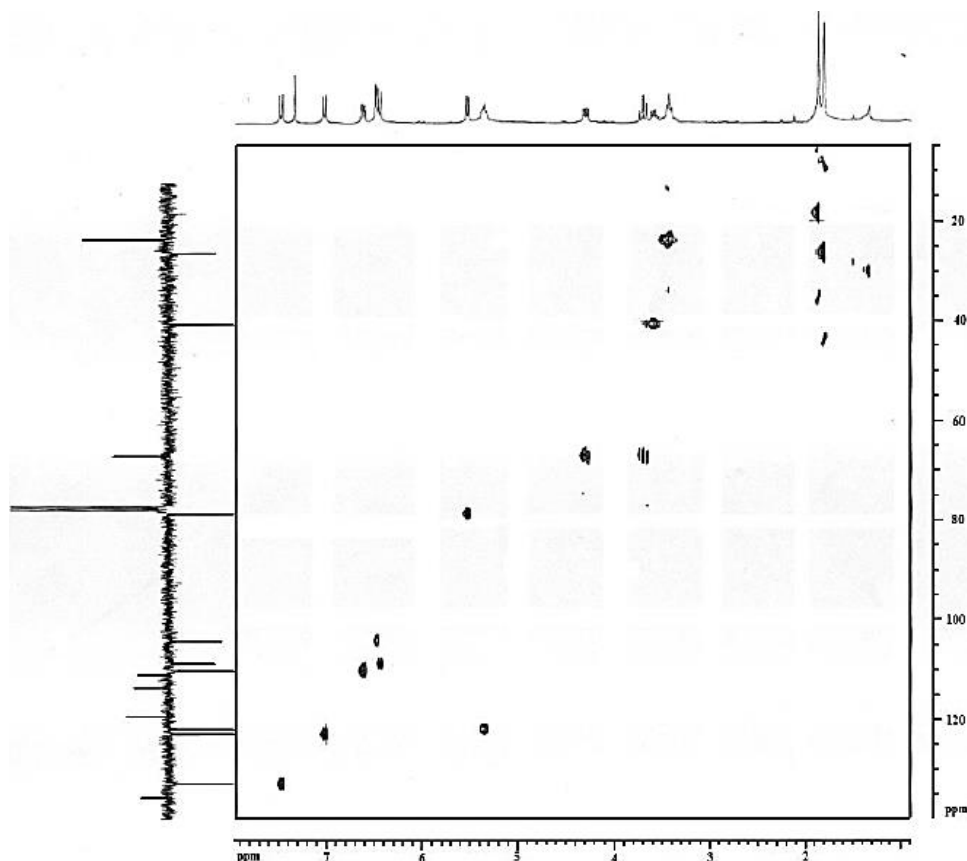


Figura 3-110. Espectro ^1H - ^1H COSY (arriba) y ^1H - ^{13}C HSQC (abajo) de la Phaseollidina

3.2.8. Phaseollina

El compuesto se aisló como un aceite ámbar. En CCF presentó un R_f de 0.87 (n -hex- Et_2O , 1:3); reveló de color verde con revelador universal, seguido de calentamiento. Tiene un T_R de 53.0 min en el sistema empleado para HPLC (**Figura 2-21**). La phaseollina presentó bandas de absorción UV intensas a 240, 279, y 310 nm (**Figura 3-111**). El espectro de masas (FAB-MS de ion positivo) (**Figura 3-112**) de baja resolución presentó una masas de 323 uma y el de alta resolución de 323.13419 uma, concordante con una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_4$. En el espectro de ^1H RMN (**Figura 3-113**), se apreció un patrón característico de un sistema aromático conteniendo un sustituyente isopentenil; este último se evidenció por las señales en δ 5.61 y 6.54 ppm, correspondientes a los protones olefínicos ($J = 9.9$, geometría *cis*). Los protones H1, H2 y H4 forman un sistema AMX; H1 aparece como doblete ancho (δ_{H} : 7.43 ppm, $J = 8.4$ Hz) acoplado con H2 (δ_{H} : 6.59 ppm, $J = 8.4$ Hz, 2.4 Hz), el cual debido al acoplamiento adicional *meta* con H4 (δ 6.46 ppm, $J = 2.4$ Hz) se desdobra en un doble de dobletes. Los

protones del anillo heterocíclico, H6, H6a y H11a, forman un sistema ABMX con un patrón espectral característico del núcleo pterocarpano: H11a aparece a campos más bajos (δ_H : 5.52 ppm, d, $J = 6.6$ Hz), debido a las corrientes diamagnéticas del anillo aromático y al desapantallamiento por el átomo de oxígeno del anillo furánico, acoplado con el protón H6a (m, δ 3.49 ppm). Las magnitudes de las constantes de acoplamiento vecinales diferencian los protones en el C6, estando el protón axial mucho más cerca de H6a que su contraparte ecuatorial. Estos acoplamientos se confirmaron mediante espectroscopia de correlación 1H - 1H COSY (Figura 3-116) y HMQC (Figura 3-116). Adicionalmente, el espectro de ^{13}C RMN (Figura 3-114, Figura 3-115) mostró señales para veinte carbonos, cinco de los cuales son aromáticos no sustituidos y que resuenan a δ 132.3 (C1), 123.9 (C7), 109.9 (C2), 108.7 (C8), y 103.7 (C4), además de cuatro señales correspondientes a carbonos aromáticos hidroxilados en δ 157.3 (C3), 156.6 (C10a), 155.4 (C9) y 153.7 ppm (C4a), y un carbono aromático unido al grupo isopreno a δ 112.4 ppm. A campos más altos se apreciaron los carbonos metínicos C11a y 6a en δ 78.8 y 39.7 ppm respectivamente; el carbono cuaternario en δ 76.2 ppm, el carbono metilénico en δ 67.0 ppm (C6) y los carbonos metílicos en δ 27.7 y 27.8 ppm. Las propiedades espectroscópicas del compuesto coinciden con las determinadas en reportes previos para la phaseollina (Perrin, 1964).

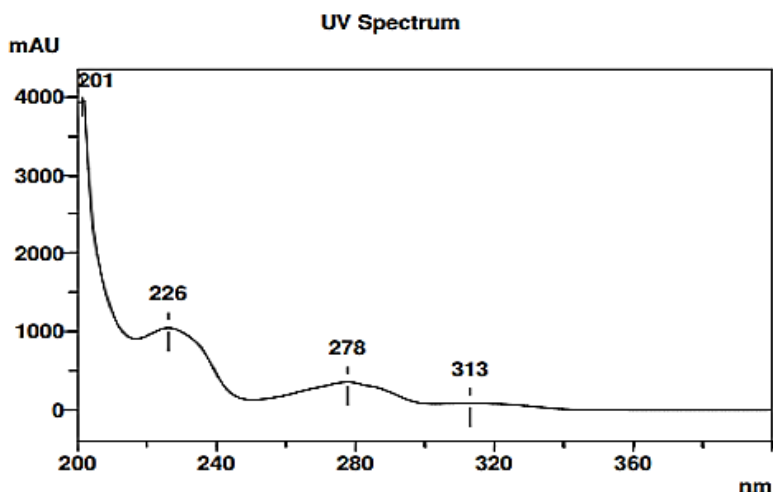


Figura 3-111. Espectro de absorción UV de la Phaseollina

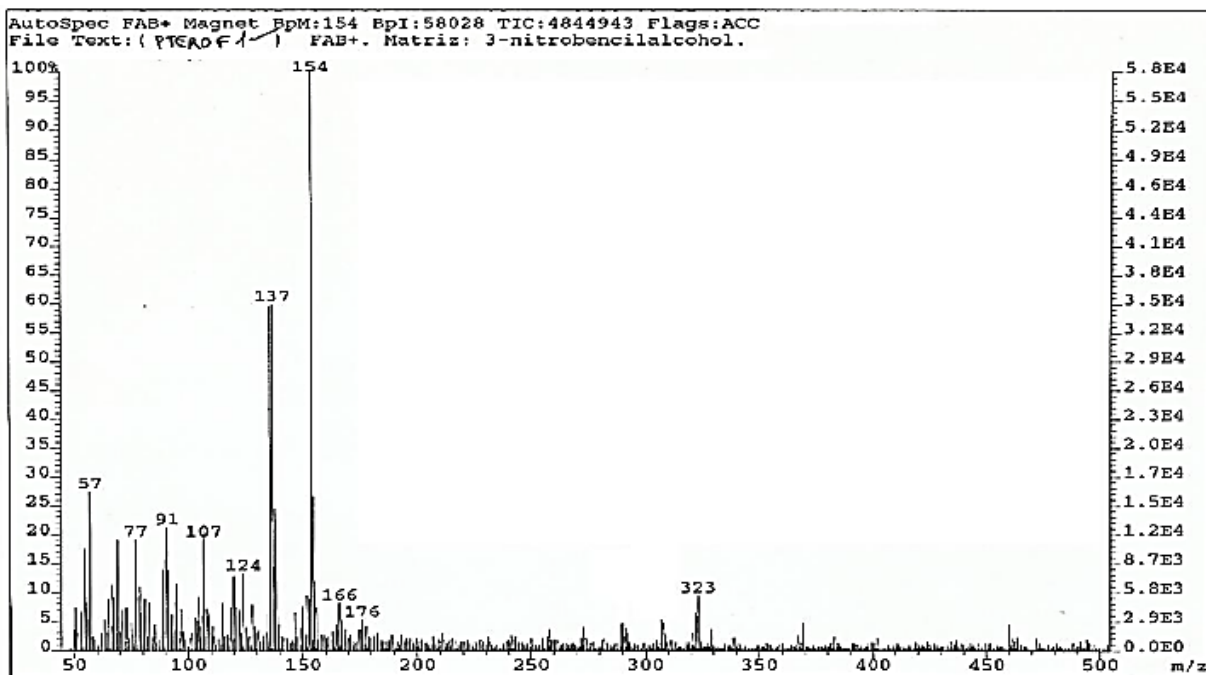


Figura 3-112. Espectro de masas (FAB de ion positivo) de la Phaseollina

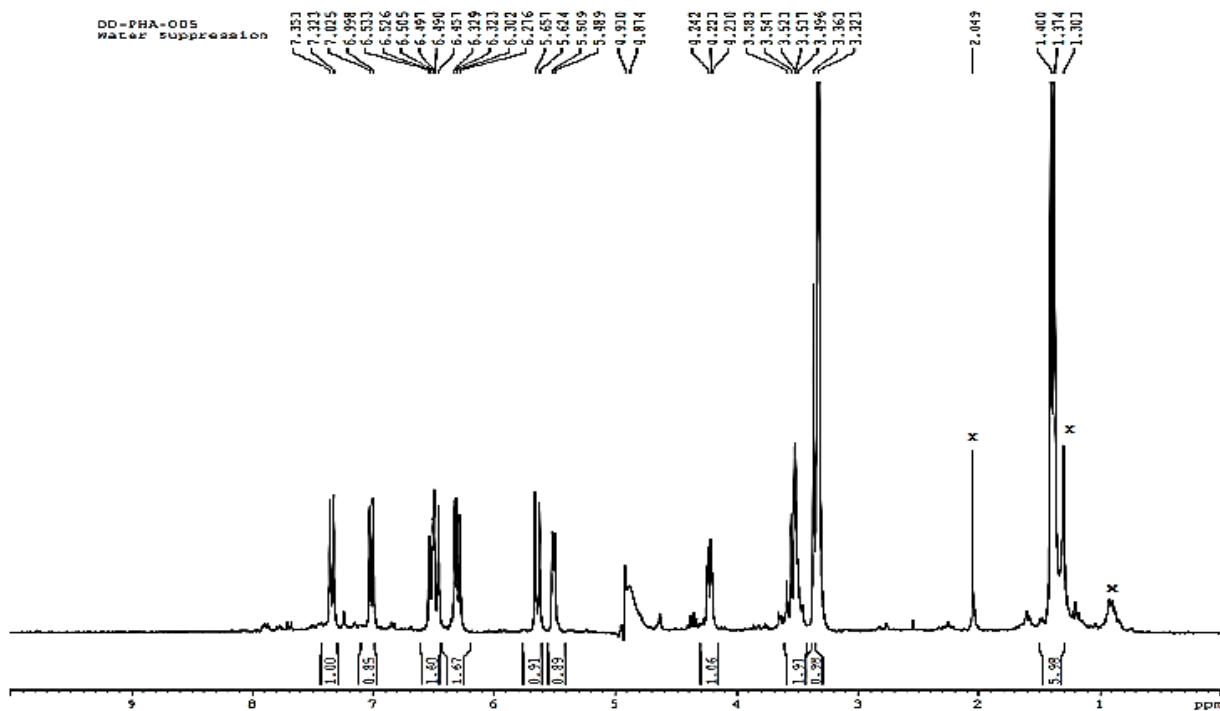


Figura 3-113. Espectro de ¹H RMN de la Phaseollina

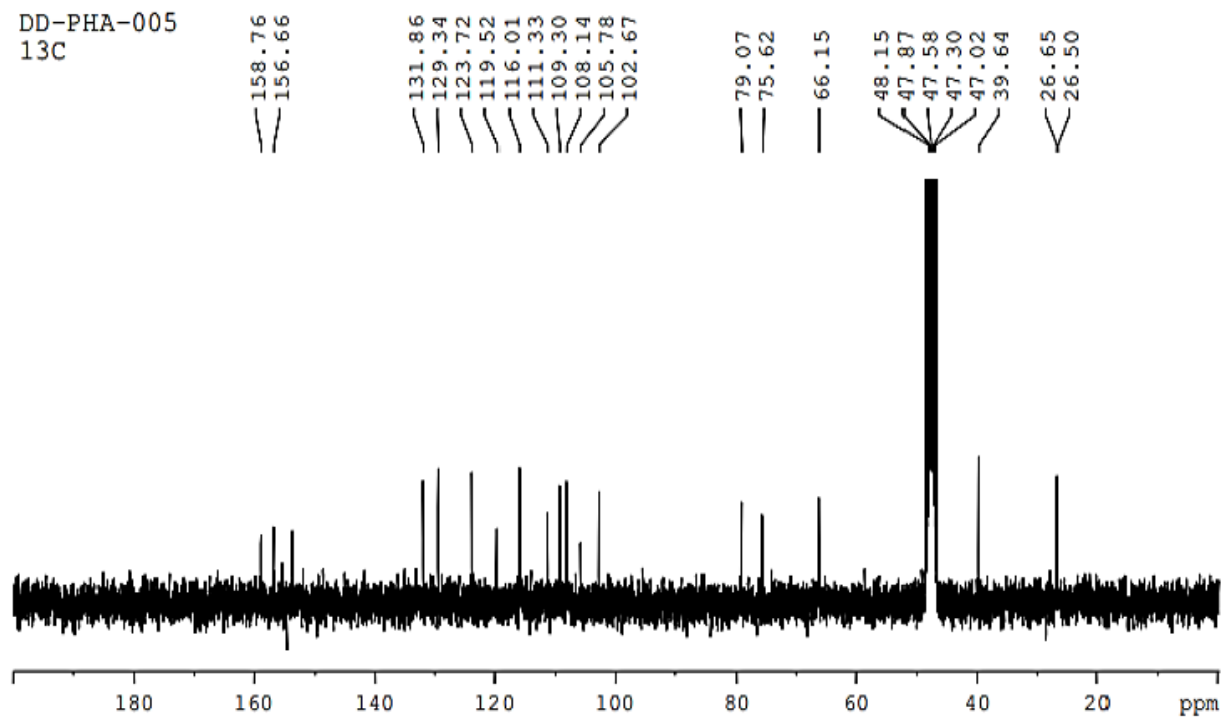


Figura 3-114. Espectro de ^{13}C RMN de la Phaseollina

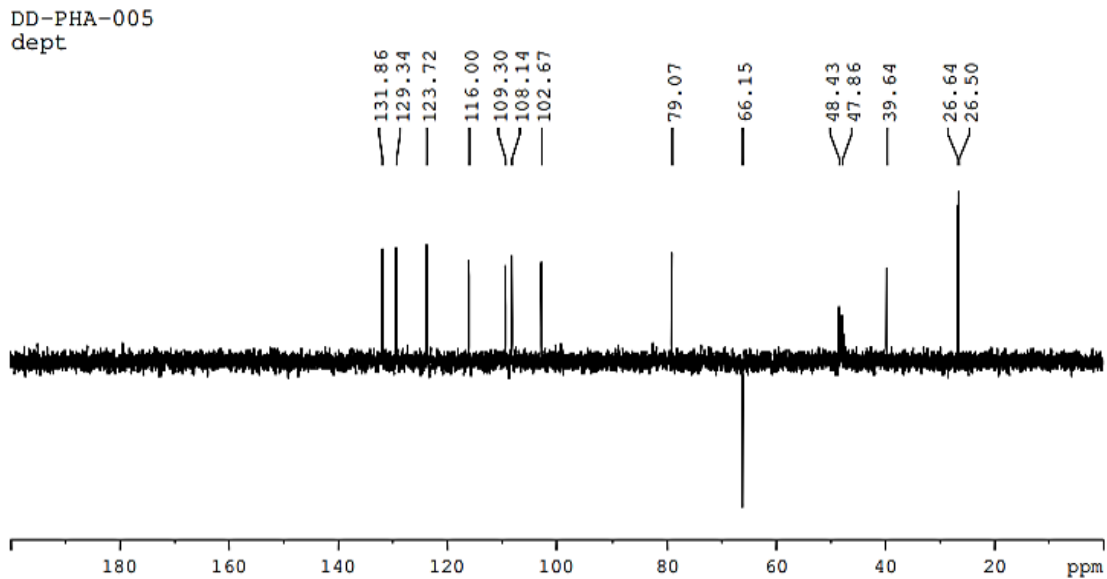


Figura 3-115. Espectro de ^{13}C RMN (DEPT 135) de la Phaseollina

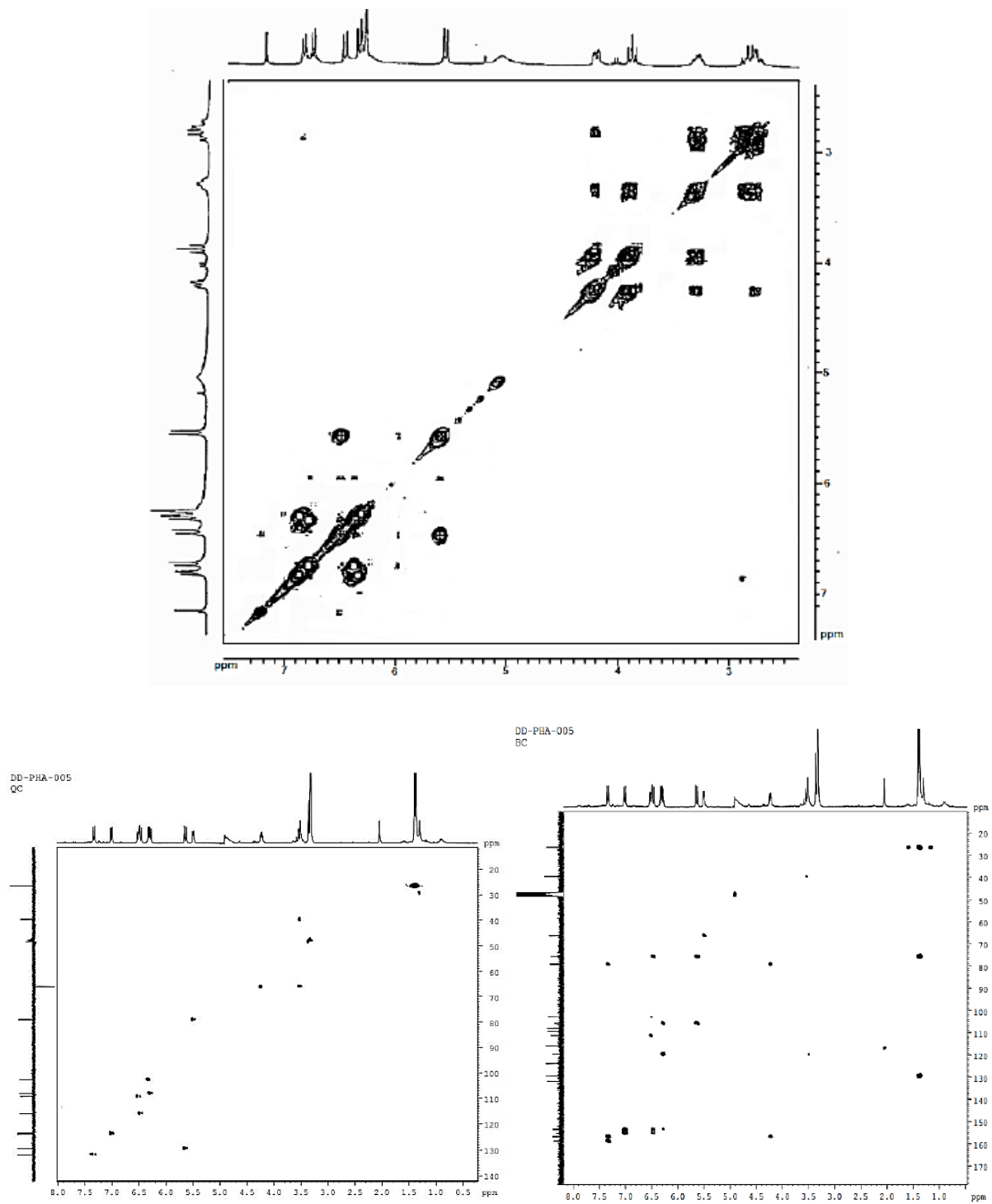


Figura 3-116. Espectro ^1H - ^1H COSY (superior), ^1H - ^{13}C HSQC (inferior derecho) y ^1H - ^{13}C HMBC (inferior izquierdo) de la Phaseollina

3.2.9. Kievitona

La identificación de compuesto y tiempo de retención se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas. Tiene un T_R de 46.0 min en el sistema empleado para HPLC (**Figura 2-21**). La kievitona presentó bandas de absorción UV intensas a 255, 280, y 334 nm (**Figura 3-117**). El espectro de masas (ESI-MS ionización por electrospray, mostró el ion $[M + H]^+$, el cual presentó una masa de 357 uma., concordante con una fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_6$.

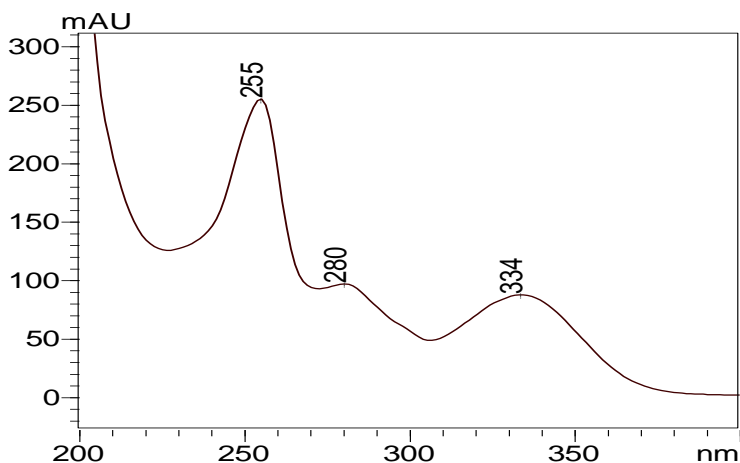


Figura 3-117. Espectro de absorción UV de la Kievitona

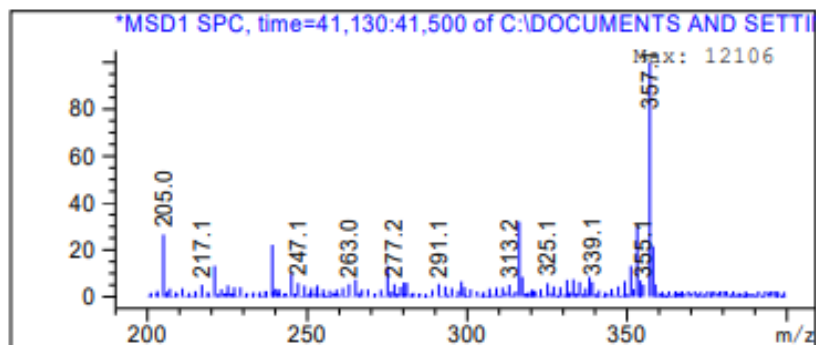


Figura 3-118. Tiempo de retención y espectro de masas para la kievitona

A continuación, se presenta la estructura de las fitoalexinas de frijol detectadas e identificadas en el presente trabajo:

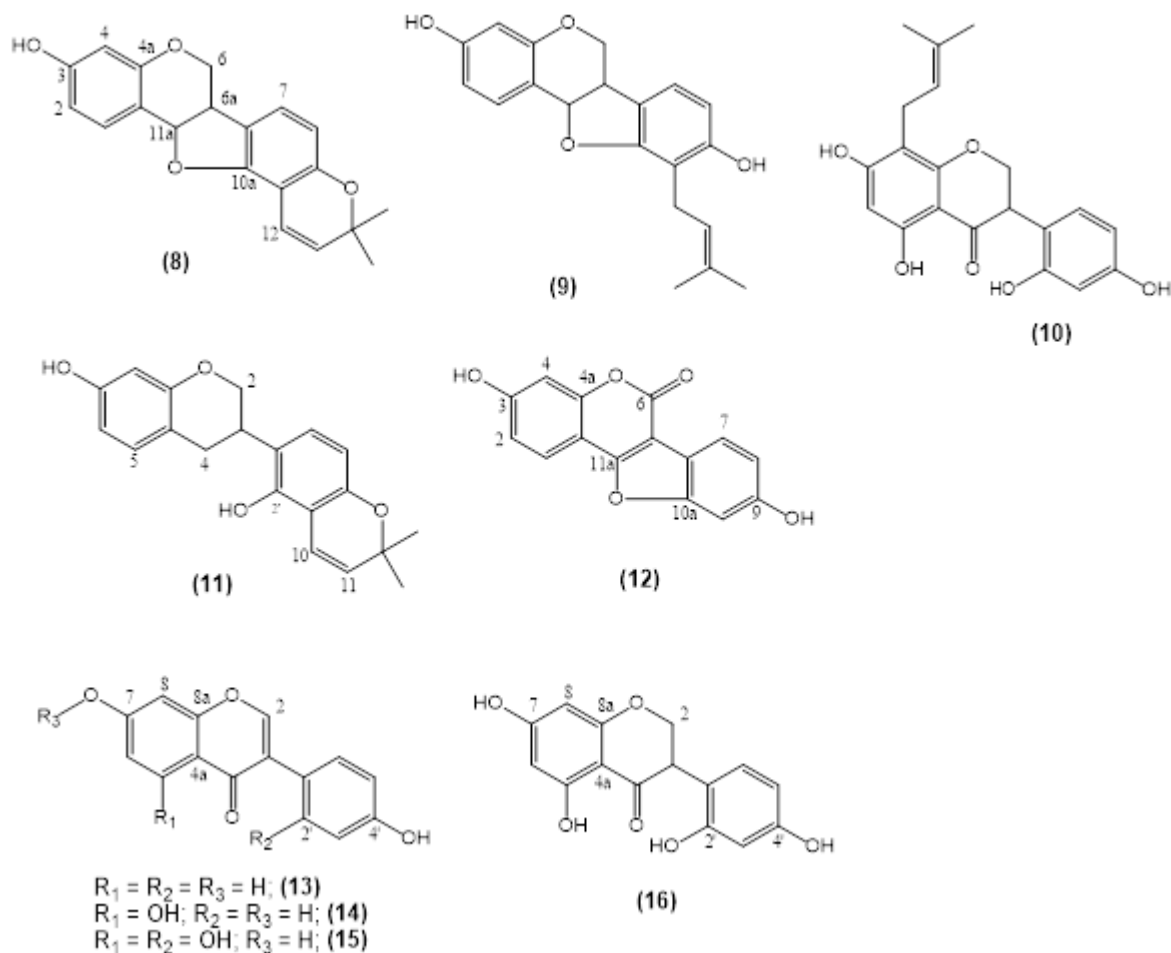


Figura 3-119. Fitoalexinas de frijol identificadas y aisladas.

3.3. Detección, identificación y cuantificación de las fitoalexinas

Se desarrolló un protocolo de detección de las fitoalexinas por cromatografía líquida de alta eficiencia. Se usó un cromatógrafo Shimadzu equipado con un detector de arreglo de diodos, una columna Luna C-18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m). Se evaluaron diferentes condiciones de fase móvil (gradientes con MeOH-agua, ACN-agua, y MeOH-0.05% AcOH), gradientes de elución, flujo (1.0 mL/min, 0.8 mL/min, y 0.7 mL/min), concentración y volumen de extracto inyectado, entre otras. Finalmente, se seleccionó una metodología con un flujo para la fase móvil de 0.7 mL/min con los solventes A: metanol y B: solución acuosa de ácido acético al 0.05% como sigue: de 10 hasta 90% de A en 60 min. Una vez transcurre este tiempo se reequilibra la columna con el sistema inicial por 8 min para una nueva inyección. Se empleó un loop de 20

μL y se inyectan $80 \mu\text{L}$ de muestra, para garantizar el llenado completo del loop. Las longitudes de onda se escanearon en el rango 200 a 500 nm.

Para la detección e identificación, inicialmente, se inyectaron soluciones de las fitoalexinas puras (**Figura 3-120**) y se determinó su tiempo de retención, T_R , seguidamente se corroboraron los valores mediante la adición de una pequeña cantidad del estándar a algunos de los extractos resultantes de cada uno de los tratamientos de inducción, y se estableció el incremento de su señal con relación a los demás constituyentes presentes en el extracto (**Figura 3-121**). Lo anterior permitió determinar con exactitud los T_R de las fitoalexinas, la pureza y sus correspondientes espectros UV/Vis bajo las condiciones empleadas en los correspondientes análisis por HPLC. A partir de estos se seleccionaron las longitudes de onda de análisis, correspondiendo a los máximos de absorción. Todos los picos presentaron una pureza superior al 95 %.

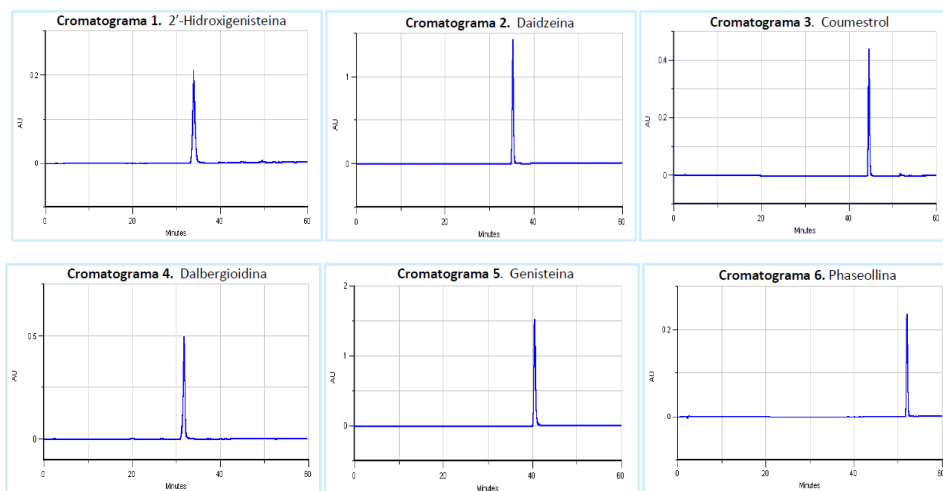


Figura 3-120. HPLC-DAD para las fitoalexinas identificadas en frijol

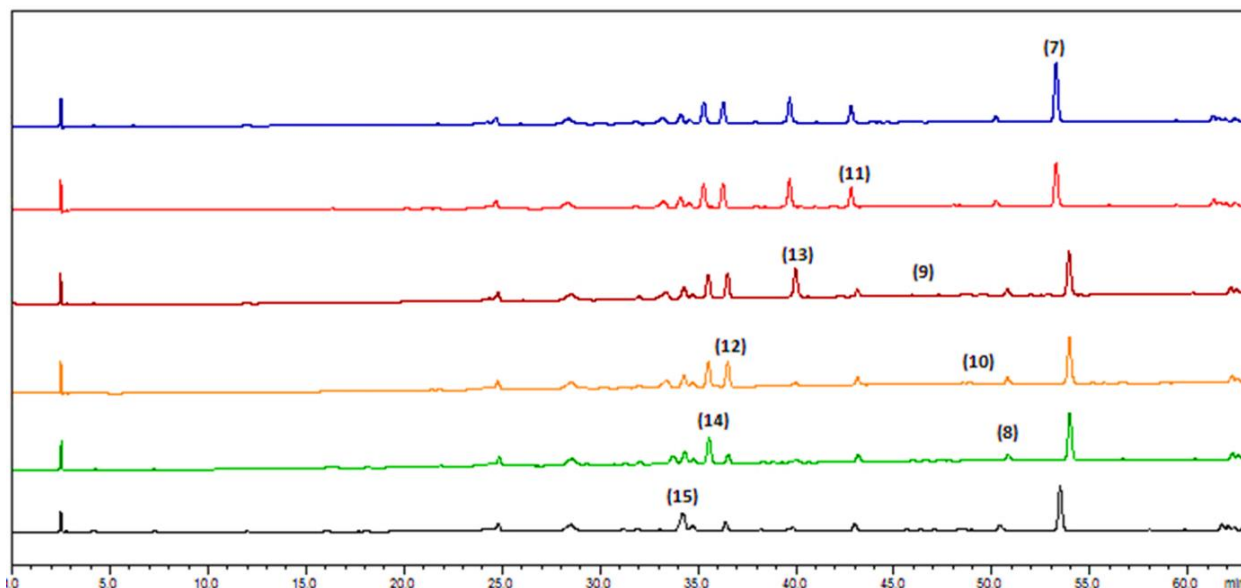


Figura 3-121. Adición de estándar de fitoalexina a un extracto de frijol inducido para la identificación de los tiempos de retención

En general, se observó un amplio número de picos de variada polaridad; las isoflavonas precursoras genisteína (**14**), daidzeína (**13**), 2'-hidroxigenisteína (**15**), y la isoflavanona dalbergioidina (**16**) presentan los menores tiempos de retención (T_R 39.0, 36.0, 35.0, 34.0 min, respectivamente), indicando una mayor polaridad. A mayores tiempos de retención aparece el cumestano cumestrol (**12**, T_R 43.0 min), y posteriormente las fitoalexinas preniladas: la isoflavona prenilada kievitona (**9**, T_R 46.0 min), los pterocarpanos prenilados phaseollidina (**8**, T_R 51.0 min) y phaseollina (**7**, T_R 53.0 min), y el isoflavano prenilado phaseollinisoflavano (**10**, T_R 49.0 min), indicando una menor polaridad. Las longitudes de onda de análisis correspondieron a 248 nm para daidzeína, 259 nm para genisteína, 286 nm para dalbergioidina y kievitona, 278 nm para 2'-hidroxigenisteína, phaseollina, phaseollidina, y phaseollinisoflavano, y 343 nm para coumestrol.

Para la cuantificación se construyeron las curvas de calibración (**Figura 3-122**) de cada fitoalexina, a la longitud de onda de análisis. Todas las curvas de calibración presentaron un coeficiente de correlación lineal mayor que 0.95. Las fitoalexinas phaseollidina y phaseollinisoflavano, aisladas en cantidades muy pequeñas, se analizaron usando la curva de calibración de la phaseollina, dada sus similitudes tanto en estructura como en su espectro de absorción. Similarmente, la kievitona se cuantificó usando la curva de calibración de la dalbergioidina.

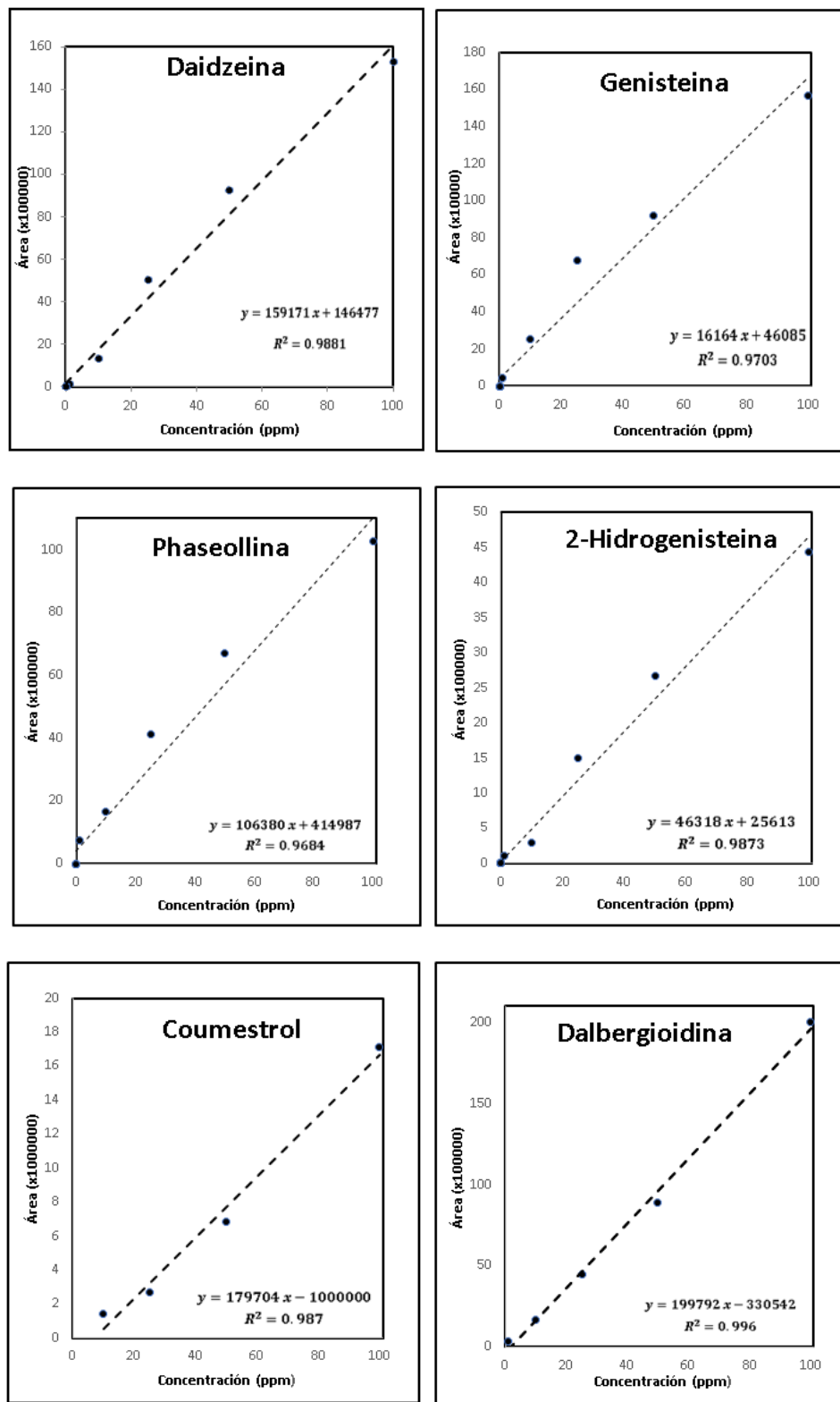


Figura 3-122. Curvas de calibración para la cuantificación de fitoalexinas en plántulas de frijol

3.4. Elicitación de fitoalexinas en frijol con metil jasmonato.

Para llevar a cabo el estudio de la producción de fitoalexinas del tipo isoflavonoide, se analizó el efecto de variables como la variedad de frijol, el tiempo post-inducción, la concentración y estructura del elicitor, teniendo en cuenta diferentes reportes sobre la importancia de dichas variables (Morrisey & Osbourn, 1999; Soriano-Richards et al., 1998).

Inicialmente, se analizó el efecto del tiempo post-inducción y la concentración de metiljasmonato en la biosíntesis y acumulación de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de plántulas de frijol, de las variedades ICA Cerinza y Uribe Rosado. Con base en este análisis se determinaron variables como concentración óptima del elicitor y tiempo de máxima acumulación de fitoalexinas, para las evaluaciones posteriores.

3.4.1. Efecto del tiempo post-inducción en la elicitación con metiljasmonato

Las plántulas fueron inmersas durante 3 h en una solución 0.44 mM metil jasmonato y posteriormente se incubaron durante 96 h, posteriores a la inducción. Cada 24 h, a las plántulas se les retiraron cuidadosamente los cotiledones y se descartaron, y los hipocótilos-raíz se extrajeron por maceración en presencia de etanol. Una vez removido el solvente a presión reducida, la fracción acuosa se extrajo con AcOEt, y el contenido de fitoalexinas se analizó por HPLC. El perfil cromatográfico de los extractos en función del tiempo post-inducción (24, 48, 72, y 96 h), se presenta en la **Figura 3-123**. Como control se emplearon los hipocótilos-raíz de plántulas tratadas sólo con agua.

En general, se observa un incremento notable en la concentración de algunas de las fitoalexinas en el curso del tiempo en comparación con el control. A medida que aumenta el tiempo post-inducción, se presenta aumento en la intensidad de los picos, particularmente de la phaseollina. Adicionalmente, se observa que la composición en los tejidos elicitados es usualmente más compleja, y se presentan otros metabolitos, que no pudieron ser identificados en el presente estudio. Evidentemente como resultado del tratamiento con 0.44 mM, se genera un incremento significativo de las fitoalexinas de fríjol, particularmente del pterocarpano phaseollina, lo que podría ser usado como una alternativa para proteger los cultivos de frijol. La phaseollina ha demostrado ser altamente activa contra microorganismos patogénicos (Ingham, 1982; Mohamed et al., 1987).

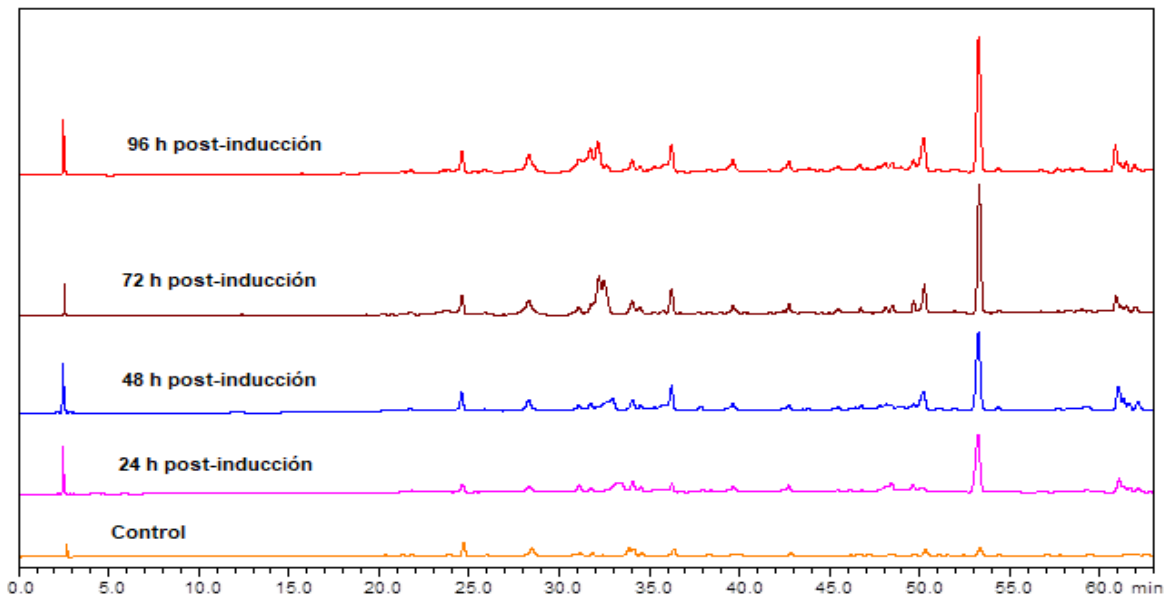


Figura 3-123. Perfil cromatográfico característico del efecto en el curso del tiempo post-inducción de la acumulación de fitoalexinas en hipocótilos-raíz de frijol variedad ICA Cerinza, elicitada con 0.44 mM metiljasmonato (longitud de onda de análisis: 278 nm).

La concentración de las fitoalexinas en el curso del tiempo en la variedad ICA Cerinza como resultado de la inducción con 0.44 mM metiljasmonato, se presenta en la **Figura 3-124**. En general, se observa un aumento gradual de la concentración de algunas de las fitoalexinas con el avance del tiempo. Se encontró que durante las primeras 72 h, la fitoalexina mayoritaria correspondió a la isoflavona genisteina (31.4 $\mu\text{g/g}$ a las 72 h). A las 48 h, se alcanzaron los mayores niveles de dalbergiodina (3.4 $\mu\text{g/g}$), 2'-hidroxigenisteina (5.9 $\mu\text{g/g}$), y daidzeina (5.2 $\mu\text{g/g}$). Luego, entre 72 y 96 h post-inducción, se observó un leve decrecimiento en la concentración de genisteina y daidzeina, acompañado de un incremento notable en la concentración de los pterocarpanos phaseollina (35.5 $\mu\text{g/g}$ a las 96 h) y phaseollidina (6.0 $\mu\text{g/g}$ a las 96 h), y el phaseollinisoflavano (1.2 $\mu\text{g/g}$ a las 96 h). Comparado con el control, el incremento de phaseollina en los tejidos elicitados luego de 96 h post-inducción fue de aproximadamente 70 veces. Este comportamiento es consistente con el hecho de que durante las primeras horas se biosintetizan las isoflavonas precursoras, genisteina y daidzeina, y finalmente en tiempos más prolongados los productos biosintéticos más elaborados, como los pterocarpanos. Se ha establecido que existen dos rutas biosintéticas separadas para la formación de fitoalexinas isoflavonoide en frijol, la ruta 5-hidroxi y la 5-deoxi (Brooks & Watson, 1985). La primera ruta involucra la secuencia genisteina \rightarrow 2'-hidroxigenisteina \rightarrow dalbergiodina \rightarrow kievitona. La ruta de los 5-deoxiisoflavonoides usa daidzeina como

precursor, y conduce a dos ramificaciones: una que pasa a través de phaseollidina a phaseollina y phaseollinisoflavano, y la otra que produce coumestrol. La producción predominante de las isoflavonas durante las primeras horas, y posteriormente de los pterocarpanos ha sido informada por otros autores (Botero et al., 2021).

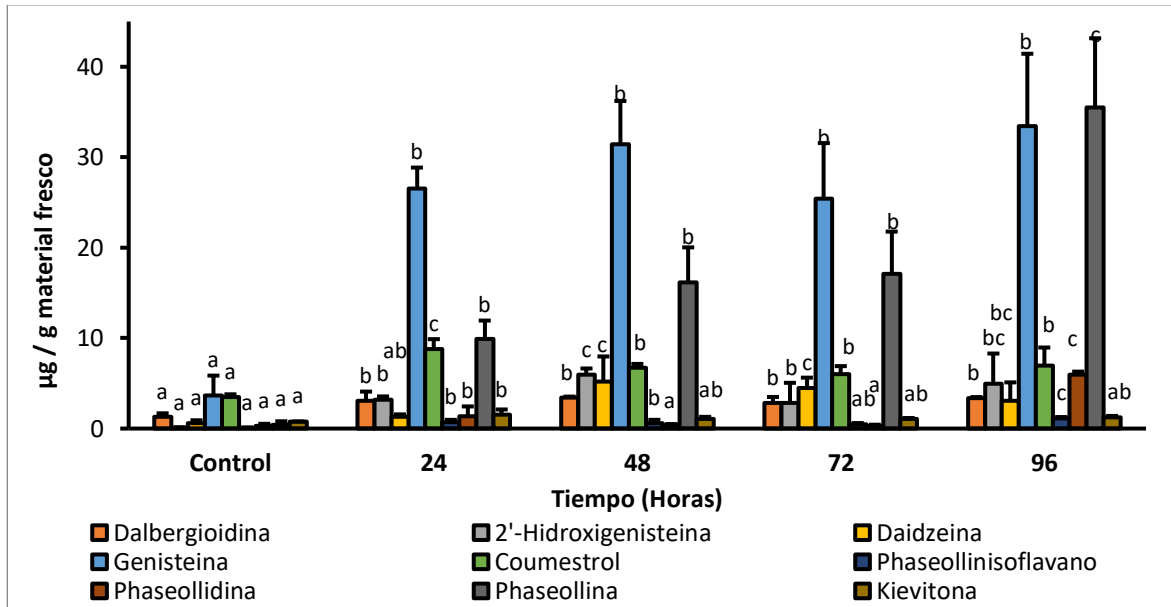


Figura 3-124. Concentración de fitoalexinas en el curso del tiempo en hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con 0.44 mM metil jasmonato.

La presencia en los controles (plántulas tratadas con agua) de niveles considerables de genisteína (3.7 µg/g) y coumestrol (3.5 µg/g), puede sugerir que estos metabolitos pueden ser constitutivos (preformados) y actuar como una primera barrera defensiva a los microorganismos fitopatógenos. En el caso de las otras fitoalexinas los valores no superaron 1.3 µg/g m.f. acorde con reportes de diferentes autores (Botero et al., 2021). La presencia de estas fitoalexinas en los controles, también puede suponer una respuesta de la planta al estrés ocasionado por micro-lesiones mecánicas y diversas condiciones ambientales (contaminantes del aire, radiación, temperatura). Estas micro-lesiones mecánicas pueden ocurrir durante el tratamiento, específicamente al ser removidas del lecho de arena y su posterior trasplante al algodón, provocando respuestas de defensa no específicas como consecuencia de la liberación de inductores endógenos (de la propia planta) (Hargreaves & Bailey, 1978).

Por otro lado, la genisteína ha sido reportada como antifúngico (Rivera-Vargas et al., 1993) mientras que el coumestrol, como un antibacteriano (Gnanamanickam & Patil, 1977). Para la kievitona se detectaron bajos niveles en los hipocótilos-raíz, lo cual es concordante con

Goossens et al. (1987), quienes encontraron que los mayores niveles de esta fitoalexina se presentan en los cotiledones y decrecen para los hipocótilos y la raíz.

Para la variedad Uribe Rosado (**Figura 3-125**), se observó un incremento en la concentración de algunas de las fitoalexinas como resultado de la elicitación con 0.44 mM metil jasmonato. La fitoalexina mayoritaria durante todo el tiempo del análisis fue la genisteína. La mayor concentración de genisteína se detectó a las 72 h post-inducción (136.6 µg/g). Las isoflavonas daidzeína (10.0 µg/g a las 72 h) y 2'-hidroxigenisteína (10.0 µg/g a las 72 h), junto con la dalbergioidina (2.0 µg/g a las 24 h) también alcanzaron los mayores niveles durante las primeras 72 h, luego de lo cual se presentó un descenso. Este decrecimiento estuvo acompañado de un incremento en los niveles de phaseollina (21.1 µg/g a las 96 h), phaseollidina, phaseollinisoflavano, y kievitona. Interesantemente, aunque los niveles de isoflavonas precursoras (genisteína y daidzeína), en la variedad Uribe Rosado fueron superiores que en ICA Cerinza, la concentración de los pterocarpanos phaseollidina y phaseollina fue muy baja. Este hecho demuestra la posibilidad, que para esta variedad se presenta un bloqueo metabólico en la conversión de daidzeína → phaseollidina y phaseollina. Este bloqueo parece no presentarse hacia la otra rama de la ruta biosintética de los 5-deoxyisoflavonoides, dado que la conversión daidzeína → coumestrol parece ser más eficiente en Uribe Rosado que en ICA Cerinza, a la luz de los mayores niveles de coumestrol (16.0 µg/g a las 24 h). Los niveles bajos de phaseollina en la variedad Uribe Rosado y altos en ICA Cerinza, podrían explicar su comportamiento fitopatológico. Uribe Rosado es catalogada como susceptible a la antracnosis mientras que ICA Cerinza es tolerante. Esto sugiere que la fitoalexina tipo-pterocarpano phaseollina podría ser un marcador químico y emplearse para detectar de forma preliminar y rápida, la resistencia potencial de una variedad de frijol a la antracnosis. Esta misma conclusión ha sido propuesta por otros autores (Botero et al., 2021).

Es de resaltar que la variedad Uribe Rosado mostró niveles mayores de fitoalexinas en el control (plántulas tratadas con agua) que la variedad ICA Cerinza, incluyendo la presencia de phaseollina; estos metabolitos podrían ser preformados o ser rápidamente elaborados como resultado del estrés. Lo anterior sugiere que podrían estar actuando como una primera barrera química defensiva contra microorganismos fitopatógenos en la variedad Uribe Rosado. Este resultado concuerda con los resultados previos reportados por Durango et al. (2002).

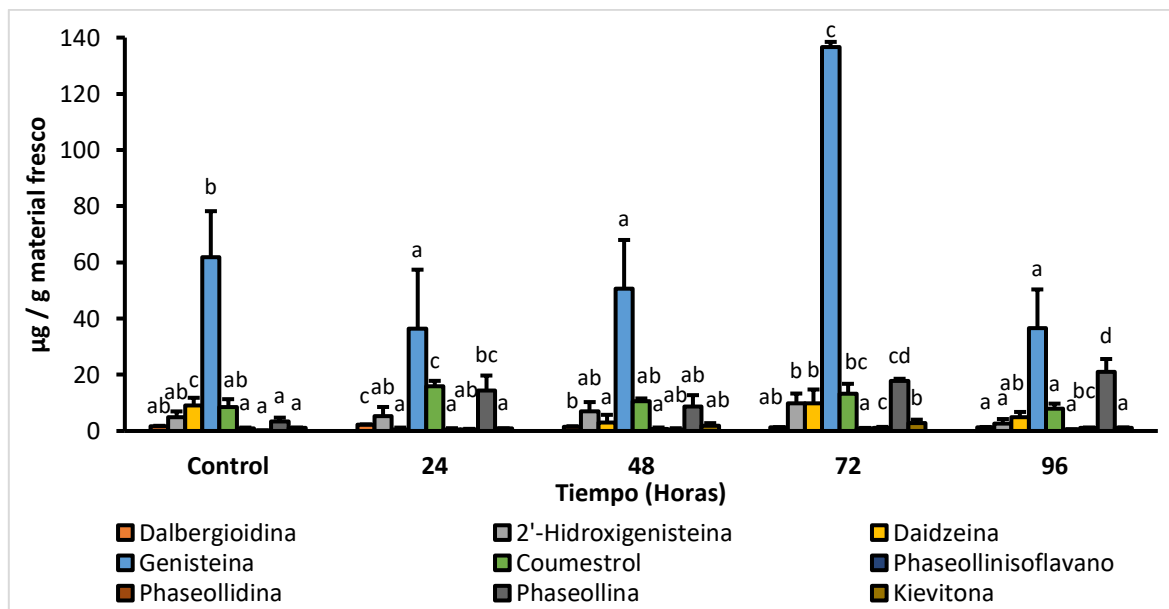


Figura 3-125. Concentración de fitoalexinas en el curso del tiempo en hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con 0.44 mM metil jasmonato Para cada fitoalexina, las barras con distinta letra son significativamente diferentes ($p=0.05$; prueba LSD de Fisher).

3.4.2. Efecto de la concentración del elicitor

Se realizó un estudio de la acumulación de fitoalexinas con el cambio en la concentración de metil jasmonato, entre 0.04 y 4.40 mM. Las plántulas, una vez tratadas con la solución del elicitor por 3 h, se incubaron durante 96 h. Se evidencia un incremento significativo en la concentración de todas las fitoalexinas comparado con el control (plántulas tratadas con agua) (**Figura 3-126; Figura 3-127**). En general, la concentración de las fitoalexinas fue dependiente de la concentración del elicitor. En la variedad ICA Cerinza, la concentración de la fitoalexinas genisteína, phaseollina, phaseollidina, phaseollinisoflavano y kievitona incrementó con el aumento de la concentración de metil jasmonato entre 0.04 y 2.22 mM. Así, la concentración máxima de genisteína (33.3 µg/g), phaseollina (35.5 µg/g), coumestrol (6.9 µg/g), y phaseollidina (6.0 µg/g), se presentó cuando se usó una concentración de metil jasmonato de 2.22 mM. Luego, a 4.40 mM metil jasmonato, la concentración de todas las fitoalexinas decreció fuertemente, el cual puede ser el resultado de efectos fitotóxicos sobre las plántulas

En el caso de la variedad Uribe Rosado, la concentración de las fitoalexinas fue dependiente de la concentración de elicitor. Entre 0.04 y 2.22 mM metil jasmonato, se detectó un incremento gradual en la concentración de algunas de las fitoalexinas, particularmente

phaseollina. La concentración máxima de phaseollina (24.0 $\mu\text{g/g}$) se presentó para una concentración de 2.22 mM metil jasmonato. La genisteína (37.0 $\mu\text{g/g}$) presentó un nivel máximo cuando se empleó 0.44 mM metil jasmonato. Es de resaltar que bajo las mismas condiciones, los niveles de phaseollina fueron superiores para la variedad ICA Cerinza, siendo casi 1.5 veces mayores que en Uribe Rosado. La reducción en la concentración de las fitoalexinas para altas concentraciones del elicitor, particularmente 4.40 mM metil jasmonato, puede ser el resultado de efectos fitotóxicos sobre las plántulas. Se ha reportado que el uso de niveles elevados de algunos elicitores puede conducir a la inhibición de algunas enzimas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas y otros procesos metabólicos (Schüler et al., 2004, Pancheva et al., 1996).

Tomando en cuenta la reducción en la concentración de fitoalexinas para las dos variedades de frijol cuando se usaron altas concentraciones del elicitor metil jasmonato, un estudio visual adicional sobre el efecto fitotóxico fue realizado. A partir de 2.22 mM, se observaron efectos negativos sobre las raíces de las plántulas, tales como pérdida de dureza y resistencia (las fibras se rompían con mayor facilidad), y reducción en el número de raíces secundarias (Figura 3-128).

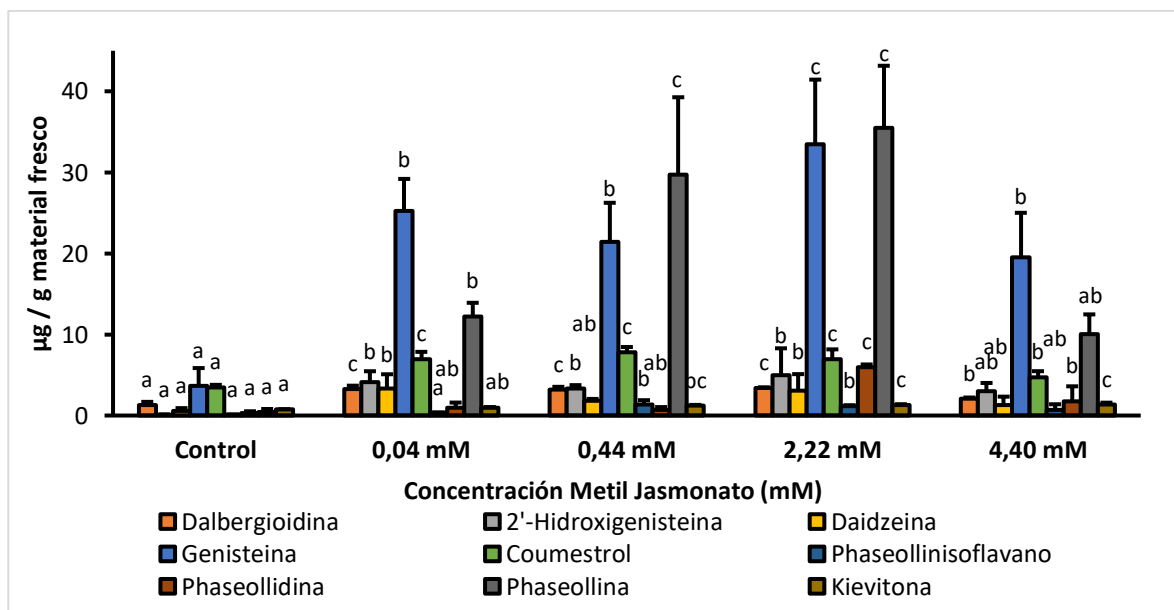


Figura 3-126. Estudio de la concentración de fitoalexinas a las 96 h realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto metil jasmonato a diferentes concentraciones 0.04 mM a 4.40 mM. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher).

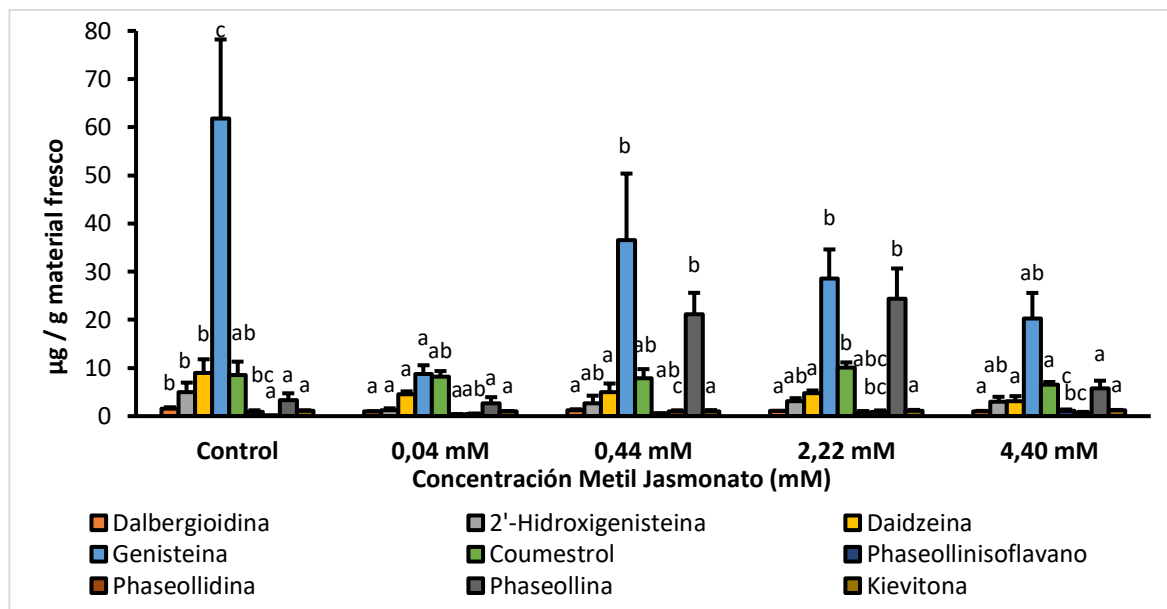


Figura 3-127. Estudio de la concentración de fitoalexinas a las 96 h realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto metil jasmonato a diferentes concentraciones 0.04 mM a 4.40 mM.

Asimismo, la elicitación con 2.22 y 4.40 mM metil jasmonato mostró cambios en la coloración de las raíces, y alteración y destrucción de la pared celular (**Figura 3-128**). La lisis de la pared celular disminuye en número de células viables para la producción de fitoalexinas. Así, estos cambios morfológicos y fisiológicos podrían sustentar las reducciones en el contenido de fitoalexinas, cuando se emplean altas concentraciones del elicitor. El metil jasmonato causó una reducción significativa en el crecimiento de plántulas de cebada, lo cual fue más evidente en la longitud y el peso seco de las primeras hojas, y en la eficiencia fotosintética (Kurowska et al., 2020).

También se ha reportados síntomas de estrés o toxicidad en forma de clorosis, que pudo alterar el contenido fenólico total en las hojas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Konan et. Al., 2014). El efecto de metil jasmonato a altas concentraciones ha sido previamente reportado en muchas plantas (Heijari et al., 2005; Moreira et al., 2009).



Figura 3-128. Efecto de la concentración del inductor sobre las raíces de las plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado, con un tiempo de incubación de 96 h. Muestras observadas en microscopio. Abajo izquierda 0.04 mM (40X); Abajo centro 2.22 mM (10X); Abajo derecha (40X).

3.5. Efecto de la estructura del elicitador en la acumulación de fitoalexinas

Una serie de 15 derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico (**Figura 3-72**), relacionados estructuralmente con la coronatina y la coronalona, fue sintetizada. Posteriormente, se evaluó el efecto elicitador de fitoalexinas de los derivados indanoilo, en hipocótilo-raíz de las variedades de frijol común ICA Cerinza y Uribe Rosado. Se prepararon soluciones hidroalcohólicas de los elicitores a una concentración de 1.0 mM, y los respectivos controles, en las cuales fueron

inmersas las plántulas durante 3 h. Se seleccionó la concentración de 1.0 mM, inferior a aquellas en donde el metil jasmonato provocó efectos fitotóxicos. Luego, las plántulas se incubaron durante 72 h post-inducción. Una vez retirado cuidadosamente los cotiledones, los hipocótilos-raíz pasaron a ser extraídos. Los resultados de la producción de fitoalexinas isoflavonoide se muestran en la **Figura 3-129**, **Figura 3-130**, **Figura 3-131**, **Figura 3-132**, **Figura 3-133** y **Figura 3-134**.

3.5.1. Acumulación de fitoalexinas con la permutación de la posición 4 del ácido 1-indanona-4-carboxílico.

En primer lugar, se realizaron permutaciones en la posición 4 del ácido 1-indanona-4-carboxílico, obteniéndose un éster (**7**), amidas (**9** y **10**), y un conjugado indanoil-aminoácido (**3**). En general se emplearon cadenas cortas como sustituyente, imitando características estructurales como las encontradas en la coronatina y la coronalona. La actividad elicitora de fitoalexinas se presenta en la **Figura 3-129** y **Figura 3-130**.

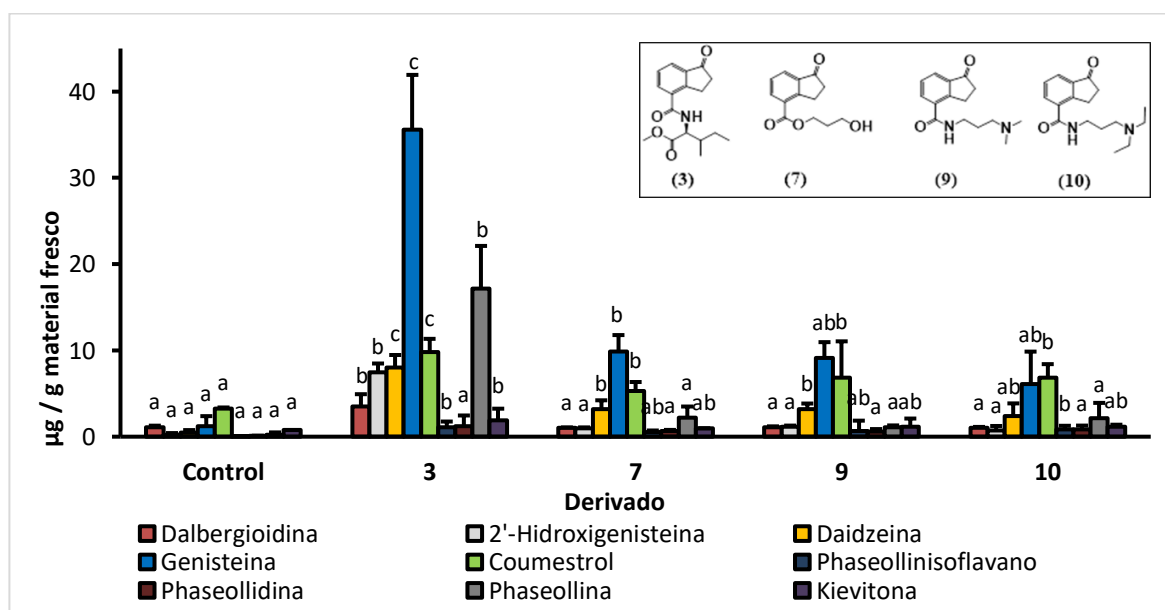


Figura 3-129. . Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad ICA Cerinza, elicitados con solución 1.0 mM de derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico y 72 h post-inducción. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher).

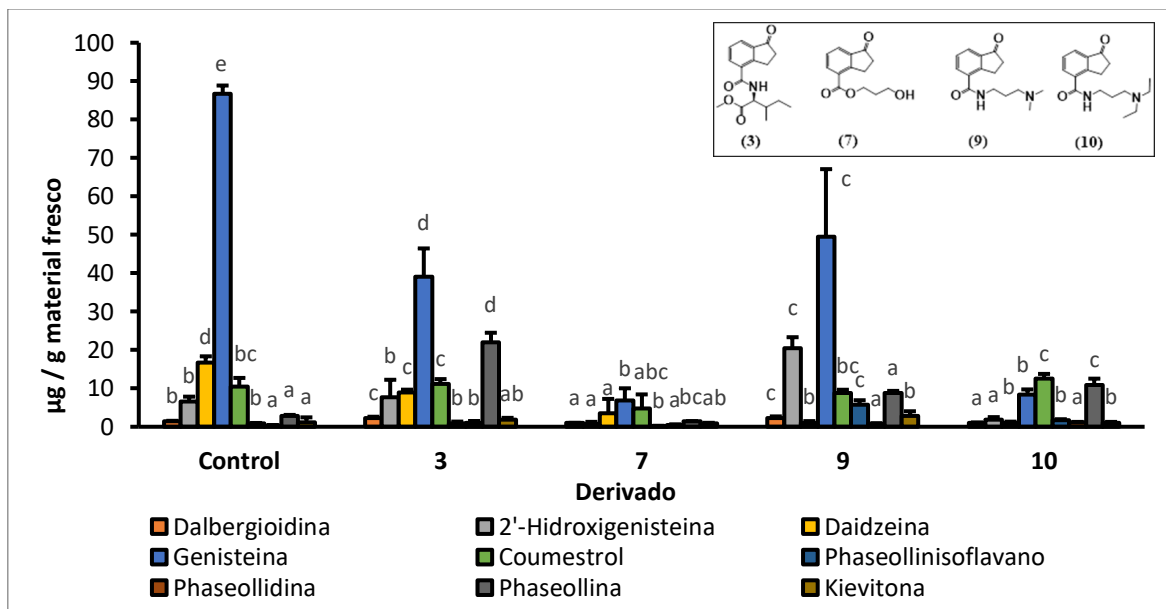


Figura 3-130. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitados con solución 1.0 mM de derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico y 72 h post-inducción. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher).

En la variedad ICA Cerinza, todos los derivados incrementaron significativamente la concentración de las fitoalexinas, particularmente de genisteína, phaseollina, coumestrol y daidzeína. La mayor acumulación de fitoalexinas se elicató con el conjugado indanoil-aminoácido (3), siendo las fitoalexinas mayoritarias genisteína (35.6 µg/g) y phaseollina (17.7 µg/g). Con este derivado, se observó un incremento significativo en la concentración de genisteína y phaseollina, de 28 y 80 veces con respecto a la concentración encontrada en los tejidos de las plántulas control. También se detectaron incrementos notables de la concentración de coumestrol, daidzeína, 2'-hidroxigenisteína y dalbergioidina. En el caso de los derivados (7), (9) y (10), las fitoalexinas mayoritarias fueron genisteína y coumestrol con concentraciones menores a 9.8 y 6.8 µg/g, respectivamente.

En la variedad Uribe Rosado, la mayor acumulación de la fitoalexina phaseollina (21.9 µg/g), se acumuló cuando los tejidos se trataron con el conjugado indanoil-aminoácido (3). También se encontró un incremento significativo de la concentración de 2'-hidroxigenisteína, dalbergioidina, y kievitona, comparada con los tejidos de las plántulas control, cuando se usó como elicitor la amida (9). Aunque (9) elicató una cantidad 3 veces superior de phaseollina comparado con el control, resultó inferior que la inducida por el derivado indanoil-aminoácido (3). Resulta claro entonces que, la inducción de las fitoalexinas en frijol con los derivados del

ácido 1-indanona-4-carboxílico es altamente dependiente de las características estructurales; incluso pequeñas diferencias en la estructura son suficientes para elicitar diferencialmente las fitoalexinas. Con el fin de seleccionar el núcleo estructural más promisorio como elicitor, se consideró a aquella sustancia que estimuló la mayor acumulación del pterocarpano phaseollina; por ser esta fitoalexina una reconocida sustancia antifúngica (Perrin & Cruickshank, 1969) cuya producción está directamente relacionada con la resistencia a microorganismos fitopatogénicos en frijol (García & Pérez, 2003; Bailey, 1973), además de que su biosíntesis se realiza en las últimas etapas de la ruta de los 5-deoxi isoflavonoides (Dewick & Steele, 1982). En este sentido, el conjugado indanoil-aminoácido elicó los mayores incrementos de phaseollina, en las dos variedades consideradas en el presente estudio.

3.5.2. Acumulación de fitoalexinas con conjugados indanoil-aminoácido.

En segundo lugar, se analizó el efecto del aminoácido (**3**; **4**; **5**; **6**) en el núcleo indanoil-aminoácido, sobre la capacidad elicitora de fitoalexinas. En la **Figura 3-131** y **Figura 3-132** se presentan los resultados. Como se puede ver, el conjugado indanoil-L-isoleucina metil éster elicó los mayores niveles de fitoalexinas, particularmente de phaseollina. Interesantemente, los niveles de fitoalexinas encontrados en los tejidos de plántulas tratadas con (**4**, indanoil-L-leucina metil éster), (**5**, indanoil-L-valina metil éster) y (**6**, indanoil-L-glicina éster) resultaron similares a las detectadas en el control (plántulas tratadas con agua). Esto demuestra que los derivados indanoilo conteniendo los aminoácidos L-leucina metil éster, L-valina metil éster, y L-glicina éster, resultaron inactivos biológicamente. El derivado indanoil-aminoácido conteniendo el éster metílico de la L-isoleucina parece ser particularmente interesante, debido a que este elemento estructural es fácilmente derivado del bloque de construcción del aminoácido ácido coronámico de la coronatina, por apertura del enlace C(2)-C(3) del aminoácido ciclopropílico (Schüler, 2004).

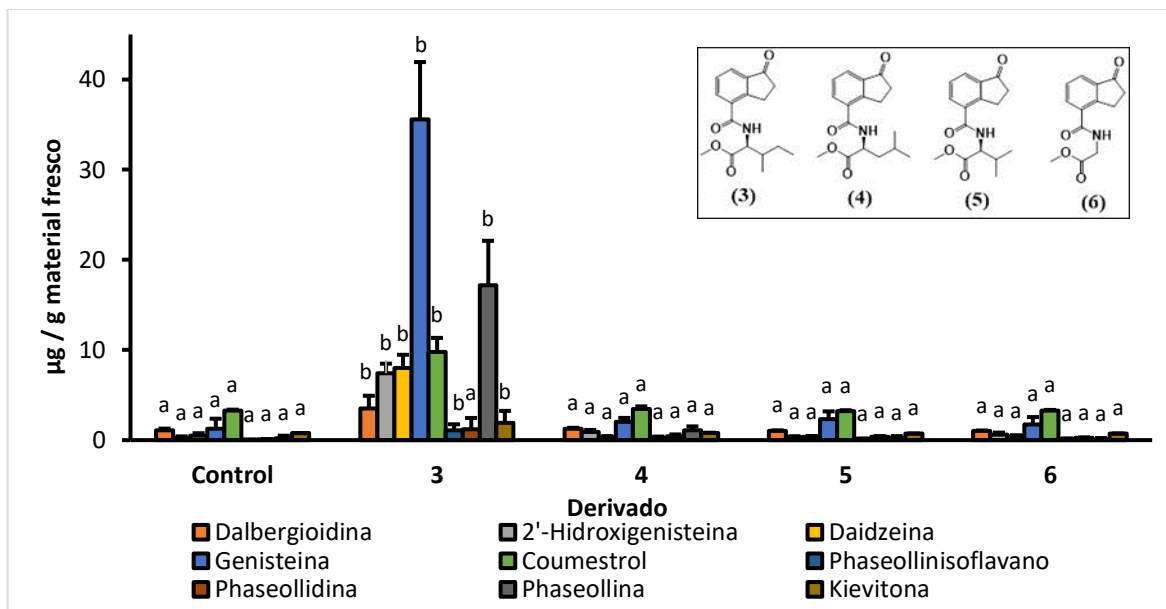


Figura 3-131. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad ICA Cerinza, elicitada con soluciones 1.0 mM de conjugados indanoil-aminoácido, y 72 h post-inducción. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher)..

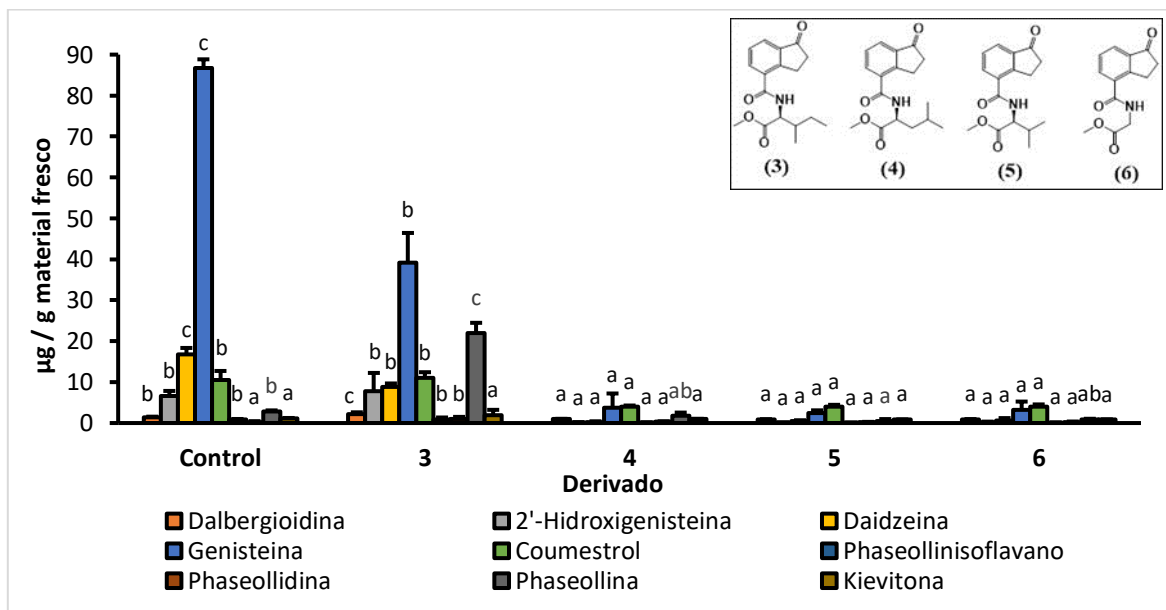


Figura 3-132. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitada con soluciones 1.0 mM de conjugados indanoil-aminoácido, y 72 h post-inducción. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher)..

Estudios con diferentes conjugados indanoil-aminoácido han reportado que sólo aquellos conteniendo isoleucina y leucina son activos biológicamente induciendo volátiles de defensa

en frijol Lima (*P. lunatus* L.); los autores informan que la pérdida de un grupo $-CH_2-$, como en el caso de la valina, lleva a una pérdida total de la actividad biológica (Krumm et al., 1995; Lauchli & Boland, 2003). Lo anterior sugiere que la interacción del elicitor indanoilo con el receptor que desencadena la actividad biológica es muy específica, discriminando pequeñas diferencias en la cadena carbonada del aminoácido, o incluso entre la conformación L y D (Krumm et al. 1995). Dicho sitio activo parece estar optimizado para la cadena lateral de la isoleucina, preferentemente por la configuración L.

3.5.3. Acumulación de fitoalexinas con derivados del 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster.

En tercer lugar, puesto que el compuesto 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (**3**) exhibió un efecto elicitor de fitoalexinas en frijol promisorio, se utilizó como una plantilla estructural para la obtención de nuevos derivados. Entre las modificaciones estructurales se incluyó: la reducción del grupo carbonilo para la obtención del alcohol (**8**), la condensación aldólica en C-2 para la síntesis del 2-bencilideno (**11**), la adición nucleofílica de hidrazina para la preparación de la imina (**12**) y la bromación en el carbono 6 (por una ruta alterna a partir del ácido 2-carboxicinámico) involucrando sustitución electrofílica (**15**). En la **Figura 3-133** y **Figura 3-134** se presentan los resultados de la acumulación de fitoalexinas en los hipocótilos-raíz de las dos variedades de frijol, tratados con los elicitores derivados de (**3**). En general, el tratamiento de los tejidos de frijol con los derivados indanoilo incrementó la concentración de las fitoalexinas; en la variedad ICA Cerinza, particularmente de dalbergioidina, daidzeina, 2'-hidroxigenisteina, phaseollina, coumestrol, y kievitona. En el caso de la phaseollina, se detectaron diferencias significativas en la concentración entre los tejidos tratados con (**3**), (**12**), y (**15**) comparados con el control. No obstante, se evidencia una pérdida significativa de la actividad elicitora de fitoalexinas isoflavonoides en las dos variedades de frijol analizadas, como resultado de la reducción del grupo carbonilo (en C1)(**8**) y la formación de la hidrazona (**12**). El 1-hidroxiindanoil-L-isoleucina metil éster (**8**) exhibió una actividad elicitora significativamente superior con respecto al control, en la concentración de 2'-hidroxigenisteina, daidzeina, genisteina y coumestrol para la variedad ICA Cerinza. Sin embargo, los niveles elicitados por (**8**) de phaseollina, phaseollidina, phaseollinisoflavano, y kievitona fueron similares a los encontrados en el control. Esto demuestra que (**8**) elicita las isoflavonas precursoras, pero no los pterocarpanos ni la kievitona.

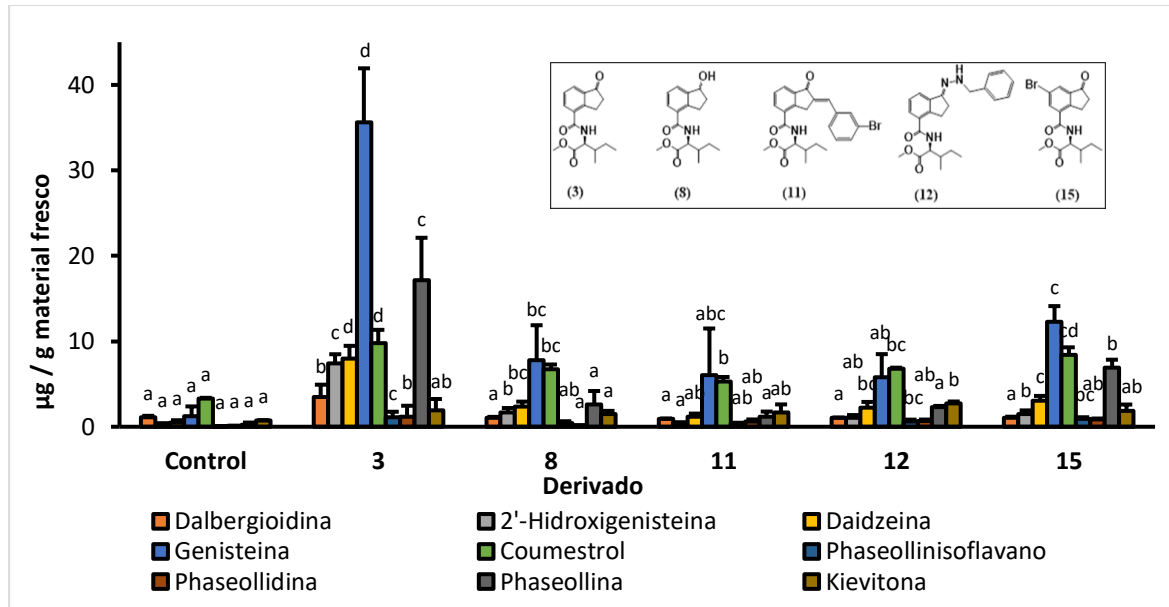


Figura 3-133. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad ICA Cerinza, elicitada con soluciones 1.0 mM de derivados del 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster, y 72 h post-inducción. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher)

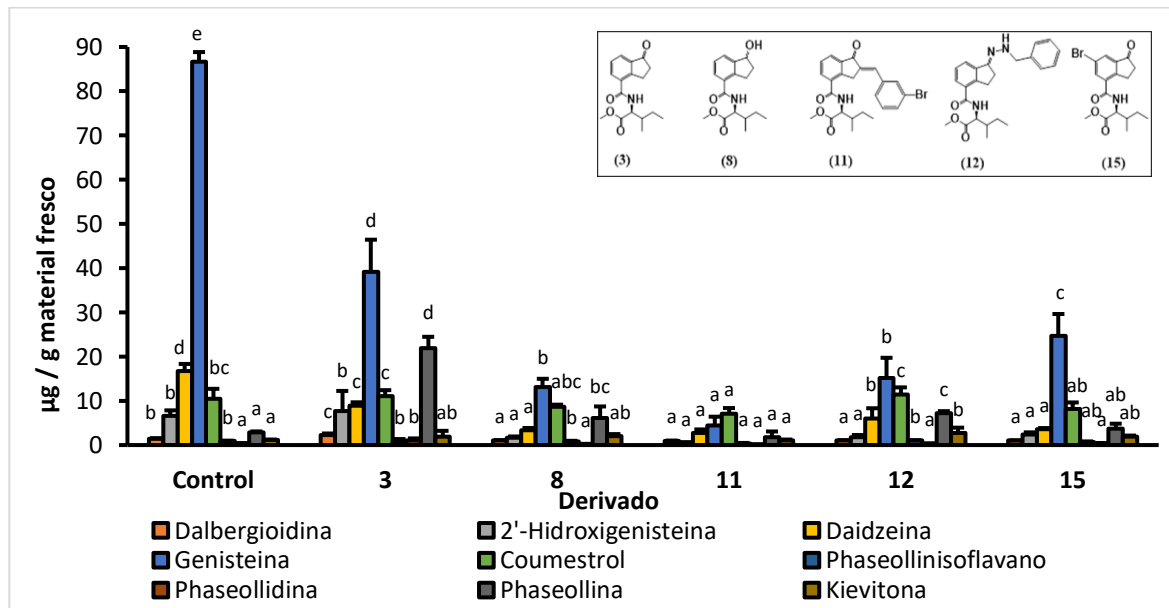


Figura 3-134. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitada con soluciones 1.0 mM de derivados del 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster, y 72 h post-inducción. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher).

Nuestros resultados contrastan con los de Krumm et al. (1995), quienes reportan que la actividad de (3) y (8) resultó similar en la inducción de volátiles en *P. lunatus*. Esta aparente

contradicción puede ser resultado de diferencias en la estructura del receptor, en especies diferentes de leguminosas. Por su parte, la acumulación de fitoalexinas en los tejidos de frijol tratados con la hidrazona (**12**), mostró un incremento significativo en la concentración de daidzeina, coumestrol, y kievitona para ICA Cerinza y de phaseollina y kievitona en Uribe Rosado, con respecto a sus respectivos controles. Por lo tanto, el grupo carbonilo juega un papel muy importante en el reconocimiento del derivado como una señal química para la activación de la producción y acumulación de fitoalexinas, lo cual coincide con lo reportado en la literatura especializada (Schüler et al. 2004).

El derivado 2-bencilideno (**11**) por su parte, no elicó la acumulación de fitoalexinas en ninguna de las variedades de frijol estudiadas. Esta inactividad estuvo acompañada de una menor solubilidad en agua para este derivado. La baja solubilidad limita el uso práctico de los derivados indanoilo, como ha sido mencionado por Lauchli et al. (2002). Finalmente, la sustitución con bromo en C-6 (**15**) exhibió un efecto elicitor en la variedad ICA Cerinza pero no en Uribe Rosado. En ICA Cerinza, el derivado (**15**) elicó la producción y acumulación significativa de 2'-hidroxigenisteina, daidzeina, genisteína, coumestrol, y phaseollina, comparado con el control. No obstante, su efecto fue inferior al observado para el derivado (**3**).

Como resultado del análisis sistemático sobre el efecto de la estructura en la elicitación de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol, se concluye que el derivado más promisorio corresponde al derivado (**3**). Por lo anterior, se llevó a cabo un análisis más detallado del efecto de la concentración del derivado (**3**) en la actividad elicitora de fitoalexinas, y en el curso del tiempo.

3.6. Efecto del tiempo post-inducción y la concentración en la elicitación con 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (2.3)

Después de identificar el derivado con mayor capacidad elicitora, es importante analizar el comportamiento de la acumulación de fitoalexinas en el proceso de elicitación teniendo en cuenta variables como el tiempo post-inducción y la concentración del elicitor. Para el efecto en el curso del tiempo, las plántulas se sumergieron durante 3 h en una solución 0.44 y 1.00 mM 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (**3**) y se incubaron durante 96 h, posteriores a la inducción. Cada 24 h, a las plántulas se les retiraron cuidadosamente los cotiledones y se descartaron, y los hipocótilos-raíz se extrajeron por maceración en presencia de etanol. Una

vez removido el solvente a presión reducida, la fracción acuosa se extrajo con AcOEt, y el contenido de fitoalexinas se analizó por HPLC. El perfil cromatográfico de los extractos en función del tiempo post-inducción (24, 48, 72, y 96 h), se presenta en la **Figura 3-135** y **Figura 3-136**. Como control se emplearon los hipocótilos-raíz de plántulas tratadas sólo con agua y 96 h de incubación.

Se observa que la concentración de las fitoalexinas incrementa significativamente con el tiempo post-inducción, en comparación con el control. Durante las primeras 24 h, en ICA Cerinza, se detectan concentraciones máximas para las isoflavonas genisteína (50.2 µg/g) y 2'-hidroxigenisteína (3.2 µg/g), y la isoflavanona dalbergioidina (5.1 µg/g); luego de lo cual, la acumulación de las isoflavonas e isoflavanona decrece. Consecuentemente, aumenta la concentración de las fitoalexinas tipo pterocarpano y coumestrol. En ICA Cerinza, la concentración máxima de phaseollina (17.2 µg/g; 39 veces mayor que en el control) y coumestrol (9.8 µg/g) se alcanza a las 72 h post-inducción. En Uribe Rosado, la phaseollina también alcanzó su mayor concentración a las 72 h post-inducción (22.0 µg/g) y el coumestrol a las 96 h post-inducción (15.8 µg/g m.f). En el caso de la isoflavona precursora daidzeína, su concentración creció gradualmente durante las 96 h post-inducción en la variedad ICA Cerinza hasta alcanzar 10.0 µg/g. Esta misma concentración máxima (13 veces mayor que en el control) fue elicitada en Uribe Rosado a 72 h post-inducción, luego de lo cual la cantidad de daidzeína decae.

Las altas concentraciones de genisteína en las dos variedades de frijol, pero bajos niveles de 2'-hidroxigenisteína, y mucho más de dalbergioidina y kievitona, claramente indican que existe algún bloqueo metabólico en la ruta biosintética de los 5-hidroxiisoflavonoides (genisteína → 2'-hidroxigenisteína → dalbergioidina → kievitona).

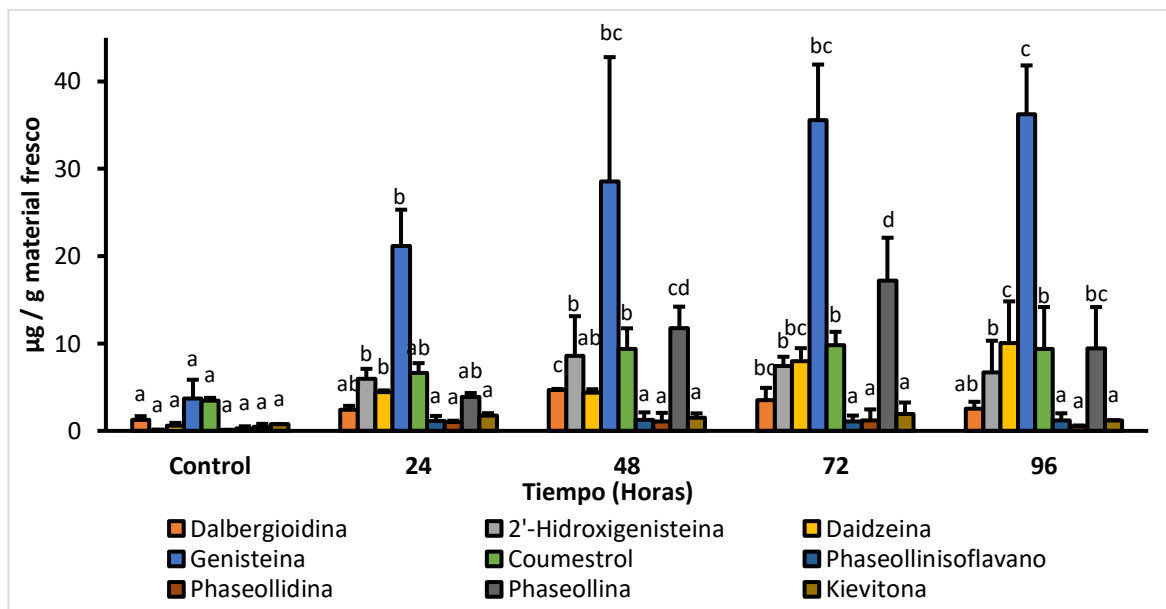


Figura 3-135. Estudio de la concentración de fitoalexinas en el curso del tiempo post-inducción en hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza, elicitada con 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher).

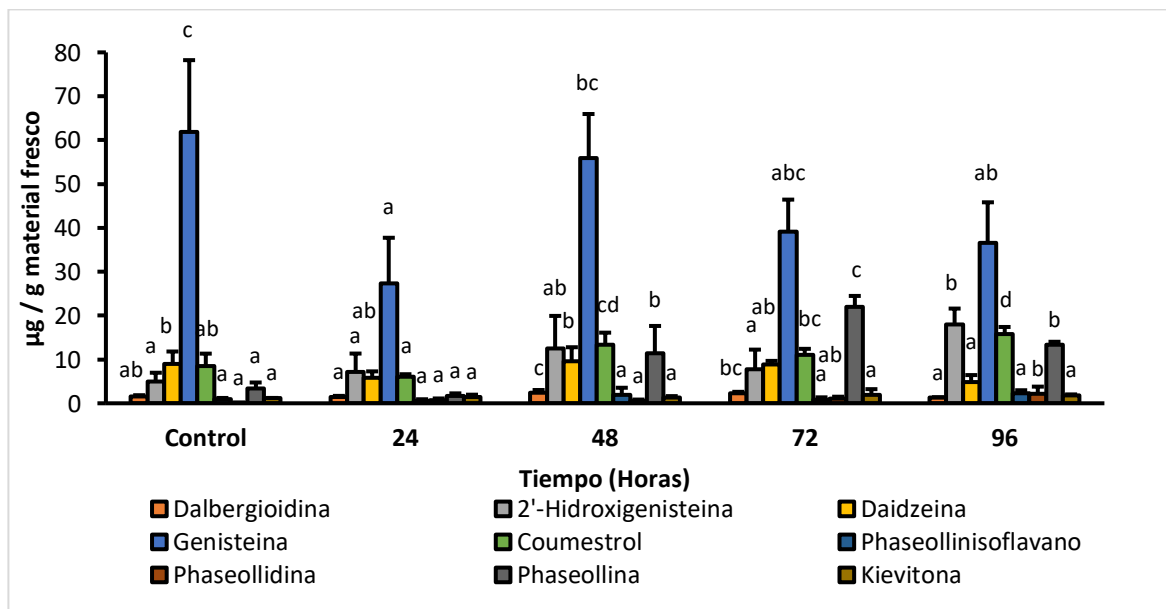


Figura 3-136. Estudio de la Concentración de fitoalexinas en el curso del tiempo en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitada con solución 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina

metil éster. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher).

Adicionalmente, la baja cantidad de kievitona puede ser el resultado del tejido estudiado. Goossens et al. (1987), encontraron que los mayores niveles de esta fitoalexina se presentan en los cotiledones y decrecen para los hipocótilos y la raíz. En contraste, la ruta biosintética de los 5-deoxiisoflavonoides parece ser bastante eficiente en los tejidos (hipocótilo-raíz) de ambas variedades como respuesta al tratamiento con 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (**3**), dado que a pesar de los bajos niveles detectados del precursor daidzeina, se elicitó una concentración relativamente alta de phaseollina y coumestrol entre 72 y 96 h post-inducción. Los bajos niveles de phaseollidina claramente indican que la conversión a phaseollina es rápida (phaseollidina \rightarrow phaseollin). El metabolismo de phaseollina a phaseollinisoflavano se ha hipotetizado que resulta de la necesidad de reducir el efecto fitotóxico de la fitoalexina phaseollina (Bailey et al., 1980). Los bajos niveles del phaseollinisoflavano detectados como resultado de la elicitación con (**3**), sugieren que las concentraciones de phaseollina alcanzadas en ambas variedades no representan niveles tóxicos para las plántulas (Bailey *et al.*, 1980).

En segundo lugar, se evaluó el efecto de la concentración (entre 0.44 mM y 4.40 mM) del 1-oxo-indanoil isoleucina metil éster en el proceso de elicitación (**Figura 3-137** y **Figura 3-138**). La concentración de las fitoalexinas fue dependiente de la concentración del derivado (**3**). Para ambas variedades, se observó un incremento en la concentración de fitoalexinas cuando los tejidos de frijol se trataron con soluciones 0.44 y 1.00 mM de (**3**). A 1.00 mM de (**3**), se elicitó cantidades máximas de genisteína (36.3 $\mu\text{g/g}$), daidzeina (10.0 $\mu\text{g/g}$), coumestrol (9.4 $\mu\text{g/g}$), 2'-hidroxigenisteína (7.0 $\mu\text{g/g}$) y dalbergioidina (3.0 $\mu\text{g/g}$) en la variedad ICA Cerinza, y de genisteína (36.5 $\mu\text{g/g}$), 2'-hidroxigenisteína (18.0 $\mu\text{g/g}$) y coumestrol (16.0 mM) en Uribe Rosado. El tratamiento de hipocótilos-raíz con 2.22 mM (**3**), causó un decrecimiento en la concentración de muchas de las fitoalexinas, lo que puede posiblemente ser el resultado de efectos fitotóxicos, tales como la muerte celular o la inhibición de enzimas involucradas en la biosíntesis de isoflavonoides. De modo interesante, la elicitación de los tejidos de frijol con 4.44 mM (**3**) exhibió un incremento transitorio en la concentración de algunas fitoalexinas; particularmente, se alcanzó la máxima concentración de phaseollina en las dos variedades, siendo 20.0 $\mu\text{g/g}$ en ICA Cerinza y 17.0 $\mu\text{g/g}$ en Uribe Rosado.

Resulta interesante, al comparar con la elicitación con 2.22 mM metiljasmonato (**Figura 3-126** y **Figura 3-127**), que la concentración de las fitoalexinas no mostró la reducción transitoria

observada para el derivado (3), a la misma concentración. Por el contrario, el tratamiento con 2.22 mM metiljasmonato exhibió un incremento continuado del contenido de las fitoalexinas, mostrando concentraciones máximas para todas las fitoalexinas en ICA Cerinza, y de phaseollina y coumestrol para Uribe Rosado. En ICA Cerinza, particularmente, la concentración de phaseollina fue de aproximadamente 35.0 µg/g. Sólo a 4.40 mM metiljasmonato, se apreció una reducción considerable en el contenido de todas las fitoalexinas y en ambas variedades. Bajo estas condiciones, los niveles de las fitoalexinas resultaron incluso inferiores a las detectadas para la elicitación con 4.44 mM del derivado (3). La elicitación de los tejidos de frijol con 4.44 mM metiljasmonato mostró niveles de phaseollina inferiores a 10.0 µg/g.

Tomando en cuenta la actividad elicitora de fitoalexinas del derivado (3), un estudio adicional sobre otro tejido del frijol, las vainas, se llevó a cabo.

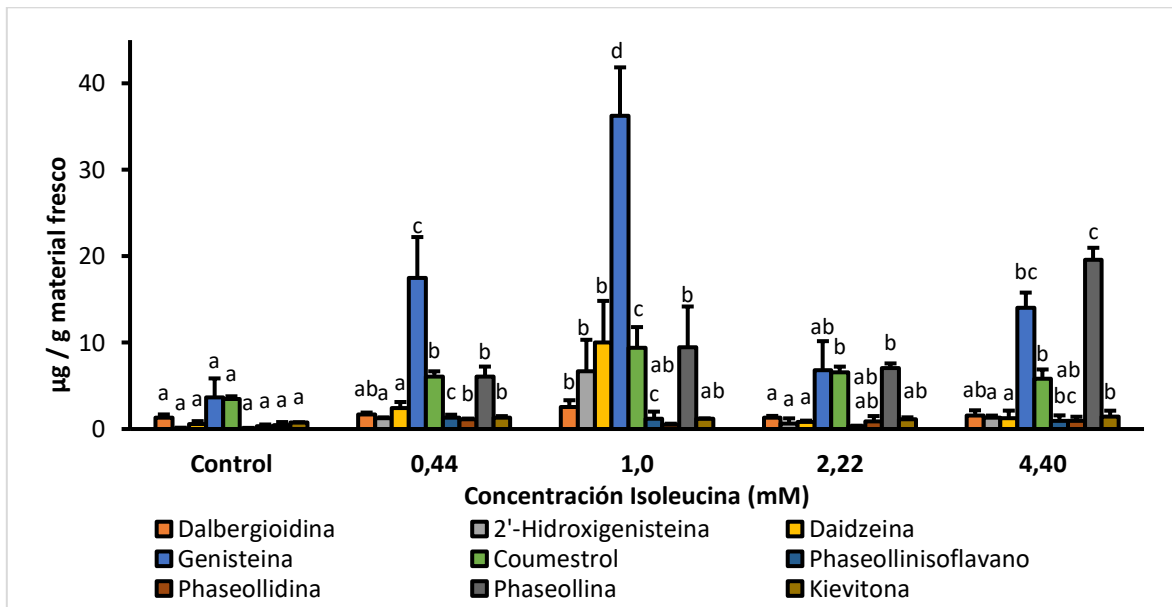


Figura 3-137. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad ICA Cerinza, elicitada con solución de 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster entre 0.44 mM a 4.40 mM, y 96 h post-inducción. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher).

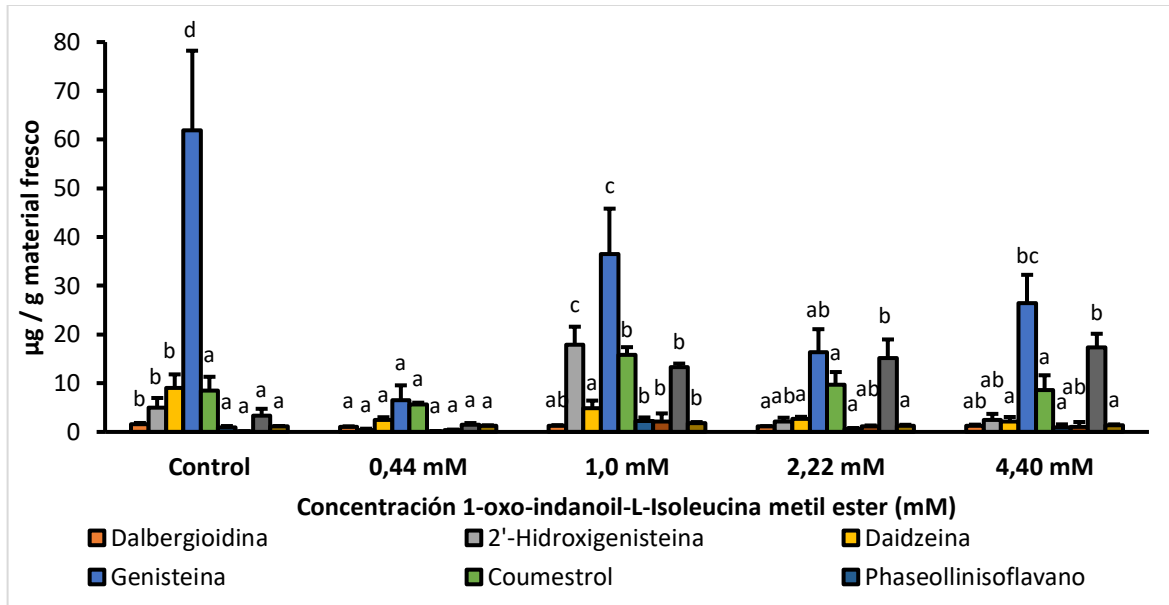


Figura 3-138. Estudio de la concentración de fitoalexinas en hipocótilo-raíz de frijol variedad Uribe Rosado, elicitada con solución de 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster entre 0.44 mM y 4.40 mM y 96 h post-inducción. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher).

3.7. Acumulación de fitoalexinas en vainas de frijol común

Se evaluó la acumulación de fitoalexinas en vainas de frijol común (variedad Cargamanto Blanco) adquiridas en una plaza de mercado campesino de la ciudad de Medellín y su respuesta utilizando el derivado 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (3). Las vainas se sumergieron en una solución 1.0mM del elicitor, con sus respectivos controles (agua como control negativo y metil jasmonato como control positivo), durante un tiempo de 3 horas, y posteriormente se incubaron por 96 h. Los resultados de la producción de fitoalexinas isoflavonoide se muestra en la **Figura 3-139**. Se encontró un incremento significativo en la concentración de las fitoalexinas como resultado del tratamiento de las vainas con los elicitores, comparado con el control (vainas tratadas con agua). En particular, se observa un aumento significativo en la concentración de 2'-hidroxigenisteína, genisteína, phaseollinisoflavano, y phaseollina luego del tratamiento con la solución 1.0 mM metil jasmonato y del derivado (3), comparado con el control. Tras la elicitación con metil jasmonato, las fitoalexinas mayoritarias fueron genisteína (8.0 µg/g; 3.4 veces mayor al control), phaseollina (9.5 µg/g; 2.0 veces mayor al control), phaseollinisoflavano (3.8 µg/g; 1.8 veces

mayor al control), coumestrol (2.3 µg/g) y 2'-hidroxigenisteína (2.3 µg/g; 1.6 veces mayor al control). Para el caso del derivado (3), las fitoalexinas mayoritarias fueron genisteína (5.1 µg/g) y phaseollina (8.9 µg/g). En general, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de coumestrol, phaseollina, phaseollinisoflavano, phaseollina, y kievitona en las vainas elicidadas con metil jasmonato y el derivado (3). Sólo pequeñas diferencias se detectaron entre los dos elicitores, para la inducción en vainas de frijol de las isoflavonas precursoras 2'-hidroxigenisteína, daidzeína, genisteína, y para el pterocarpano phaseollidina. Lo anterior demuestra que el derivado 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (3) es un inductor de fitoalexinas en diferentes tejidos de frijol, y cuyo potencial es comparable con el del metil jasmonato.

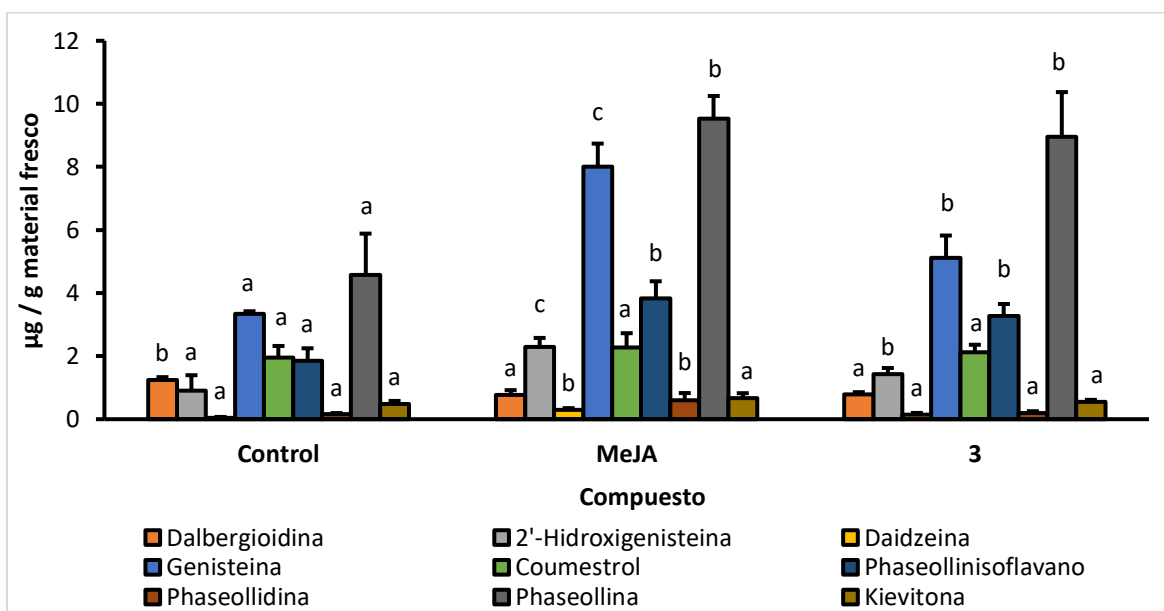


Figura 3-139. Estudio de la concentración de fitoalexinas en vainas de frijol variedad Cargamanto Blanco, elicitada con solución 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster, y 96 h post-inducción. Para cada fitoalexina, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher).

3.8. Actividad antifúngica contra *C. Lindemuthiamun*

3.8.1. Inhibición del crecimiento micelial

Se evaluó la inhibición del crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* de los extractos en AcOEt de los tejidos de las plántulas de frijol, variedades ICA Cerinza y Uribe Rosado,

elicitadas con 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (**3**) durante 3 horas e incubadas 72 h. Además, se utilizó como control positivo, extractos en AcOEt de los tejidos de las plántulas de frijol tratadas en una solución 1.0 mM metil jasmonato y 200 µg/mL phaseollina, y como control negativo, extractos de tejidos tratados con agua. Para el crecimiento del hongo, se utilizó como control absoluto el medio del cultivo, y como control solvente, el medio de cultivo conteniendo 0.3% etanol. Los extractos en AcOEt se disolvieron inicialmente en una solución hidroalcohólica y posteriormente en el medio de cultivo (0.3% etanol) a una concentración de 1000 µg/mL. Se determinó el diámetro de crecimiento micelial cada 2 días, a partir del cual se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Los resultados de la inhibición del crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* se presentan en la **Figura 3-140**.

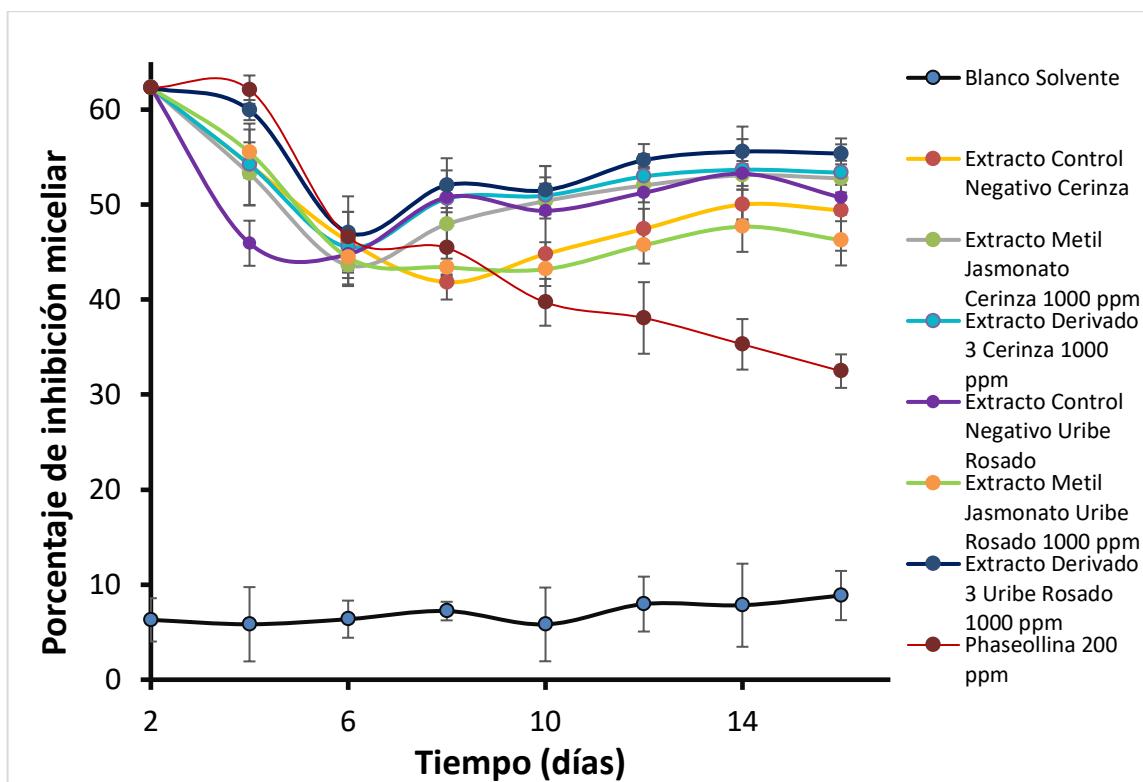


Figura 3-140. Inhibición del crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* de extractos de plántulas de frijol variedades ICA Cerinza y Uribe Rosado, elicitadas con 1.0 mM 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (**3**) y metil jasmonato, no elicitadas (control negativo) y phaseollina.

En general, se observó una alta inhibición (entre 62 y 50%) del crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* con la incorporación de los extractos en el medio de cultivo. Es de resaltar, la

mayor inhibición de *C. lindemuthianum* exhibida por los extractos de los tejidos de Uribe Rosado e ICA Cerinza elicitados con 1.0 mM de (3), seguida del extracto de los tejidos de ICA Cerinza tratados con 1.0 mM metil jasmonato. Le siguieron en actividad antifúngica los controles negativos de Uribe Rosado e ICA Cerinza, y el extracto de los tejidos de Uribe Rosado elicitados con metil jasmonato. Lo anterior, es consistente con la mayor acumulación de fitoalexinas en los tejidos de ambas variedades tratados con (3) y metil jasmonato, comparado con los hipocótilos-raíz tratados con agua (controles negativos).

Resulta interesante que los controles negativos (tejidos tratados con agua), para ambas variedades, exhibieron altas inhibiciones del patógeno, lo que podría ser el resultado de los niveles relativamente elevados de algunas fitoalexinas, como genisteína, daidzeína y coumestrol. La actividad antifúngica de la genisteína ha sido reportada por varios autores (Rivera-Vargas *et al.*, 1993; Cruickshank & Perrin, 1971; Van den Heuvel & VanEtten, 1973). Estos metabolitos pueden actuar como una primera barrera química defensiva, estando de manera constitutiva (preformada) o acumulándose rápidamente en las primeras etapas de la infección.

Por otra parte, 200 µg/mL phaseollina mostró una actividad inhibitoria de *C. lindemuthianum* entre 62 y 33%, decreciente con el tiempo, y siendo inferior a la desplegada por los extractos. La mayor actividad antifúngica de los extractos en AcOEt con respecto a la phaseollina, posiblemente se deba a efectos sinérgicos de todos sus componentes, resultantes de la combinación de diferentes fitoalexinas acumuladas en el proceso de elicitación. Estos componentes pueden actuar con mecanismos de acción antifúngica diferentes, y potenciar su efecto inhibitorio contra el microorganismo. El efecto fungiestático decreciente con el tiempo de la phaseollina, puede ser consecuencia de la detoxificación del medio de cultivo realizada por *C. lindemuthianum*. Esta detoxificación del medio por parte del hongo, puede verse más limitada en el caso de la mezcla de componentes presentes en el extracto, dada las diferencias estructurales de las diferentes fitoalexinas y otros metabolitos. Se ha reportado que la phaseollina afecta la membrana celular; causa una cesación inmediata del flujo protoplásmico y en la contracción del protoplasto de la punta de la hifa (VanEtten & Bateman, 1971). Lo anterior muestra la posibilidad de usar el 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (3) para incrementar la protección de las plántulas de frijol contra enfermedades como la antracnosis, dado su efecto elicitor de fitoalexinas isoflavonoides.

Durante la evaluación de inhibición del crecimiento micelial, en las cajas conteniendo los extractos, se observó un crecimiento del hongo de manera irregular comparado con su crecimiento normal en agar PDA (Blanco absoluto y Blanco solvente). Las estructuras observadas del hongo presentaron una coloración blanca-rosada, y su consistencia fue dura y callosa. Cuando se observó la estructura al microscopio, se evidenció un engrosamiento de las hifas (**Figura 3-141**). Adicionalmente, al utilizarse 200 µg/mL phaseollina, se observó inhibición significativa del crecimiento micelial, pero la morfología de la colonia (plana) fue similar a la observada en el Blanco absoluto y Blanco solvente. Lo anterior, posiblemente sea el resultado de la afectación de las estructuras del hongo por efecto de los extractos de los tejidos de frijol elicitados, provocando una morfología de la colonia con elevación umbonada; esta adaptación morfológica posiblemente sea una respuesta a la actividad antimicrobiana de los extractos.

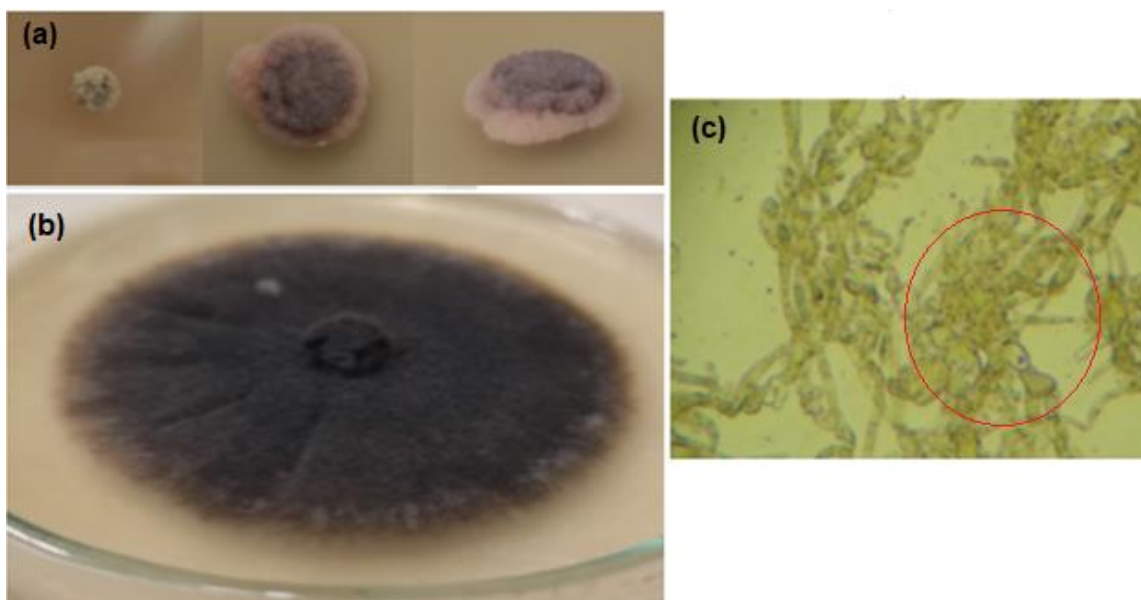


Figura 3-141. Crecimiento de *C. lindemuthianum*. Arriba: medio de cultivo con extractos de plántulas de frijol sometidas a proceso de elicitación. Abajo: solo medio de cultivo. Medio derecha: hifas observadas en el microscopio.

3.8.2. Efecto sobre la esporulación de *C. Lindemuthianum*

Se evaluó el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de *C. lindemuthianum*. Se evaluaron extractos en AcOEt de tejidos (hipocótilos-raíz) de las variedades de frijol ICA Cerinza y Uribe Rosado elicitados con 1.0 mM del 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (**3**) y 72 h post-inducción; además, se utilizó como control positivo extractos en AcOEt de tejidos de

frijol tratados con 1.0 mM metil jasmonato, y como control negativo, tejidos tratados con agua. Adicionalmente, se utilizó phaseollina. La medición de la esporulación del hongo se midió el último día (día 16) del experimento de inhibición del crecimiento micelial, empleando las concentraciones en el medio de cultivo de 1000 µg/mL para los extractos y 200 µg/mL para la phaseollina, como se indicó en el numeral anterior.

La **Figura 3-142** muestra inhibiciones en la esporulación del 100 % para los extractos de plántulas de frijol de las dos variedades evaluadas. En el Blanco solvente, se evidenció bajos niveles de inhibición de la esporulación del hongo. La afectación del proceso esporulativo es, en definitiva, el que reviste mayor importancia desde el punto de vista agrícola, pues la enfermedad se disemina a través de estructuras reproductivas (esporas asexuales) denominadas conidios (Soares et al., 2019).

Interesantemente, para la phaseollina, se observó una elevada esporulación del hongo (136%, comparada con el Blanco absoluto). Es importante tener presente que las esporas son las estructuras de resistencia al estrés que emplea el hongo para garantizar su supervivencia. La alta producción de esporas en el medio conteniendo phaseollina, sugiere una condición adversa de crecimiento para el hongo.

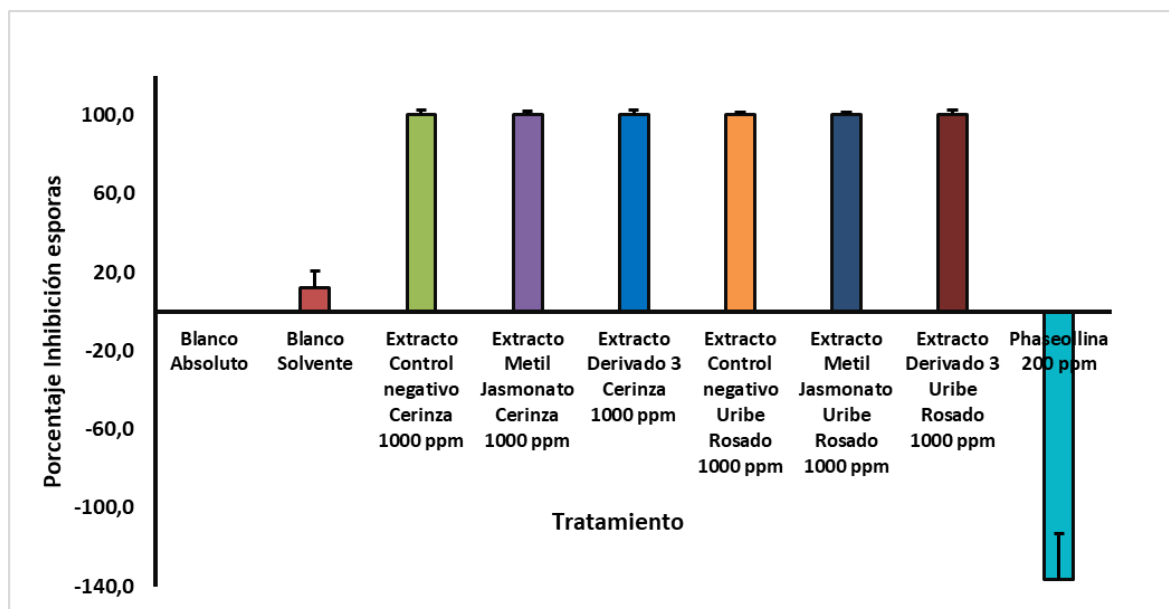


Figura 3-142. Porcentaje de inhibición de la esporulación de *C. lindemuthianum* por extractos de plántulas de frijol variedades ICA Cerinza y Uribe Rosado elicitadas con 1.0 mM 1-oxoindanoil-L-Isoleucina metil éster (3), metil jasmonato, control negativo y phaseollina.

3.9. Metabolismo de la Phaseollina por *C. lindemuthianum*

Se analizó la capacidad y mecanismo de detoxificación de phaseollina con el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum*. El análisis de los cromatogramas (**Figura 3-143**) sobre los productos metabólicos en el curso del tiempo (0, 24, 48 y 120 h) obtenidos mediante HPLC, muestra que el hongo transformó la phaseollina rápidamente; en 24 h, la cantidad de phaseollina se redujo casi en más del 90%. En la **Figura 3-143**, se observa la aparición de dos productos metabólicos. Un producto mayoritario (producto metabólico, **I**), con un tiempo de retención de 41.0 min en las condiciones HPLC, que exhibe mayor polaridad que su precursor. Adicionalmente, se observa la aparición de otro producto metabólico (producto metabólico, **II**) en menor proporción, con un tiempo de retención de 45.0 min.

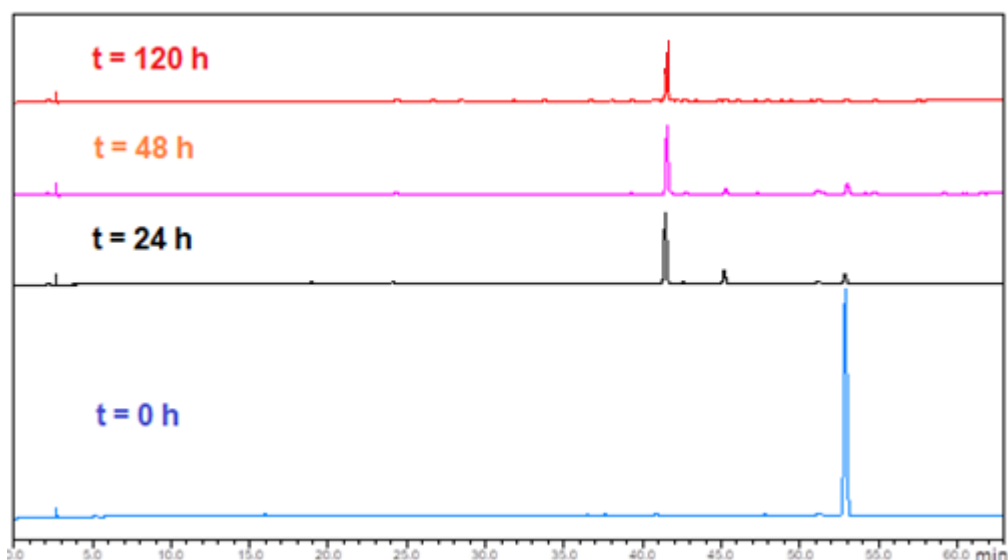


Figura 3-143. Perfil en HPLC-DAD del metabolismo en el curso del tiempo de phaseollina por *C. lindemuthianum*.

Por otro lado, en la **Figura 3-144** se observa una transformación rápida de la phaseollina (de 100 a 7% en 24 h). En ese mismo lapso de tiempo, la concentración de los productos metabólicos (**I**) y (**II**) aumento a 47 y 9%, respectivamente. La máxima abundancia del producto metabólico (**I**) se alcanzó a las 48 h (54.1%) y su abundancia relativa permaneció constante hasta las 120 h. La rápida conversión de phaseollina a los productos metabólicos (**I**) y (**II**), puede ser el resultado de un proceso de detoxificación. La phaseollina ha sido reconocida como una potente sustancia fungiestática (García & Pérez, 2003).

En estudios del metabolismo de la phaseollina por diferentes patógenos, Van Den Heuvel & Vollaard (1976) encontraron que la phaseollina es rápidamente metabolizada por diferentes razas de *C. lindemuthianum*; en las primeras 24 h la concentración cae por debajo del 15 % comparada con su concentración inicial. Lo anterior también fue observado en el presente estudio, donde la conversión de phaseollina fue rápida en las primeras 24 h con la cepa de *C. lindemuthianum* aislada en el Oriente Antioqueño. Se han reportado diferentes productos del metabolismo de la phaseollina, como la 6a-hidroxi-phaseollina y la 6a,7-dihidroxi-phaseollina por diferentes razas de *C. lindemuthianum* (Van Den Heuvel & Vollaard, 1976), la 1a-hidroxi-phaseollina por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Heuvel et al., 1974), y el *cis*- y *trans*-12,13-dihidroxi-dihidroxi-phaseollina por *Septoria nodorum* (Bailey et al. 1977). Además, los autores reportan que la concentración de la phaseollina y los productos del metabolismo son dependientes de la raza del patógeno (Van Den Heuvel & Vollaard, 1976). En el presente estudio, no se detectó la hidroxilación en 6a. Otros autores como Higgins et al. (1973), han reportado el phaseollinisoflavano como producto metabólico del *Stemphylium botryosum* a partir de phaseollina.

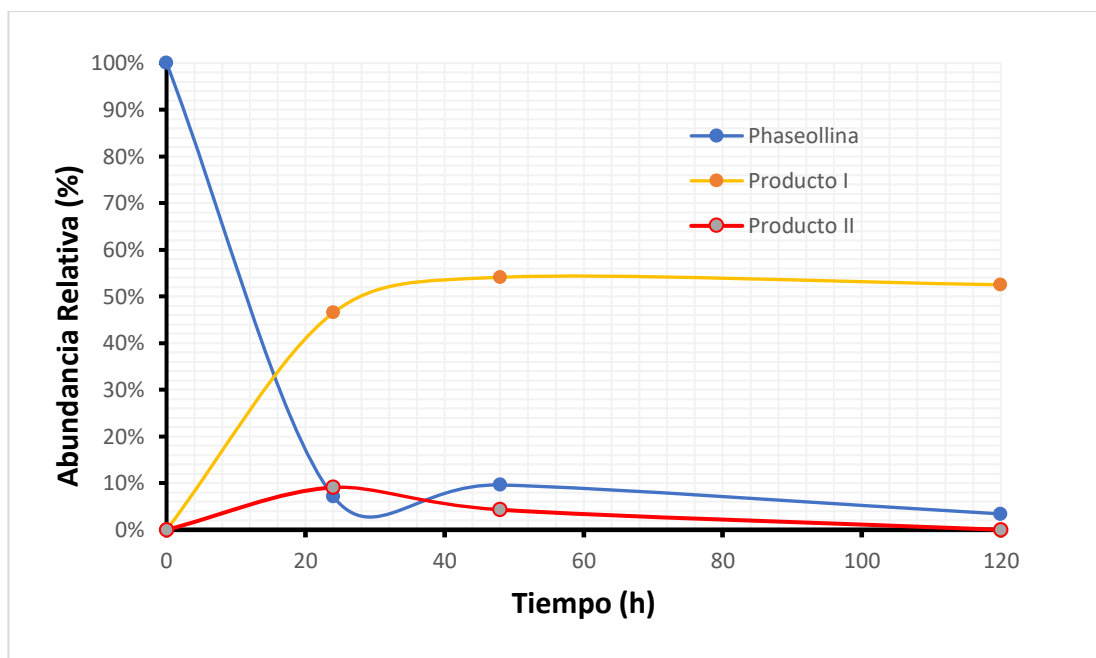


Figura 3-144. Abundancia relativa en el curso del tiempo de la phaseollina y los productos del metabolismo (I y II) con *C. lindemuthianum*.

Los productos metabólicos se identificaron tentativamente mediante ^1H RMN, debido a la cantidad insuficiente de material. En la **Figura 3-145** se observan los desplazamientos químicos para el producto (I); se observan los protones diastereotópicos H4 en δ 2.7 a 2.9 ppm,

mientras el protón H3 aparece como un multiplete en 3.5 ppm; asimismo los protones H2 aparecen en δ 4.0 a 4.2 ppm, confirmándose el esqueleto del phaseollinisoflavano. Así, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Higgins et al. (1973), en el sentido de que uno de los productos metabólicos de la phaseollina correspondió al phaseollinisoflavano. En la **Figura 3-146** se observa el espectro de ^1H RMN de la mezcla de los productos metabólicos. Descontando las señales correspondientes al phaseollinisoflavano, se pueden asignar los desplazamientos químicos del producto (II); aparecen los protones H13 y H12 en δ 2.8 y 3.0 ppm producto de la reducción del enlace doble C-C del sistema, luego aparecen los protones del anillo heterocíclico 6a (3.38 ppm), 6 (3.5 ppm, 4.3 ppm) y 11a (5.3 ppm), de esta manera se confirma el esqueleto del producto (II) (Bailey et al., 1977). Los protones aromáticos no presentaron diferencias con respecto a la phaseollina.

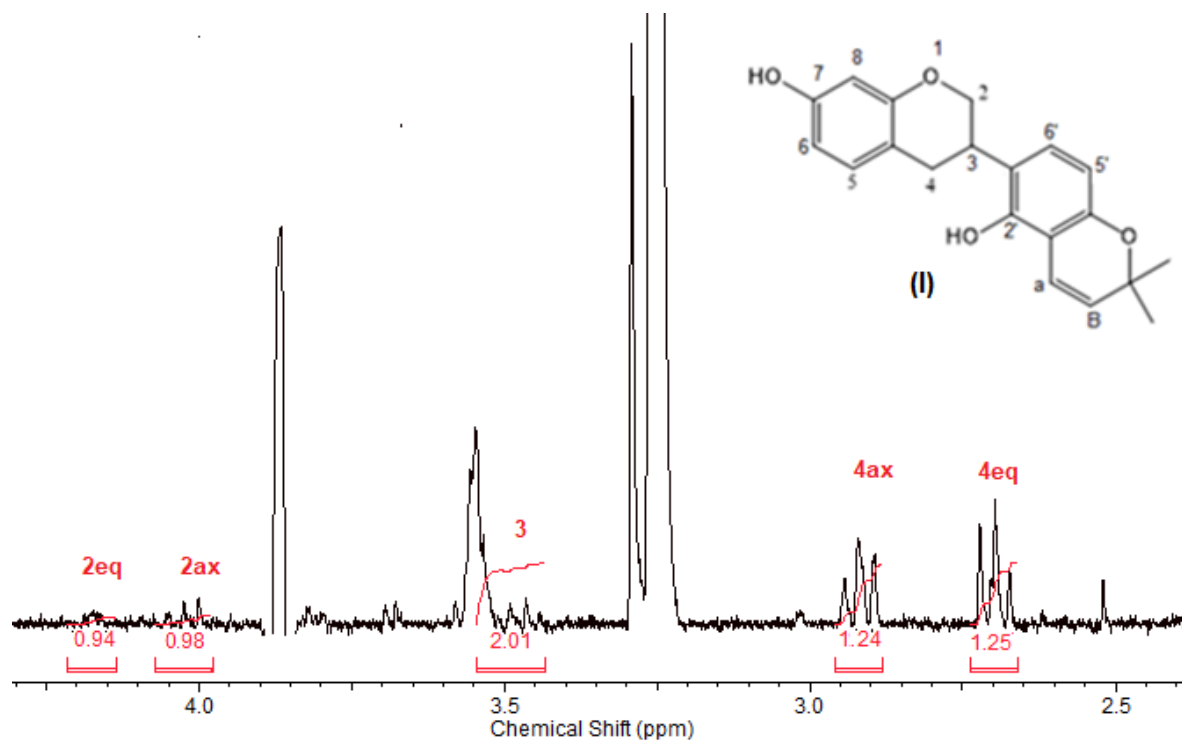


Figura 3-145. Espectro de ^1H RMN del producto I.

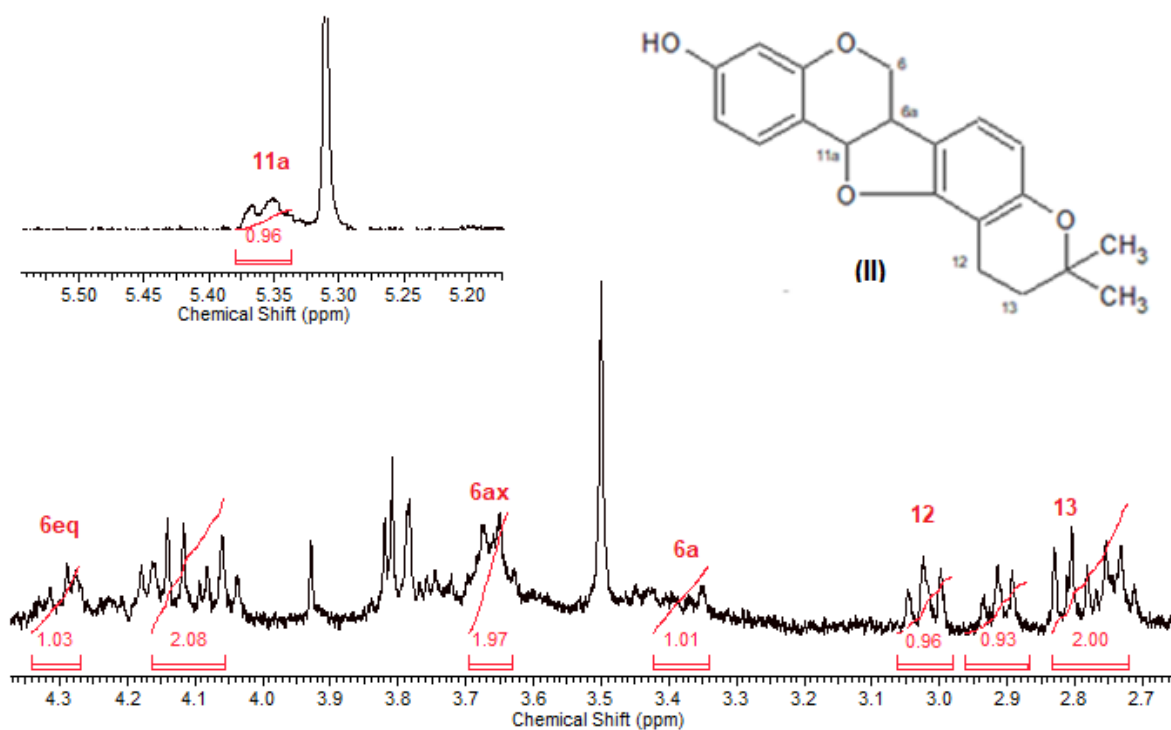


Figura 3-146. Espectro de ^1H RMN de la mezcla de los productos (I) y (II).

A partir de los análisis, se demuestra que la cepa del hongo *C. lindemuthianum* aislada en el Oriente Antioqueño metaboliza rápidamente la phaseollina. Se ha sugerido que la patogenicidad hacia una planta huésped puede estar relacionada con la capacidad del hongo patógeno para metabolizar o detoxificar las fitoalexinas. Así, la cepa de *C. lindemuthianum* estudiada podría ser altamente patógena al frijol. Como productos metabólicos se generaron el phaseollinisoflavano y un producto de hidrogenación en el doble enlace C-C del anillo 2,2-dimetilcromeno. Se demuestra la capacidad del hongo para realizar la apertura reductiva del anillo de la phaseollina para formar el 2'-hidroxiisoflavano, phaseollinisoflavano. Así como también, la hidrogenación del doble enlace C-C del anillo 2,2-dimetilcromeno para producir (II). Ha sido reportado que el phaseollinisoflavano es un compuesto no-tóxico al hongo *Stemphylium botryosum*, a diferencia de la phaseollina (Higgins et al. 1973). Tomando en cuenta esto, la conversión de phaseollina llevada a cabo por la cepa de *C. lindemuthianum* en el presente estudio, podría ser considerada una detoxificación

3.10. Fitotoxicidad de los derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico sobre plántulas de frijol

Para el presente estudio es de gran importancia evaluar el efecto fitotóxico de los elicitores sobre las plántulas de frijol, debido a que han sido reportados gran cantidad de efectos negativos y positivos sobre las plántulas de frijol, en la fase de germinación de las semillas hasta el crecimiento de las plántulas (Pancheva et al., 1996). Realizando un análisis sistemático en varias etapas del ciclo de vida de las plántulas de los efectos producidos con la aplicación de los elicitores sintetizados sobre las plántulas de frijol, puede arrojar información de gran interés referente sobre las mejores condiciones para la aplicación y utilización de los elicitores en campo. Para este fin, se utilizó el elicitor con mayor acumulación de fitoalexinas, el 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) con una concentración de 1.0 mM, además se utilizó Metil Jasmonato como control positivo y Agua como control negativo, para efectos de comparación de los efectos en las plántulas. Se utilizaron semillas de la variedad Uribe Rosado para los ensayos.

3.10.1. Germinación de semillas

Se realizó seguimiento de la germinación de semillas de la variedad de frijol Uribe Rosado durante 5 días en cajas Petri que su interior contenían un disco de papel filtro impregnado del compuesto evaluado, cada 24 h se aplicaba el compuesto mediante aspersión de este; las cajas Petri se mantuvieron en ausencia de luz durante la prueba. Los resultados se presentan en la **tabla 1**, donde la germinación de las semillas inició a partir del día 3, observándose influencia del tratamiento en el tiempo de germinación de las semillas, donde la aplicación de Metil Jasmonato (56.9 %) y 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (71.7 %) disminuyó significativamente el tiempo de germinación de las semillas. Para los días restantes no se observó diferencias significativas en el porcentaje de germinación de las semillas. Estos resultados también han sido observados en semillas de zanahoria, en donde el tratamiento con ácido salicílico o acetilsalicílico mejoró significativamente el porcentaje de germinación (Rajasekaran et al., 2002). Asimismo, han sido reportados compuestos como derivados del ácido cinámico, que al ser utilizados en semillas de frijol común disminuyeron significativamente el porcentaje de germinación de dichas semillas (Jitäreanu et al., 2011).

Posteriormente al seguimiento de la germinación de las semillas de frijol, el día 5 se retiró cuidadosamente el tegumento de los cotiledones que no se les había caído libremente, separándose los cotiledones de las radículas. A estas últimas se les midió la longitud y número

de raíces secundarias. Los resultados (**Figura 3-147**) no mostraron diferencias significativas en el número de raíces y su longitud entre el control negativo y metil jasmonato, sin embargo, se evidencian diferencias significativas con el tratamiento con el derivado 2.3, mostrando una reducción en la longitud de las radículas y una inhibición total en el crecimiento de las raíces secundarias. Estos efectos sobre la longitud y las raíces se han sido documentadas en estudios con análogos de coronalona (Schüler et al., 2004).

Tabla 1. Porcentaje Germinación semillas variedad Uribe Rosado

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Control Negativo	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	21.0 ± 11.9 ^a	95.5 ± 6.2 ^a	97.5 ± 5.6 ^a
Metil Jasmonato	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	56.9 ± 21.1 ^b	81.1 ± 15.9 ^a	92.8 ± 11.0 ^a
Derivado 2.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	71.7 ± 21.6 ^b	90.0 ± 16.3 ^a	100.0 ± 0.0 ^a

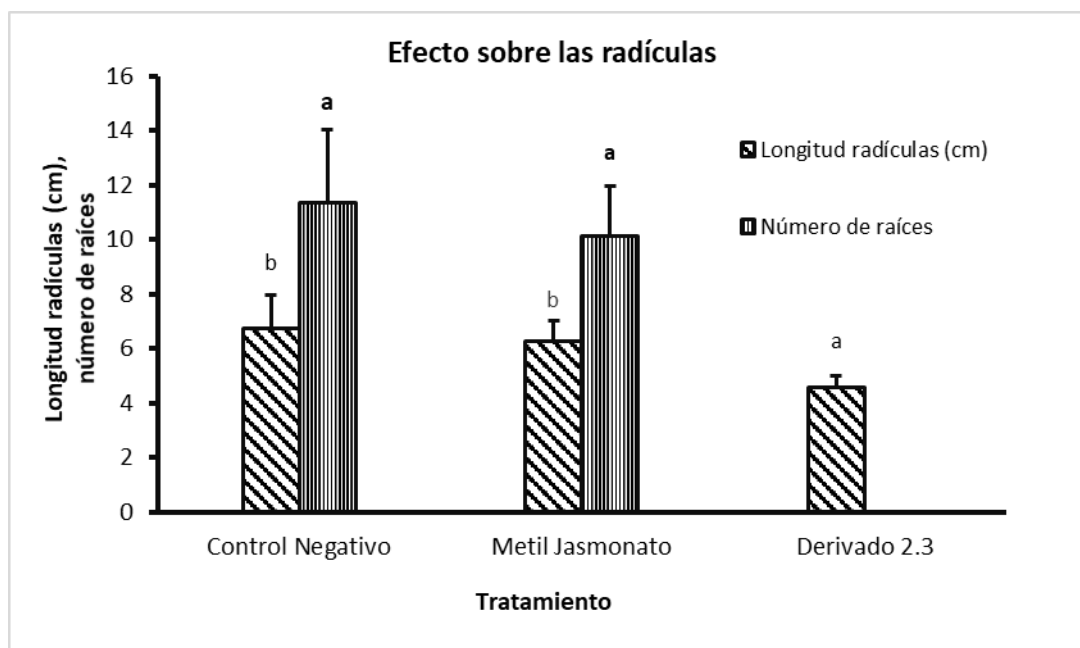


Figura 3-147. Efecto sobre el número y longitud de las radículas después de la germinación de semillas

3.10.2. Dureza de cotiledones de frijol

Para determinar los efectos del tratamiento con elicitores en la dureza de los cotiledones de frijol se realizó la prueba de punción y la prueba de compresión utilizando un analizador de texturas modelo TA.XTplus. Los resultados se pueden observar en la tabla 2, donde se evidencian diferencias significativas con el tratamiento con el derivado 2.3, mostrando una reducción del 17 % en la fuerza de punción y del 31.5 % de la fuerza de compresión de los cotiledones de frijol comparado con el control negativo. Los resultados anteriores requieren un estudio más profundo sobre la relación de la disminución de la dureza de los cotiledones con el tratamiento con elicitores. Algunos autores han encontrado una relación inversa entre la dureza de los cotiledones y la absorción de agua, a menor dureza mayor absorción de agua, lo cual podría tener grandes implicaciones en el crecimiento de las plántulas, además, posibles diferencias en la activación de la maquinaria enzimática de las semillas de frijol (Peña-Valdivia et al., 2012), lo anterior podría explicar los resultados obtenidos en la germinación de las semillas en variables como la longitud de raíces y número de raíces secundarias, ya que la interacción con el elicitador puede desviar el metabolismo primario hacia la producción de metabolitos secundarios. Los anteriores resultados y la inhibición en el crecimiento de las raíces secundarias en la etapa de germinación podrían sugerir que es más conveniente la aplicación del derivado 2.3 en una etapa posterior a la germinación de las semillas.

Tabla 2. Dureza de cotiledones de frijol tratados con elicitores

Fuerza punción cotiledones (N)		Fuerza compresión cotiledón (N)	
Tratamiento	Fuerza (N)	Tratamiento	Fuerza (N)
Control Negativo	10.62 ± 1.02 ^b	Control Negativo	167.16 ± 21.88 ^b
Metil jasmonato	10.91 ± 1.28 ^b	Metil jasmonato	152.22 ± 36.75 ^b
Derivado 2.3	8.79 ± 1.24 ^a	Derivado 2.3	114.49 ± 19.05 ^a

3.10.3. Efecto sobre el crecimiento de la plántula.

Se analizó el efecto de la aspersion de los elicitores en plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado con un tiempo de crecimiento de 5 días en arenilla; se utilizó metil jasmonato (1.0 mM)

como control positivo y agua como control negativo. El elicitor se aplicó los días 5, 7, 9 y 11. Se realizó seguimiento de variables de importancia relacionadas con la fisionomía y funcionamiento de las plántulas, como tamaño de la plántula (**Figura 3-148a**), tamaño tallo (**Figura 3-148b**), tamaño hojas (**Figura 3-148c**) y contenido de clorofilas (**Tabla 4**). Los resultados evidencian que no hay una diferencia significativa en las variables estudiadas para los días 7, 9, 11 y 13. Los grupos de clasificación obtenidos mediante las pruebas de Fisher muestran que los grupos son homogéneos y no hay diferencias en los tratamientos. Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se observa que la aspersion del derivado 2.3 a una concentración de 1.0 mM en plántulas de frijol no tiene efectos significativos en las plántulas en esta etapa de desarrollo. Otros autores han encontrado efectos negativos en el tamaño de las plántulas, hipocótilo y hojas cuando se realiza la aplicación exógena de derivados del ácido cinámico, metil jasmonato en frijol común y lupino respectivamente (Jitäreanu et al., 2011; Zalewski et al., 2020).

Por otro lado, el contenido de clorofilas es una variable muy importante en el normal funcionamiento de las plántulas por su participación en el proceso de fotosíntesis, por lo cual el día 13 se midió el contenido de clorofilas teniendo en cuenta los reportes de Tetley & Thimann, 1974. Los resultados mostrados en la tabla 3, no evidencian diferencias significativas en el contenido de clorofilas después de aplicar las soluciones de los elicitores durante 8 días, para este fin se utilizó el análisis estadístico realizado de comparación de medias ($p = 0.05$; prueba LSD de Fisher). Adicionalmente no se observaron cambios de coloración o signos de clorosis en las hojas de las plántulas de frijol durante el tratamiento con los elicitores. En contraste con los resultados obtenidos, Pancheva et al. (1996) han encontrado una disminución de la cantidad de clorofilas producidas en plántulas de trigo con la aplicación de ácido salicílico, donde la cantidad de clorofilas es dependiente de la concentración y el tiempo de contacto; asimismo, Xie et al. (2015) han estudiado el efecto de la concentración de coronatina en la producción de clorofilas en plántulas de algodón, mostrando una disminución en la producción de estas.

En general, se observa que la aplicación de los elicitores durante esta etapa de crecimiento muestra efectos fitotóxicos nulos o poco significativos para el desarrollo normal de las plántulas de frijol, lo cual refuerza los resultados obtenidos sobre el 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster, como potencial elicitor como alternativa para el control de enfermedades en cultivos de frijol común.

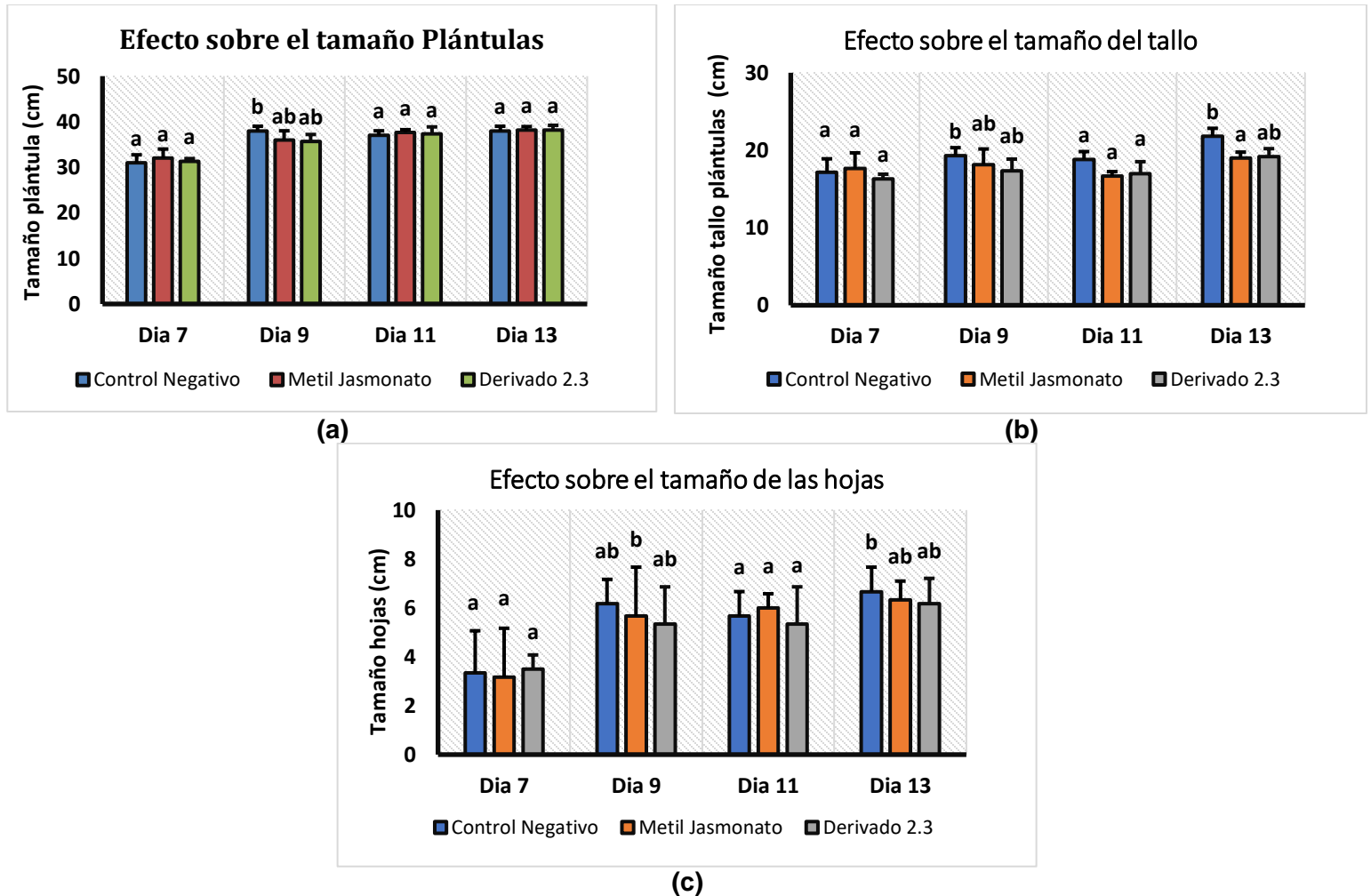


Figura 3-148. Efecto sobre el crecimiento de las plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado. Tamaño Plántula (Arriba izquierda). Tamaño tallo (Arriba derecha). Tamaño hojas (inferior)

Tabla 3. Contenido de clorofilas en hojas de plántulas de frijol tratados con elicitores

Contenido clorofilas (mg/g m.f.)	
Control Negativo	142.64 ± 37.21 ^a
MeJA	180,96 ± 35.67 ^a
Derivado 2.3	126,34 ± 20.88 ^a

3.10.4. Efecto sobre las raíces de la plántula.

Para garantizar el efectivo contacto de la solución de los elicitores con las raíces de las plántulas, estas se cultivaron durante 5 días en arenillas, luego fueron retiradas y puestas en vasos plásticos de 13 onzas con una pequeña capa de algodón humedecida de agua, que garantice las necesidades de agua de las plántulas. Se le aplicó los diferentes tratamientos con una concentración de 1.0 mM (Elicitor, MeJA y Agua) mediante aspersion directa sobre las raíces, estos se aplicaron los días 5, 7, 9, 11. Se realizó seguimiento de variables de importancia de la fisionomía de las raíces de las plántulas de frijol de la variedad Uribe Rosado, como longitud y número de raíces secundarias. Los resultados son presentados en la Tabla 4, donde se evidencia que los tratamientos no producen diferencias significativas en la longitud y número de raíces, dichos resultados se cumplen desde el día 7 hasta el final del experimento, por lo cual es importante mencionar el derivado 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster no tiene efectos negativos sobre las raíces de las plántulas a la concentración evaluada de 1.0 mM. Debido a la importancia de las raíces, muchos autores han documentado la influencia de la aplicación exógena de gran variedad de compuestos como derivados del ácido cinámico en frijol común (Jitäreanu et al., 2011) y ácido salicílico en cebada ((Pancheva et al., 1996); en primer lugar, encontraron que a medida que aumenta la concentración del derivado hay un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las raíces de las plántulas. Mientras en el caso del ácido salicílico el cual es reconocido por ser un regulador del crecimiento de las plantas, se observó que a bajas concentraciones incrementó el tamaño de las raíces, pero a altas concentraciones la inhibición en el crecimiento fue significativo.

El análisis de fitotoxicidad y su capacidad como elicitor del 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster en la acumulación de fitoalexinas en las variedades de frijol ICA Cerinza y Uribe, muestran el potencial que poseen los elicitores sintéticos tipo indanoilo, los cuales pueden representar una opción prometedora a largo o mediano plazo como alternativa agronómica para el control de enfermedades en frijol.

Tabla 4. Efecto sobre las raíces de la aspersión de elicitores

Día	Día 7		Día 9		Día 11		Día 13	
Tratamiento	Longitud raíces	Número raíces secundarias	Longitud raíces	Número raíces secundarias	Longitud raíces	Número raíces secundarias	Longitud raíces	Número raíces secundarias
Control Negativo	12.0 ± 1.7 ^a	15.4 ± 1.3 ^a	12.6 ± 1.1 ^a	15.2 ± 1.1 ^a	14,2 ± 1.6 ^a	16.4 ± 1.7 ^a	13.6 ± 1.1 ^a	15.4 ± 1.7 ^a
Metil Jasmonato	11.6 ± 0.9 ^a	15.8 ± 1.9 ^a	12.6 ± 1.7 ^a	15.2 ± 1.6 ^a	13,0 ± 2.2 ^a	16.4 ± 1.1 ^a	12.6 ± 0.5 ^a	15.8 ± 0.8 ^a
Derivado 2.3	12.8 ± 3.1 ^a	16 ± 1.6 ^a	12.2 ± 1.6 ^a	14 ± 1.2 ^a	14,0 ± 2.0 ^a	15 ± 0.7 ^a	13.4 ± 1.1 ^a	15 ± 1.0 ^a

4. Conclusiones

Los elicitores tipo indanoilo y metil jasmonato, permiten modificar la respuesta química de plántulas de frijol común en variedades colombianas como ICA Cerinza y Uribe Rosado, generando una mezcla de fitoalexinas para el control no biocida de enfermedades como la antracnosis. Esta respuesta depende de la variedad del frijol (susceptible o resistente a enfermedades), el tiempo post-inducción, y la concentración y la estructura del elicitador. Los resultados del presente estudio mostraron que las máximas concentraciones de fitoalexinas isoflavonoides se elicitaban en tejidos de frijol (hipocótilo-raíz, vainas) luego del tratamiento con el compuesto 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster (**3**), en una concentración de 1.0 mM y un tiempo post-inducción de 72 h. Adicionalmente, las fitoalexinas mayoritarias en el proceso de elicitación fueron genisteína y phaseollina, las cuales son reconocidas por su efecto antimicrobiano. Se observó, que el derivado 1-oxo-indanoil-(L)-isoleucina metil éster induce niveles de fitoalexinas comparables al metil jasmonato, hormona vegetal utilizada como señal de alarma por las plantas. Asimismo, la aplicación de elicitores derivados del ácido 1-indanona-4-carboxílico, mostró que la vía biosintética de los 5-desoxiisoflavonoides, la cual usa daidzeína como precursor, fue canalizada preferencialmente hacia la producción de pterocarpanos, específicamente phaseollina. En el caso de la ruta biosintética de los 5-hidroxiisoflavonoides, se observó una concentración mayoritaria de genisteína, pero baja de 2'-hidroxigenisteína, y mucho menos de dalbergioidina y kievitona; lo anterior puede suponer que la ruta de las fitoalexinas 5-hidroxiisoflavonoide se encuentra reprimida ó bloqueada en los tejidos (hipocótilo-raíz) de las variedades ICA Cerinza y Uribe Rosado.

Por otro lado, se encontró que los extractos en AcOEt de los tejidos de frijol (hipocótilo-raíz), elicitados con 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster y metil jasmonato y no elicitados (tratados con agua), de las dos variedades estudiadas, poseen propiedades contra *Colletotrichum lindemuthianum* (agente responsable de la antracnosis), como alta inhibición del crecimiento micelial y la esporulación. No obstante, son los extractos procedentes de los tejidos tratados con el derivado 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster los que mostraron la mayor inhibición del crecimiento radial.

Asimismo, el análisis cualitativo de estructura-actividad elicitora, y las modificaciones sistemáticas en las posiciones 4, 2, 1 y 6 del ácido 1-indanona-4-carboxílico, mostraron la

importancia de diferentes grupos funcionales y sustituyentes en la actividad inductora de fitoalexinas isoflavonoides. En primer lugar, un cambio en la posición 4 por otro sustituyente diferente al aminoácido L-isoleucina metil éster resultó en una pérdida significativa de la actividad biológica antes mencionada; en segundo lugar, el grupo funcional carbonilo de la ciclopentanona juega un papel importante en la actividad elicitora; la reducción de este grupo o la adición nucleofílica para la formación de hidrazonas tuvo efectos negativos en la actividad. En último lugar, la incorporación de un sustituyente voluminoso como el Bromo en la posición 6 redujo significativamente la actividad elicitora. Es claro que es posible modular la producción de fitoalexinas en frijol con el uso de elicitores tipo indanoilo.

El derivado 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster mostró un bajo efecto fitotóxico sobre diferentes tejidos de frijol. La aplicación del elicitor debe realizarse en una etapa posterior a la germinación, ya que se evidenció inhibición en el crecimiento de las raíces. Además, en esta etapa se encontró que la aplicación del elicitor a las semillas trae consigo una reducción en el tiempo de germinación de dichas semillas. Por otro lado, en las pruebas realizadas en la etapa donde las plántulas se han desarrollado significativamente (5-13 días de crecimiento), se encontró que los efectos en variables morfológicas y fisiológicas como el tamaño de la plántula, tallo y hojas, contenido de clorofilas, número de raíces secundarias y longitud de raíces son poco significativas o nulas, lo cual sumado a la capacidad elicitora de fitoalexinas del 1-oxo-indanoil-L-isoleucina metil éster lo convierte en un elicitor potencial para el control de enfermedades y su aplicación en campo.

El método de detección, identificación y cuantificación de fitoalexinas puede ser usado para detectar rápidamente variedades con buenas perspectivas de resistencia a enfermedades, basado en la acumulación de fitoalexinas. El pterocarpano phaseollina puede ser usado como un marcador químico de resistencia, y su rápida y elevada acumulación, como un factor clave en la resistencia a enfermedades de una variedad de frijol.

Los resultados obtenidos de la acumulación de fitoalexinas y las pruebas de fitotoxicidad utilizando elicitores sintéticos tipo indanoilo, muestran que estos compuestos pueden representar una opción prometedora a mediano o largo plazo como alternativa agronómica para el control de enfermedades en frijol.

Anexo: Información Suplementaria

Resumen proceso de elicitación

Tabla 5. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g m.f.}$) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto metil jasmonato 0.44 mM.

Variedad ICA Cerinza, Metil Jasmonato 0.44 mM					
Fitoalexina	Control	24	48	72	96
Dalbergioidina	1,29	3,04	3,40	2,83	3,36
2'-Hidroxigenisteina	0,06	3,21	5,93	2,82	4,97
Daidzeina	0,59	1,31	5,17	4,47	3,09
Genisteina	3,68	26,56	31,42	25,43	33,44
Coumestrol	3,47	8,80	6,70	6,00	6,95
Phaseollinisoflavano	0,08	0,68	0,62	0,45	1,15
Phaseollidina	0,31	1,36	0,42	0,29	5,98
Phaseollina	0,44	9,91	16,14	17,12	35,49
Kievitona	0,77	1,53	1,06	1,05	1,26

Tabla 6. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g m.f.}$) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 0.44 mM.

Variedad ICA Cerinza, 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 0.44 mM					
Fitoalexina	Control	24	48	72	96
Dalbergioidina	1,29	3,16	2,63	2,47	1,70
2'-Hidroxigenisteina	0,06	5,07	3,02	2,10	1,24
Daidzeina	0,59	3,53	6,55	2,80	2,45
Genisteina	3,68	50,21	17,99	15,13	17,50
Coumestrol	3,47	10,77	8,72	8,07	6,08
Phaseollinisoflavano	0,08	1,27	1,60	1,65	1,33
Phaseollidina	0,31	2,86	3,01	1,77	1,14
Phaseollina	0,44	8,99	13,45	4,41	6,05
Kievitona	0,77	1,52	1,15	1,77	1,34

Tabla 7. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g m.f.}$) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 1.0 mM.

Variedad ICA Cerinza, 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 1.0 mM					
Fitoalexina	Control	24	48	72	96
Dalbergioidina	1,29	2,44	4,65	3,49	2,53
2'-Hidroxigenisteina	0,06	5,96	8,58	7,44	6,68
Daidzeina	0,59	4,42	4,36	8,00	10,03
Genisteina	3,68	21,20	28,53	35,60	36,27
Coumestrol	3,47	6,65	9,38	9,78	9,39
Phaseollinisoflavano	0,08	1,12	1,28	1,09	1,19
Phaseollidina	0,31	1,02	1,11	1,20	0,50
Phaseollina	0,44	3,91	11,77	17,17	9,44
Kievitona	0,77	1,75	1,52	1,92	1,18

Tabla 8. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la concentración del elicitador realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto Metil Jasmonato.

Variedad ICA Cerinza, Metil Jasmonato					
Fitoalexina	Control	0,04 mM	0,44 mM	2,22 mM	4,40 mM
Dalbergioidina	1,29	3,25	3,17	3,36	2,06
2'-Hidroxigenisteina	0,06	4,09	3,34	4,97	2,99
Daidzeina	0,59	3,34	1,81	3,09	1,30
Genisteina	3,68	25,23	21,43	33,44	19,50
Coumestrol	3,47	6,92	7,78	6,95	4,72
Phaseollinisoflavano	0,08	0,34	1,36	1,15	0,71
Phaseollidina	0,31	0,97	0,70	5,98	1,75
Phaseollina	0,44	12,24	29,69	35,49	10,05
Kievitona	0,77	0,99	1,20	1,26	1,34

Tabla 9. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la concentración del elicitador realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3).

Variedad ICA Cerinza, 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3)					
Fitoalexina	Control	0,44 mM	1,0 mM	2,22 mM	4,40 mM
Dalbergioidina	1,29	1,70	2,53	1,28	1,57
2'-Hidroxigenisteina	0,06	1,24	6,68	0,62	1,34
Daidzeina	0,59	2,45	10,03	0,79	1,23
Genisteina	3,68	17,50	36,27	6,81	14,00
Coumestrol	3,47	6,08	9,39	6,57	5,81
Phaseollinisoflavano	0,08	1,33	1,19	0,34	0,93
Phaseollidina	0,31	1,14	0,50	0,89	0,96
Phaseollina	0,44	6,05	9,44	7,07	19,56
Kievitona	0,77	1,34	1,18	1,15	1,42

Tabla 10. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g m.f.}$) con el cambio en la estructura del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución de los compuestos 2.3 – 2.6 a 1.0 mM.

Variedad ICA Cerinza, Elicitor 1,0 mM, Tiempo Post-inducción 72 h					
Fitoalexina	Control	2.3	2.4	2.5	2.6
Dalbergioidina	1,09	3,49	1,29	1,05	1,03
2'-Hidroxigenisteina	0,25	7,44	0,93	0,32	0,60
Daidzeina	0,49	8,00	0,32	0,35	0,46
Genisteina	1,24	35,60	2,01	2,34	1,72
Coumestrol	3,28	9,78	3,46	3,24	3,27
Phaseollinisoflavano	0,04	1,09	0,29	0,16	0,13
Phaseollidina	0,09	1,20	0,43	0,38	0,24
Phaseollina	0,21	17,17	1,06	0,26	0,11
Kievitona	0,77	1,92	0,80	0,72	0,72

Tabla 11. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g m.f.}$) con el cambio en la estructura del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol ICA Cerinza inducida con una solución de los compuestos 2.7 - 2.15 a 1.0 mM.

Variedad ICA Cerinza, Elicitor 1,0 mM, Tiempo Post-inducción 72 h									
Fitoalexina	Control	2.3	2.7	2.8	2.9	2.10	2.11	2.12	2.15
Dalbergioidina	1,09	3,49	1,05	1,07	1,07	1,03	0,95	1,03	1,07
2'-Hidroxigenisteina	0,25	7,44	0,94	1,69	1,17	0,69	0,36	1,07	1,48
Daidzeina	0,49	8,00	3,17	2,36	3,21	2,40	1,16	2,23	3,04
Genisteina	1,24	35,60	9,84	7,76	9,14	6,07	6,03	5,80	12,28
Coumestrol	3,28	9,78	5,29	6,70	6,82	6,85	5,32	6,78	8,39
Phaseollinisoflavano	0,04	1,09	0,57	0,45	0,65	0,84	0,40	0,64	0,89
Phaseollidina	0,09	1,20	0,64	0,14	0,58	0,86	0,62	0,67	0,87
Phaseollina	0,21	17,17	2,18	2,61	1,10	2,15	1,19	2,32	6,91
Kievitona	0,77	1,92	0,95	1,47	1,13	1,18	1,64	2,73	1,87

Tabla 12. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g m.f.}$) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto metil jasmonato 0.44 mM.

Variedad Uribe Rosado, Metil Jasmonato 0.44 mM					
Fitoalexina	Control	24	48	72	96
Dalbergioidina	1,59	2,25	1,56	1,28	1,22
2'-Hidroxigenisteina	4,94	5,20	7,07	9,75	2,69
Daidzeina	9,00	0,47	3,06	9,82	4,95
Genisteina	61,86	36,37	50,57	136,61	36,55
Coumestrol	8,50	15,92	10,51	13,21	7,91

Phaseollinisoflavano	0,93	0,62	0,80	0,99	0,58
Phaseollidina	0,08	0,62	0,55	1,18	1,03
Phaseollina	3,35	14,39	8,64	17,80	21,13
Kievitona	1,13	0,84	1,91	2,72	1,07

Tabla 13. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 0.44 mM.

Variedad Uribe Rosado, 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 0.44 mM					
Fitoalexina	Control	24	48	72	96
Dalbergioidina	1,59	2,03	1,03	1,38	1,13
2'-Hidroxigenisteina	4,94	6,39	0,66	2,30	0,91
Daidzeina	9,00	3,76	1,11	3,18	2,79
Genisteina	61,86	29,69	6,23	28,64	26,96
Coumestrol	8,50	8,04	6,70	8,46	6,27
Phaseollinisoflavano	0,93	2,11	0,76	1,66	0,70
Phaseollidina	0,08	0,48	0,45	1,39	0,81
Phaseollina	3,35	6,65	3,11	13,60	7,45
Kievitona	1,13	1,69	0,77	1,66	1,73

Tabla 14. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) en el curso del tiempo realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 1.0 mM.

Variedad Uribe Rosado, 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3) 1.0 mM					
Fitoalexina	Control	24	48	72	96
Dalbergioidina	1,59	1,49	2,38	2,23	1,30
2'-Hidroxigenisteina	4,94	7,15	12,51	7,73	17,95
Daidzeina	9,00	5,82	9,62	8,88	4,84
Genisteina	61,86	27,37	55,96	39,12	36,53
Coumestrol	8,50	6,04	13,37	11,09	15,80
Phaseollinisoflavano	0,93	0,60	1,94	0,86	2,28
Phaseollidina	0,08	0,67	0,59	1,04	2,19
Phaseollina	3,35	1,71	11,40	21,96	13,29
Kievitona	1,13	1,46	1,27	1,90	1,78

Tabla 15. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la concentración del elicitador realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto Metil Jasmonato.

Variedad Uribe Rosado, Metil Jasmonato					
Fitoalexina	Control	0,04 mM	0,44 mM	2,22 mM	4,40 mM
Dalbergioidina	1,59	0,98	1,22	1,06	1,05
2'-Hidroxigenisteina	4,94	1,21	2,69	3,07	3,01
Daidzeina	9,00	4,50	4,95	4,71	3,15
Genisteina	61,86	8,74	36,55	28,54	20,26
Coumestrol	8,50	8,21	7,91	10,03	6,50
Phaseollinisoflavano	0,93	0,29	0,57	0,73	1,10
Phaseollidina	0,08	0,45	1,01	0,86	0,63
Phaseollina	3,35	2,68	21,13	24,38	5,73
Kievitona	1,13	1,02	1,05	1,15	1,19

Tabla 16. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la concentración del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución del compuesto 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster.

Variedad Uribe Rosado, 1-oxo-indanoil-L-Isoleucina metil éster (2.3)					
Fitoalexina	Control	0,44 mM	1,0 mM	2,22 mM	4,40 mM
Dalbergioidina	1,59	1,08	1,30	1,10	1,25
2'-Hidroxigenisteina	4,94	0,35	17,95	2,10	2,51
Daidzeina	9,00	2,41	4,84	2,70	2,15
Genisteina	61,86	6,53	36,53	16,32	26,42
Coumestrol	8,50	5,65	15,80	9,68	8,64
Phaseollinisoflavano	0,93	0,09	2,28	0,59	0,94
Phaseollidina	0,08	0,41	2,19	1,15	1,07
Phaseollina	3,35	1,47	13,29	15,12	17,38
Kievitona	1,13	1,23	1,78	1,30	1,32

Tabla 17. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g}$ m.f.) con el cambio en la estructura del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución de los compuestos 2.3 – 2.6 a 1.0 mM.

Variedad Uribe Rosado, Elicitor 1,0 mM, Tiempo Post-inducción 72 h					
Fitoalexina	Control	2.3	2.4	2.5	2.6
Dalbergioidina	1,39	2,23	0,98	0,93	0,92
2'-Hidroxigenisteina	6,55	7,73	0,09	0,11	0,16
Daidzeina	16,71	8,88	0,21	0,44	0,65
Genisteina	86,68	39,12	3,77	2,45	3,23
Coumestrol	10,48	11,09	4,02	3,99	3,99
Phaseollinisoflavano	0,90	0,86	0,13	0,09	0,14
Phaseollidina	0,28	1,04	0,31	0,26	0,27
Phaseollina	2,89	21,96	1,74	0,43	0,87

Kievitona	1,12	1,90	0,97	0,87	0,84
-----------	------	------	------	------	------

Tabla 18. Concentración de fitoalexinas promedio ($\mu\text{g/g m.f.}$) con el cambio en la estructura del elicitor realizada sobre hipocótilo-raíz de la variedad de frijol Uribe Rosado inducida con una solución de los compuestos 2.7 - 2.15 a 1.0 mM

Variedad Uribe Rosado, Elicitor 1,0 mM, Tiempo Post-inducción 72 h									
Fitoalexina	Control	2.3	2.7	2.8	2.9	2.10	2.11	2.12	2.15
Dalbergioidina	1,39	2,23	0,97	1,05	2,26	1,03	0,95	1,05	1,04
2'-Hidroxigenisteina	6,55	7,73	0,69	1,65	20,43	1,80	0,43	1,82	2,39
Daidzeina	16,71	8,88	3,57	3,40	1,07	1,08	2,68	6,03	3,59
Genisteina	86,68	39,12	6,84	13,11	49,52	8,39	4,45	15,15	24,68
Coumestrol	10,48	11,09	4,75	8,68	8,81	12,47	7,13	11,38	8,14
Phaseollinisoflavano	0,90	0,86	0,24	0,81	5,73	1,68	0,38	1,03	0,68
Phaseollidina	0,28	1,04	0,51	0,18	0,70	1,14	0,12	0,26	0,31
Phaseollina	2,89	21,96	1,38	6,13	8,80	10,85	1,83	7,20	3,68
Kievitona	1,12	1,90	0,86	2,05	2,79	1,07	1,08	2,69	1,95

Análisis Estadístico

Análisis de varianza y pruebas múltiples de rangos de fitoalexinas acumuladas en el curso del tiempo por inducción del compuesto Metil Jasmonato a 0.44 mM.

Tabla 19. Pruebas de Múltiple Rangos para Dalbergioidina.

Tiempo	Media	Desviación Estándar	Grupos Homogéneos	Equivalencia Grupos
Control	1,29	0,39	X	A
24	3,04	1,04	X	B
48	3,40	0,14	X	B
72	2,83	0,66	X	B
96	3,36	0,12	X	B

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0. En este se aplica, un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias es significativamente diferentes de otras. Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias

estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Tabla 20. Pruebas de Múltiple Rangos para 2'-Hidroxigenisteina.

Tiempo	Media	Desviación Estándar	Grupos Homogéneos	Equivalencia Grupos
Control	0,06	0,01	X	a
24	3,21	0,34	X	b
48	5,93	0,71	X	c
72	2,82	2,24	X	b
96	4,97	3,33	X X	bc

Tabla 21. Pruebas de Múltiple Rangos para Daidzeina.

Tiempo	Media	Desviación Estándar	Grupos Homogéneos	Equivalencia Grupos
Control	0,59	0,32	X	a
24	1,31	0,26	X X	ab
48	5,17	2,80	X	c
72	4,47	1,16	X	c
96	3,09	2,01	X X	bc

Tabla 22. Pruebas de Múltiple Rangos para Genisteína.

Tiempo	Media	Desviación Estándar	Grupos Homogéneos	Equivalencia Grupos
Control	3,68	2,18	X	a
24	26,56	2,29	X	b
48	31,42	4,81	X	b
72	25,43	6,13	X	B
96	33,44	8,00	X	B

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0. En este se aplica, un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias es significativamente diferentes de otras. Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias

estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Tabla 23. Pruebas de Múltiple Rangos para Coumestrol

Tiempo	Media	Desviación Estándar	Grupos Homogéneos	Equivalencia Grupos
Control	3,47	0,32	X	A
24	8,80	1,09	X	C
48	6,70	0,45	X	B
72	6,00	0,90	X	B
96	6,95	2,01	X	B

Tabla 24. Pruebas de Múltiple Rangos para Phaseollinisoflavano.

Tiempo	Media	Desviación Estándar	Grupos Homogéneos	Equivalencia Grupos
Control	0,08	0,05	X	A
24	0,68	0,28	X	B
48	0,62	0,34	X	B
72	0,45	0,15	X X	Ab
96	1,15	0,12	X	C

Tabla 25. Pruebas de Múltiple Rangos para Phaseollidina.

Tiempo	Media	Desviación Estándar	Grupos Homogéneos	Equivalencia Grupos
Control	0,30	0,22	X	A
24	1,35	1,09	X	B
48	0,42	0,08	X	A
72	0,29	0,14	X	A
96	5,98	0,32	X	C

Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos para Phaseollina.

Tiempo	Media	Desviación Estándar	Grupos Homogéneos	Equivalencia Grupos
Control	0,44	0,36	X	A
24	9,91	2,03	X	B
48	16,14	3,89	X	B
72	17,12	4,65	X	B
96	35,49	7,66	X	C

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0. En este se aplica, un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias es significativamente diferentes de otras. Se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Tabla 27. Pruebas de Múltiple Rangos para Kievitona.

Tiempo	Media	Desviación Estándar	Grupos Homogéneos	Equivalencia Grupos
1	0,77	0,01	X	A
2	1,52	0,59	X	B
3	1,06	0,23	X X	ab
4	1,05	0,12	X X	ab
5	1,26	0,13	X X	Ab

5. Bibliografía

- Alzate, Diego A.O., Gonzalo I.M. Mier, Lucía K. Afanador, Diego L.R. Durango, and Carlos M.P. García. (2009). "Evaluación de La Fitotoxicidad y La Actividad Antifúngica Contra *Colletotrichum Acutatum* de Los Aceites Esenciales de Tomillo (*Thymus Vulgaris*), Limoncillo (*Cymbopogon Citratus*), y Sus Componentes Mayoritarios." *Vitae* 16: 116–25.
- Afanador-Kafuri, L., González, A., Gañán, L., Mejía, J.F., Cardona, N., Álvarez, E. (2014). Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Disease*. 98: 1503-1513.
- AGROSAVIA. (2018). Tofiño Rivera A. Modelo productivo de frijoles para el Caribe húmedo colombiano. Mosquera, (Colombia)
- Araya, C.M, Hernández J.C. (2012). "Guía Para La Identificación de Las Enfermedades Del Frijol Más Comunes En Costa Rica," 16–19.
- Ardila F., Astrid Y.; Castellanos, D. and Sicard T. (2011). Efecto Antagónico in vitro de Actinomicetos Aislados de Purines de Chipaca (*Bidens pilosa* L.) Frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 64: 6111-6119.
- Arias, J.H., Guzman, M. (2001). Evaluación y transferencia de tecnología para el manejo integrado del cultivo de frijol en el Oriente antioqueño. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. La selva. Rionegro.
- Arias, J.H., Guzman, M. (2004). Capacitación en Tecnología de Fríjol y en Gestión Empresarial para Agricultores y Técnicos de la Región Andina. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. La selva. Rionegro.
- Arias Restrepo, Jesús Hernando, Teresita Rengifo Martínez, and Maribel Jaramillo Carmona. (2007). Manual Técnico. Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).

- Bailey, J., Burden, S., Mynett, A., Brown, C. (1977). Metabolism of phaseollin by *Septoria Nodorum* and other non-pathogens of *Phaseolus Vulgaris*. *Phytochemistry* 16,1541-1544.
- Bektas, Yasemin, and Thomas Eulgem. (2015). "Synthetic Plant Defense Elicitors." *Frontiers in Plant Science* 5 (January): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00804>.
- Belalcazar Carvajal, S.L., Cali (Colombia) spa Instituto Colombiano Agropecuario, Ottawa, Ontario (Canada) spa Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, and Armenia (Colombia) spa Comité Departamental de Cafeteros del Quindío. (1991). "El Cultivo Del Platano (Musa AAB Simmonds) En El Tropico." Cali (Colombia) ICA. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2016040780>.
- Brooks, C.J.W. and Watson, D.G. (1985). Phytoalexins. *Natur. Prod. Rep.* 2, 427 459.
- Botero L, Vizcaíno S, Quiñones W, Echeverri F, Gil J, Durango D. (2021). Increased accumulation of isoflavonoids in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) tissues treated with 1-oxo-indane-4-carboxylic acid derivatives. *Biotechnol Rep (Amst)*. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00601. PMID: 33732630; PMCID: PMC7937663.
- Brauer, Veronica S .; Rezende, Caroline P .; Pessoni, Andre M .; De Paula, Renato G .; Rangappa, Kanchugarakoppal S .; Nayaka, Siddaiah C .; Gupta, Vijai K .; Almeida, Fausto. (2019). "Agentes antimicóticos en la agricultura: amigos y enemigos de la salud pública" *Biomoléculas* 9: 521. <https://doi.org/10.3390/biom9100521>
- Buonaurio, Roberto, Luciano Scarponi, Mery Ferrara, Paola Sidoti, and Angelo Bertona. (2002). "Induction of Systemic Acquired Resistance in Pepper Plants by Acibenzolar-S-Methyl against Bacterial Spot Disease." *European Journal of Plant Pathology* 108: 41–49. <https://doi.org/10.1023/A:1013984511233>.
- Cámara de Comercio de Bogotá. (2015). "Manual Frijol," 1–56. Programa de apoyo agrícola y agroindustrial vicepresidencia de fortalecimiento empresarial. <https://www.ccb.org.co/content/download/13731/175123/file/Frijol.pdf>.

- Camarena-Gutiérrez G. (2002). Octadecanoides como reguladores de la defensa de las plantas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 8: 107-112.
- Cano, G. (2016). Evaluación de tres extractos vegetales para el control de plagas en el cultivo de frijol arbustivo *Phaseolus vulgaris* L. Tesis (Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente). Universidad de Manizales. Facultad de Ciencias Contables, Económicas y Administrativas. CIMAD.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. :803-814. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.008. PMID: 16497589.
- Chu J. (2014). Effect of cultivar and growth region on the mechanical and biochemical properties of canned baked beans. The University of Leeds. *Food Science and Nutrition*
- Cuéllar Quintero, Colombia, Álvarez Cabrera, and Castaño Zapata. (2011). "Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín." *Mycosphaerella Fijensis* Morelet.) *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín* 64: 5853–65. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179922364011>.
- Dekker, J., Georgopoulos, SG (1982). Fungicide Resistance in Crop Protection. *El Centro Internacional de Agricultura y Biociencia, Wallingford*, 177-186
- Dewick P., Steele M., Dixon R. and Whitehead I. (1982). Biosynthesis of Isoflavonoid Phytoalexins: Incorporation of Sodium [1,2-¹³C₂] Acetate into Phaseollin and Kievitone. *Naturforsch.* 37 c, 363 - 368.
- Diener AC, Ausubel FM (2005). Resistance to fusarium oxysporum 1, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics*171:305-21. doi: 10.1534/genetics.105.042218. Epub 2005 Jun 18. PMID: 15965251; PMCID: PMC1456520.

- Dirección de Investigación y Evaluación Económica, Secretaría de Ambiente. (2016). "Panorama Agroalimentario de Frijol." CONVENCION INTERNACIONAL DEL CAFE EN MEXICO 2015.
- Dotor M., Cabezas M. (2014). Mecanismos de Resistencia Sistémica en Plantas. Acta Iguazu, Cascavel 3,1-19.
- Durango, D. L. (2013). Fitoalexinas En Variedades Colombianas de Frijol, Soya y Banano: Aislamiento, Caracterización e Inducción Mediante Elicitores. Universidad de Antioquia.
- Durango, Diego, Winston Quiñones, Fernando Torres, Yoni Rosero, Jesús Gil, and Fernando Echeverri. (2002). "Phytoalexin Accumulation in Colombian Bean Varieties and Aminosugars as Elicitors." *Molecules* 7: 817–32. <https://doi.org/10.3390/71100817>.
- Eusebio Nava-Pérez; Cipriano García-Gutiérrez; Jesús Ricardo Camacho-Báez y Elva Lorena Vázquez-Montoya. (2012). bioplaguicidas: una opción para el control biológico de Plagas. Ra Ximhai 8 Universidad Autónoma Indígena de México. Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa,17-29.
- Fahri, Yigit. (2011). Acibenzolar-S-Methyl Induces Lettuce Resistance against *Xanthomonas Campestris* Pv. Vitians. *African Journal of Biotechnology* 10: 9606–12. <https://doi.org/10.5897/AJB11.850>.
- Fenalce. (2018). Estadísticas Área, producción y rendimientos de cereales y leguminosas en Colombia. Información anual (Nivel nacional)-(2012 -2020 B). <https://www.fenalce.org/alfa/pg.php?pa=60>
- Ferrufino, Armando. (2008). Guía de Identificación y Manejo Guía de Identificación y Manejo Integrado de Enfermedades Del Integrado de Enfermedades Del Frijol En América Central Frijol En América Central. Instituto Interamericano de Cooperación Para La Agricultura (IICA), 18. <http://repiica.iica.int/docs/B0891E/B0891E.pdf>.

- Fonseca Ardila, Yudy Astrid, Castellanos Suárez, Diana Edith y León Sicard, Tomás Enrique. (2011). Efecto Antagónico in vitro de Actinomicetos Aislados de Purines de Chipaca (*Bidens pilosa* L.) Frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 64, 6111-6119.
- García-Arenal F., Aurora Frame A., Sagasta E. (1978). The multiple phytoalexin response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to infection by *Botrytis cinerea*. Physiological Plant Pathology 13,151-156
- Gnanamanickam, S.S., & Mansfield, J.W. (1980). Selective toxicity of wyerone and other phytoalexins to gram-positive bacterias. Phytochemistry 20: 997-1000.
- Ghini R., Kimati H. (2000). Resistência de Fungos a Fungicidas. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, Brazil, 78 pp.
- Goossens JF, Stabel A, Vendrig JC. (1987). Relationships between kievitone and phaseollin accumulation in different tissues of *Phaseolus vulgaris* in response to treatment with mercuric chloride, a fungal cell wall elicitor and abscisic acid. Physiol Mol Plant Pathol 30: 1 - 12.
- GR Sánchez, EC Mercado, EB Peña, HR de la Cruz, EG Pineda. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. Biológicas 12, 90-95
- Grayer, R. J., and T. Kokubun. (2001). "Plant-Fungal Interactions: The Search for Phytoalexins and Other Antifungal Compounds from Higher Plants." Phytochemistry 56: 253–63. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00450-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00450-7).
- Hammerschmidt R, Schultz JC. (1996). Múltiples defensas y señales en la defensa de las plantas contra patógenos y herbívoros. Rec Adv Phytochem 30: 122–154.
- Hargreaves, J. (1981). Accumulation of phytoalexins in cotyledons of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) following treatment with Triton (T-Octylphenol Polyethoxyethanol) surfactants. The New Phytologist, 87: 733 - 741.

- Heijari, J., Nerg, A.M., Kainulainen, P., Viiri, H., Vuorinen, M., Holopainen, J.K., (2005). Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. *Entomol. Exp. Appl.* 115, 117–124.
- Higgins, S.J., Rousseau, G.G., Baxter, J.D., and Tomkins, G.M. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 70,3415.
- Higgins, J., Stoessl, A., Heath, C. 1973. Conversion of Phaseollin to Phaseollinisoflavan by *Stemphylium botryosum*. *Phytopathology* 64: 105-107.
- Hu, Qun, Wilhelm Boland, and Ji Kai Liu. (2005). “6-Substituted Indanoyl Isoleucine Conjugate Induces Tobacco Plant Responses in Secondary Metabolites.” *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*.
- Heuvel, J., Van den (1976). Sensitivity to, and metabolism of, phaseollin in relation to the pathogenicity of different isolates of *Botrytis cinerea* to bean (*Phaseolus vulgaris*). *Netherlands Journal of Plant Pathology* 82, 153 - 160.
- Huang, Yun Sheng, Jian Qiang Liu, Lang Jun Zhang, and He Lin Lu. (2012). “Synthesis of 1-Indanones from Benzoic Acids.” *Industrial and Engineering Chemistry Research* 51: 1105–9. <https://doi.org/10.1021/ie202369w>.
- Ingham, J.L. (1982). Phytoalexin Production by *Ononis* species. *Bioch. Syst Ecol.* 10:233-237.
- Jones JD, Dangl JL. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444:323-9. doi: 10.1038/nature05286. PMID: 17108957.
- Kistler H., VanEtten H. (1981). Phaseollin metabolism and tolerance in *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*. *Physiological Plant Pathology* 19, 257-271
- Koda, Y., Takahashi, K., Kikuta, Y., Greulich, F., Toshima, H., and Ichihara, A. (1996).

- Similarities of the biological activities of coronatine and coronafacic acid to those of jasmonic acid. *Phytochemistry* 41: 93–96.
- Konan F., Modeste K., Kouakou L., Koffi L., Kouassi N., Sekou D., Kone M. and Hilaire T. (2014). Effect of Methyl Jasmonate on Phytoalexins Biosynthesis and Induced Disease Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectorum* in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *International Journal of Agronomy*. Volume 2014 |Article ID 806439 | <https://doi.org/10.1155/2014/806439>
- Krumm, Thomas, Katja Bandemer, and Wilhelm Boland. (1995). "Induction of Volatile Biosynthesis in the Lima Bean (*Phaseolus Lunatus*) by Leucine- and Isoleucine Conjugates of 1-Oxo- and 1-Hydroxyindan-4-Carboxylic Acid: Evidence for Amino Acid Conjugates of Jasmonic Acid as Intermediates in the Octadecanoid Signalling Pathway." *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01398-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01398-9).
- Kurowska, Marzena M.; Daszkowska-Golec, Agata; Gajecka, Monika; Kościelniak, Paulina; Bierza, Wojciech; Szarejko, Iwona. (2020). "Methyl Jasmonate Affects Photosynthesis Efficiency, Expression of HvTIP Genes and Nitrogen Homeostasis in Barley" *Int. J. Mol. Sci.* 21,: 4335. <https://doi.org/10.3390/ijms21124335>
- Lauchli, Ryan, Göde Schüler, and Wilhelm Boland. (2002). "Selective Induction of Secondary Metabolism in *Phaseolus Lunatus* by 6-Substituted Indanoyl Isoleucine Conjugates." *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00397-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00397-7).
- Jeandet, Philippe. (2015). Phytoalexins: Current progress and future prospects. *Molecules*. 20: 2770 - 2774.
- Jitareanu, Alexandra & Tataringa, Gabriela & Ana Maria, Zbancioc & Stănescu, U.. (2011). Toxicity of Some Cinnamic Acid Derivatives to Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 39. 130-134. [10.15835/nbha3927183](https://doi.org/10.15835/nbha3927183).
- León, Ileana. (2009). "Notas La Antracnosis y La Mancha Angular Del Frijol Común

(Phaseolus Vulgaris L.)” Temas de Ciencia y Tecnología 13: 45–54.

Littleson, M.M., Baker, C.M., Dalencon, A.J., Frye, E.C., Craig, J., Kennedy, A.R., Ling, B.K., Mclachaln, M.M., Montgomery, M.G., Rusell., C.J & Watson, J.B.A. (2018). Scalable total synthesis and comprehensive structure–activity relationship studies of the phytotoxin coronatine. *Natural Communications* 9: 1105.

McKay, GJ, Egan, D, Morris, E and Brown, AE (1998). Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. *Mycol Res.* 102:671-676.

Maringoni A.C., Barros E.M. (2002). Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. *Summa Phytopathol.* 28: 197–200.

Medzhitov R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* Oct 18;449(7164):819-26. doi: 10.1038/nature06246. PMID: 17943118.

Mena, C. J. y R. V. Velázquez, (2010). Manejo integrado de plagas y enfermedades de frijol en Zacatecas. Folleto Técnico No. 24. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. 83 pp

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). Frijol. Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. <https://sioc.minagricultura.gov.co/AlimentosBalanceados/Documentos/2019-03-30%20Cifras%20Sectoriales%20Fr%C3%ADjol.pdf>

Mithöfer A., Maitrejean M., Boland W. (2004). Structural and biological diversity of cyclic octadecanoids, jasmonates, and mimetics. *J. Plant Growth Regul.* 23:170-178.

Mohamed S., Thomas P., Whiting D. (1987). Synthesis of the phytoalexin (±)-phaseollin: 3-phenylthiochromans as masked 2H-chromenes and o-prenyl phenols. *J. Chem. Soc.,*

- Perkin Trans. 1,431 – 437.
- Moreira, X., Costas, R., Sampedro, L., Zas, R., (2008). A simple method for trapping *Hylobius abietis* (L.) alive in northern Spain. *Invest. Agrar. Sist. Rec. For.* 17, 188-192.
- Morrissey JP, Osbourn AE (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:708-24. PMID: 10477313; PMCID: PMC103751.
- Nava-Pérez, Eusebio; García-Gutiérrez, Cipriano; Camacho-Báez, Jesús Ricardo; Vázquez-Montoya, Elva Lorena. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8, 17-29. Universidad Autónoma Indígena de México. El Fuerte, México
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2002). “Manejo Agronómico Semillas y Variedades.” <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1359s/a1359s03.pdf>.
- Pancheva, T.V., Popova, L.P. and Uzunova, A.M. (1996). Effect of Salicylic Acid on Growth and Photosynthesis in Barley Plants. *Journal of Plant Physiology*, 149, 57-63. [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80173-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80173-8)
- Pastor-Corrales M. (2002). “Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades En Cultivos Hidropónicos En Invernadero.”
- Pastor-Corrales M, Otoyá M, Maya M. (1993). “Diversidad de La Virulencia de *Colletotrichum Lindemuthianum* En Mesoamerica y La Región Andina.” *Fitopatología Colombiana* 17: 31–37.
- Pedras, M Soledade & Ahiahonu, Pearson. (2005). Metabolism and Detoxification of Phytoalexins and Analogues by Phytopathogenic fungi. *Phytochemistry*. 66. 391-411.
- Peña-Valdivia, C. B., J. R. Aguirre R., y V. B. Arroyo-Peña. 2012. *El Frijol Silvestre. Síndrome de Domesticación.* Editorial COLPOS. México. 206

p.10.1016/j.phytochem.2004.12.032.

Pelaéz V., Luis Germán, and Manuel José Ríos B. (1999). Nuevos Genotipos de Frijol Voluble Resistente a La Antracnosis Para El Clima Frío Moderado En El Departamento de Antioquia. [s.n.]. http://biblioteca.minagricultura.gov.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=18568&shelfbrowse_itemnumber=35920.

Peña-Valdivia, C. B.; Garcia, N. J. R.; Aguirre, R. J. R.; Ybarra-Moncada, Ma. C. and López, H. M. (2011). Variation in physical and chemical characteristics of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grain along a domestication gradient. *Chem. & Biod.* 8(12):2211-2225.

Perrin, D.R. (1964). The structure of phaseollin. *Tetrahedron Letters* 5: 29 - 35.

Perrin, D.R., & Cruickshank A.M. (1969). The antifungal activity of pterocarpans towards *Monilinia fruticola*. *Phytochemistry* 8: 971 - 978.

Perrin, D.R., Whittler, C.P & Batterham, T.J. (1972). The structure of phaseollidin. *Tetrahedron Letters* 17: 1673 - 1676.

Quintana Blanco, W. A., Pinzón Sandoval, E. H., & Fernando Torres, D. (2016). Evaluación del crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Ica Cerinza, bajo estrés salino. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 19, 87-95. <https://doi.org/10.31910/rudca.v19.n1.2016.113>

Rajasekaran, L.R., Stiles, A., Caldwell, C.D., (2002). Stand establishment in processing carrots - effects of various temperature regimes on germination and the role of salicylates in promoting germination at low temperatures. *Can. J. Plant Sci.* 82, 443–450.

Rangel Sánchez G., Castro Mercado E., Beltran Peña E., Reyes de la Cruz H. y García Pineda E. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* , 12: 90–95.

- Restrepo, M, N Muñoz, N E Day, J E Parra, L de Romero, and X Nguyen-Dinh. (1990). "Prevalence of Adverse Reproductive Outcomes in a Population Occupationally Exposed to Pesticides in Colombia." *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 16: 232–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2389129>.
- Rivera-Vargas, LI; Schmitthenner, AF y Graham, TL (1993). Efectos de los flavonoides de la soja y metabolismo de *Phytophthora sojae*. *Fitoquímica* 32 , 851-857.
- Santana F, Gloria E, Matthew W Blair, Francisco J Morales G, George Mahuku, and Carlos Jara Mauricio Castaño Gloria Esperanza. (2004). "Selección de Genotipos de Frijol Resistentes a Antracnosis y Mosaico Común Utilizando Técnicas Convencionales y Avanzadas de Mejoramiento Genético." http://agrogestion.com.co/site/revista/no1_2004/fitotecnia_no1_2004_p44-54.pdf.
- Sartorato A. (2006). Sensibilidad 'in vitro' de aislados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. *Pesqui. Agropecu. Trop.* 36: 211–213.
- Schuler, G, H Gorgs, and W Boland. (2001). "6-Substituted Indanoyl Isoleucine Conjugates Mimic the Biological Activity of Coronatine." *European Journal of Organic Chemistry*. [https://doi.org/10.1002/1099-0690\(200105\)2001:9<1663::AID-EJOC1663>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1099-0690(200105)2001:9<1663::AID-EJOC1663>3.0.CO;2-I).
- Schüler G, Mithofer A, Baldwin IT, Berger S, Ebel J, Santos JG, Herrmann G, Holscher D, Kramell R, Kutchan TM, et al (2004). Coronalin: a powerful tool in plant stress physiology. *FEBS Lett* 563: 17–22
- Singh, Roop & Chandrawat, Kuldeep Singh. (2017). Role of phytoalexins in plant disease resistance. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6: 125 - 129.
- Smith, D. A., J. M. Harrer, and T. E. Cleveland. (1982). Relation between extracellular production of kievitone hydratase by isolates of *Fusarium* and their pathogenicity on *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 72:1319–1323.

- Soriano, E., Uribe, D., & Ibarra G. (1998). Phaseollidin stored in vacuoles and the phytoalexin response in bean. *Plant Pathol* 47: 480 - 485.
- Svoboda, Jiří, and Wilhelm Boland. (2010). "Plant Defense Elicitors: Analogues of Jasmonoyl-Isoleucine Conjugate." *Phytochemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.04.027>.
- Thakur, Meenakshi, and Baldev Singh Sohal. (2013). "Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review." *ISRN Biochemistry* 2013: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>.
- Tetley, R.M. and Thimann, K.V. (1974). The Metabolism of Oat Leaves during Senescence: 1. Respiration, Carbohydrate Metabolism and the Action of Cytokinins, *Plant Physiol* 54, 294–303.
- Van den Heuvel, J., VanEtten, H.D. (1973). Detoxification of phaseollin by *Fusarium solani* f. sp. phaseolin. *Physiological Plant Pathology* 3: 327 -339.
- Van Den Heuvel, J., Vollaard, P.J. (1976). Metabolism of phaseollin by different races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 82, 103–108
<https://doi.org/10.1007/BF01976693>.
- Whitehead, I., Dey, P., & Dixon, R. (1982). Differential patterns of phytoalexin accumulation and enzyme induction in wounded and elicitor-treated tissues of *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, 154: 156 - 164.
- Xie, Z., Duan, L., Li, Z. (2015). Efectos dependientes de la dosis de coronatina sobre el crecimiento de plántulas de algodón bajo estrés por sal. *J Plant Growth Regul* 34, 651–664. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9501-1>
- Zalewski K., Nitkiewicz B., Stolarski M., Amarowicz R., Okorski A. (2020). The influence of exogenous methyl jasmonate on the germination and, content and composition of flavonoids in extracts from seedlings of yellow and narrow-leafed lupine. *Journal of*

Food Composition and Analysis 87, 103398, ISSN 0889-1575, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103398>.

Zizumbo-Villarreal, Daniel & Colunga-GarcíaMarín, Patricia. (2008). El origen de la agricultura, la domesticación de plantas y el establecimiento de corredores biológico-culturales en Mesoamérica. *Revista Geografía Agrícola* 41. 85-113.