UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE VIÑA DEL MAR - JOSÉ MIGUEL CARRERA

SÍNTESIS DE DERIVADOS DE LAWSONA Y ESTUDIO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA CONTRA HONGOS *Botrytis cinerea* y *Gibberella fujikuroi*

Trabajo de Titulación para optar al Título Profesional de Técnico Universitario en QUÍMICA CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA

Alumno:
Carla Patricia Lucero Urbina

Profesor Guía:
Dr. Luis Espinoza Catalán
Sr. Gonzalo Sepulveda Ramírez
Sr. Jaime Carmi Karmy

2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a don Jorge González Valdés por su dedicación y gran entrega de valores.

A los Doctores Luis Espinoza y Marcela Carvajal por permitir realizar mi Trabajo de Titulación en el Laboratorio de Productos Naturales y Síntesis Orgánica de la UTFSM. Además de su constante entrega de apoyo.

A Karen Catalán, Mauricio Osorio, César González y a todo el equipo del Laboratorio quienes me ayudaron durante todo este proceso.

A los amigos y familia por los momentos compartidos y su apoyo incondicional.

RESUMEN

KEYWORDS: NAFTOQUINONAS, SÍNTESIS, HONGOS.

Las naftoquinonas son productos y pigmentos naturales que tienen como característica estructural poseer dos grupos carbonilo en el anillo del naftaleno, donde deriva su nombre común. La distribución de las naftoquinonas es amplia, ya que se han aislado de plantas, hongos, bacterias e inclusive de animales.

Las naftoquinonas y sus derivados han demostrado poseer interesantes actividades biológicas dentro de las cuales destacan: antiparasitarios, antibacterianos, antifúngicos y anticancerígenos.

Un importante derivado de éstas, es la lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), pigmento que se extrae de los tallos y las hojas secas de la henna, *Lawsonia inermis L., lythraceae.*

En el presente trabajo se realizó la síntesis de derivados de lawsona con diferentes sustratos dando lugar a productos tales como ésteres, carbonatos y una función éter.

El transcurso de las reacciones de síntesis de estos compuestos se monitoreó por medio de cromatografía en capa fina (C.C.F.) y posteriormente los productos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna (C.C.). La determinación estructural y la caracterización de los compuestos sintetizados fueron desarrolladas por técnicas espectroscópicas de IR, EM y RMN.

De acuerdo al procedimiento utilizado fueron obtenidos los compuestos: **15, 16, 35, 37, 39 y 41.**

Posteriormente se determinó la actividad biológica de los compuestos obtenidos mediante ensayos *in Vitro* a los hongos fitopatógenos vegetales *Botrytis cinerea* y *Gibberella fujikuroi*.

ÍNDICE

RESUMEN
SIGLAS Y SIMBOLOGÍAS
INTRODUCCIÓN
OBJETIVOS
OBJETIVO GENERAL
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTO TEÓRICO **3**
1.1. NATURALEZA QUÍMICA DEL SUSTRATO 5
1.1.1. Benzoquinonas 5
1.1.2. Antraquinonas y fenantraquinonas: 6
1.1.3. Metilenquinonas 6
1.1.4. Naftoquinonas 7
1.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE 1,4-NAFTOQUINONAS 11
1.2.1. Actividad antiparasitaria 11
1.2.2. Actividad antibacteriana 12
1.2.3. Actividad antifúngica 13
1.2.4. Actividad anticancerígena 14
1.2.5. Mecanismo de acción de las naftoquinonas 15
1.3. SÍNTESIS ORGÁNICA 16
1.3.1. Técnicas de síntesis 17
1.4. ESTUDIO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA 26
1.4.1. Hongos 26
1.4.2. Ascomycotina 28

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL **33**
2.1. EQUIPOS Y MATERIALES 35
2.1.1. Equipos 35
2.1.2. Materiales 35
2.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES 36
2.2.1. Reactivos 36
2.2.2. Soluciones 36
2.2.3. Preparación de soluciones 37
2.2.4. Cepa de Microorganismos 37

2.2.5. Medios de cultivo 37
2.3. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 2-HIDROXI-1,4-NAFTOQUINONA 38
2.3.1. Síntesis de 2-metoxinaftalen-1,4-diona **15** 38
2.3.2. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il acetato **16** 39
2.3.3. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il benzoato **35** 40
2.3.4. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il etil carbonato **37** 41
2.3.5. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il isobutil carbonato **39** 42
2.3.6. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il metacrilato **41** 43
2.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA 44
2.4.1. Análisis estadístico 44
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIONES 45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 55
BIBLIOGRAFÍA 57
ANEXOS 63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Benzoquinonas 5
Figura 1-2. Antraquinona y fenantraquinona 6
Figura 1-3. Metilenquinonas triterpénicas 7
Figura 1-4. Naftoquinonas naturales polihidroxiladas 8
Figura 1-5. Formas tautoméricas de lawsona 10
Figura 1-6. Derivados de lawsona 11
Figura 1-7. Naftoquinonas que presentan actividades antiparasitarias 12
Figura 1-8. Naftoquinonas con actividades antibacterianas 13
Figura 1-9. Naftoquinonas naturales 14
Figura 1-10. Naftoquinonas que presentan actividad anticancerígena 14
Figura 1-11. Formación de semiquinona y dianión 15
Figura 1-12. Elución de una columna 20
Figura 1-13. Proceso de cromatografía en capa fina 20
Figura 1-14. Cromatoplaca 21
Figura 1-15. Espectro de absorción 23
Figura 1-16. Clasificación de los hongos 27
Figura 1-17. *Botrytis cinerea* desarrollado sobre una frutilla 30
Figura 1-18. Imagen de *Gibberella fujirukoi* 31

Figura 2.1. Obtención de 2-metoxinaftalen-1,4-diona 38
Figura 2.2. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il acetato 39
Figura 2-3. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il benzoato 40
Figura 2.4. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il etil carbonato 41
Figura 2.5. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il isobutil carbonato 42
Figura 2.6. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il metacrilato 43
Figura 3-1. Esquema resumen de las síntesis realizadas 47
Figura 3-2. Correlación heteronuclear 2D ^{1}H-^{13}C HMBC 48
Figura 3-3. Correlación heteronuclear 2D ^{1}H-^{13}C HMBC 49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 3-1. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Gibberella fujikuroi* a 50 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo 51
Gráfico 3-2. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Gibberella fujikuroi* a 250 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo 52
Gráfico 3-3. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Gibberella fujikuroi* a 500 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo 52
Gráfico 3-4. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* a 50 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo 53
Gráfico 3-5. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* a 250 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo 53
Gráfico 3-6. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* a 500 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo 54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Naftoquinonas naturales 9

SIGLAS Y SIMBOLOGÍAS

SIGLAS

C.C.	: Cromatografía en columna
C.C.F.	: Cromatografía en capa fina
CMI	: Concentración mínima inhibitoria
E.M.	: Espectroscopía de masas
F.T.	: Transformada de Fourier
HSQC	: Heteronuclear single quantum coherence
HMBC	: Heteronuclear multiple bond connectivities
I.R.	: Espectroscopía infrarroja
PDA	: Agar papa dextrosa
PPM	: partes por millón
Rf	: Factor de reparto
RMN	: Resonancia magnética nuclear
^{1}H RMN	: Resonancia magnética nuclear de hidrógeno 1
^{13}C RMN	: Resonancia magnética nuclear de carbono 13

SIMBOLOGÍA

d	: doblete
dd	: doble doblete
J	: Constante de acoplamiento
m/z	: Relación masa/carga
M^{+}	: Ión molecular
rf	: Región de las radiofrecuencias
s	: singlete
t	: triplete
ν	: Frecuencia
δ	: Desplazamiento químico de ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, etc.
λ	: Longitud de onda
μm	: Micrómetro

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de los tiempos las especies vegetales se han visto afectadas por un sin número de microorganismos tales como bacterias, virus y hongos además de las plagas, los que producen diversas enfermedades, muchas de estas son de importancia a nivel global debido a que representan un problema en los cultivos por las pérdidas asociadas al incremento de los costos de cosecha e identificación del fruto.

Dentro de las enfermedades producidas por hongos patógenos se encuentran la *pudrición gris* del tomate provocada por *Botrytis cinerea*, con lesiones necróticas que se pueden observar en las hojas y en los tallos de la planta, otra no menos importante es la *bakanae* enfermedad del grano de arroz producida por la sobrecarga de la fitohormona giberelina como su producto derivado metabólico propio de la *Gibberella fujikuroi.* A su vez para controlar estas y otras enfermedades de las plantas se utilizan ciertos compuestos químicos, algunos de estos con efectos tóxicos tanto para las plantas como para el ser humano.

Nace así la idea de formar nuevas alternativas para el control de estos microorganismos utilizando metabolitos sintetizados a partir de lawsona, (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), la cual es un pigmento color rojo-naranja presente en las hojas de la planta *Lawsonia inermes,* conocida tanto por su poder colorante como fungicida.

La síntesis de derivados de lawsona se lleva a cabo mediante reacciones de sustitución donde los compuestos obtenidos son purificados mediante técnicas cromatográficas habituales, como cromatografía de adsorción directa en columna (C.C) procesos que son monitoreados mediante cromatografía de adsorción en capa fina (C.C.F).

La identificación de los compuestos obtenidos se realiza por medio de sus propiedades físicas (punto de fusión) y propiedades espectroscópicas de IR, EM, RMN 1D y 2D.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Sintetizar derivados de lawsona y evaluar su actividad fungicida contra los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Gibberella fujikuroi.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar derivados de lawsona mediante reacciones de sustitución clásicas con diferentes sustratos.
- Identificar los productos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas de IR, EM, RMN 1D y 2D.
- Evaluar la actividad biológica de los compuestos obtenidos, a través de la inhibición del crecimiento de los hongos patógenos vegetales *Botrytis cinerea* y *Gibberella fujikuroi* mediante ensayo *in Vitro.*
- Comparar la efectividad de los productos sintetizados versus las naftoquinonas naturales **25**, **26** y **27**.

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTO TEÓRICO

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

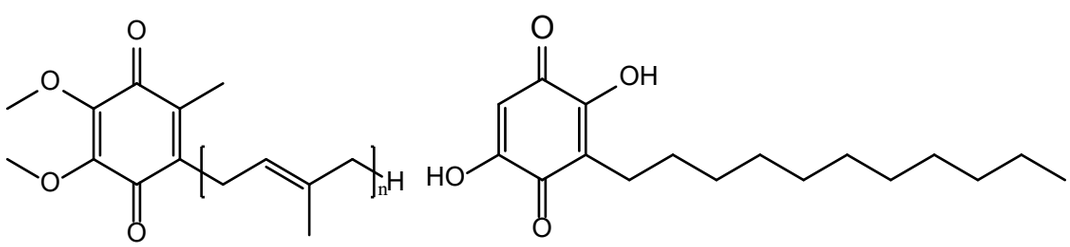
1.1. NATURALEZA QUÍMICA DEL SUSTRATO

Las quinonas son compuestos orgánicos de gran importancia en sistemas biológicos y en aplicaciones industriales como colorantes o fármacos [1]. Compuestos con núcleos quinónicos son comunes en la naturaleza y juegan un importante papel en plantas y animales [2]. Muchas quinonas son utilizadas como anticancerígenos [3, 4], antibacterianos y antimaláricos así como fungicidas [5]. En base a las numerosas actividades biológicas que presentan estos compuestos, el agrupamiento quinónico es considerado una estructura privilegiada en Química Médica [6].

A continuación se muestra una clasificación de algunas de las quinonas más representativas:

1.1.1. Benzoquinonas

Muchas veces son denominadas simplemente quinonas. Estos metabolitos secundarios son pigmentos de color amarillo que con frecuencia se encuentran en hongos, artrópodos y en plantas superiores. La coenzima Q10 **1** (ubiquinona) y la vitamina E son benzoquinonas (ver Figura 1-1). Un ejemplo de este tipo de quinonas con actividad antitumoral es la embelina **2** (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona) [7, 8,9,10]



Coenzima Q10.n=6-10 Embelina

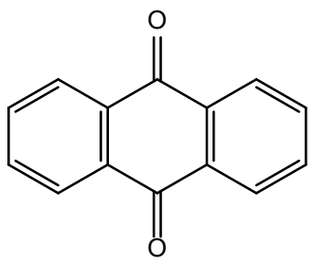
1 **2**

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-1. Benzoquinonas

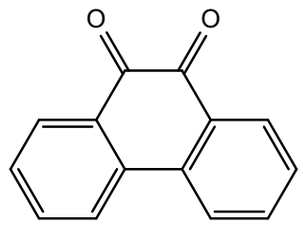
1.1.2. Antraquinonas y fenantraquinonas:

Son una clase de metabolitos secundarios vegetales con una funcionalidad de p-quinona en un núcleo antracénico, o de o-quinona en un núcleo fenantreno (ver Figura 1-2). Se pueden encontrar también de forma dimérica [7].



Antraquinona

3



Fenantraquinona

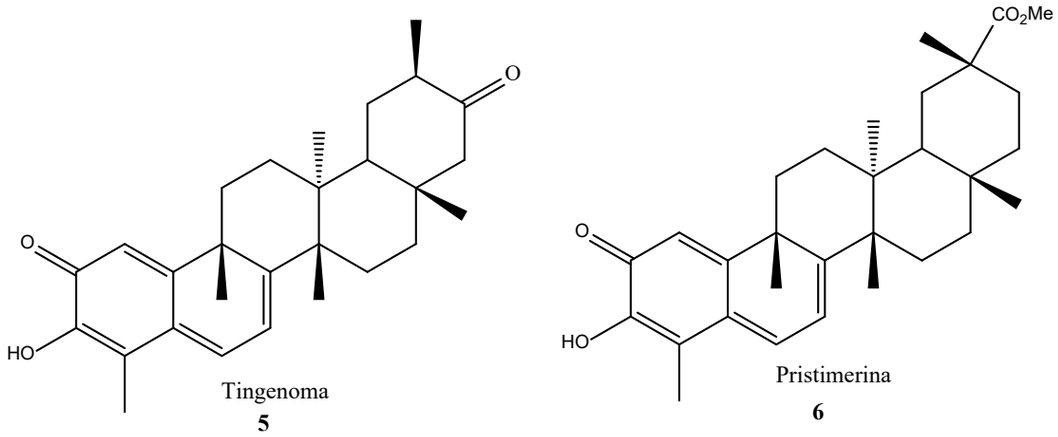
4

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-2. Antraquinona y fenantraquinona

1.1.3. Metilenquinonas

Se cree que son intermedios fundamentales en el mecanismo de acción de muchos fármacos anticancerígenos. Las metilenquinonas triterpénicas (ver Figura 1-3), presentes en plantas de la Familia de las *Celastraceae*, son agentes citotóxicos efectivos [11,12, 13].



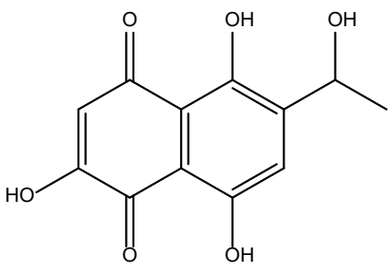
Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-3. Metilenquinonas triterpénicas

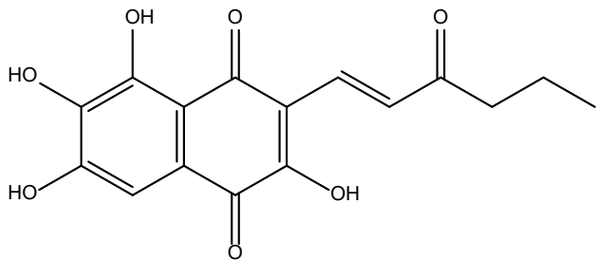
1.1.4. Naftoquinonas

Las naftoquinonas son pigmentos naturales cuyo color va desde el amarillo, pasando por el anaranjado, al rojo intenso y que tienen como característica estructural poseer dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 y con menor frecuencia en 1,2 del anillo naftalénico, de donde deriva su nombre común. En la naturaleza se presentan con grupos hidroxilos y/o metilo como sustituyentes (ver Tabla 1-1), además de encontrarse en forma libre o condensada con diversos monosacáridos. La distribución de las naftoquinonas es amplia, ya que se han aislado de plantas, hongos, bacterias, e inclusive de animales. Sin embargo, se encuentran en mayor proporción en plantas superiores de determinadas Familias de Angiospermas como: *Ebenacea, Droseraceae, Bignoniaceae, Verbenaceae, Plumbaginaceae, Juglandaceae, Boraginaceae,* etc.

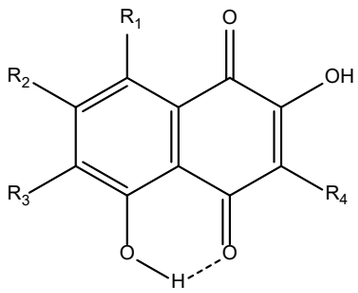
Antiguamente compuestos de naftoquinonas eran empleados en industrias de pigmentos por sus propiedades colorantes, pero en la actualidad se ha dado gran énfasis a este tipo de compuestos porque han demostrado tener importantes actividades biológicas, por ejemplo, la cribariona B **7** y lindbladiona **8** (Figura 1-4) aisladas de las especies *Cribaria cancellata* y *Lindbladia tubulina* son naftoquinonas polihidroxiladas que muestran una promisoria actividad antifúngica [14,15]. Otros derivados polihidroxilados son los llamados equinocromos (**9, 10, 11, 12 y 13**) encontrados en las espinas y caparazones de los erizos de mar [16,17]



Cribariona B
7



Lindbladiona
8

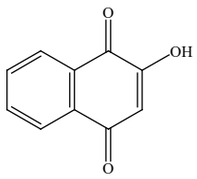
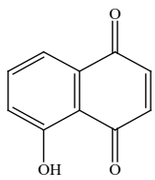
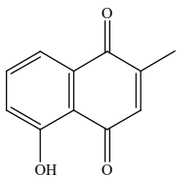
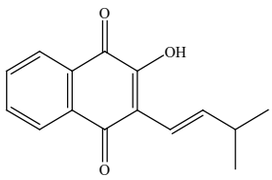
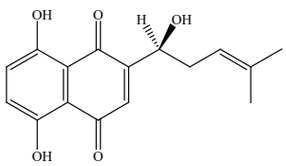
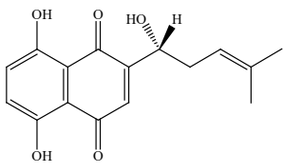


9	$R_1=R_2=OH$	$R_3=H$	$R_4=COCH_2$	Equinocromo A
10	$R_1=R_3=H$	$R_2=R_4=OH$		Equinocromo B
11	$R_1=R_2=R_3=OH$	$R_4=COCH_2$		Equinocromo C
12	$R_1=R_2=R_4=OH$	$R_3=H$		Equinocromo D
13	$R_1=R_2=R_3=R_4=OH$			Equinocromo E

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-4. Naftoquinonas naturales polihidroxiladas

Tabla 1-1. Naftoquinonas naturales

NAFTOQUINONAS NATURALES	OBTENCIÓN	PROPIEDADES
LAWSONA 	De las hojas y tallos de la Henna (*Lausonia inermis L., lythraceae.*)	Colorante de cabello y lanas
JUGLONA 	De las hojas y cáscara del fruto del nogal (*Juglans regia L., juglandaceae*) .	De uso común en la tinción de madera y como protector ante organismos saprófitos.
PLUMBAGINA 	De las hojas, corteza y raíces de especies de géneros como Plumbago (*Plumbaginaceae*), Drosera (*Droseraceae*) y Diospyros (*Ebenaceae*)	Tratamiento de dolores reumáticos, antiespasmódica y anticancerígena.
LAPACHOL 	En la corteza y la madera de plantas de los Géneros *Tabebuia spp*. y *Tecoma spp.*	Presenta actividades antibacterianas, antifúngicas, antimaláricas y antitumorales.
ALKALINA 	De la raíz desecada de Ancusa (*Alkanna tinctoria, Boraginaceae*)	Posee propiedades colorantes para la detección histoquímica de aceites y grasas.
SHIKONA 	Semillas del mijo (*Lithospermum officinae*)	Antinflamatorio para el tratamiento de úlceras, heridas y quemaduras.

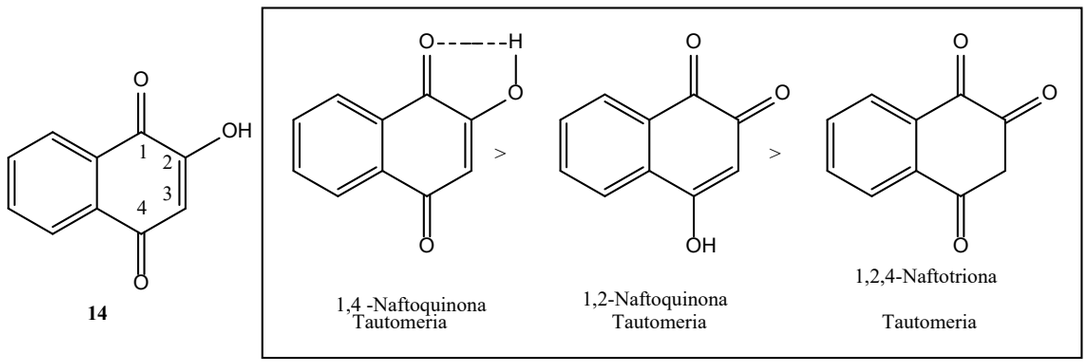
Fuente: Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. Revista Mexicana de Cs Farmacéuticas [28]

Un interesante derivado de naftoquinona es lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), pigmento natural que además de sus propiedades tintóreas presenta

importantes actividades biológicas. Dicho compuesto es el sustrato principal de este trabajo.

1.1.4.1. Lawsona

La estructura de lawsona **14** ha sido analizada por cristalografía de rayos X [18] y cálculos teóricos [19,20]. Todos los datos indican que entre las posibles formas tautoméricas (Figura 1-5), la estructura con los grupo 1,4 - naftoquinona es la más estable por al menos 10,3 kcal/mol (¼ de 43,0 kJ/mol) [21].

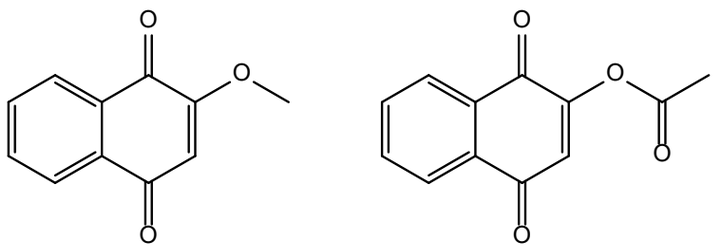


Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-5. Formas tautoméricas de lawsona

Una de sus mayores aplicaciones y en especial derivados de ésta tienen relación con su importante actividad biológica que apunta a aplicaciones en la agricultura.

Derivados como metoxi lawsona **15** y acetato de lawsona **16** (Figura 1-6) han reportado estudios indicando su reactividad química en función de sus estructuras [21, 22], por otra parte se reportaron estudios de actividad antifitopatógena contra el hongo *Botrytis cinerea* y otros hongos que atacan a vegetales [23,24].



15 **16**

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

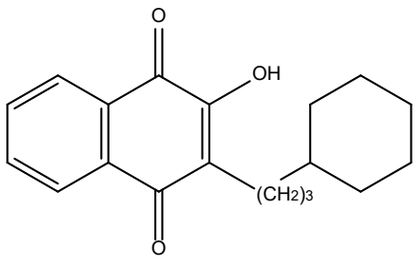
Figura 1-6. Derivados de lawsona

1.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE 1,4-NAFTOQUINONAS

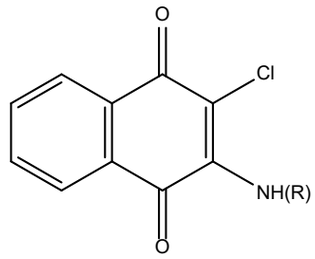
Las quinonas, incluidas las naftoquinonas son el segundo grupo de compuestos que se encuentran en etapa de investigación clínica y preclínica debido a la gran diversidad de propiedades biológicas descritas, destacando como antiparasitarias, antibacterianas, anticancerígenas y antifúngicas.

1.2.1. Actividad antiparasitaria

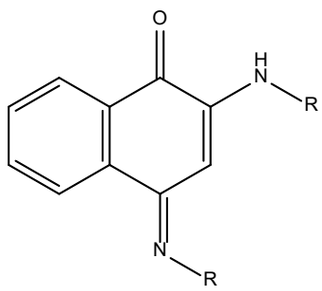
La malaria o paludismo es una de las enfermedades tropicales más importantes causada por la infección de un parásito protozoario del Género *Plasmodium*. El compuesto 2-hidroxi-3-fenil-1,4-naftoquinona **20** (Figura 1-7) se reportó por poseer actividad antimalárica cuatro veces mayor que la quinina [25]. Como resultado de esta observación, los reportes de nuevas moléculas con estructura de 1,4-naftoquinona fueron en aumento, los compuestos 2-hidroxi-3-ciclohexilpropil-1,4-naftoquinona **17**, 2-alquilamino-3-cloro-1,4-naftoquinona **18** y 2-amino-1,4-naftoquinona imina **19** son ejemplo de ello [26], estas moléculas son activas contra diversas especies de *Plasmodium.*



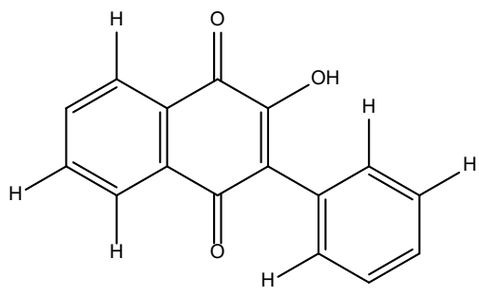
17



18



19



20

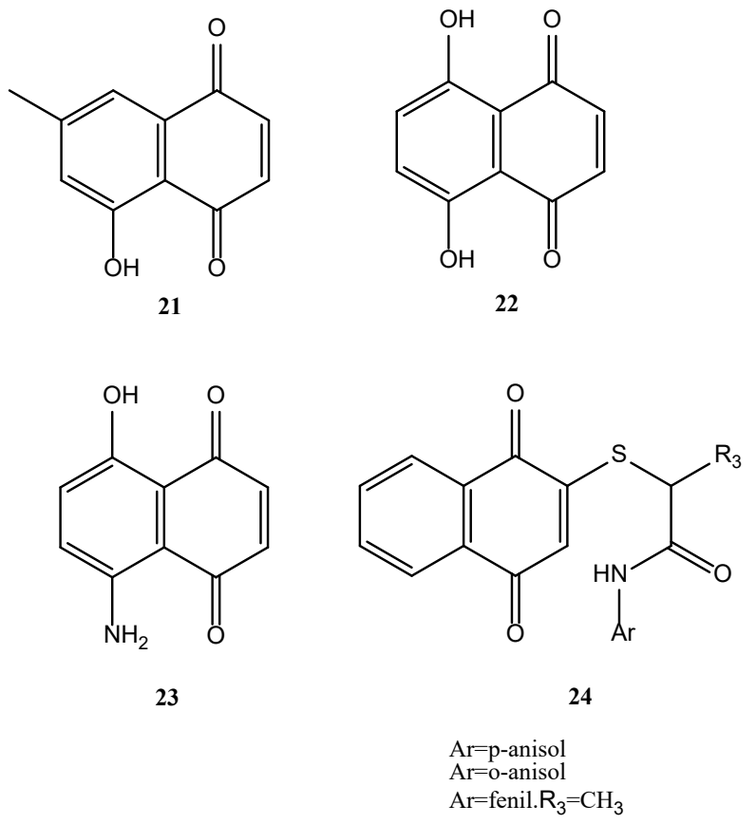
Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-7. Naftoquinonas que presentan actividades antiparasitarias

1.2.2. Actividad antibacteriana

Desde *Diospyros lycioides* se ha aislado la juglona y 7-metiljuglona **21** presentando actividad contra *Streptococcus mutans* y *S. sanguis* responsables de caries dental, y sobre *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* causantes de gingivitis.

Contra *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. epidermidis* se ha reportado la actividad de compuestos hidroxilados como la 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona **23** (Figura 1-8) con una CMI en el rango de 30 a 125 mg/mL. Diversas especies de micobacterias también muestran susceptibilidad por derivados hidroxilados como la 5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona **22** a una CMI de 6,25 mg/mL. Otros derivados azufrados de la naftoquinona con sustitución *p*-anisidilo muestran actividad contra *Streptococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* a una CMI de 6,25 mg/mL y los compuestos con sustitución *o*-anisidilo, fenilo y metilo, presentan actividad antimicrobiana a una CMI de 6,25 mg/mL para *Escherichia coli* [27].



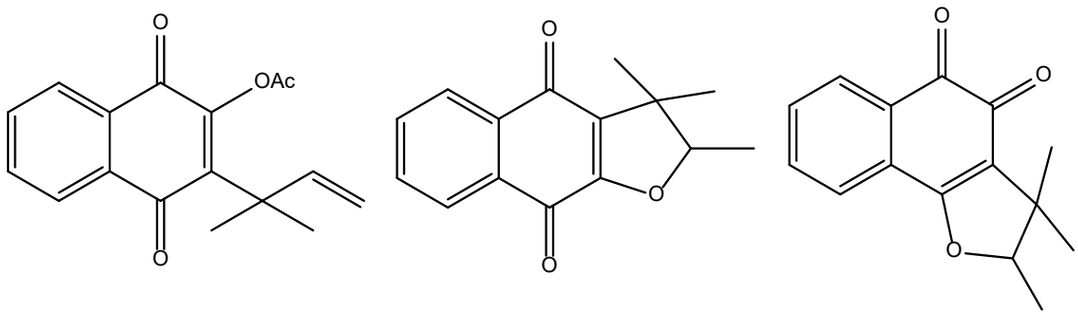
Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-8. Naftoquinonas con actividades antibacterianas

1.2.3. Actividad antifúngica

De las partes aéreas de la planta *Impatiens balsamina* se ha aislado el compuesto 2-metoxi-1,4-naftoquinona, el cual presentó actividad antifúngica contra 4 cepas de *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes* en un rango de 0,31 a 1,25 mg/mL [28]. La actividad mostrada por este compuesto es aún mayor que la actividad del fármaco antifúngico anfotericina B45.

Las naftoquinonas naturales (Figura 1-9) 2 acetoxi(1,1-dimetil alil)1,4naftoquinona **25**, α-diunona **26 y** diunona **27** extraídas de la planta *Calceolaria andina* también han demostrado tener importantes actividades antifúngicas contra cierto tipo de hongos**.**



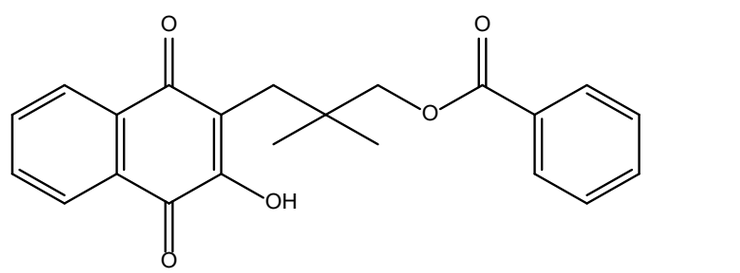
25 **26** **27**

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

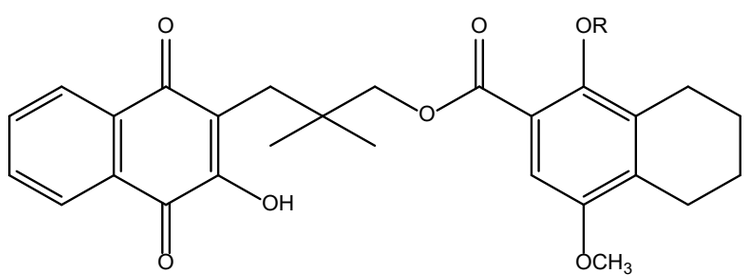
Figura 1-9. Naftoquinonas naturales

1.2.4. Actividad anticancerígena

Las naftoquinonas naturales aisladas de *Rhincanthus nasutus*, nombradas Rinacantinas -M, -N y -Q junto con otro número de C-(3)- análogos, son compuestos naturales usados en el tratamiento del cáncer. Diversos compuestos análogos muestran potente actividad anticancerígena (Figura 1-10) [29].



28



29

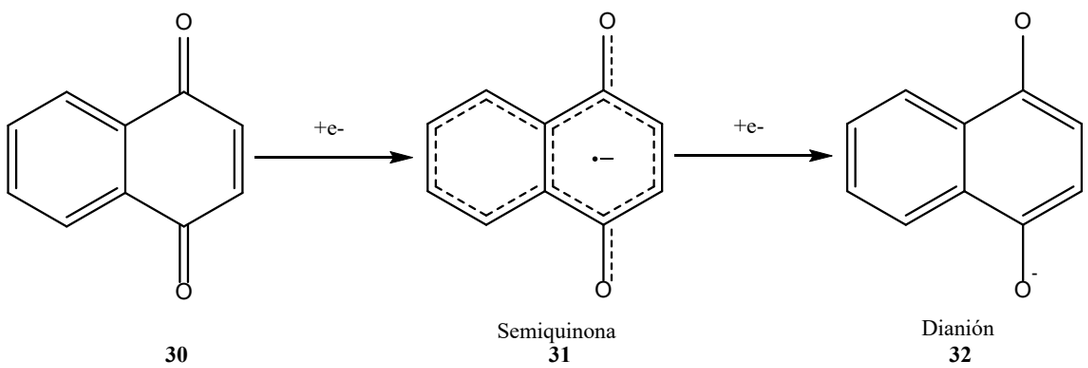
Rinacantina-N, R=H
Rinacantina-Q, R=CH_3

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-10. Naftoquinonas que presentan actividad anticancerígena

1.2.5. Mecanismo de acción de las naftoquinonas

Mucha de la actividad biológica que presentan las naftoquinonas se ha explicado con base a su capacidad de aceptar uno o dos electrones para formar su correspondiente radical anión ó dianión y a sus propiedades ácido-base (Figura 1-10). Estas propiedades dependen directamente de su estructura química y de la naturaleza electrónica de los grupos que sustituyen el núcleo naftoquinona [21, 30]. En general, se ha descrito que su toxicidad es ocasionada por dos mecanismos principales: generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), o mediante la formación de aductos con macromoléculas tales como el ADN y proteínas [31, 32, 33].



Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-11. Formación de Semiquinona y Dianión

Bajo condiciones fisiológicas las naftoquinonas pueden experimentar una reducción no enzimática por ganancia de un electrón generando la semiquinona, que es una especie de moderada toxicidad, mediante la transferencia electrónica de un radical apropiado [34]. La formación de la semiquinona también puede llevarse a cabo enzimáticamente, usualmente por una reacción de reducción mediada por flavoenzimas. La reducción de la naftoquinona puede seguir un mecanismo de un electrón, en donde participan la NADPH-citocromo P450 reductasa, NADH deshidrogenasa y la NADP ferredoxina reductasa, y por un mecanismo mixto de reducción por uno y dos electrones, con participación de las enzimas NAD(P)H deshidrogenasa (ó DT-Diaforasa) y la lipoamida deshidrogenasa. Bajo condiciones aeróbicas, los radicales semiquinona pueden auto-oxidarse para regenerar la quinona con la subsecuente formación de aniones superóxido generando peróxido de hidrógeno. Tanto las especies radicales activas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno resultan particularmente tóxicos para la célula

[35], alterando en última instancia procesos celulares básicos como la biosíntesis de ácidos nucleicos y los mecanismos responsables de la biosíntesis de energía en forma de ATP. Las naftoquinonas naturales y sintéticas muestran su actividad antiprotozoaria por la generación de especies reactivas de oxígeno causando la peroxidación de lípidos y la alteración en el transporte electrónico con inhibición de la respiración celular [36]. Se tienen reportes de que la interacción de las naftoquinonas con proteínas estructurales y enzimáticas, afectan vías y procesos metabólicos determinantes en la funcionalidad celular. Así, derivados de la 2-metil-1,4-naftoquinona actúan como inhibidores de la carboxilasa dependiente de la vitamina K, afectando la conversión de los residuos glutarilo de proteínas precursoras a residuos g-carboxiglutarilo [37]. Otros mecanismos de acción relacionados con la toxicidad de las naftoquinonas y sus derivados, son con base a los sustituyentes del anillo farmacóforo de la 1,4-naftoquinona, interaccionando con la membrana celular microbiana, en función de la lipofília de los sustituyentes, ó bien con ácidos nucleicos mediante la intercalación de su parte 1,4-naftoquinona entre los pares de bases de la doble hélice del ADN, con la consecuente inhibición en la replicación y trascripción, ambos procesos involucrados en funciones determinantes en la viabilidad celular tales como la división y expresión de genes.

1.3. SÍNTESIS ORGÁNICA

La síntesis orgánica es un área de la química que ha alcanzado notables avances en el desarrollo de métodos para producir comercialmente sustancias de origen natural usadas en amplios campos de la medicina, agricultura, en la vida cotidiana e industrial, por lo cual muchas compañías de fármacos, detergentes, polímeros, fertilizantes, pesticidas y cosméticos, dependen fundamentalmente de la síntesis orgánica para su desarrollo.

Hoy en día los científicos de otras disciplinas como la biología, bioquímica, física o la ciencia de los materiales, necesitan de la cooperación interdisciplinaria con especialistas en síntesis orgánica para sus investigaciones.

La síntesis representa un aspecto de gran importancia en la química y mediante ella los investigadores pueden crear moléculas con los propósitos anteriormente mencionados, por lo tanto, se define como una vía química que permite a través de reacciones específicas obtener moléculas nuevas o copiar moléculas ya existentes en la naturaleza, como los productos naturales, que constituyen claramente una fuente de estímulo para el trabajo sintético.

Este desafío al conocimiento humano no sólo ha representado la preparación de esas sustancias sino también una enorme gama de nuevos productos que no existen en la naturaleza.

Dentro de la síntesis orgánica se encuentra la derivatización, que consiste en producir modificaciones estructurales mayores o menores en moléculas de compuestos ya existentes, por medio de reacciones químicas, con el fin de cambiar alguna propiedad física, química, biológica o todas simultáneamente. Algunos ejemplos de las propiedades físicas que pueden ser modificadas son el punto de ebullición, punto de fusión, polaridad, solubilidad, densidad, etc.

En cuanto a las propiedades químicas se pueden mencionar cambios en la reactividad o inercia frente a determinados tipos de reacción. Finalmente como propiedad biológica se puede destacar el hecho de potenciar o inhibir algún tipo de actividad fisiológica, farmacológica o simplemente modificar una función orgánica ya existente o incorporando una nueva.

1.3.1. Técnicas de síntesis

Para estos efectos es necesario realizar algunos procesos, cuya metodología comprende tres etapas [38]:

- Reacción de síntesis
- Separación y purificación
- Identificación

1.3.1.1. Reacciones de síntesis

Las reacciones de síntesis orgánica son reacciones químicas que involucran al menos un compuesto orgánico como reactivo [39]. Atendiendo a la variación de la estructura de los compuestos involucrados las reacciones orgánicas suelen clasificarse en reacciones de adición, eliminación, sustitución, transposición y oxido-reducción. Para efectos de esta experiencia sólo se materializan reacciones de sustitución.

Estas consisten en procesos en los que un átomo o grupo de átomos del compuesto de partida es reemplazado por un átomo o grupo de átomos procedente del reactivo. Dependiendo de las sustancias utilizadas, es posible obtener productos de propiedades y aplicaciones muy diversas.

Mediante la introducción de distintos grupos funcionales, por sustitución de ciertos radicales, se generan compuestos específicos, en esta oportunidad éteres, ésteres y carbonatos.

1.3.1.2. Separación y purificación

Debido a que los productos obtenidos de las reacciones se encuentran con otras sustancias, es necesario extraerlos y purificarlos, mediante el empleo de cromatografía de adsorción directa en columna, una técnica ampliamente utilizada para la separación de compuestos, cuya metodología está estandarizada.

a) Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación de una mezcla de dos o más solutos basada en la distribución de los componentes de una muestra entre dos fases, una móvil (eluyente) y una estacionaria, mediante la adsorción, un fenómeno que retiene y concentra un soluto en la fase estacionaria, por su alta afinidad lo separa del resto más similar al eluyente [38,39].

En esta experiencia se utiliza una cromatografía de adsorción en fase directa, que emplea como fase estacionaria un soporte polar y como eluyente un solvente de polaridad baja de manera tal que los componentes de una mezcla eluyan de menor a mayor polaridad, lo que sumado al uso de gradientes, permiten alcanzar una buena separación. Estos gradientes determinan el aumento gradual de la polaridad, definido mediante un monitoreo del proceso de elución, por cromatografía en capa fina (CCF).

- Cromatografía en columna

Emplea un tubo de vidrio para contener la fase estacionaria. Estos contenedores llamados comúnmente columnas son de variados tamaños y diámetros y están acondicionadas con una llave de paso en su parte inferior, que permite la regulación del flujo del eluyente.

La elección de la columna obedece a la cantidad de muestra a separar y junto al eluyente dependerán, obviamente, de la naturaleza química de la mezcla y también de la fase estacionaria elegida.

- Preparación de la columna:

Colocando la columna fija en posición vertical, se instala un tapón de algodón, que retienen el material sólido (gel de sílice que actúa como fase estacionaria), permitiendo sólo el paso del líquido (eluyente).

El adsorbente (fase estacionaria) puede introducirse en seco o en forma de papilla con el eluyente, por gravedad y evitando la formación de bolsas de aire.

- Preparación de la muestra:

El procedimiento consiste en mezclar el material a separar, en la mínima cantidad de un solvente que permita la disolución completa de la muestra (analito) y además que sea volátil (normalmente diclorometano) de esta forma la mezcla muestra-solvente es sembrada en un vidrio reloj que contiene una pequeña cantidad del material adsorbente.

Alternativamente esta operación puede realizarse disolviendo la muestra dentro de un balón de destilación y posteriormente se remueve el solvente utilizando un evaporador rotatorio.

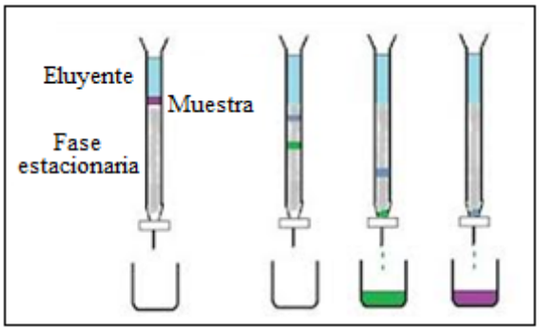
En ambos casos la mezcla se deja reposar a temperatura ambiente un tiempo determinado (por lo general ½ hora) para asegurar la máxima remoción del solvente y posteriormente la mezcla libre de solvente es depositada en la parte superior de la columna, sellando esta con un tapón de lana de vidrio o algodón.

De esta forma la columna está preparada para el proceso de separación.

La técnica de elución utilizada en este trabajo se hizo, en primer lugar con solvente puro p.a. (hexano) para compactar la columna y luego para la separación se utilizó un gradiente de polaridad, técnica que consiste en utilizar una mezcla de dos solventes que se agregan en proporciones diferentes en tal forma de aumentar la polaridad del eluyente desde un grado de menor a mayor polaridad (Figura 1-12). Por lo general se utilizan mezclas de hexano- acetato de etilo, con aumento gradual de la polaridad, que se agregan en un volumen total de 20 mL.

El volumen de las fracciones colectadas dependerá de la cantidad de muestra agregada a la columna.

Las fracciones obtenidas se concentran empleando un evaporador rotatorio



Fuente: Elaboración por medio de programa MS Paint

Figura 1-12. Elución de una columna

- Cromatografía en capa fina

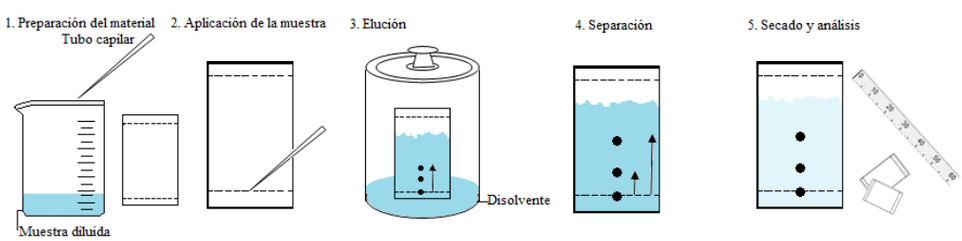
Consiste en una fina película de adsorbente (fase estacionaria) aplicada uniformemente sobre una superficie (soporte) de vidrio, plástico o aluminio (cromatoplaca).

A diferencia de la cromatografía en columna el proceso consiste en un movimiento capilar ascendente del eluyente a través de la capa adsorbente.

La muestra se aplica puntualmente en la línea base (origen) mediante un fino capilar, previamente disuelta en un solvente de rápida evaporación, cuya elección dependerá de la naturaleza química de la muestra a analizar.

El desarrollo cromatográfico se realiza dentro de una cámara (cubeta) en la cual se coloca un trozo de papel filtro impregnado en el eluyente que cubra la parte inferior de la cubeta para conseguir una atmósfera homogénea del eluyente. La cubeta se cierra.

La placa se retira una vez que el solvente alcanza la altura deseada, se seca, y se revela en cámara de revelado con un reactivo (revelador) adecuado con el fin de visualizar el proceso. Generalmente esta etapa (carbonización) requiere de temperatura que permite colorear los compuestos (Figura 1-13).



Fuente: Elaboración por medio de programa MS Paint

Figura 1-13. Proceso de cromatografía en capa fina

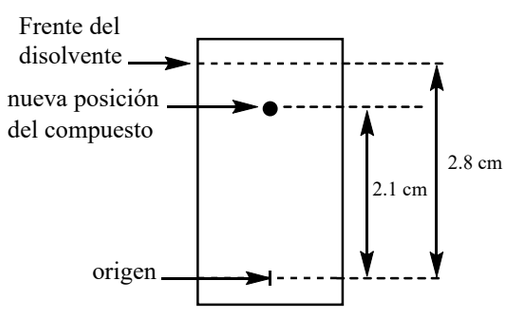
La cromatografía en capa fina (CCF) es de gran utilidad para:

- Monitorear una reacción y separación por cromatografía en columna
- Detectar compuestos conocidos mediante el uso de sustancias patrones
- Dar un diagnóstico semicuantitativo de la presencia de los componentes de la mezcla de acuerdo a la intensidad de la mancha.

La CCF es un proceso rápido, de fácil realización, que requiere de una infraestructura muy simple y además es un proceso reproducible ya que permite determinar un coeficiente denominado "Factor de Reparto" el cual bajo idénticas condiciones debe ser repetitivo para una misma sustancia proveniente de diversos orígenes (Figura 1-14).

El factor de reparto se calcula con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$



$$Rf = \frac{2.1}{2.8} = 0.75$$

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 1-14. Cromatoplaca

1.3.1.3. Identificación

Para la identificación de los compuestos puros obtenidos se emplean métodos físicos y espectroscópicos que permiten determinar estructuras de los mismos, y sus características.

a) Métodos físicos

Permiten establecer las características físicas de una sustancia, además entregan un criterio de pureza por lo que resulta importante el empleo de estas técnicas.

- Punto de fusión

El punto de fusión es una constante física importante que presentan los sólidos, por lo demás muy utilizada por los químicos orgánicos. Desde un punto de vista práctico el punto de fusión de un sólido cristalino se puede definir como la temperatura a la que el sólido se transforma en líquido a una presión dada.

Cuando una sustancia pura en estado líquido se enfría de tal modo que se evite el sub-enfriamiento, solidifica a la misma temperatura a la que la fase sólida funde; por lo tanto, en una sustancia pura el punto de fusión y el punto de solidificación son idénticos, por lo tanto se define mejor como la temperatura en la que las fases sólidas y líquidas están en equilibrio, una en presencia de la otra, a una presión determinada [40].

Después de ocurrido este suceso se podrá comprobar si la muestra es recuperable, esto será posible, a menos que se produzca una descomposición de la misma por efecto de la temperatura.

El punto de fusión constituye un valioso parámetro del grado de pureza de la muestra, el cambio de estado a una temperatura determinada es característico de la sustancia pura y se altera sensiblemente con la presencia de impurezas.

b) Métodos espectroscópicos

Debido a que cada elemento posee un espectro específico es posible identificar la presencia de ciertos grupos funcionales, sus pesos moleculares, y establecer posibles fórmulas mediante el uso de instrumentos que identifican estos espectros y permiten confirmar su estructura. Para ello se utilizan tres técnicas, IR, Espectro de masas y RMN [41].

- Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Esta técnica entrega información sobre los grupos funcionales de la molécula, con lo que se puede concluir a que familia de compuesto pertenece (alcohol, amina, ácido, etc.). Es una técnica no destructiva que permite recuperar la muestra empleada.

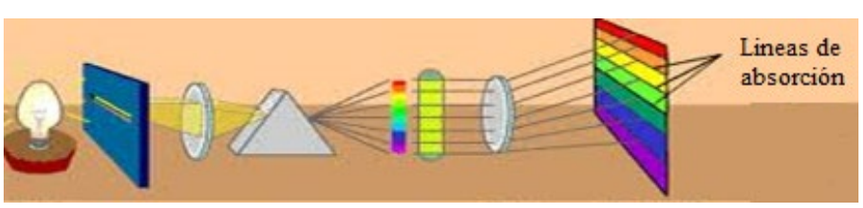
La radiación infrarroja, llamada también radiación térmica ya que la piel humana la capta como calor, es un tipo de radiación electromagnética de mayor longitud de onda que la luz visible, y aunque no tiene suficiente energía para ocasionar la excitación de los electrones, es suficiente para que los átomos y/o grupos de los compuestos orgánicos vibren alrededor de los enlaces covalentes que los unen [42].

Esas vibraciones son cuantizadas, y los compuestos absorben energía infrarroja en regiones específicas del espectro.

El nombre de infrarrojo significa por debajo del rojo y proviene precisamente de que su frecuencia está justo por debajo de la luz roja. El rojo es el color de longitud de onda más larga de la luz visible, comprendida entre 700 nanómetros y un milímetro.

La espectroscopía de infrarrojo utiliza la radiación del espectro electromagnético, cuya longitud de onda (λ) está comprendida entre los 800 y los 400000 nm (0,8 y 400 μm ,1 $\mu = 10^{-3}$ mm) (Figura 1-15) y su efecto sobre la materia orgánica, como se indicó con anterioridad, es producir deformaciones de los enlaces de la sustancia [41,42].

Debido a su gran amplitud se divide en tres zonas IR próximo , medio y lejano. Siendo el "IR medio" utilizado experimentalmente en determinación estructural (2,5 – 16 μm). Debido a consideraciones de tipo histórico la unidad más usada en la espectroscopía infrarroja no es la longitud de onda (λ) sino el número de onda (υ, $\upsilon = 1/\lambda$ cm^{-1}), correspondiendo el IR medio a la zona comprendida entre 4000 y 625 cm^{-1}.



Fuente: Elaboración por medio de programa MS Paint

Figura 1-15. Espectro de absorción

- Espectroscopía de Masas

Esta técnica consiste en fragmentar una molécula mediante un bombardeo electrónico de alta energía. Como resultado de esos bombardeos los átomos o moléculas neutras, pierden electrones formando iones de carga positiva. Por ejemplo al bombardear el vapor del etilbenceno con un haz de electrones, éste forma un ión molecular (M+) como se muestra en la reacción, el ión molécular es el ión radical y tiene el mismo peso molecular que la molécula original [43]:

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$$

$$C_6H_5CH_2CH_3 + e^- \rightarrow C_6H_5CH_2CH_3^+ + 2e^-$$

Estos iones formados son separados según su masa/carga (m/z) antes de llegar al detector, para ello los iones formados son llevados a través de los polos de un imán los cuales interaccionan con el campo magnético. Esta interacción consiste en desviar la trayectoria por la que viajan los iones, mientras más grande es la masa del ión es menor el ángulo de variación. El detector que es un ánodo recolector genera una señal que se grafica en un espectro de masa, el cual es una representación de la abundancia relativa de los iones presentes en relación masa /carga (m/z) [43].

La espectrometría de masas informa sobre:

- La elucidación de estructuras químicas con cantidad de material inferior a 1 mg.
- Indica la presencia de ciertas unidades estructurales en una molécula
- La masa molecular de los componentes estructurales de la muestra.
- El peso molecular del analito
- Fórmula molecular del analito

Un factor limitante en espectrometría de masa es que no es aplicable comúnmente a todos los compuestos, debido con frecuencia a la inestabilidad térmica que pueden presentar las moléculas. Además es un método destructivo, ya que no se puede recuperar la muestra, no así como en otros métodos, tales como IR y RMN.

- Resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN permite alinear los campos magnéticos de diferentes átomos en la dirección de un campo magnético externo. La respuesta a este campo externo depende del tipo de núcleos atómicos por lo que esta técnica puede utilizarse para obtener información sobre una muestra [44].

Se utiliza sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos).

Entre los núcleos más frecuentes en los compuestos orgánicos son magnéticamente activos el protón (^{1}H), carbono (^{13}C), nitrógeno (^{15}N), fósforo (^{31}P) y flúor (^{19}F).

Este tipo de núcleos poseen espín igual que los electrones, ya que los núcleos poseen cargas positivas y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes, por ello se dice que la RMN es una espectroscopía de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación.

La técnica de RMN es una herramienta analítica que proporciona amplia información estructural y estereoquímica en un tiempo asequible.

Esta técnica no es destructiva y tiene aplicaciones en todas las áreas de la química y en algunas de la biología.

Los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección que el campo, en un estado de mínima energía denominado espín alfa, mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín ß.

Cuando una muestra es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado espín alfa (α) son promovidos al estado de espín beta (β). Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (rf) del espectro electromagnético por eso se le denomina radiación "rf". Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre los estados de espín α y β, el espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es llamado espectro de RMN.

El término "resonancia magnética nuclear" procede del hecho que los núcleos están en resonancia con la radiación rf. Es decir, los núcleos pasan de un estado de espín a otro, como respuesta a la radiación rf a la que son sometidos.

- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear carbono ^{13}C

La RMN de carbono 13 es complementaria a la de ^{1}H. Esta última técnica se usa para deducir la estructura del esqueleto carbonado observando los entornos magnéticos de los átomos de hidrógeno, mientras que la espectroscopía de RMN de ^{13}C determina el entorno magnético de los átomos de carbono.

Aproximadamente el 99% de los átomos de carbono en una muestra natural son del isótopo ^{12}C. Este isótopo posee un número par de protones y un número par de neutrones, por tanto, no tiene espín magnético y no puede dar lugar a señales de resonancia magnética nuclear.

El isótopo de ^{13}C menos abundante tiene un número impar de neutrones, lo que confiere un espín magnético de 1/2, igual al del protón.

La RMN de ^{13}C es menos sensible que la de ^{1}H debido a que sólo el 1% de los átomos de carbono posee espín y además la frecuencia de resonancia de ^{13}C para un campo magnético dado, es la cuarta parte de la que se da en la RMN de ^{1}H.

Los desplazamientos químicos de los carbonos ofrecen una ventana espectral mayor que el hidrógeno debido a que el carbono tiene distintos estados de hibridación (sp^3, sp^2, sp). Además las señales del espectro de ^{13}C son líneas verticales, es decir no hay desdoblamiento de espín-espín entre C^{13}-C^{13}. Esto se debe a que sólo el 1% de los átomos de carbono entran en resonancia y, por tanto, existe una probabilidad muy pequeña de que un núcleo de ^{13}C esté adyacente a otro núcleo de ^{13}C [44, 45,40].

1.4. ESTUDIO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Se estima que el efecto de la presencia de patógenos en los vegetales causa una disminución de los rendimientos en los cultivos de casi el 20% de todo el mundo, lo que genera una gran demanda de fungicidas para la protección de alimentos en la agricultura.

Con el fin de hacer frente las necesidades de la población mundial, en rápido crecimiento, es imperante mejorar este rendimiento, mediante la optimización de los insumos, incluidos los fungicidas [46].

La medición de actividad inhibitoria de crecimiento de hongos filamentosos utilizando compuestos químicos en ensayos in vitro se basa en la medición del área de crecimiento radial del hongo utilizando programas computacionales que permiten medir el crecimiento y normalizar valores respecto a controles [47].

1.4.1. Hongos

Son un grupo de organismos eucariontes sin clorofila y por lo tanto heterótrofos, uni o multinucleados, de nutrición absortiva, con paredes celulares típicamente quitinosas, con meiosis dentro de un zigoto y con síntesis de lisina por la vía del ácido amino adípico [48].

La mayoría de los hongos conocidos vive sobre materia orgánica muerta y por ende su principal rol ecológico es la degradación o descomposición de estos sustratos, reciclando y retornando a los suelos o en otros ambientes, los nutrientes básicos. Sin embargo, más de 8000 especies son perjudiciales al parasitar gran cantidad de vegetales, muchos de ellos útiles en la alimentación humana [48].

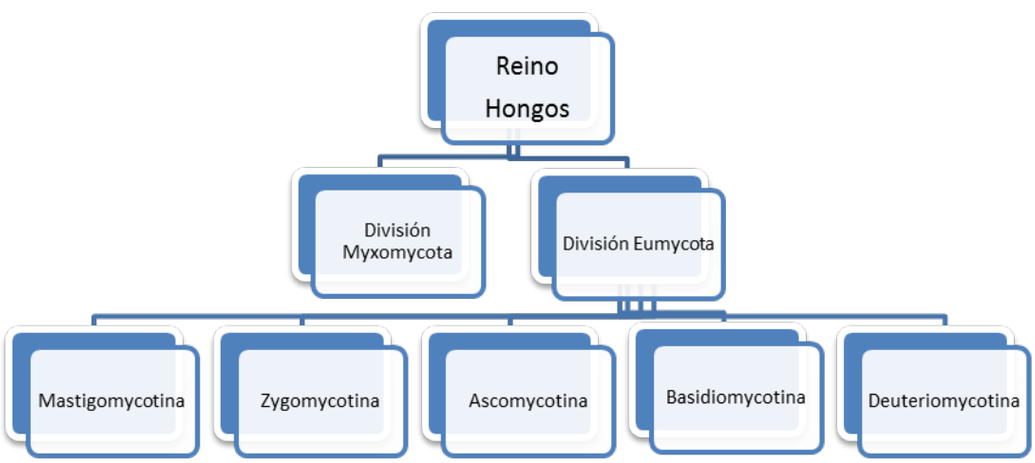
1.4.1.1. Morfología y estructuras vegetativas

El talo o micelio fúngico es la porción vegetativa de un hongo que consiste en un conjunto de organismos unicelulares (levaduras) o generalmente filamentosos multinucleados, que presentan una considerable especialización de estructuras, correspondientes a una especialización de funciones. Ambas formas pueden causar micosis superficiales o sistémicas en el hombre o en los animales.

En los hongos filamentos la fase vegetativa está constituida por un conjunto de filamentos llamados hifas que miden aproximadamente entre 3-12 µm de diámetro, hasta varios centímetros de largo en dependencia del grupo taxonómico al que pertenecen. Las hifas presentan numerosas ramas laterales que crecen por elongación apical de sus ápices y el conjunto de hifas constituye el micelio o talo [48].

1.4.1.2. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de los hongos se puede resumir de acuerdo con la siguiente categorización (Figura 1-16).



Fuente: Introducción al estudio de los microhongos. Cátedra de Micología [48]

Figura 1-16. Clasificación de los Hongos

Según el modelo de Ainsworth de 1973 el Reino de los hongos, se divide en dos divisiones, una división Myxomycota (con plásmido presente) y una Eumycota (con plásmido ausente: típica y frecuentemente filamentoso).

La división Eumycota tiene 5 Subdivisiones [48]:

- Mastigomycotina: células móviles (zoosporas) presentes, esporas sexuales (oosporas) presentes.
- Zygomycotina: esporas sexuales, Zigosporas.
- Ascomycotina: esporas sexuales, Ascosporas.
- Basidiomycotina: esporas sexuales, Basidiosporas.
- Deuteromycotina (Hongos imperfectos): esporas sexuales generalmente ausentes, reproducción principalmente por conidios.

Cada subdivisión se divide posteriormente en Clase, Orden, Familia, Género y especie.

1.4.2. Ascomycotina

El nombre específico del taxón deriva de sus estructuras reproductivas "los ascos" que contienen las ascoesporas como resultado de una cariogamia y meiosis.

Entre sus características más apreciables destacan la producción de micelio septado y por ende un crecimiento más lento. Los hongos incluidos en esta subdivisión son llamados comúnmente "Ascomicetes", término que engloba a otras denominaciones taxonómicas o morfológicas (ascolíquenes, ascomycota, ascomycoptera, etc…).

En la actualidad se han descrito más de 6000 Géneros y unas 30000 especies aproximadamente, la mayoría soprofitas, pero también parásitas de vegetales.

Dentro de estas se encuentran las dos especies de interés en este estudio *Botrytis cinerea* y *Gibberella fujikuroi.*

1.4.2.1. *Botrytis cinerea* Pers.

a) Clasificación taxonómica

Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Leotiomycetes
Orden: Heliotiales
Familia: Sclerotiniaceae
Género: *Botryotinia*

Especie: *Botryotinia fuckeliana*

Estado: *Botryotinia fuckeliana* (Teleomorfo) *Botrytis cinerea* (Anamorfo)

b) Características Morfológicas

El micelio está constituido por un conjunto de hifas tabicadas, cilíndricas que se multiplican vegetativamente mediante división citoplasmática. Características morfológicas como la coloración y el diámetro de las hifas, son muy variables, dependiendo en gran medida de las condiciones de desarrollo del micelio [50].

El micelio cumple una doble función: i) como estructura de propagación de la enfermedad, causada ésta por la dispersión de restos vegetales (tallos y hojas) infectados por el micelio y, ii) como estructura de resistencia.

A partir del micelio, generalmente envejecido, se originan diversas estructuras, como son los conidióforos, los microconidióforos y los esclerocios, cuya finalidad es la propagación y supervivencia ante condiciones adversas [50].

c) Sintomatología

En vid, ataca principalmente al racimo, aunque puede presentarse en cualquier parte verde. Puede destruir las inflorescencias antes de la floración o cubrir los frutos con una esporulación conídica gris característica. En ocasiones produce necrosis y muerte de las partes herbáceas. En el resto de especies, infecta a las plantas a partir de heridas o tejidos colonizados. Causa muerte de plántulas en pre o post brotación. Desarrolla lesiones pardas que se extienden por el tallo y las hojas. En flores produce manchas y marchiteces. En los frutos causa una podredumbre blanda que se extiende con rapidez. También afecta a los productos hortícolas almacenados.

Botrytis cinerea es un hongo que ataca a muchas especies de plantas, especialmente la vid, afectando drásticamente la producción del mercado vitivinícola, constituyéndose como el principal problema de protección vegetal en Chile, afectando la uva de vino y de mesa. Este hongo necrotrófico que produce la enfermedad conocida como pudrición gris (Figura 1-17), es considerado un patógeno con un amplio rango de hospederos que causa lesiones necróticas en distintos tejidos vegetales [50, 51, 52].

Fuente: Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Memoria Doctoral [50]

Figura 1-17. *Botrytis cinerea* desarrollado sobre una frutilla.

1.4.2.2. *Gibberella fujikuroi*

a) Clasificación taxonómica

Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Sordariomycetes
Orden: Hypocreales
Familia: Nectriaceae
Género: *Gibberella*
Especie: *Gibberella fujikuroi*
Estado: *Gibberella fujikuroi* (Teleomorfo)

b) Características Morfológicas

Microconidios en cadenas persistentes o unidos en cabezuelas falsas, con el tiempo se esparcen sobre el micelio aéreo amarillo brillante a rosa claro, como un polvillo transparente brillante, uni-o bicelulares, fusiformes, oviformes. Macroconidios delicados, en forma de lezna o punzón, ligeramente en forma de media luna o casi rectos, puntiagudos en ambos extremos, frecuentemente constreñidos en el ápice y algunas veces en forma de gancho, con célula basal verdadera o aparente, esparcidos o agrupados en esporodoquios o pionotes, brillantes en masa, de color isabelino o salmón al deshidratarse, rojo-ladrillo a café canela o pálidos, con 3 a 5, excepcionalmente 6 a 7 septas [53].

c) Sintomatología

Ataca al pie de la planta y las raíces cuando actúa como anamorfo. Como teleomorfo, produce cantidades de ácido giberélico, ocasionando la enfermedad de la "bakanae del arroz". Es también un contaminante de alimentos almacenados.

Gibberella fujirukoi es un hongo filamentoso que no causa lesiones necróticas en vegetales (Figura 1-18). Este hongo causa la enfermedad llamada "bakanae" en arroz y otras gramíneas y se caracteriza por el crecimiento desmesurado de la planta, disminuyendo el tamaño y calidad del fruto, producto de la producción excesiva de hormona de crecimiento vegetal Giberelina GA3 [53,54, 55].

Fuente: DGSSV-CNRF. Fusarium moniliforme .Ficha Técnica México [52]

Figura 1-18. Imagen de *Gibberella fujirukoi.*

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. EQUIPOS Y MATERIALES

2.1.1. Equipos

- Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400
- Balanza analítica SARTORIUS modelo 2462
- Espectrómetro de THERMO SCIENTIFIC modelo FT IR 6700
- Espectrómetro de masas HEWLETT PACKARD modelo 6890 con detector de masas modelo 5973
- Evaporador rotatorio BUCHI modelo RE-120
- Estufa eléctrica MEMMERT modelo 120-44
- Aparato punto de fusión STUART SCIENTIFIC modelo SMP3
- Plancha calefactora KOFFER
- Equipo de Autoclave HUXLEY modelo HL-341

2.1.2. Materiales

- Atomizador, para el revelado de cromatoplacas
- Balones de vidrio con boca esmerilada de distintos volúmenes
- Cámara de vidrio para elución
- Cromatoplacas de gel de sílica F254 MERCK
- Columnas de vidrio de diferentes tamaños y diámetro
- Capilares de vidrio
- Placas plásticas 12 pocillos Orange
- Material usual de laboratorio
- Micro pipetas
- Placas petri estériles para cultivo
- Asas para siembra
- Campana de extracción de gases
- Secador eléctrico DE LONGHI modelo MR-1
- Cámara Fotográfica SONY

2.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

2.2.1. Reactivos

- Sílica gel para cromatografía en columna (0,040-0,063 mm), MERCK
- Nafta técnica SHELL (purificado por destilación entre 60° y 80 °C)
- Acetato de etilo técnico QUIMICA PASSOL (purificado por destilación a 77 °C)
- Diclorometano técnico QUIMICA PASSOL (purificado por destilación a 40 °C)
- Metanol, 99% pureza, procedencia nacional
- Acetona, p.a., 99,9%, 0,79 g/mL, MERCK
- Ácido sulfúrico concentrado p.a., FLUKA
- Ácido clorhídrico p.a.,37%,1,19 g/mL, MERCK
- Bicarbonato de sodio p.a., MERCK
- Anhídrido acético 97% , 1,08 g/mL, BDH
- Solución de diazometano
- Anhídrido metacrílico, 1,042 g/mL, MERCK
- Cloruro de benzoílo,1,212 g/mL, BDH
- Cloroformiato de etilo, 1,14 g/mL, MERCK
- Cloroacetato de isopropilo g/mL, MERCK
- 2-Hidroxi-1,4 naftoquinona 97%,SIGMA-ALDRICH
- Éter etílico p.a., 99%, WINKLER
- Isopropil-cloro-acetato, 1,05 g/mL, MERCK
- Sulfato de sodio anhidro p.a., FLUKA-GARANTIE
- Carbonato de potasio, MERCK
- 4-N,N-dimetil amino piridina (DMAP), MERCK
- Piridina , 0,9819 g/cm^3, SIGMA-ALDRICH
- Cloroformo deurerado (para determinaciones por RMN)
- Anti fúngico comercial captan©
- Etanol técnico 95% para desinfectar

2.2.2. Soluciones

- Solución reveladora de H_2SO_4 25% v/v
- Solución HCl 5% v/v
- Solución $KHSO_4$ 10% p/v

2.2.3. Preparación de soluciones

- Solución reveladora de H_2SO_4 25% v/v: Tomar 25 mL de ácido sulfúrico concentrado y verter sobre agua destilada. Aforar a 100 mL con agua destilada.
- Solución HCl 5% v/v: Tomar 5 mL de ácido clorhídrico concentrado y verter sobre agua destilada. Aforar a 100 mL con agua destilada.
- Solución $KHSO_4$ 10% p/v: Tomar 10 g de $KHSO_4$ y aforar a 100 mL con agua destilada.

2.2.4. Cepa de Microorganismos

La cepa del hongo *Gibberella fujikuroi* fue cedida por el Dr. B.M Fraga. CSIC, España. Fue cultivada en un medio sólido PDA y medio líquido a 26°C con luz constante.

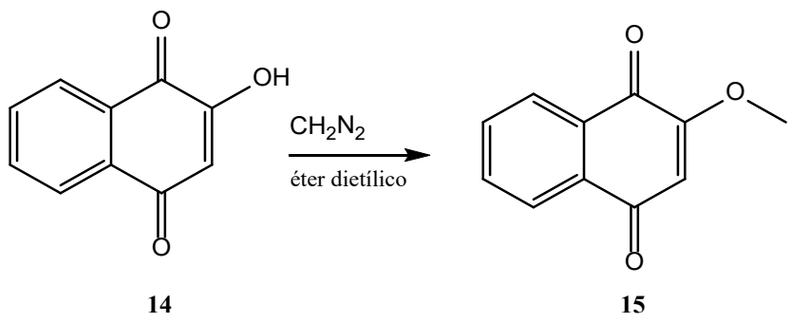
Botrytis cinerea fue obtenido a partir de un "screening" de campo realizado por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) La Platina y cedido por el Dr. H. Peña (Centro de Biotecnología, UTFSM). El hongo fue cultivado en medio sólido PDA en cámara acondicionada a temperatura ambiente (23°C) por 4-5 días para su uso en pruebas de actividad.

2.2.5. Medios de cultivo

- Medio Sólido PDA (*Giberella fujikuroi*)
- Extracto de papa (4g/L), glucosa (20g/L) y agar (15g/L) (*Botrytis cinerea*)

2.3. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 2-HIDROXI-1,4-NAFTOQUINONA

2.3.1. Síntesis de 2-metoxinaftalen-1,4-diona (**15**)



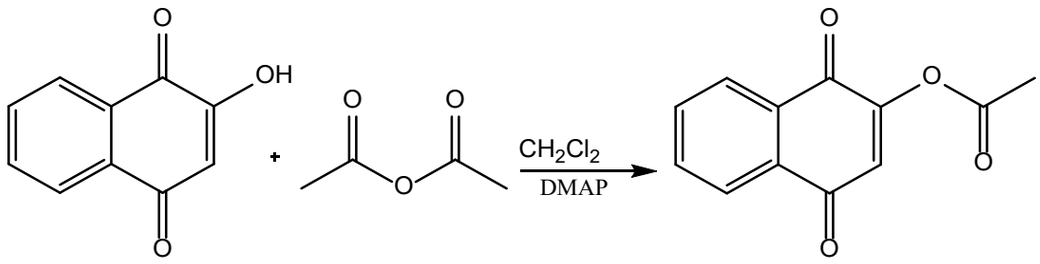
Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 2.1. Obtención de 2-metoxinaftalen-1,4-diona **(15)**

Se preparó una solución de lawsona 0,250 g (1,44 mmol) en 40 mL de éter dietílico. Lentamente y con agitación se agregó 23 mL de una solución etérea de diazometano. Después de la adición, la mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente por un período de 2 horas. Durante la reacción fue observada la formación de un precipitado el cual fue filtrado obteniéndose 0,1429 g (52,9%) de un sólido de color amarillo.

Compuesto **15**: sólido amarillo, Rf: 0,85 (30% acetato de etilo/hexano), punto de fusión: 184,2 °C. **IR** (cm^{-1}): 3050; 1682; 1648; 1605; 1446; 1337; 1266; 1244; 1216; 1194; 1158; 1046; 1024; 925; 867; 781; 724. **^{1}H-RMN**: 8, 13 (dd, J = 8.0 ; J = 2.0Hz; 2H, H-8, H-5); 7,74 (m, 2H, H-6, H-7); 6,18 (s, 1H, H-3); 3,91 (s, 3H, OCH_3). **^{13}C-RMN**: 184,8 (C-4), 180,1 (C-1), 160,4 (C-2), 134,3 (C-6, C-7), 133,3 (C-7, C-6), 132,0 (C-10), 131,1 (C-9), 126,7(C-8), 126,2 (C-5), 109,9(C-3), 56,4 (CH_3O). **E.M**. (m/z, %): [M+H]+ 189,0550 (64,8); 175,0389 (64,3); 161,0594 (100).

2.3.2. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il acetato (**16**)



14 **33** **16**

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

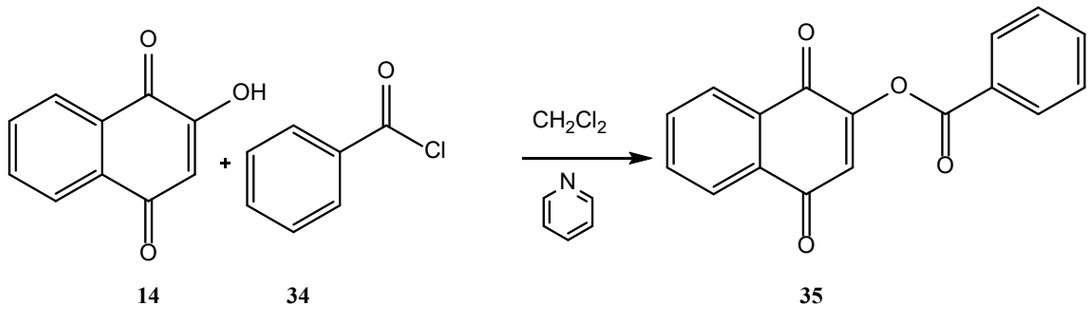
Figura 2.2. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il acetato **(16)**

En un balón se preparó una solución de lawsona 0,244g (1,4 mmol) en 40 mL de diclorometano. Lentamente y con agitación se agregó 1 mL (10,6 mmol) de anhídrido acético y 10 mg de DMAP (0,08 mmol). Después de la adición, la mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente por un período de 30 minutos. El avance y término de la reacción fue monitoreada por CCF 30 % (acetato de etilo/hexano).

Finalizada la reacción el solvente fue removido por destilación en rotavapor. El crudo fue soportado en gel de sílice y luego purificado por cromatografía en columna, eluido con mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo en gradiente de polaridad (19,8: 0,2→15: 5). Se obtuvo 0,2701 g (89,2%) de un sólido cristalino de color amarillo.

Compuesto **16**: sólido amarillo, Rf: 0,87 (30% acetato de etilo/hexano), punto de fusión: 136,5°C. **IR** (cm^{-1}): 3101; 3066; 3039; 1762; 1679; 1664; 1641; 1593; 1379; 1353; 1326; 1306; 1264; 1200; 1171; 1151; 1111; 1076; 1018; 970; 926; 909; 870; 783; 744; 711; 660. **^{1}H-RMN**: 8,11 (m, 2H, H-5, H-8); 7,77 (m, 2H, H-6, H-7); 6,76 (s, 1H, H-3); 2,39 (s, 3H, CH_3COO). **^{13}C-RMN**: 184,5 (C-4), 178,6 (C-1), 167,7 (COOCH$_3$), 154,3 (C-2), 134,4 (C-7 o C-6), 134,0 (C-7 o C-6), 131,9 (C-10), 131,0 (C-9), 127,0 (C-8 o C-5), 126,5 (C-8 o C-5), 126,0 (C-3), 20,6 (COOCH$_3$). **E.M**. (m/z, %): $[M+Na]^+$ 239,03100 (70,5), $[M-H+]^-$ 215,03401 (0,22), 173,0238 (100).

2.3.3. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il benzoato (**35**)



Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

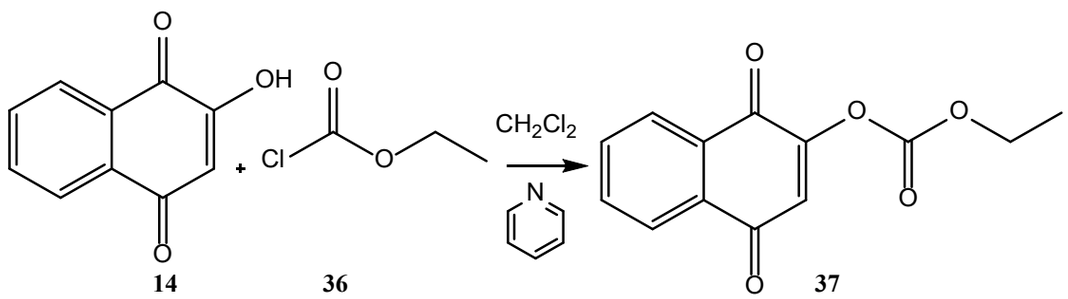
Figura 2-3. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il benzoato (**35**)

Se preparó una solución de lawsona 0,259g (1,49 mmol) en 40 mL de diclorometano. Lentamente y con agitación se agregó 1 mL de una solución de cloruro de benzoílo (8,0 mmol) y 1 mL de piridina (12,41 mmol). Después de la adición, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y con agitación por un período de 2 horas. El avance y término de la reacción fue monitoreada por CCF 30 % (acetato de etilo/hexano). Finalizada la reacción se agregó 20 g de hielo picado. El solvente orgánico fue removido por destilación en rotavapor y el residuo fue extraído con acetato de etilo (3 x 50 mL). La fase orgánica fue lavada con 25 mL de solución acuosa de $KHSO_4$ 10% $^{p}/_{v}$, luego con 25 mL de solución de $NaHCO_3$ saturada y finalmente con agua (3x50 mL) hasta pH neutro, posteriormente esta fase fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro y filtrado en un balón de fondo redondo, el solvente fue removido por destilación en rotavapor. El crudo resultante se soportó en sílica gel y luego fue purificado por cromatografía en columna, eluido con mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo en gradiente de polaridad (19,8: 0,2→15: 5). Se obtuvo 0,2613 g (63,1%) de un sólido de color amarillo.

Compuesto **35**: sólido amarillo, Rf: 0,85 (20% acetato de etilo/hexano), punto de fusión: 120,8°C. IR (cm^{-1}): 3064; 1739; 1677; 1663; 1631; 1594; 1454; 1346; 1300; 1238; 1176; 1115; 1070; 1045, 1017; 960; 913; 779; 732; 700. **^{1}H-RMN**: 8,18 (d, *J* = 7,6 Hz; 2H, H-3', H-7'); 8,14 (m, 2H, H-5, H-8); 7,79 (m, 2H, H-6, H-7); 7,68 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, H-5'); 7,54 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, H-4', H-6'); 6,94 (s, 1H, H-3). **^{13}C-RMN**: 184,6 (C-4), 178,6 (C-1), 163,6 (C-1'), 154,6 (C-2), 134,4 (C-7,C-6), 134,0 (C-5'), 132,0 (C-10), 131,1(C-9), 130,6 (C-3', C-7'), 128,8(C-4', C-6'), 127,8 (C-2'); 127,0 (C-8, C-

5); 126,5 (C-8, C-5); 126,2 (C-3). **E.M**. (m/z, %): $[M+Na]^+$ 301,0468 (35,4), 269,0429 (100), 175,0395 (52,1).

2.3.4. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il etil carbonato (**37**)



Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

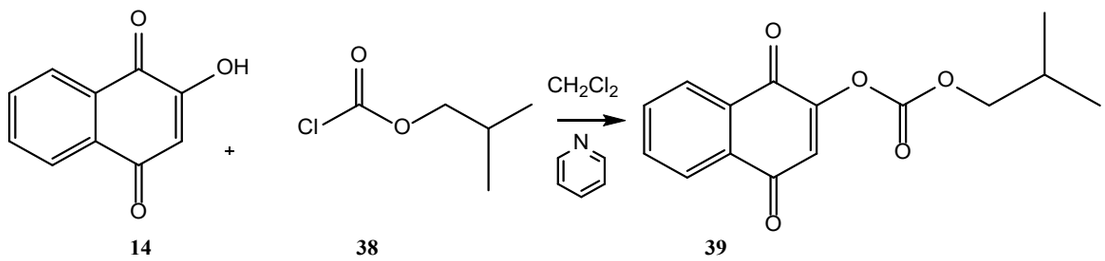
Figura 2.4. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il etil carbonato (**37**)

Se preparó una solución de lawsona 0,2500 g (1,44 mmol) en 40 mL de diclorometano. Lentamente y con agitación se agregó 1,4 mL de cloroformiato de etilo (17,7 mmol) y 1 mL de piridina (12,41 mmol). Después de la adición, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y con agitación por un período de 2 horas. El avance y término de la reacción fue monitoreada por CCF 30 % (acetato etilo/hexano). Finalizada la reacción se agregó 20 g de hielo picado. El solvente orgánico fue removido por destilación en rotavapor y el residuo fue extraído con acetato de etilo (3x50 mL); la fase orgánica fue lavada con 25 mL de solución acuosa de $KHSO_4$ 10% p/v, luego con 20 mL de solución de $NaHCO_3$ saturada y finalmente con agua (3x50 mL) hasta pH neutro. La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro, posteriormente filtrada en un balón de fondo redondo, el solvente fue removido por destilación en rotavapor. El crudo resultante se soportó en gel de sílice y luego fue purificado por cromatografía en columna, eluido con mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo en gradiente de polaridad (19,8: 0,2→16: 4). Se obtuvo 0,1743 g (49,3%) de un sólido de color amarillo.

Compuesto **37**: sólido amarillo, Rf: 0,89 (30% acetato de etilo/hexano), punto de fusión: 74,6°C. **IR** (cm^{-1}): 3076; 2987; 2926; 1775; 1682; 1663; 1642; 1593; 1474; 1446; 1368; 1355; 1302; 1246; 1216; 1188; 1163; 1114; 1076; 990; 954; 777; 742; 694; 656. **^{1}H-RMN**: 8,11 (m, 2H, H-5, H-8); 7,78 (m, 2H, H-6, H-7); 6,83 (s, 1H, H-3); 4,37 (c, J = 7,1 Hz, 2H, H-2'); 1,41 (t, J = 7,1 Hz, 3H, H-3'). **^{13}C-RMN**: 184,6 (C-4), 178,6 (C-1), 153,5 (C-2), 151,3 (C-1'), 134,1 (C-7 o C-6), 134,5 (C-7 o C-6), 131,9 (C-10),

131,0 (C-9), 127,0 (C-5 o C-8), 126,5 (C-5 o C-8), 124,9 (C-3); 66,1 (C-2'); 14,0 (C-3'). **E.M**. (m/z, %): $[M+Na]^+$ 269,0427 (100), 175,0385 (78).

2.3.5. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il isobutil carbonato (**39**)



Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

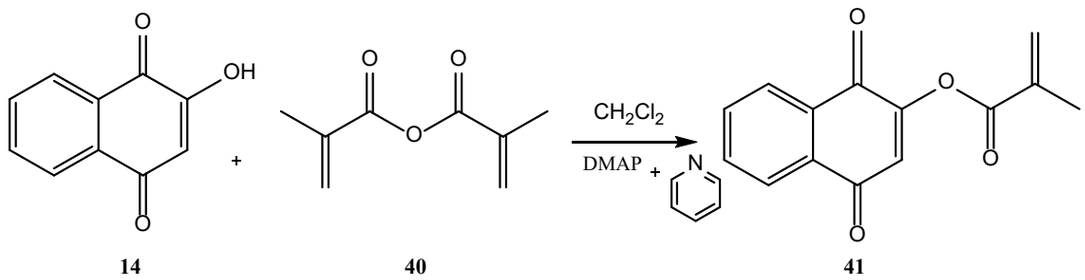
Figura 2.5. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il isobutil carbonato (**39**)

Se preparó una solución de lawsona 0,2815 g (1,62 mmol) en 40 mL de diclorometano. Lentamente y con agitación se agregó 0,21 mL (1,62 mmol) de cloroacetato de isopropilo y 1 mL de piridina (12,41 mmol). La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente por un período de 150 minutos. El avance y término de la reacción fue monitoreada por CCF 40 % (acetato de etilo/hexano). El solvente fue removido por destilación en rotavapor y el residuo fue extraído con acetato de etilo (3x50 mL). La fase orgánica fue lavada con 25 mL de solución acuosa de $KHSO_4$ 10% p/v, luego con 20 mL de solución de $NaHCO_3$ saturada y finalmente con agua (3x50 mL) hasta pH neutro. El extracto orgánico fue secado sobre Na_2SO_4 anhidro y filtrado en un balón de fondo redondo, el solvente fue removido por destilación en rotavapor. El crudo resultante se soportó en gel de sílice y posteriormente fue purificado por cromatografía en columna, eluido con mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo en gradiente de polaridad (19,8: 0,2→16: 4). Se obtuvo 0,2761 g (62,3%) de un sólido de color amarillo.

Compuesto **39**: sólido amarillo, Rf: 0,87 (20% acetato de etilo/hexano), punto de fusión: 66,6°C. **IR** (cm^{-1}): 3068; 2977; 1771; 1681; 1666; 1640; 1591; 1470; 1352; 1299; 1242; 1217; 1181; 1114; 1074; 964; 940; 787; 777; 747. **^{1}H-RMN**: 8,10 (m, 2H, H-5, H-8); 7,77 (m, 2H, H-6, H-7); 6,81 (s, 1H, H-3); 4,08 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H, H-2'); 2,07 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H, H-3'); 1,00 (d, *J* = 6,8 Hz, 6H, $CH(\underline{CH_3})_2$) . **^{13}C-RMN**: 184,5 (C-4), 178,5 (C-1), 153,4 (C-2), 151,5 (C-1'), 134,5 (C-7 o C-6), 134,0 (C-7 o C-6),

131,8 (C-10), 130,9 (C-9), 126,9 (C-8 o C-5), 126,5 (C-8 o C-5), 124,9 (C-3); 75,9 (C-2'); 27,7 (C-3'); 18,7 (C-4'). **E.M**. (m/z, %): $[M+Na]^+$ 297,0746 (12); $[M-H+]^-$ 273,0764 (1,2); 173,0238 (100).

2.3.6. Síntesis de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il metacrilato (**41**)



Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 2.6. Obtención de 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il metacrilato (**41**)

Se preparó una solución de lawsona 0,2824 g (1,62 mmol) en 40 mL de diclorometano. Lentamente y con agitación se agregó 0,35 mL (2,37 mmol) de anhídrido metacrílico, 10 mg de DMAP (0,08 mmol) y 0,5 mL de piridina (6,21 mmol). La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente por un período de 150 minutos. El avance y término de la reacción fue monitoreada por CCF 50 % (acetato de etilo/hexano).

El solvente fue removido por destilación en rotavapor y el residuo fue extraído con acetato de etilo (3x50 mL); la fase orgánica fue lavada con 25 mL de solución acuosa de $KHSO_4$ 10% p/v, luego con 20 mL solución de $NaHCO_3$ saturada y finalmente con agua (3x50 mL) hasta pH neutro. La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro y filtrada en un balón de fondo redondo, el solvente fue removido por destilación en rotavapor. El crudo resultante se soportó en sílica gel y posteriormente fue purificado por cromatografía en columna, eluido con mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo en gradiente de polaridad (19,8: 0,2→15,6: 4,4). Se obtuvo 0,2409 g (61,3%) de un sólido de color amarillo.

Compuesto **41**: sólido amarillo, Rf: 0,94 (50% acetato de etilo/hexano), punto de fusión: 95,8 °C. **IR** (cm^{-1}): 3069; 2931; 1743; 1683; 1663; 1636; 1594; 1457; 1444; 1301; 1260; 1172; 1122; 1095; 1073; 1008; 969; 950; 937; 918; 808; 781; 708; 667. **^{1}H-RMN**: 8,12 (m, 2H, H-5, H-8); 7,78 (m, 2H, H-6, H-7); 6,82 (s, 1H, H-3); 6,42 (s,1H, H-4'); 5,88 (s, 1H, H-4'); 2,07 (s, 3H, H-3'). **^{13}C-RMN**: 184,6 (C-4), 178,6 (C-1), 164,2

(C-1'), 154,6 (C-2), 134,4 (C-7, C-6, C-2'), 134,0 (C-7, C-6, C-2'), 131,9 (C-10), 131,1 (C-9), 129,4 (C-4'), 126,9 (C-8 ó C-5), 126,5 (C-8 ó C-5); 126,0 (C-3); 18,2 (C-3'). **E.M**. (m/z, %): $[M+Na]^+$ 265,0430 (1,6); $[M-H+]^-$ 241,0516 (0,6); 189,0757 (100).

2.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Para este ensayo se utilizaron placas plásticas estériles de 12 pocillos y el análisis de cada muestra se realizó en triplicado. Cada pocillo contenía el extracto a analizar en una concentración determinada en 2 mL de agar-papa dextrosa en forma homogénea.

Sobre cada pocillo, conteniendo agar y la sustancia a analizar, se inocula un trozo de agar de 1mm de diámetro que contenía el micelio de *Botrytis cinerea* y *Gibberella fujikuroi*. El efecto de cada compuesto sintetizado fue testeado en concentraciones de 50-250-500 µM. El crecimiento fue monitoreado macroscópicamente a diferentes tiempos (24-48-72 horas), realizando registros fotográficos en cada tiempo.

Para la determinación del crecimiento del micelio en la placa de agar se midió la superficie del micelio, utilizando el programa Sigma Scan-Pro 5.

2.4.1. Análisis estadístico

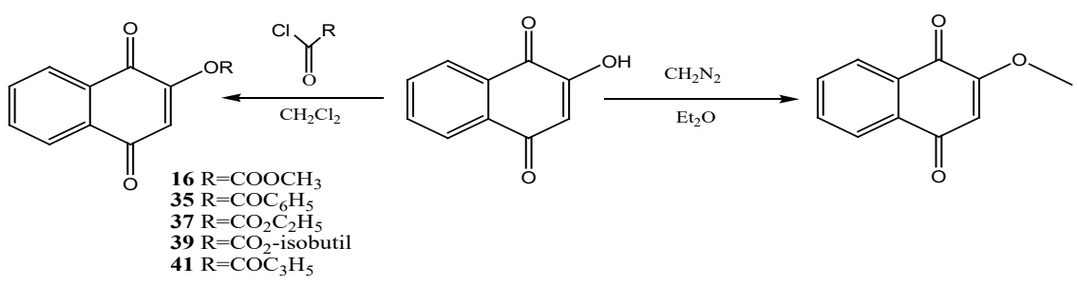
El análisis estadístico realizado sobre resultados de esta investigación, necesario para determinar su significancia, fue basado en la prueba Anova ($p>0,05$; grados de libertad: n-1) combinada a la matriz de Tukey utilizando el programa de análisis estadístico GraphPad Prism 5.0. La utilización de esta matriz permite el análisis de múltiples datos dentro de un experimento. Esto permite evaluar la significancia práctica de diferencias entre medias, además de la significancia estadística. La significancia observada ha sido calculada en función de la muestra correspondiente al control positivo de cada ensayo a un determinado tiempo.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIONES

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el marco de las síntesis realizadas, se obtuvieron tres series de compuestos correspondientes a: tres ésteres, dos carbonatos y un éter.

Dentro de los ésteres se encuentra el compuesto **16** el cual se obtuvo a través de una reacción de acetilación, la que consiste en tratar, en este caso, lawsona con anhídrido acético en CH_2Cl_2, catalizada por DMAP según se indica en la Figura 3-1. De esta forma se logró obtener el compuesto **16** con un 89,2% de rendimiento. La caracterización por IR, mostró principalmente la presencia de una señal a 1761 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C=O del éster, mientras que el espectro de ^1H RMN observó una señal singlete a δ_H = 2,39 ppm correspondiente al metilo ($\underline{CH_3}COO$), ratificándose por ^{13}C RMN al observar las señales a δ_c = 20,6 ppm ($\underline{CH_3}COO$) y 167,72 ppm ($CH_3\underline{C}OO$). En tanto, en el análisis de EM se pudo observar la señal $[M-H^+]^-$ a m/z 215,0340 (0,22 %) y pico base a m/z 173,0238 correspondiente al fragmento **[$C_{10}H_5O_3$]**.

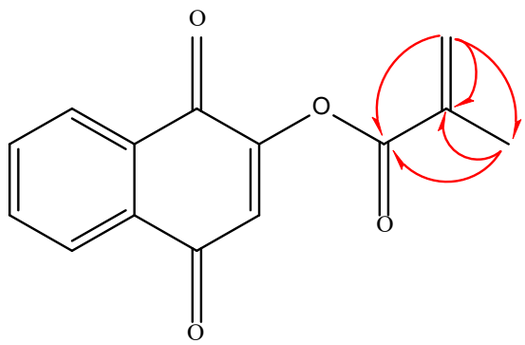


Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 3-1. Esquema resumen de las síntesis realizadas.

El segundo éster obtenido se realizó del mismo modo que el compuesto anterior, a diferencia que el anhídrido utilizado fue el metacrílico, dando como resultado el compuesto **41** con un 61,3% de rendimiento, cuyo espectro IR reveló las señales a 1742 cm^{-1} y 1636 cm^{-1} correspondiente al enlace C=O del éster y C=C respectivamente. Por otra parte, en el espectro ^1H RMN se visualizaron señales a δ_H = 2,07 ppm (singlete) asignada a ($\underline{CH_3}CCH_2COO$) o H-3'(3H) y δ_H = 6,42 ppm, δ_H = 5,88 correspondientes a ($CH_3C\underline{CH_2}COO$) o H-4' (2H) que en ^{13}CRMN tuvieron un desplazamiento de 129,4 ppm (C-4') y 18,2 ppm (C-3'). Adicionalmente se registró un espectro bidimensional

heteronuclear ^{1}H-^{13}C HMBC, donde se observaron las correlaciones ^{3}J entre H-4' con C-3' y con C-1', $\underline{CH_3}CCH_2COO$ con C-1' y correlaciones ^{2}J entre H-4' con C-2' y $\underline{CH_3}CCH_2COO$ con C-2' tal como se indica en la Figura 3-2. En el espectro de masas de este compuesto se logró identificar la señal $[M-H^+]^-$ 241,0516 (0,1%) y pico base a m/z 189,0752.



41

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 3-2. Correlación heteronuclear 2D ^{1}H-^{13}C HMBC del compuesto **41**.

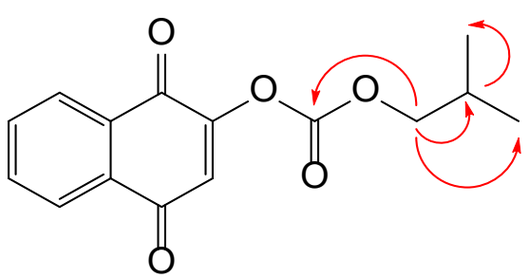
Un tercer éster se obtuvo al reaccionar lawsona con cloruro de benzoílo en CH_2Cl_2, catalizada con DMAP, dando como producto el compuesto **35** con un rendimiento de 63,1%. La caracterización de éste se efectuó en conjunto con las técnicas espectroscópicas IR, ^{1}H, ^{13}C RMN y EM. En el espectro IR se observaron principalmente las señales correspondientes al enlace C=O (del éster) y C=C Ar a 1739 y 1594 cm^{-1} respectivamente. En ^{1}H RMN se percibieron las señales a δ_H = 8,18 ppm (d, J = 7,6 Hz, 2H, H-3' y H-7'); 7,68 ppm (t, 1H, H-5') y 7,54 ppm (t, 2H, H-4' y H-6'), en tanto que en ^{13}C se registraron las señales a δ_c = 163,6 ppm correspondiente al C=O del éster (C-1'), 134,0 ppm (C-5'); 130,6 (C-3' y C-7'); 128,8 ppm (C-4' y C-6') y 127,8 ppm (C-2'). Adicionalmente en el espectro de masas de alta resolución se detectó el peak base a m/z = 269,0420.

Con un método similar al de acetilación, pero utilizando como reactivos carbonos clorhidratos se obtuvieron los derivados hemisintéticos de Lawsona correspondientes a las series de carbonatos, en los que se encuentran los compuestos **37** y **39**.

Al igual que todos los compuestos obtenidos su caracterización estructural se efectuó por técnicas de IR, ^{1}H, ^{13}C RMN, correlaciones 2D HSQC y HMBC además EM. Para el compuesto **37** en IR, con un rendimiento de 49,3%, se reconoció una señal a

1775 cm^{-1} para el estiramiento del enlace C=O del carbonato. En el caso de ^{1}H se observó claramente las señales correspondientes al grupo etilo a δ_H = 4,37 ppm (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, H-2') y a δ_H = 1,41 ppm (t, *J*= 7,1 Hz, 3H, H-3'), mientras que en ^{13}C se destacaron las señales a δ_c = 151,3 ppm asignada al C=O del carbonato, δ_c = 66,1 ppm C-2' y a δ_c = 14,0 ppm C-3'. En tanto, en el espectro de masas de alta resolución se mostraron dos señales de interés, uno correspondiente a la señal base a m/z 269,0427 $[M+Na]^+$ y a 173,0385 (78,0%) correspondiente al fragmento $C_{10}H_5O_3$.

Por otra parte, el compuesto **39** obtenido con un 62,3% de rendimiento en IR muestra una señal a 1771 cm^{-1} correspondiente al enlace C=O del carbonato y a 2977 cm^{-1} asignada a C-H alifáticos. En ^{1}H se observaron señales de interés a δ_H = 4,08 ppm correspondientes a H-2' (d, *J* = 6,7 Hz, 2H), δ_H = 2,07 ppm a H-3' (q, *J* = 6,7 Hz, 1H) y δ_H = 1,00 ppm (d, *J* = 6,7 Hz, 6H) asignados a los metilos del grupo isobutilo. En cuanto al espectro ^{13}C las señales de interés se registraron a δ_c = 151,5 ppm correspondiente a C-1', δ_c = 75,9 ppm a C-2', δ_c = 27,7 ppm a C3' y δ_c = 18,7 ppm asignada a C-4'. Todas estas señales se confirmaron por correlaciones bidimensionales ^{1}H-^{13}C , HSQC y HMBC en este último se observaron correlaciones a ^{3}J entre H-2' con C-4' y C-1', H-4' con C-2' y ^{2}J entre H-2' con C-3', H-3' con C-4' y C-2', H-4' con C-3' y C-2' tal como muestra la figura 3-3. En el espectro de masas de alta resolución se detectaron dos señales de interés correspondientes a $[M-H^+]^-$ a m/z 273,0764 (1,2%) y m/z 173,0238 (100%) correspondiente al fragmento $C_{10}H_5O_3$.



39

Fuente: Estructuras obtenidas a partir de programa Chem Draw Office versión 8.0

Figura 3-3. Correlación heteronuclear 2D ^{1}H-^{13}C HMBC del compuesto **39**.

El éter obtenido corresponde al compuesto **15** con un 52,9 % de rendimiento según ruta graficada en la Figura 3-1. Según espectros IR se pudo observar señal a 1244

cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C-O de éter. En el espectro ^{1}H se registró una señal a $\delta_H = 3,91$ ppm característica del metoxilo (s, 3H), en tanto, en el espectro ^{13}C se observó una señal a $\delta_c = 56,4$ ppm correspondiente a $O\underline{C}H_3$. En el espectro de masa de alta resolución se observaron señales correspondientes a $[M+H]^+$ m/z 189,0550 (64,8%), a m/z 175,0380 (64,3%) y m/z 161,0594 (100%).

Respecto a las pruebas de actividad antifúngica, el potencial fue examinado contra 2 hongos fitopatógenos mediante ensayos in vitro. En general, los compuestos analizados varían estructuralmente en su grado de acetilación y tipo de sustitución respecto a la estructura base (anillos quinónicos).

Las pruebas biologicas se centraron en evaluar el posible efecto inhibidor de los compuestos en estudio sobre el crecimiento de hongos patógenos de vegetales de interés comercial a nivel nacional e internacional, como lo son *Botrytis cinerea y Gibberella fujikuroi*. Las concentraciones ensayadas de cada compuesto se encuentran en el orden de los µM en un rango entre 50 y 500.

Para medir la actividad biologica, se utilizó un control negativo de inhibicion, que consistente en un medio de cultivo semisólido en el cual se deja crecer el hongo y un control positivo de inhibicion, un medio de cultivo con una cantidad conocida de Captan (N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide), un antifúngico comercial, tanto para *Botrytis* como para *Gibberella*.

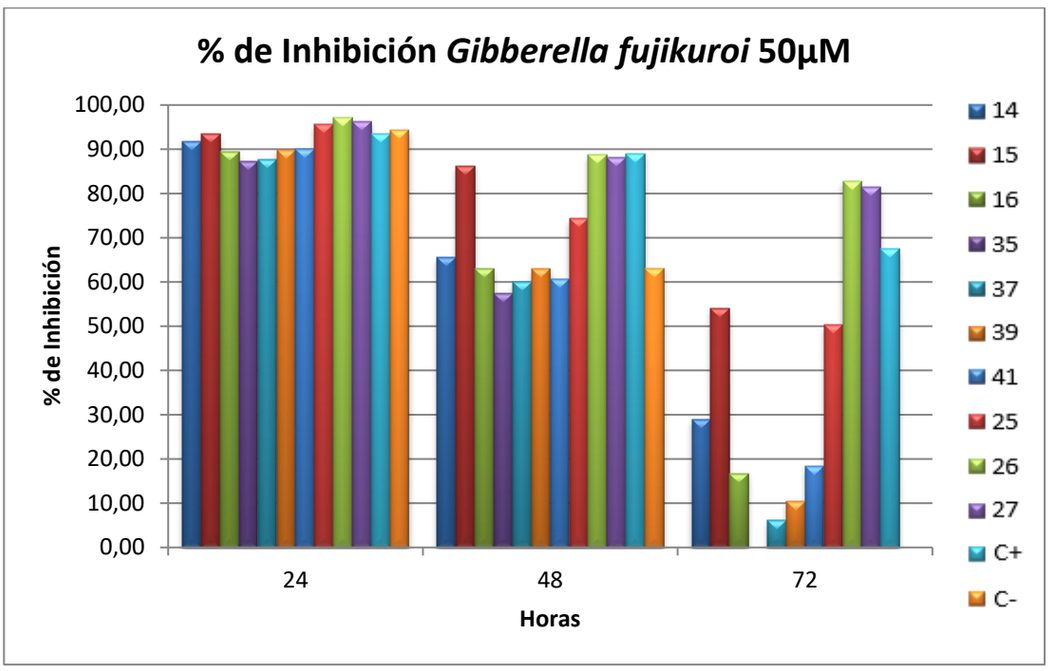
En el caso de las pruebas biológicas en contra del fitopatógeno *Gibberella fujikuroi*, fue posible apreciar que en general los extractos presentan actividad antifúngica en las primeras 48 horas de crecimiento con porcentajes de inhibición que superan el 60% y este efecto inhibitorio del crecimiento es independiente de la concentración de compuesto probado. Específicamente, de manera interesante, se puede apreciar que aquellas moléculas correspondientes a las naftoquinonas naturales (**25, 26** y **27**) promueven mayores efectos inhibitorios del crecimiento del hongo en comparación a las moléculas sintética y a la misma lawsona, y este efecto es constante en el tiempo e independiente de la concentración, de tal forma que es posible observar dicho efecto citotóxico a concentraciones bajas como 50 µM, logrando incluso porcentajes de inhibición cercanos al 90%. Estos compuestos resultaron inhibir significativamente en mayor porcentaje el desarrollo de *Gibberella* en el tiempo, registrando inhibiciones entre un 85 y 90% superando al control positivo de inhibicion a las 72 horas post inoculación. Este resultado propone a las moléculas **25**, **26** y **27** como candidatos importantes para la formulación de un fungicida comercial de origen natural.

Por otro lado el compuesto **15** presenta resultados similares a la molécula **25**, pero menores que las **26** y **27**, siendo considerado de igual forma un buen candidato como antifúngico de origen sintético.

Respecto a los otros compuestos sintetizados sólo el **41** presenta algún grado de inhibición destacable, independiente de la concentración utilizada , si bien los restantes ejercen un efecto inhibitorio del crecimiento de *Gibberella* respecto, este efecto no supera al observado por el control positivo de inhibicion del antifúngico comercial.

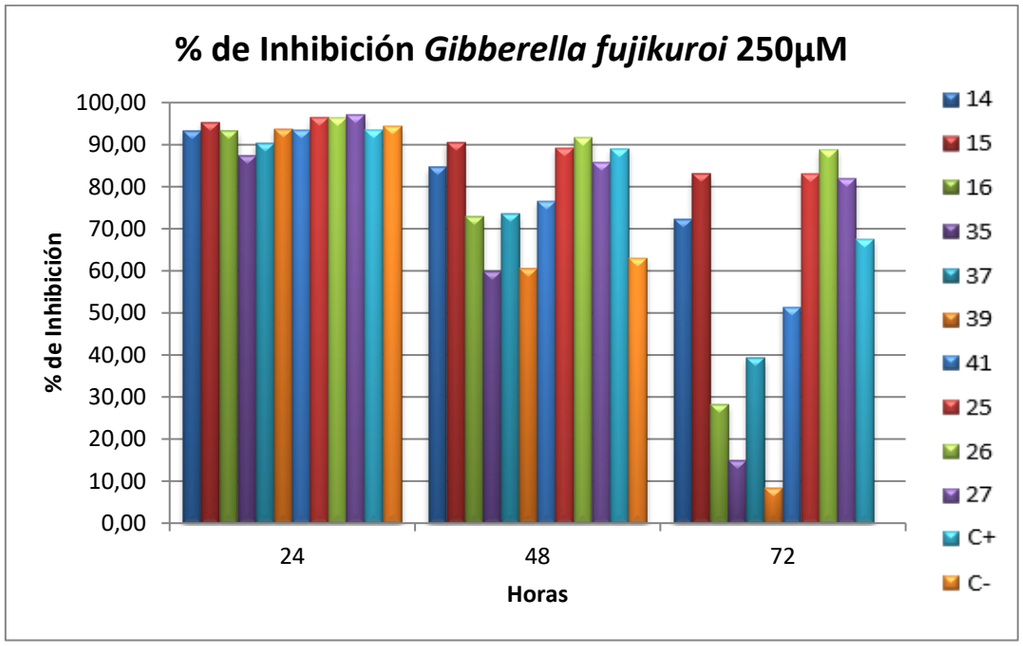
El efecto de inhibición de las moléculas en estudio sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* se observa de manera menos evidente en comparación al observado con *Gibberella*. Independientemente de la concentración todas presentan niveles similares de inhibición a las 24 horas, pero al cabo de 72 horas post inoculación sólo el compuesto sintético **16** y el natural **27** tuvieron buenos resultados.

En relación a las concentraciones en estudio, a 50 µM ni la lawsona natural ni sus derivados sintéticos mostraron una respuesta destacable, sólo a concentraciones más altas (250 y 500 µM) es posible observar un efecto fungicida con los compuestos sintetizados **16** y **35**, y en los naturales **26** y **27**. Este último llega a superar el efecto inhibitorio observado con el control negativo (antifúngico comercial) alcanzando un 97% de inhibición a las 72 horas a 500 µM, lo que da cuenta que esta molécula es un excelente candidato para una formulación natural con efecto fungicida.



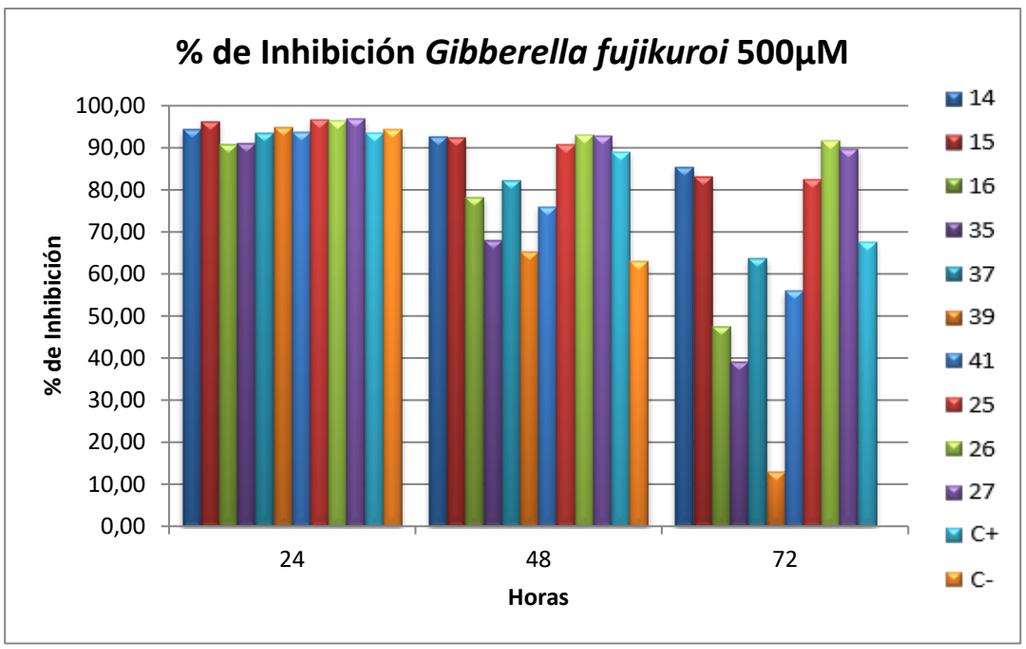
Fuente: Obtenidos a partir de medición realizada con Sigma Scan-Pro 5.0, llevado a plantilla MS Excel

Gráfico 3-1. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Gibberella fujikuroi* a 50 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo.



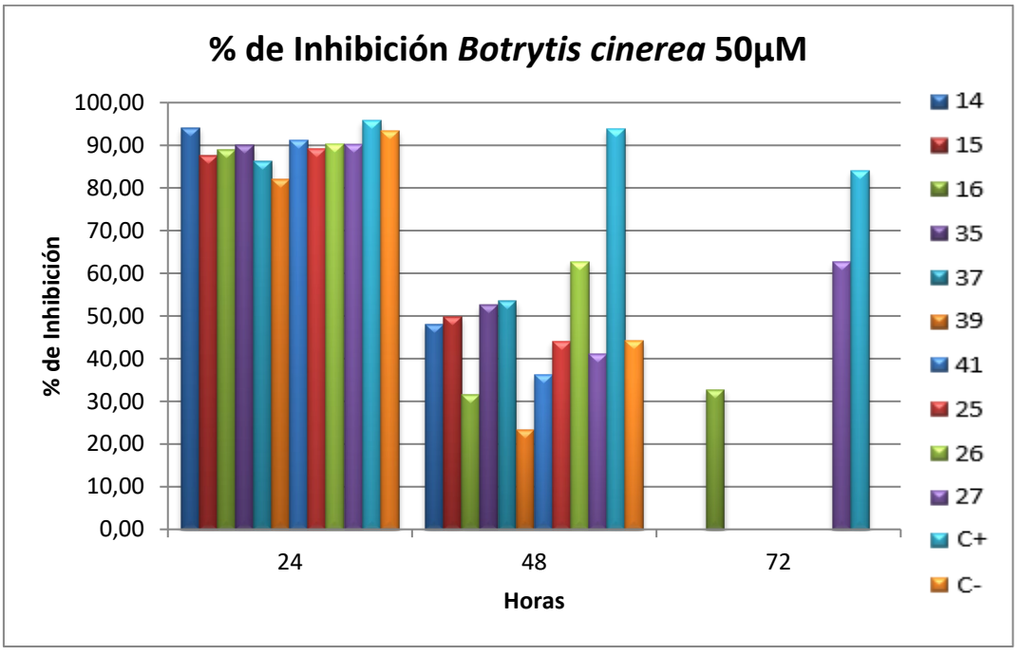
Fuente: Obtenidos a partir de medición realizada con Sigma Scan-Pro 5.0, llevado a plantilla MS Excel

Gráfico 3-2. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Gibberella fujikuroi* a 250 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo.



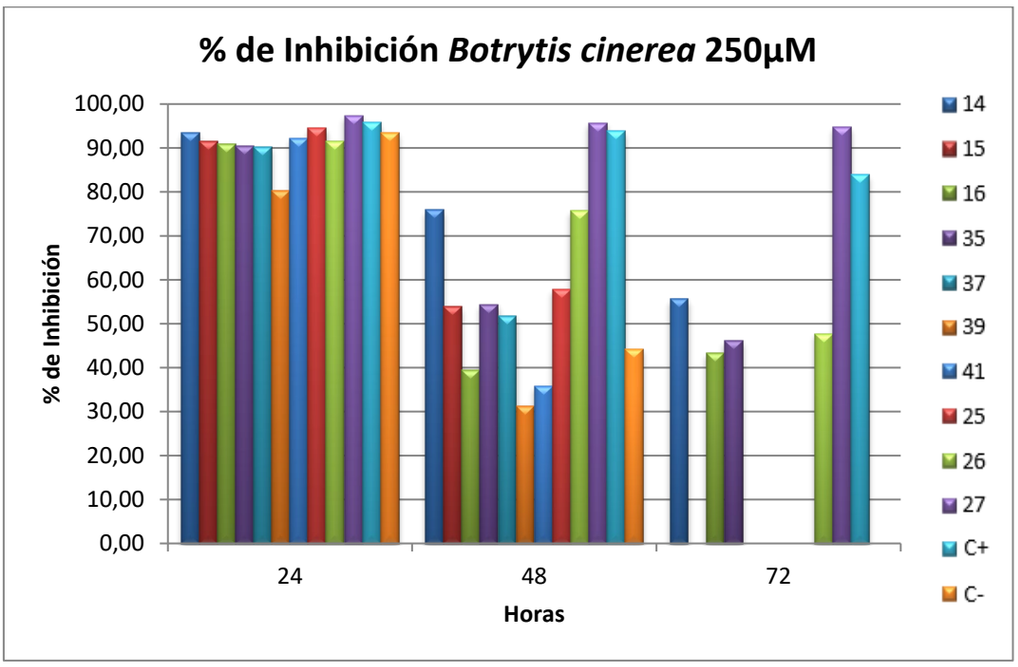
Fuente: Obtenidos a partir de medición realizada con Sigma Scan-Pro 5.0, llevado a plantilla MS Excel

Gráfico 3-3. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Gibberella fujikuroi* a 500 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo.



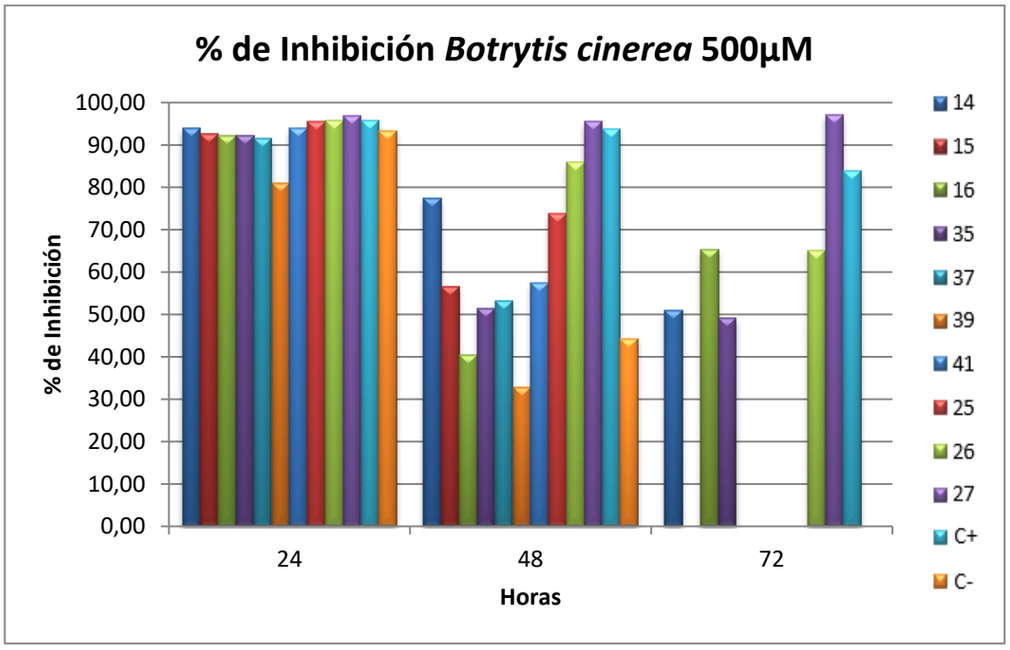
Fuente: Obtenidos a partir de medición realizada con Sigma Scan-Pro 5.0, llevado a plantilla MS Excel

Gráfico 3-4. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* a 50 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo.



Fuente: Obtenidos a partir de medición realizada con Sigma Scan-Pro 5.0, llevado a plantilla MS Excel

Gráfico 3-5. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* a 250 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo.



Fuente: Obtenidos a partir de medición realizada con Sigma Scan-Pro 5.0, llevado a plantilla MS Excel

Gráfico 3-6. Efecto de los compuestos estudiados sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* a 500 µM durante 24, 48, 72 horas post inoculación del hongo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al finalizar este trabajo de investigación es posible concluir lo siguiente:

Las reacciones de sustitución empleadas resultan ser satisfactorias para la obtención de seis derivados de naftoquinonas sintéticas, los cuales son separados efectivamente mediante las técnicas de cromatografía en placa y columna, con rendimientos entre un 49 y 89%. Cabe destacar que solo los compuestos **15** y **16** poseen información previa en la literatura especializada.

De los compuestos resultantes sólo el **15** fue obtenido de manera directa, las otras muestras requirieron un tratamiento cromatográfico.

Todas ellas fueron identificadas eficientemente mediante sus propiedades físicas y por técnicas espectroscopicas de IR, EM, RMN 1D y 2D.

Posteriormente fue posible evaluar su actividad de inhibición de crecimiento frente a los hongos patógenos vegetales *Botrytis cinerea* y *Gibberella fujikuroi* mediante ensayo *in Vitro.*

Si bien la lawsona exibe niveles de inhibición similares a la mayoría de los compuestos sintetizados, no son tan efectivos respecto a las naftoquinonas naturales **25**, **26** y **27**.

Siendo la naftoquinona natural **27** la que presentó mayor actividad antifúngica frente a los dos hongos fitopatógenos estudiados. Se reconoce entonces como candidata para la formulación de un fungicida comercial; a diferencia de las moléculas sintéticas que en su mayoría presentaron efectos fungiestáticos no significativos respecto a los antifúngicos comerciales ya existentes.

Se hace necesario en un futuro continuar con los estudios que apunten a investigar los mecanismos de acción involucrados de los compuestos **25**, **26** y **27**.

Para finalizar, atendiendo a las naftoquinonas naturales se debe señalar que basados en los resultados generados a partir de este estudio, queda abierta la posibilidad de continuar futuros estudios en esta especie de planta. La información obtenida aquí será de gran utilidad para nuevos trabajos fitoquímicos que puedan establecer comparaciones en esta misma especie pero recolectada en temporadas y lugares geográficos distintos a los de este estudio.

Por otro lado, cabe destacar la potencialidad de las naftoquinonas naturales como posibles candidatas para el control de enfermedades fúngicas de cultivos con importancia comercial en nuestro país. Esta sería una oportunidad real para la producción de un antifúngico natural y eficiente que le otorgaría un valor agregado a esta especie de *Calceolaria*.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Hui, Y.; Khim Chng, E. L.; Lin Chng, C. Y.; Poh, H. L.; Webster, R. D., Hydrogen-Bonding Interactions between Water and the One- and Two-Electron-Reduced Forms of Vitamin K1:Applying Quinone Electrochemistry To Determine the Moisture Content of Non-AqueousSolvents, J. Am. Chem. Soc., **2009**, 131, 1523–1534.

[2] Ogawa, M.; Koyanagi, J.; Sugaya, A.; Tsuda, T.; Ohguchi, H.; Nakayama, K.; Yamamoto,K.; Tanaka, A., Cytotoxic Activity toward KB Cells of 2-Substituted Naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and Their Related Compounds, Biosci. Biotechnol. Biochem., **2006**, 70, 1009–1012.

[3] Ravelo, A. G.; Estevez-Braun, A.; Chavez-Orellana, H.; Perez-Sacau, E.; Mesa-Siverio, D.,Recent Studies on Natural Products as Anticancer Agents, Curr. Top. Med. Chem., **2004**, 4,241-265.

[4] Stahl, P.; Kissan, L.; Mazitschek, R.; Giannis, A.; Waldmann, H., Natural Product Derived Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: Identification of IGF1R, Tie-2, and VEGFR-3 Inhibitors, Angew. Chem. Int. Ed., **2002**, 41, 1174-1178.

[5] Campos-Takaki, G. M.; Steiman, R.; Seigle-Murandi, F.; Silva, A. A.; Bieber, L., Effect of medium composition on the antifungal susceptibility tests to lapachol, β-lapachone, phthiocol and its synthetic analogs, Rev. Microbiol., **1992**, 23, 106–111.

[6] DeSimone, R. W.; Currie, K. S.; Mitchell, S. A.; Darrow, J. W.; Pippin, D. A., Privileged Structures: Applications in Drug Discovery, Comb. Chem. High T. Scr., **2004**, 7, 473–491.

[7] Sandra Jimenez-Alonso, Sandra Oramas, Gema Guedes, Rosalyn Peña,Patricia Quintana, Haydee Chavez, Angel G. Ravelo y Ana Estevez Braun. Diseño y Síntesis de derivados quinónicos mediante reacciones dominó y formación de complejos metálicos. Actividad citotóxica antitipoisomerasa II y anti-MDR.Biocancer 5,2011.

[8] Jimenez-Alonso, S.; Chavez-Orellana, H.; Estevez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Ferensin, G.;Tapia, A., An efficient synthesis of embelin derivatives through domino

Knoevenagel hetero Diels–Alder reactions under microwave irradiation, Tetrahedron, **2008**, 64, 8938-8942.

[9] Jimenez-Alonso, S.; Chavez-Orellana, H.; Estevez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Perez-Sacau,E.; Machin, F., Design and Synthesis of a Novel Series of Pyranonaphthoquinones as Topoisomerase II Catalytic Inhibitors, J. Med. Chem., **2008**, 51, 6761-6772.

[10] Jimenez-Alonso, S.; Perez-Lomas, A. L.; Estevez-Braun, A.; Munoz-Martinez, F.; Chavez-Orellana, H.; Ravelo, A. G.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Lopez, M., Bis-pyranobenzoquinones as a New Family of Reversal Agents of the Multidrug Resistance Phenotype Mediated by p-Glycoprotein in Mammalian Cells and the Protozoan Parasite Leishmania, J. Med. Chem., **2008**,51, 7132-7143.

[11] Estevez-Braun, A.; Perez-Sacau, E.; Ravelo, A. G.; Yapu, D. G.; Turba, A. G.,Antiplasmodial Activity of Naphthoquinones related to Lapachol and β- Lapachone, Chem.Biodiversity, **2005**, 2, 264–274.

[12] Estevez-Braun, A.; Ravelo, A.G.; et al., "Triterpenequinone and triterpenephenolderivatives and their application for the treatment of tumors and diseases"(PCT/EP2006/070276).

[13] Oramas-Royo, S.; Chavez, H.; Martin-Rodriguez, P.; Fernandez-Perez, L.; Ravelo, A.G.;Estevez-Braun, A. Cytotoxic triterpenoids from Maytenus retusa. J. Nat .Prod. 2010, 73, 2029-2034.

[14] Iwata D.; Ishibashi M., Yamamoto Y. 2003. Cribarione B, a new naphthoquinone pigment from the myxomycete *Cribaria cancellata. Journal of Natural Products*, 66:1611-1612.

[15] Misono Y.; Ishikawa Y., Yamamoto Y., Hayashi M., Komiyama K., Ishibashi M. 2003. Dihydrolindbladiones. Three new naphthoquinone pigments from a myxomycete *Lindbladia tubulina*. *Journal of Natural Products*, 66:999-1001.

[16] Kuklinskli C. 2000. *Farmacognosia,* Omega, España.

[17] Thomson, R.H. 1957. *Naturally Occurring Quinones,* Butter Worths Scientific Publications, USA.

[18] J. Dekkers, H. Krooijman, J.Kroon, E. Grech. Acta Crust 1996, C52, 2896-2899.

[19] M.S. Khan, Z.H. Khan. Spectrochim. Acta A 2005, 61, 777-790.

[20] H.Rostkowska, M.J.;Nowzk, L.;Lapinski, L. Adamowicz. Spectrochim. Acta A 1998, 54, 1091-1103.

[21] Lamoureux,G; Perez,A.L; Araya,M;Agüero. Reactivity and Structure of derivates 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone(lawsone).2008,21,1022-1028.

[22] R. Munday, B. L. Smith and C. M. Munday. *Journal of Applied Toxicology. 2007, 27, 262-269.* Khambay,B:P.S;L; Jewes, P. The potential of natural naphtoquinones as basis for a newclass of pest control agents –an overview of research at IACR-Rothams, 2000,19,597-601.

[23] Marcel Pârvu1 and Alina E. Pârvu, Antifungal plant extracts.

[24] Vio-Michaelis S., Apablaza-Hidalgo G.,Gomez M.,Peña-Vera R. ,Montenegro G.; Antifungal Activity of Three Chilean Plant Extracs on *Botrytis Cinerea*. Botanical Sciences 90 (2): 179-183, 2012.

[25] Díaz Dellavalle P., Cabrera A., Alem D., Larrañaga P., Ferreira F., Dalla Rizza M.,; Antifungal Activity of Medicinal Plant Extracts Against Phytopathogenic Fungus. Chilean Journal of Agricultural Research 71 .APRIL-JUNE. 2011.

[26] Bullock F.J.; Tweedie J.F.; McRitchie D.D., Tucker M.A. 1970. Antiprotozoal quinones. IV. 2-Amino-1,4-naphthoquinones imines as potential antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry*, 13:550-552.

[27] Tandon V.K., Yadav D. B., Singh R.V., Vaish M., Chaturvedi A.K., Shukla P.K. 2005. Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antibacterial and antiviral agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15:3463-3466.

[28] Lluvia Itzel López L., Elisa Leyva, Ramón Fernando García de la Cruz. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 42, 1, 2011.

[29] Kongkathip N., Luangkamin S., Kongkathip B., Sangma C., Grigg R., Kongsaevee P., Prabpai S., Pradidphol N., Piyaviriyagul S., Siripong P. 2004. Synthesis of novel Rhinacanthins and related anticancer naphthoquinone esters. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47:4427-4438.

[30] Aguilar-Martínez M., Cuevas G., Jiménez-Estrada M., González I., Lotina-Hennsen B., Macías-Ruvalcaba N. 1999. An experimental and theoretical study of the substituent effects on the redox properties of 2-[(R-phenyl) amine]-1,4-naphthalenediones in acetonitrile. *Journal of Organic Chemistry,* 64:3684-3694.

[31] Bergeron F., Klarskov K., Hunting D.J., Wagner J.R. 2007. Near-UV photolysis of 2-methyl-1,4-naphthoquinone- DNA duplexes: characterization of reversible and stable interstrand cross-links between quinones and adenine moieties. *Chemical Research in Toxicology*, 20:745-756.

[32] Bitter S., Gorohovsky O., Paz-Tal L., Becker J.Y. 2002. Synthesis, electrochemical and spectral properties of some w-n-quinonyl amino acids. *Amino Acids*, 22:71-93.

[33] Wang Y. 2008. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chemical Research in Toxicology*, 21:276-281.

[34] Bergeron F., Klarskov K., Hunting D.J., Wagner J.R. 2007. Near-UV photolysis of 2-methyl-1,4-naphthoquinone- DNA duplexes: characterization of reversible and stable interstrand cross-links between quinones and adenine moieties. *Chemical Research in Toxicology*, 20:745-756.

[35] Salmon-Chemin L., Buisine E., Yardley V., Kohler S., Debreu M.-A., Landry V., Sergheraert Ch., Croft S.L., Krauth-Siegel R.L., Davioud-Charvet E. 2001. 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenasa from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and *in vitro* cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44:548-565.

[36] Ferreira R.A., Oliveira A.B., Ribeiro M.F.B., Tafuri W.L., Vitor R.W.A. 2006. *Toxoplasma gondii*: *in vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Experimental Parasitology*, 113:125-129.

[37] Dhaon M.K., Lehrman S.R., Rich D.H., Engelke J.A., Suttie J.W. 1984. Derivatives of 2-methyl-1,4-naphthoquinone as substrates and inhibitors of the vitamin k dependent carboxilasa. *Journal of Medicinal Chemistry*, 27:1196-1201.

[38] Mac Nair, Harold. Basic Gas Chromathography. 2° Edición. John Wiley & Sons. 2009.

[39] Skog, D.; West, D. Fundamentos de Química Analítica. International Thomson Editores. 2005.

[40] Skoog, D. y Leary, J. J. "Análisis Instrumental". 4a. ed. Madrid: McGraw-Hill, 935 p. ISBN 844810191X. 1994.

[41] Skoog D.; Holler F. J.; Nieman T. A.; Principios de Análisis Instrumental, 5a Edición McGraw- Hill Higher. España, pág. 122-565, 2001.

[42] Morcillo, R., Espectroscopía Infrarroja. Serie Química. Secretaría General de la O.E.A. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D.C. 1974.

[43] Gottlieb, R. O y Braz R. F. Introducción a la Espectrometría de Masa de Sustancias Orgánicas". Washington, D.C. OEA, 114 p. Serie de Química. Monografía; no. 17.

[44] Espinoza,L.; Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear de Alta Resolución 1D y 2D. Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso Chile. Impresor Fermín Pastén. Pág. 5-7. 2004.

[45] Joseph-Nathan, P., DÍAZ, E. Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear. Editorial Limusa S.A. México. 1980.

[46] Jaca, J.; Caballero, P.; Ávila, J., El control biológico de plagas y enfermedades. Publicación de la Universidad Jaume,d .l. 2005,ISBN:84-80-21-514-3,P.115-117.

[47] Carvajal, M., Producción de nuevos derivados de ácido salicílico y ácido jasmónico mediante biotransformación en hongo *Gibberella fujikuroi*. Tesis para obtener el Grado de Doctorado en Biotecnología. Universidad Técnica Federico Santa María. 2008.

[48] Piontelli, E.; Toro M.A., Introducción al estudio de los microhongos. Cátedra de Micología Facultad de Medicina. Universidad de Valparaíso.1989. p11,127,36,68.

[49] Benito,E .P; Arranz,M.; Eslava, A.P;Pathogenicity factors in *Botritys Cinerea*.Rev Iberoam Micol 2000;17:S43-S46.

[50] Espinosa de los Monteros,M. Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinérea*. Memoria para optar al grado de Doctora por la Universidad de Cádiz.2006.

[51] Wilson, C.L; Solar, J.M. ;El Ghaouth,A.;Wisniewski,M.E.; Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential oils for Antifungal Activity Against *Botritys Cinerea.*USDA-ARS Appalachian Fruits Research Station ,Kearneysville,WV 25430.Plant Disease /vol.81n2.

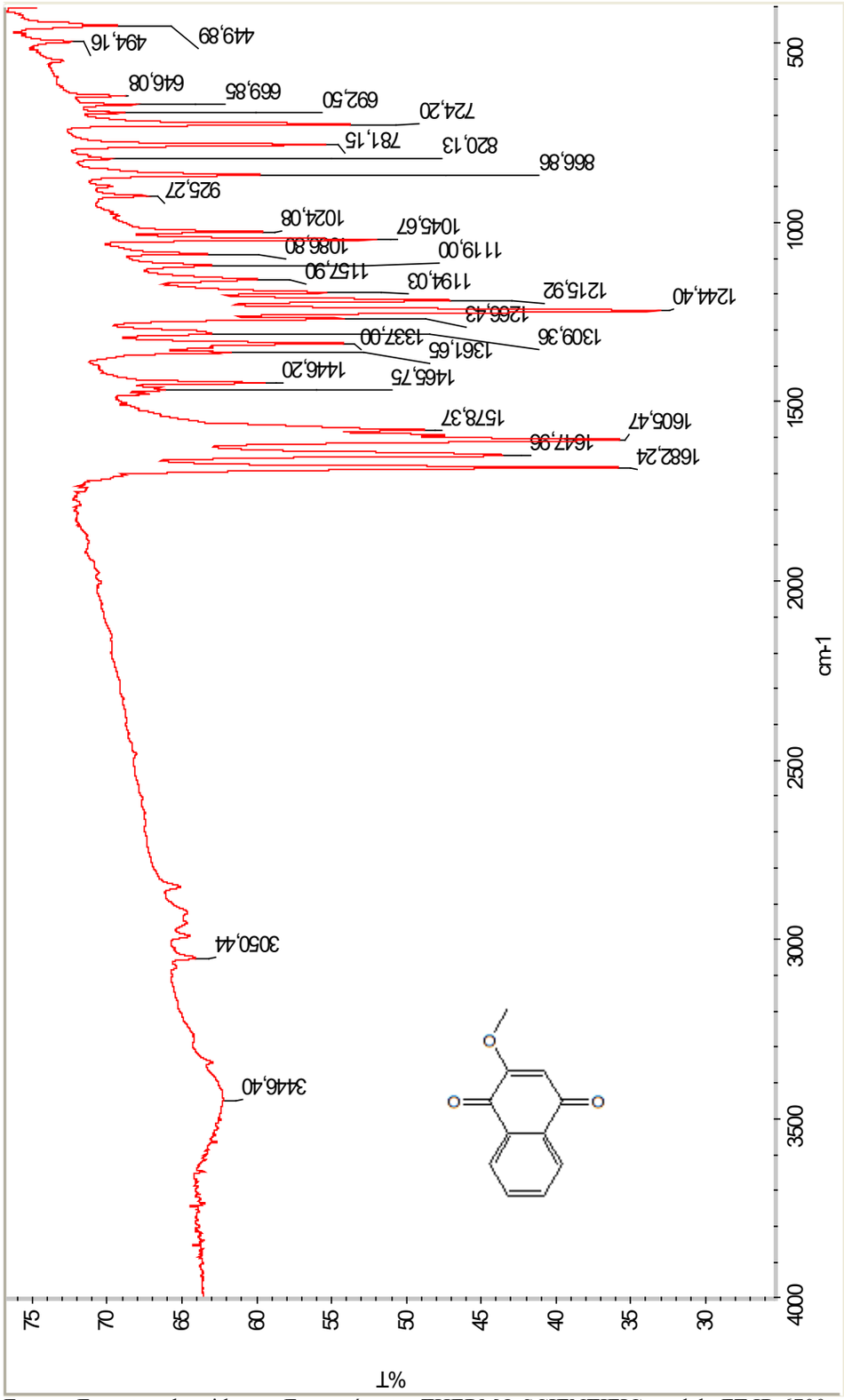
[52] DGSSV-CNRF. *Fusarium moniliforme* .Ficha Técnica.México,D.F.5p..2011.

[53] S.H.OU; Rice Deseases. 2a. ed., 1985, ISBN:0-851-198-545-9.P. 118-305.

[54] Wulff, E., Sorensen, J.L; Lubeck, M.; Nielsen, K.F.;Thrane ,U.; Torp ,J; Fusarium spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. Environ Microbiol .Marzo 2010. Vol. 12 n°3 .pp. 649-529.

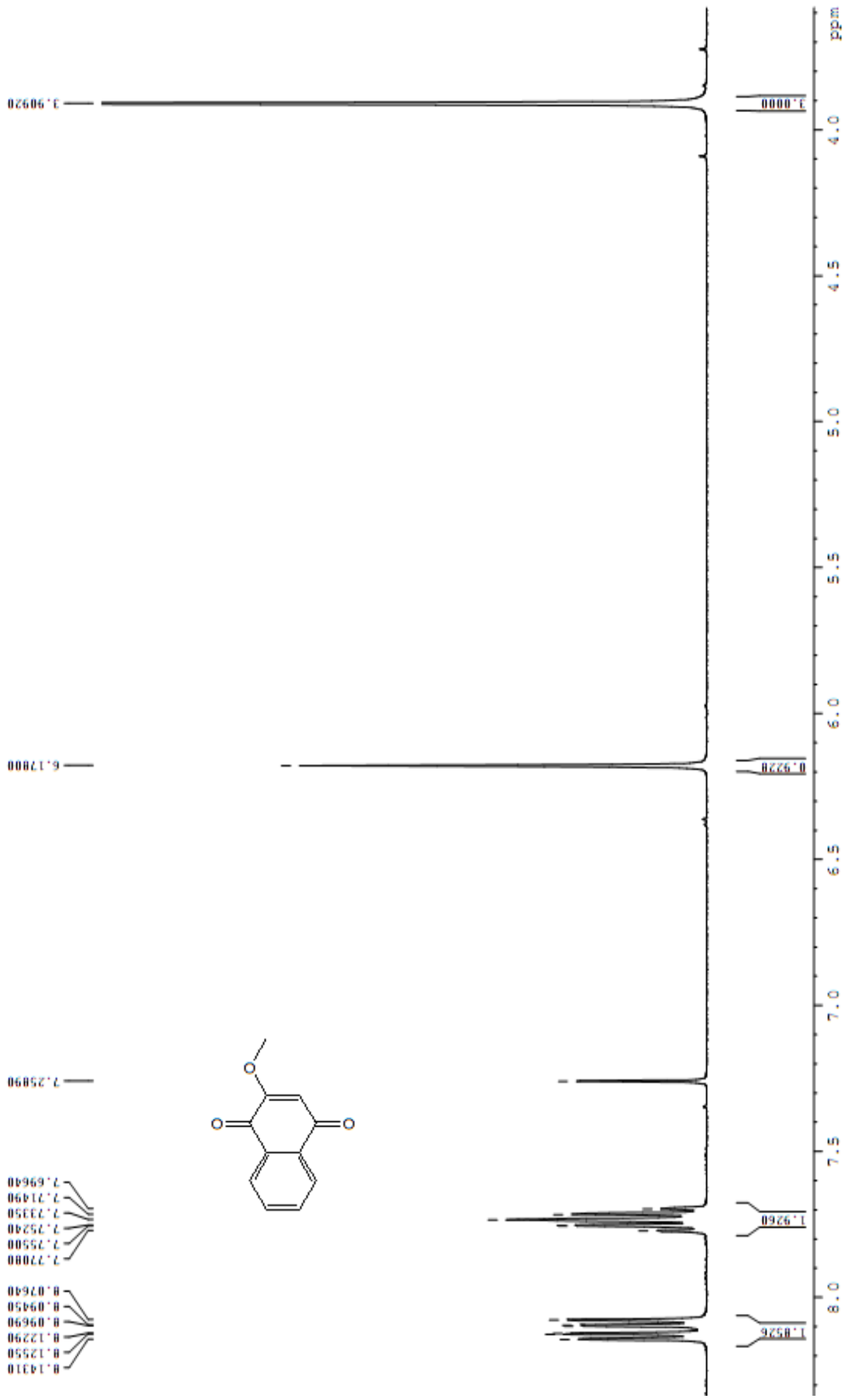
ANEXOS

ANEXO A: ESPECTROS DEL COMPUESTO 2-METOXINAFTALEN-1,4-DIONA 15



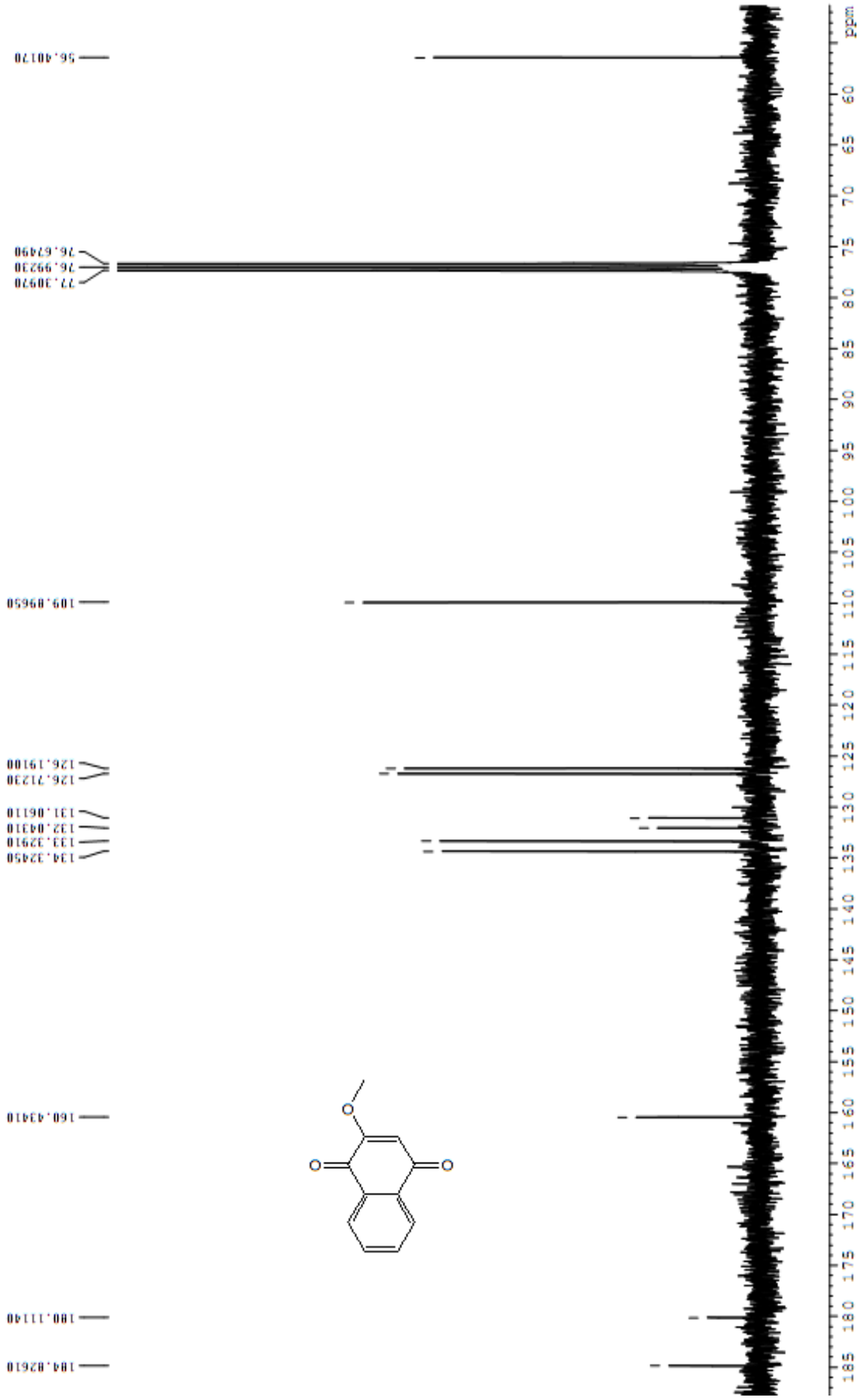
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro THERMO SCIENTIFIC modelo FT IR 6700

Figura A-1: Espectro IR compuesto 2-metoxinaftalen-1,4-diona (**15**).



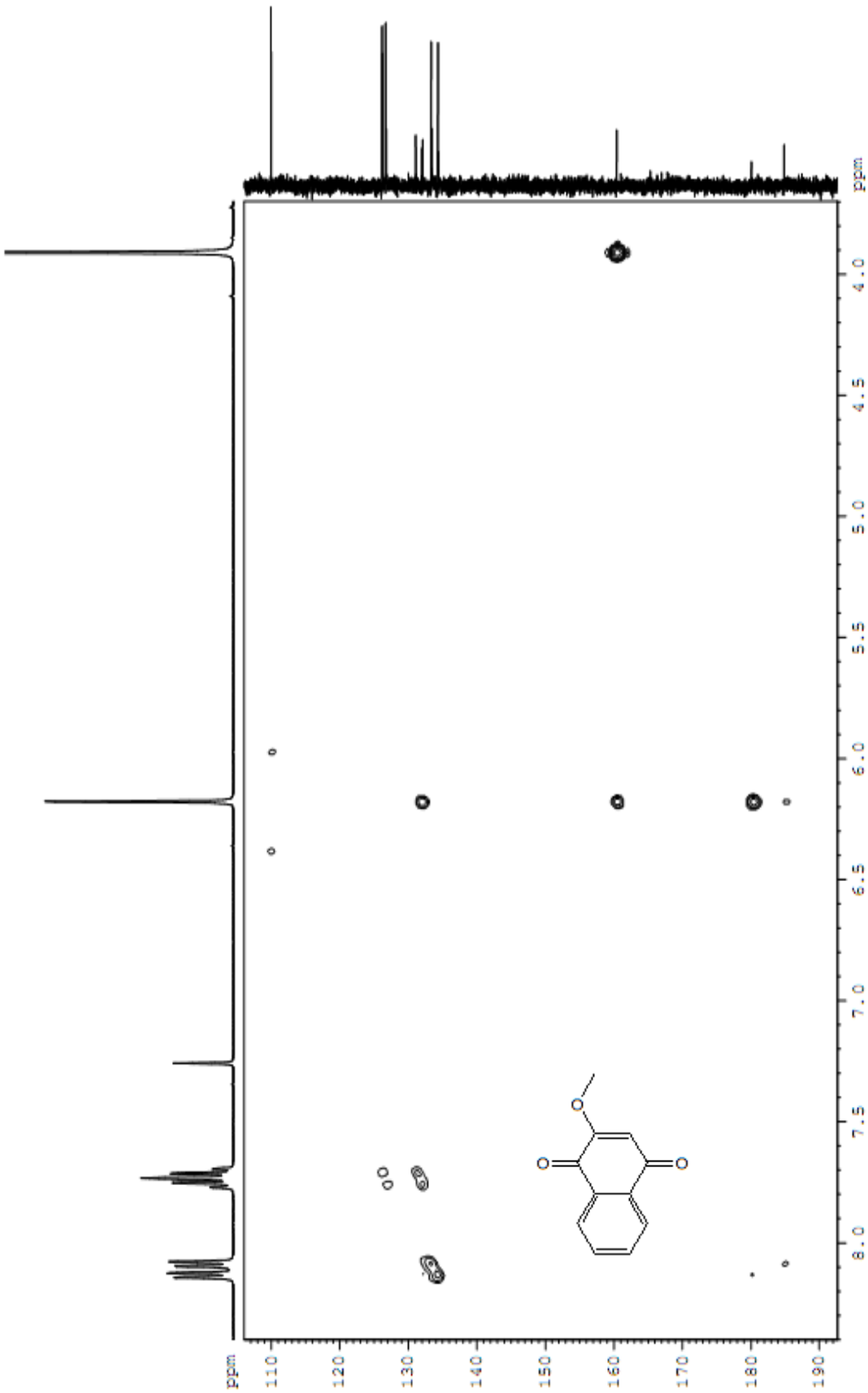
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

Figura A-2: Espectro ^{1}H RMN compuesto 2-metoxinaftalen-1,4-diona (**15**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

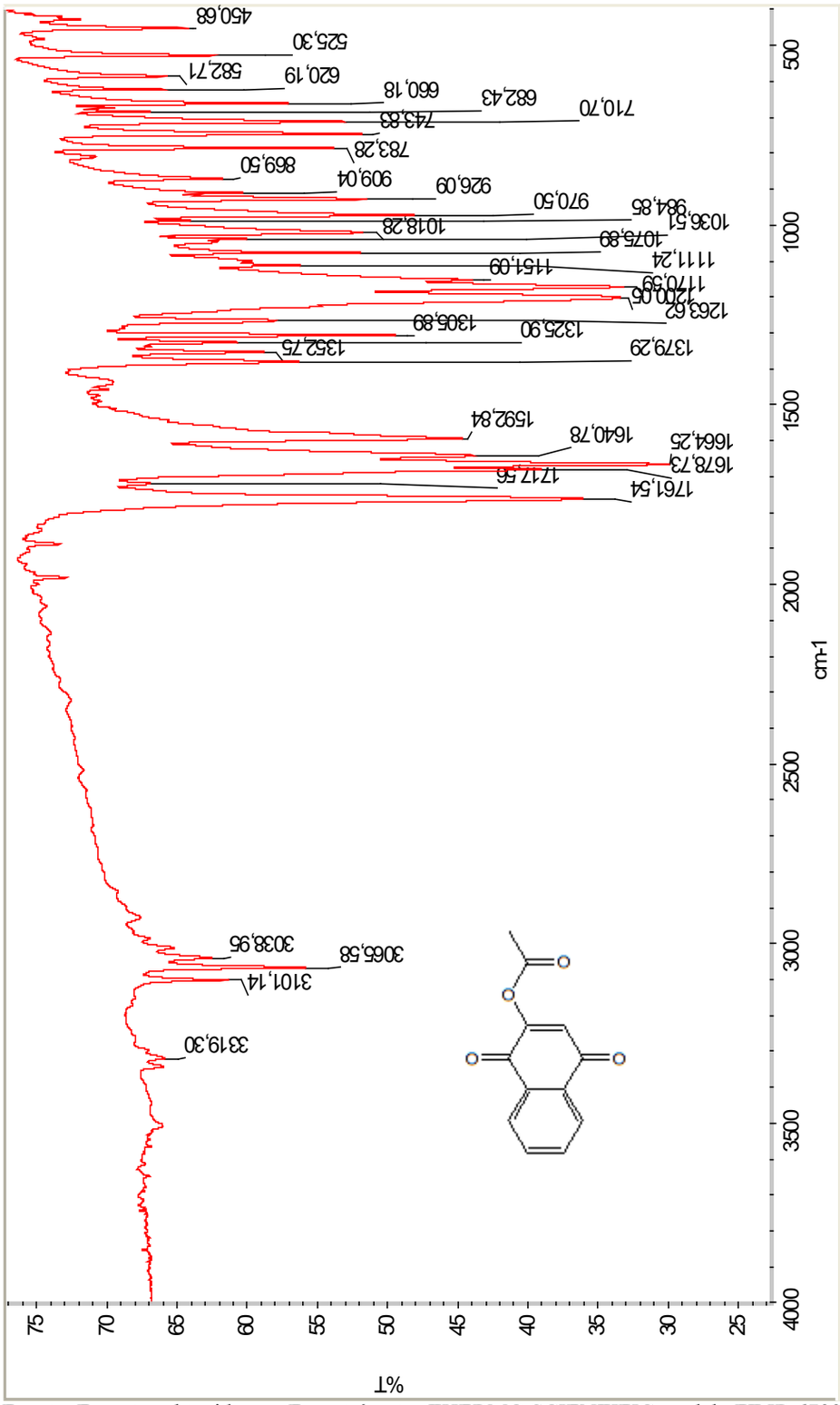
Figura A-3: Espectro ^{13}C RMN compuesto 2-metoxinaftalen-1,4-diona (**15**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

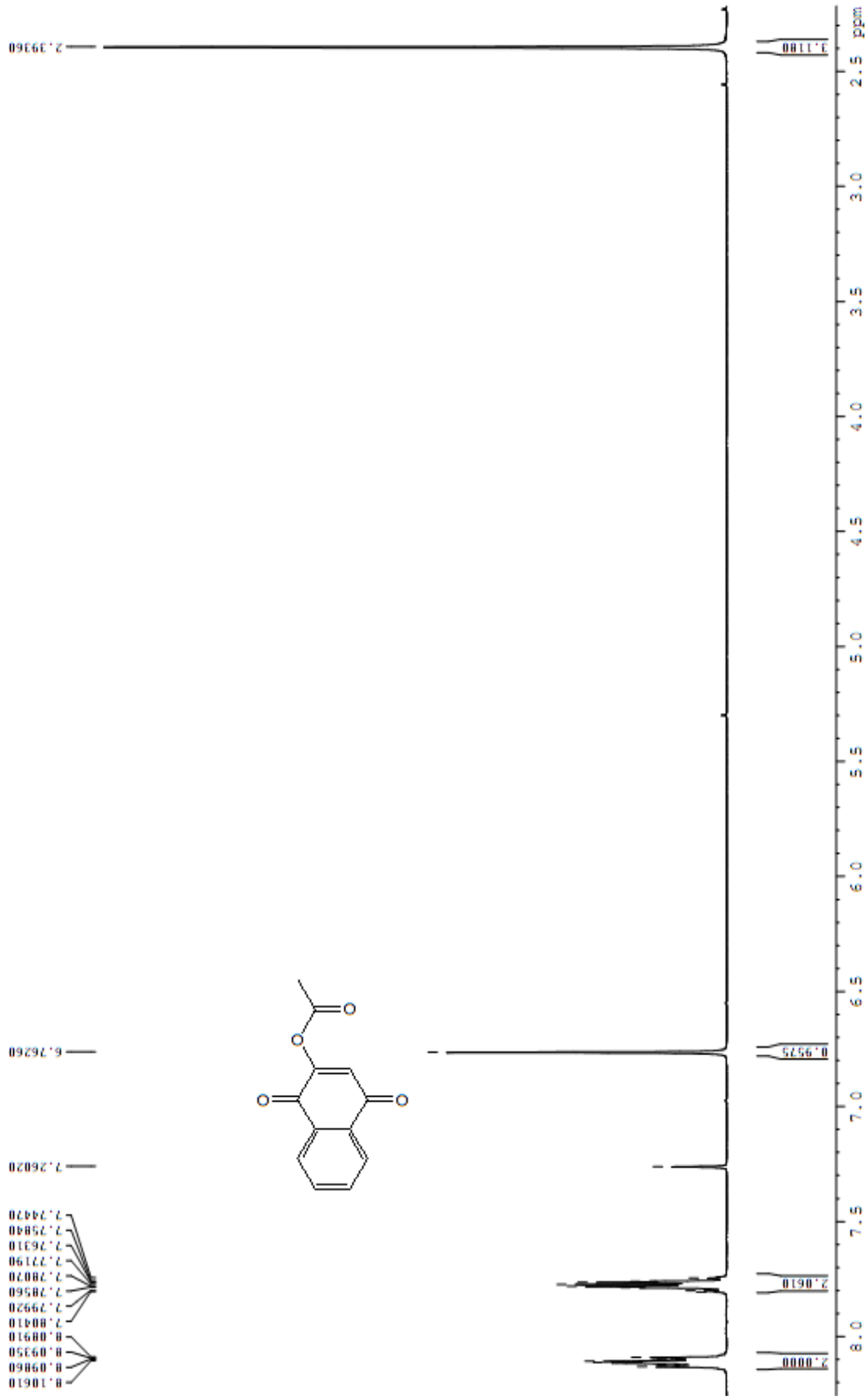
Figura A-4: Espectro HMBC compuesto 2-metoxinaftalen-1,4-diona (**15**).

ANEXO B: ESPECTRO DEL COMPUESTO 1,4-DIOXI-1,4-DIHIDRONAFTALEN-2-IL ACETATO 16



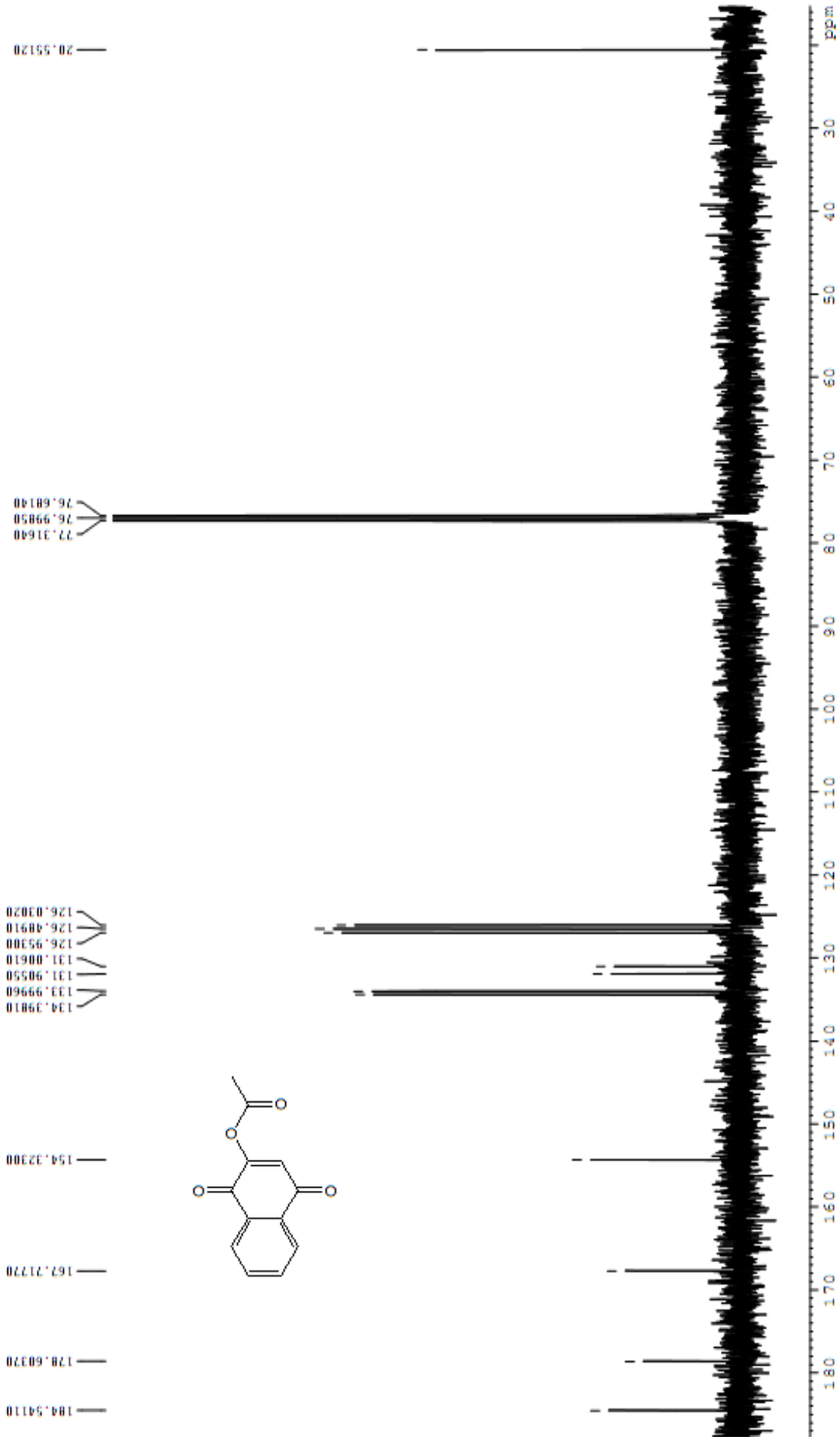
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro THERMO SCIENTIFIC modelo FT IR 6700

Figura B-1: Espectro IR compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il acetato (**16**).



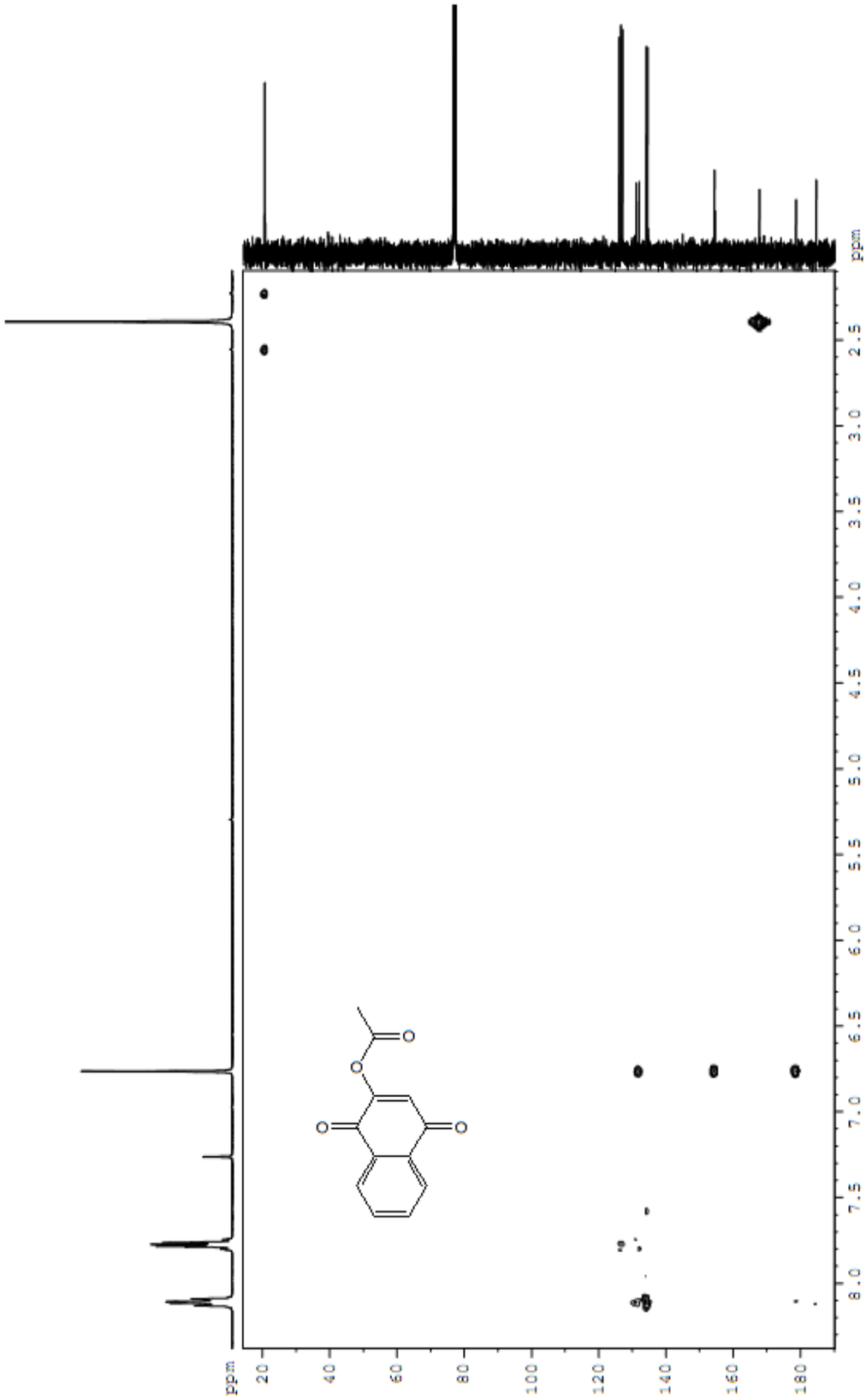
Fonte: Espectro obtenido com Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

Figura B-2: Espectro ^{1}H RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il acetato (**16**).



Fuente:Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

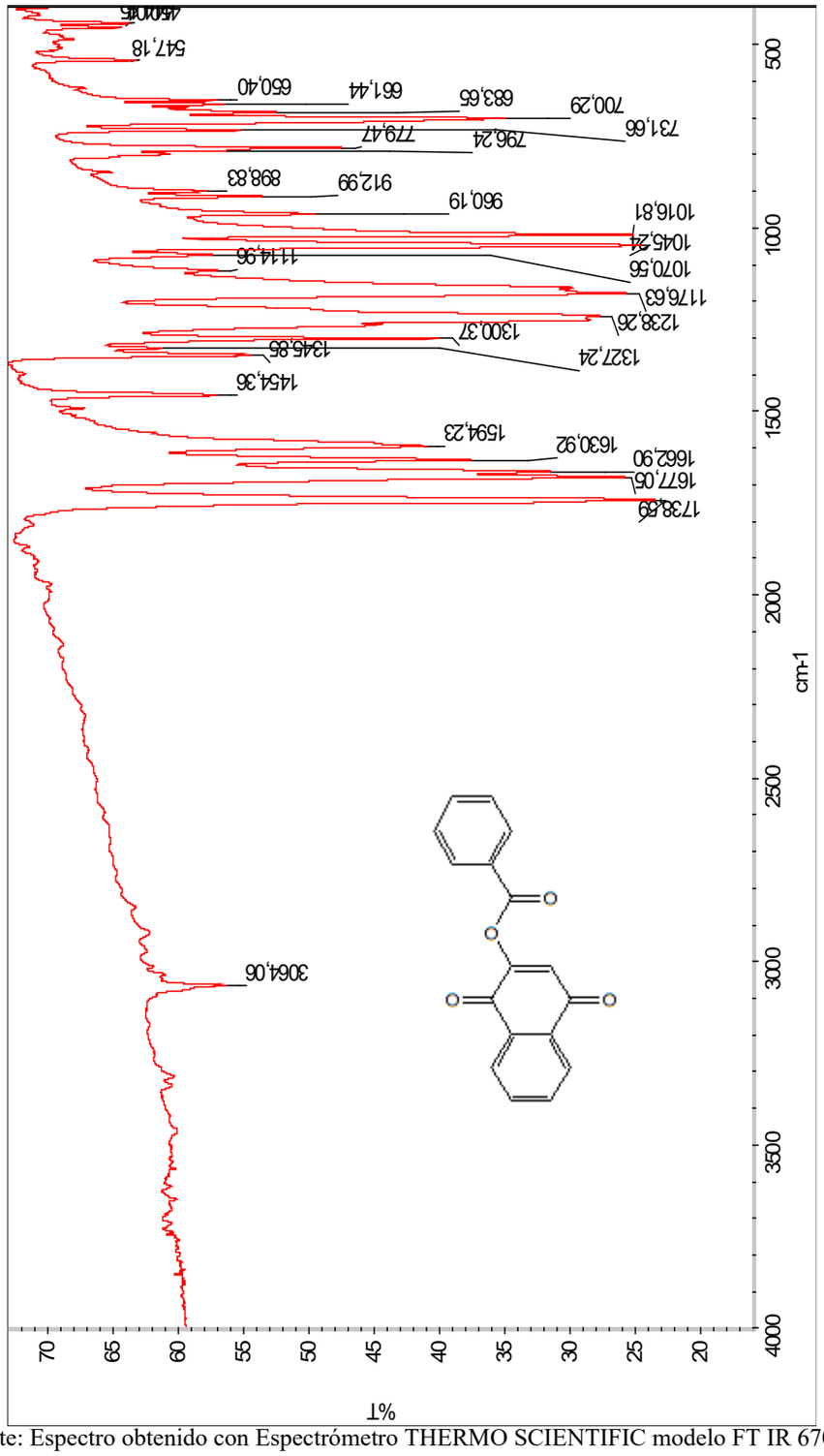
Figura B-3: Espectro ^{13}C RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il acetato (**16**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

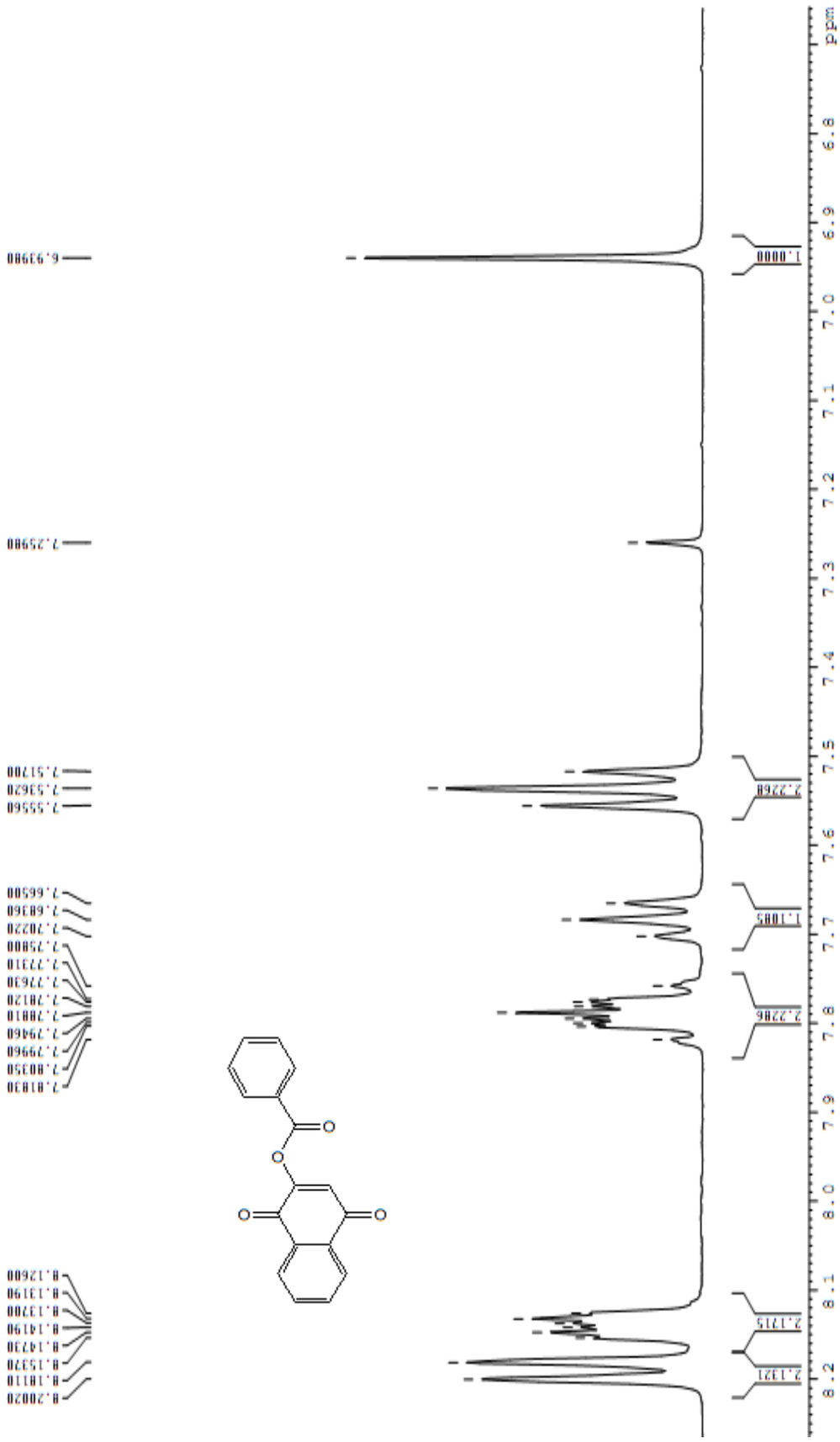
Figura B-4: Espectro HMBC compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il acetato (**16**).

ANEXO C: ESPECTROS DEL COMPUESTO 1,4-DIOXI-1,4-DIHIDRONAFTALEN-2-IL BENZOATO 35



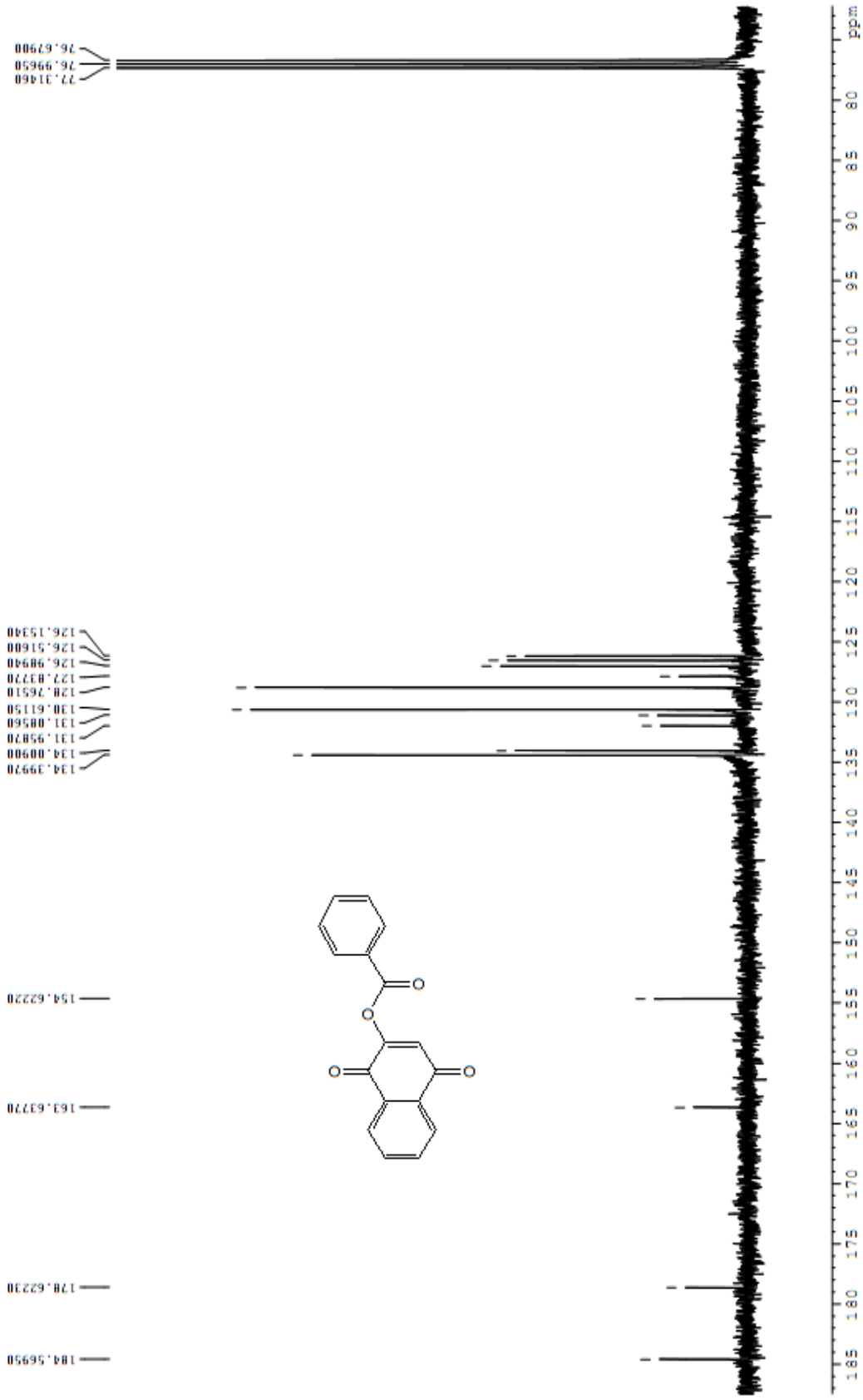
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro THERMO SCIENTIFIC modelo FT IR 6700

Figura C-1: Espectro IR compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il benzoato (**35**).



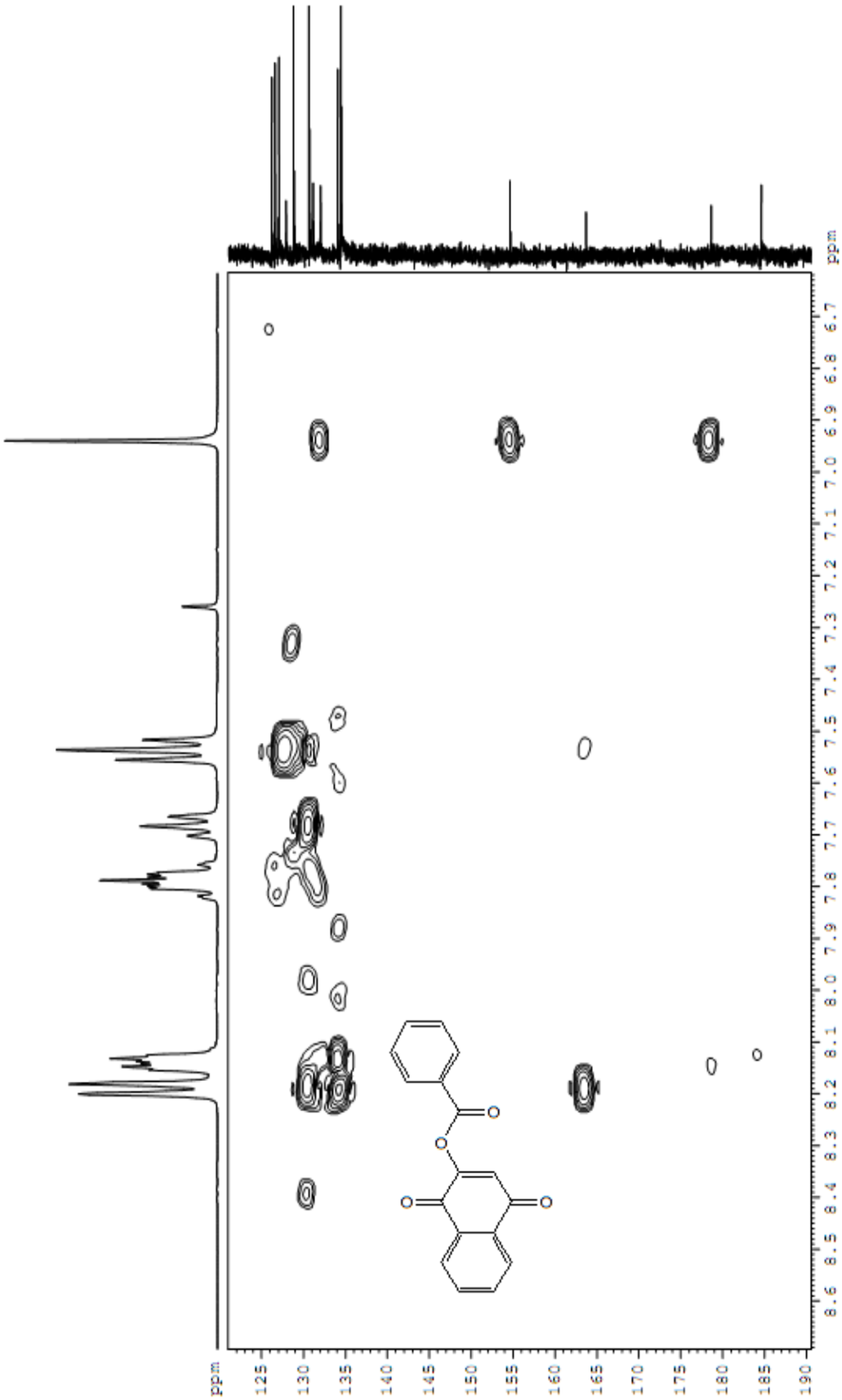
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

Figura C-2: Espectro ^{1}H RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il benzoato (**35**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

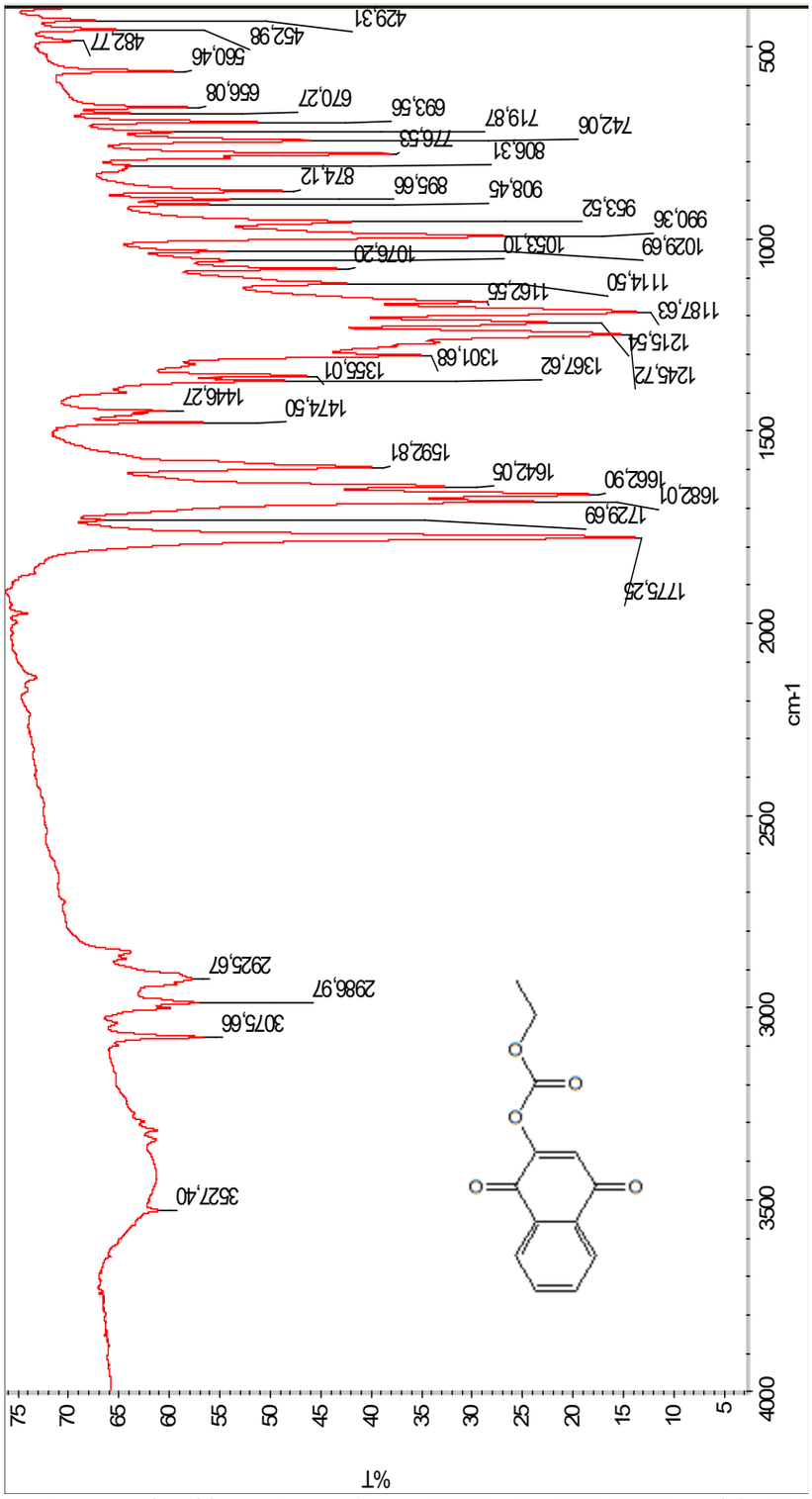
Figura C-3: Espectro ^{13}C RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il benzoato (**35**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

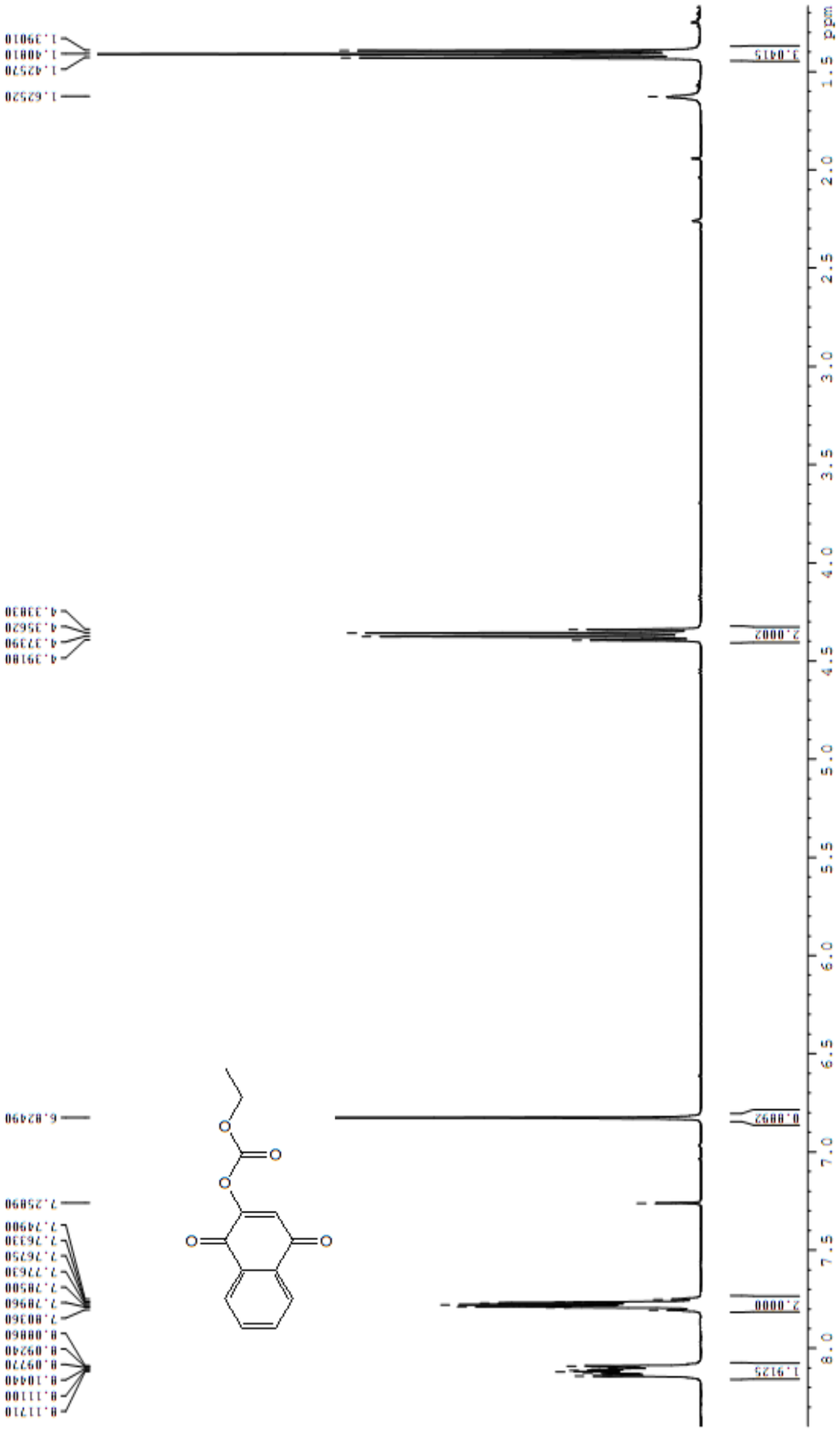
Figura C-4: Espectro HMBC compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il benzoato (**35**).

ANEXO D: ESPECTROS DEL COMPUESTO 1,4-DIOXI-1,4-DIHIDRONAFTALEN-2-IL ETIL CARBONATO 37



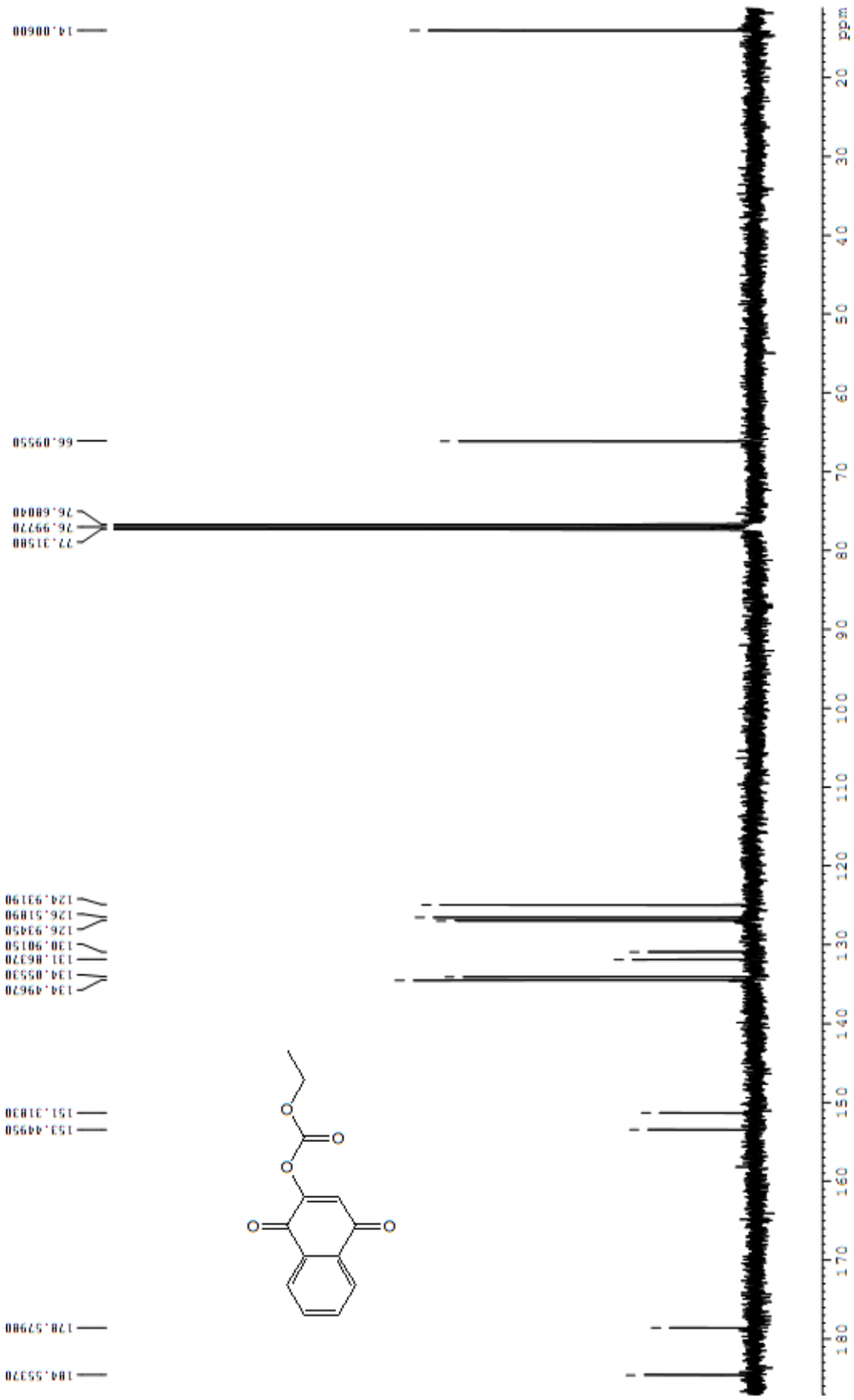
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro THERMO SCIENTIFIC modelo FT IR 6700

Figura D-1: Espectro IR compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il etil carbonato (**37**).



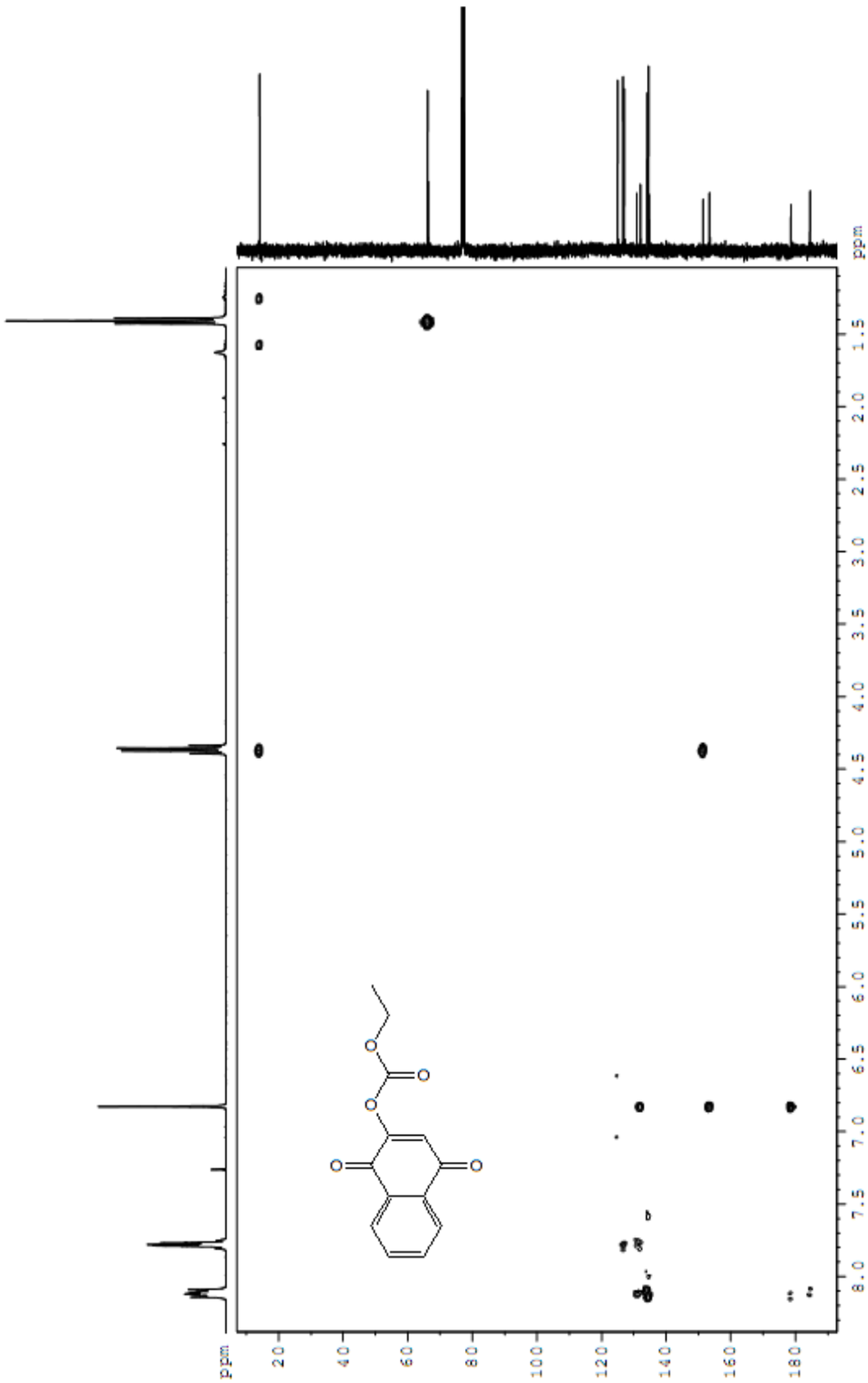
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

Figura D-2: Espectro ^{1}H RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il etil carbonato (**37**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

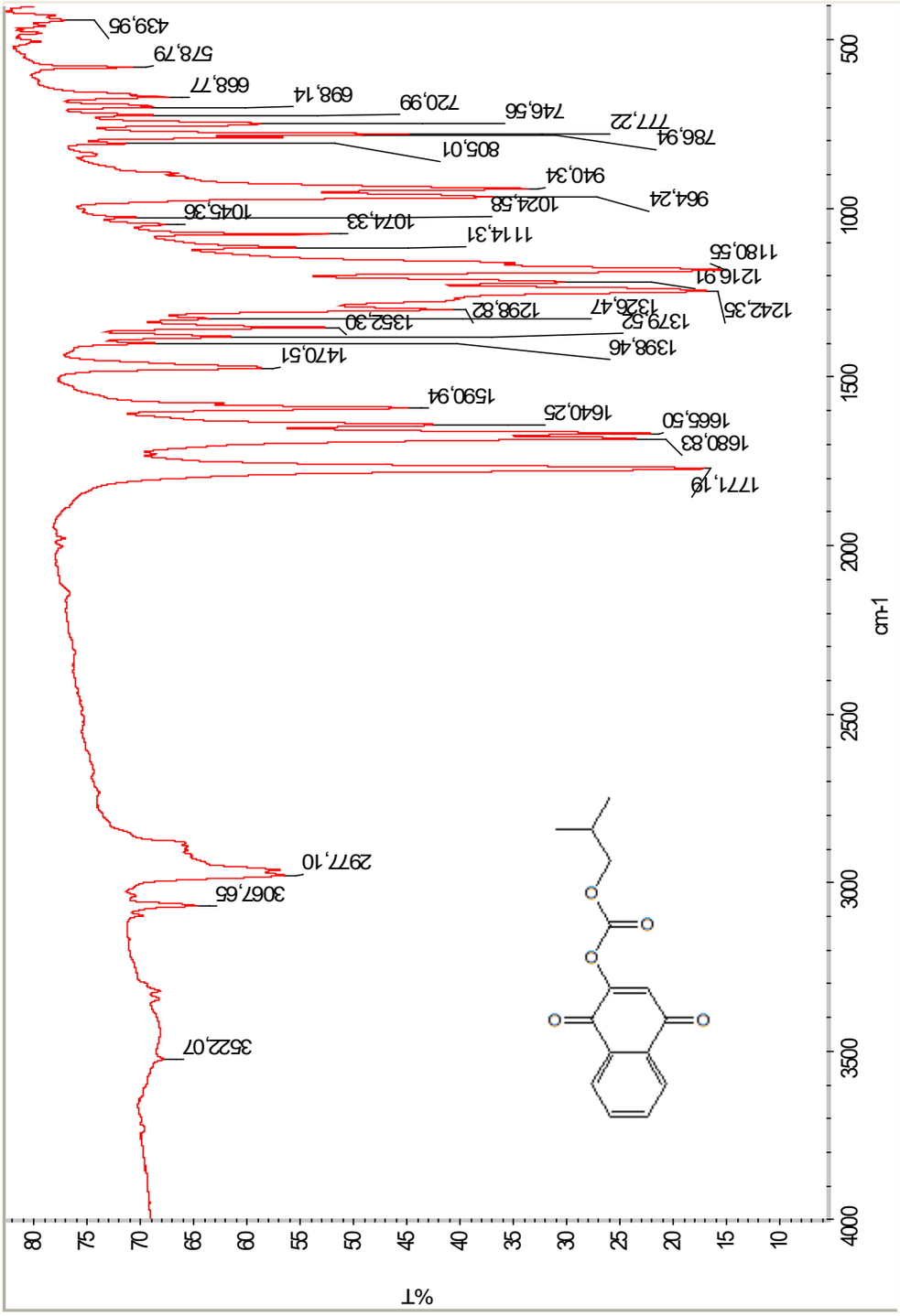
Figura D-3: Espectro ^{13}C RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il etil carbonato (**37**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

Figura D-4: Espectro HMBC compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il etil carbonato (**37**).

ANEXO E: ESPECTROS DEL COMPUESTO 1,4-DIOXI-1,4-DIHIDRONAFTALEN-2-IL ISOBUTIL CARBONATO 39

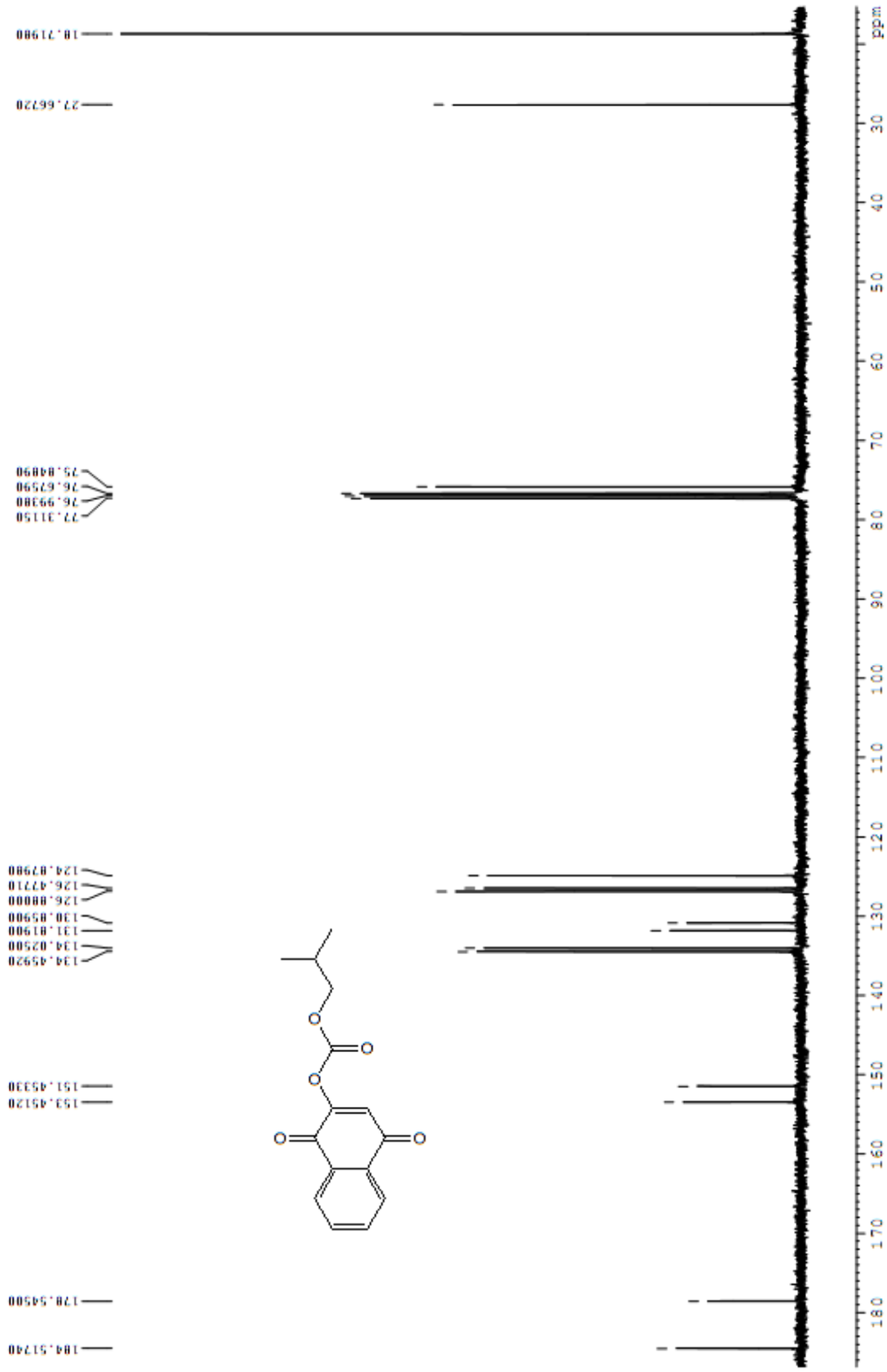


Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro THERMO SCIENTIFIC modelo FT IR 6700

Figura E-1: Espectro IR compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il isobutil carbonato (**39**).

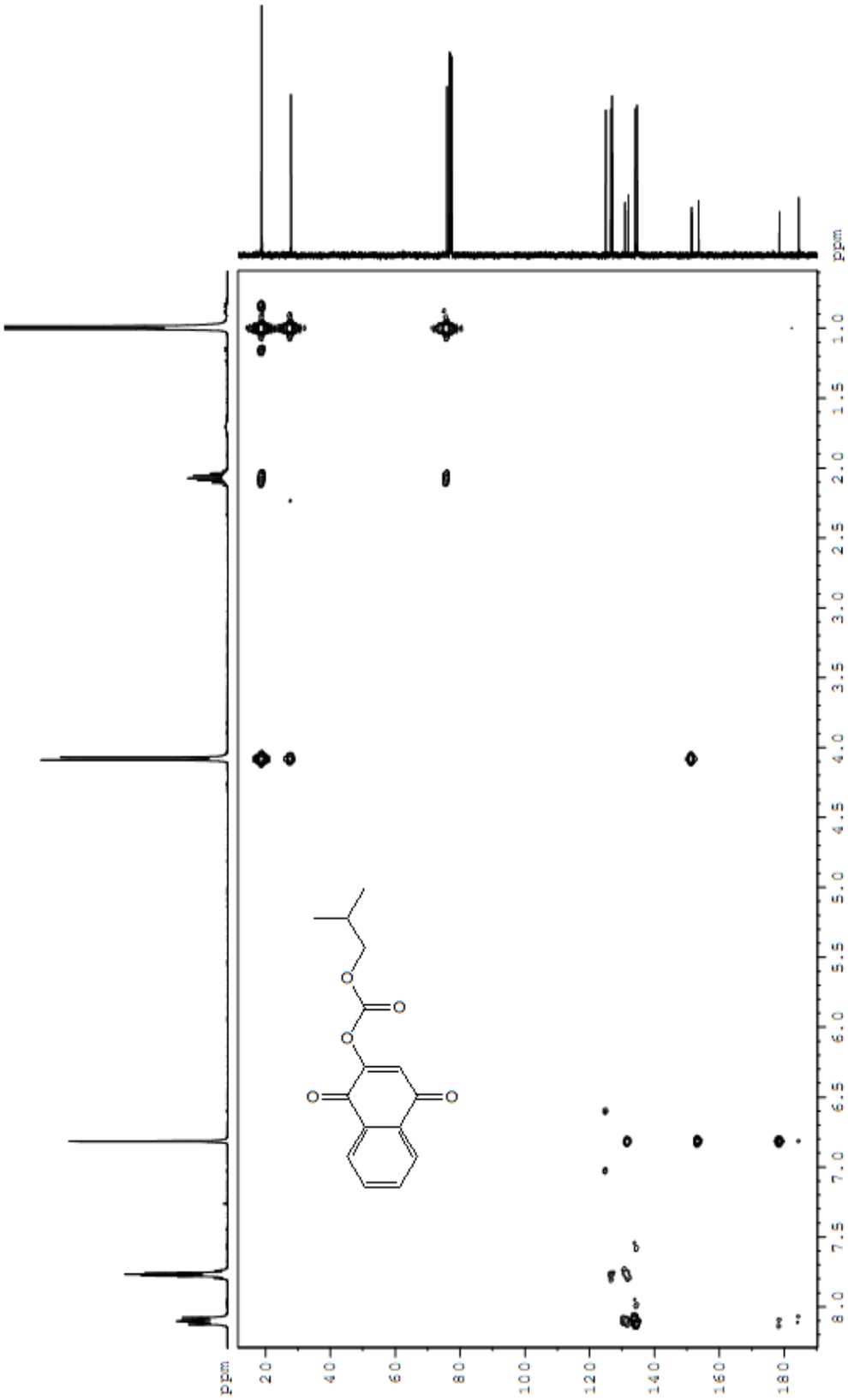
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

Figura E-2: Espectro ^{1}H RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il isobutil carbonato (**39**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

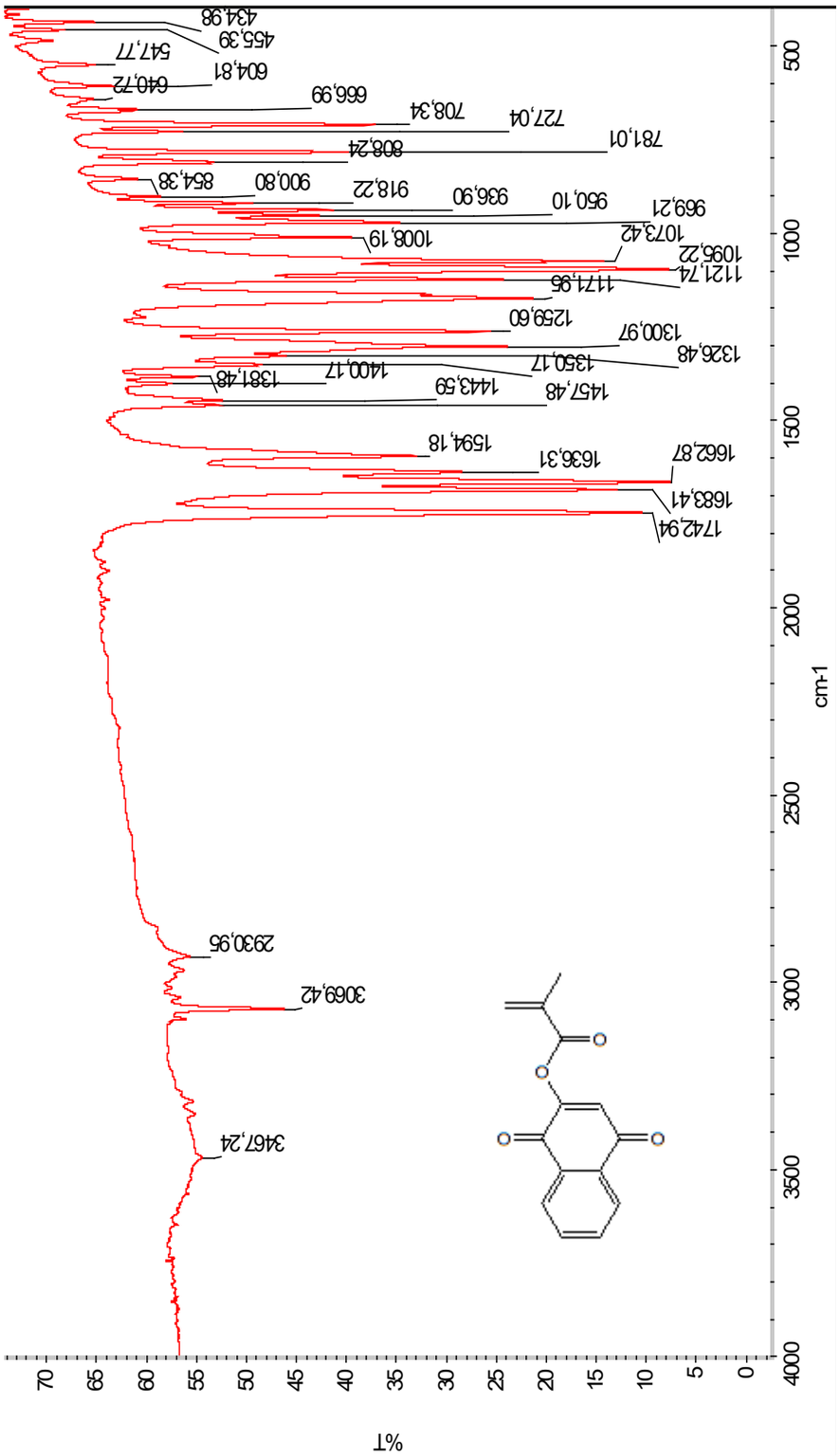
Figura E-3: Espectro ^{13}C RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il isobutil carbonato (**39**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

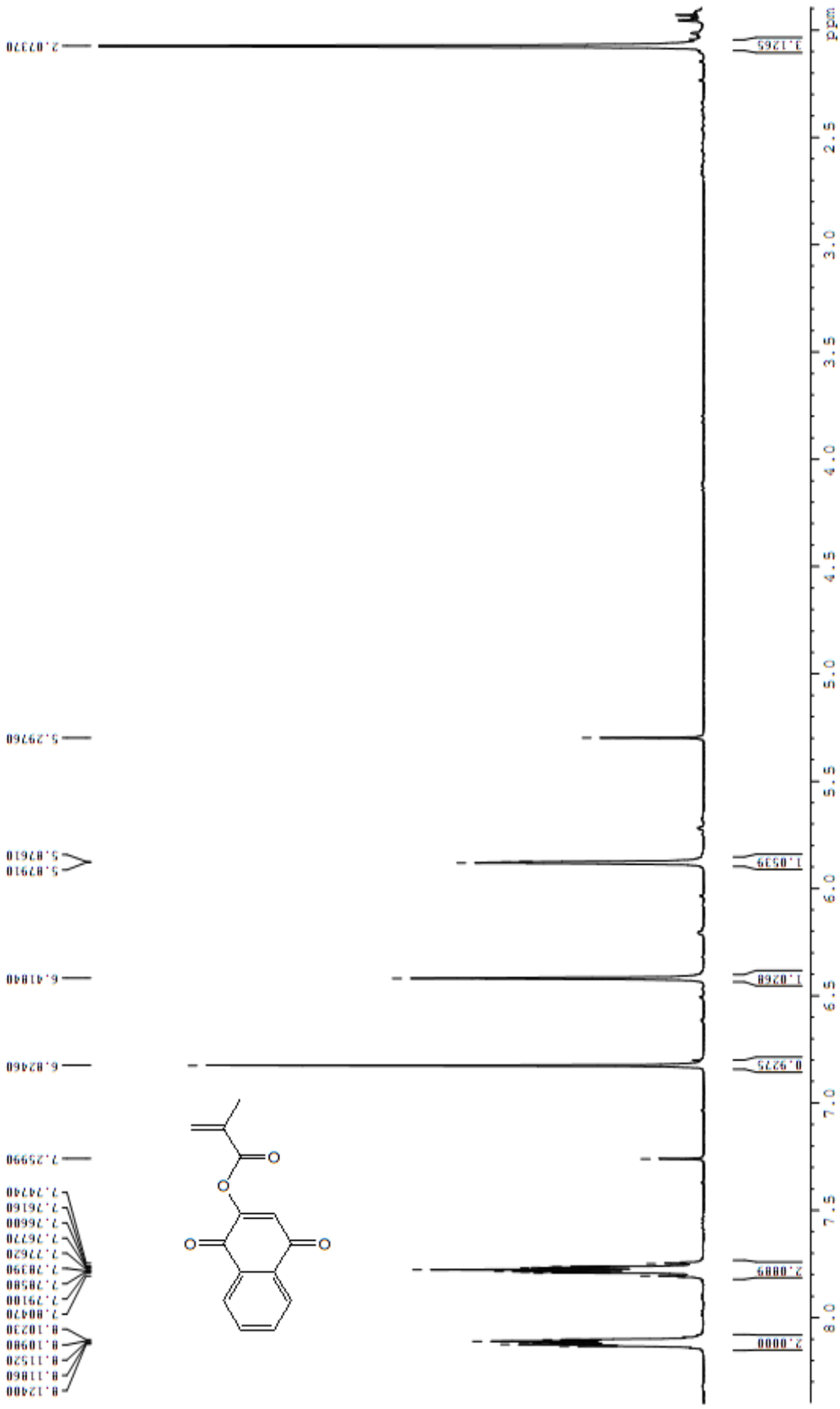
Figura E-4: Espectro HMMC compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronafthalen-2-il isobutil carbonato (**39**).

ANEXO F: ESPECTROS DEL COMPUESTO 1,4-DIOXI-1,4-DIHIDRONAFTALEN-2-IL METACRILATO 41



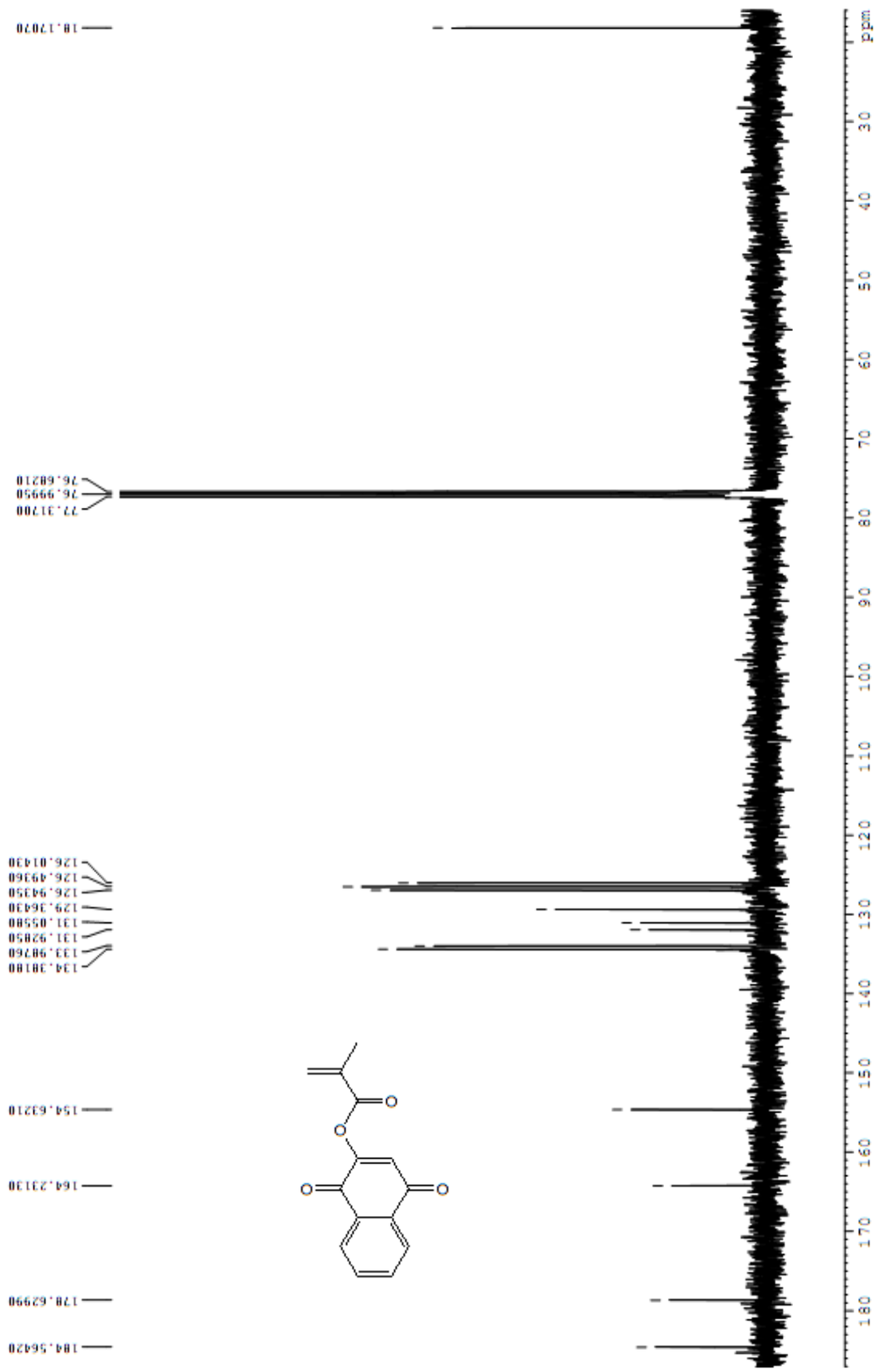
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro THERMO SCIENTIFIC modelo FT IR 6700

Figura F-1: Espectro IR compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il metacrilato (**41**).



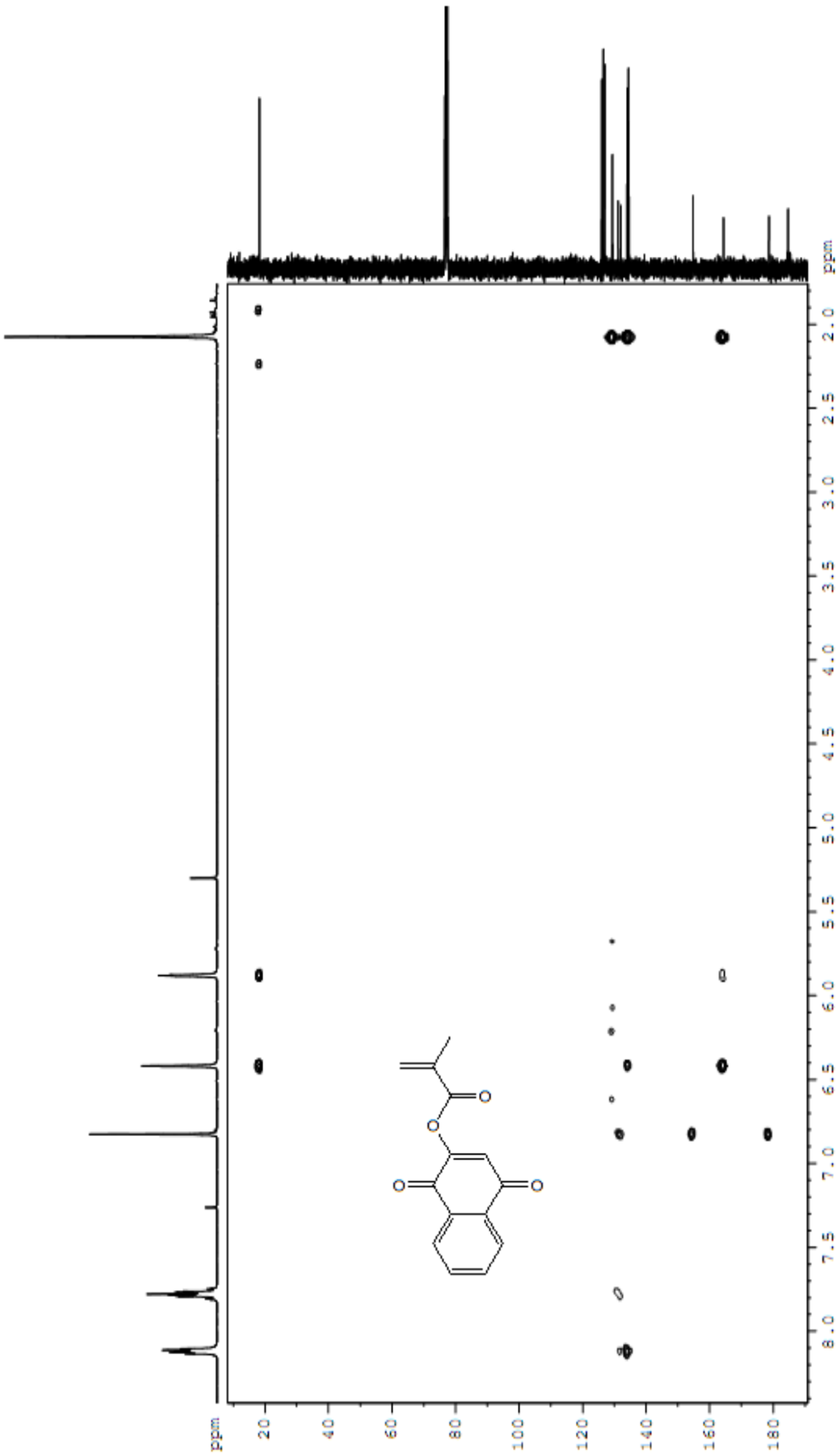
Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

Figura F-2: Espectro ^{1}H RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il metacrilato (**41**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

Figura F-3: Espectro ^{13}C RMN compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il metacrilato (**41**).



Fuente: Espectro obtenido con Espectrómetro de RMN BRUKER modelo Advance-400

Figura F-4: Espectro HMBC compuesto 1,4-dioxi-1,4-dihidronaftalen-2-il metacrilato (**41**).