Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

“SINTESIS DE DERIVADOS DE 2-ALILFENOL CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIFUNGICA SOBRE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* RANDS”

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología.

Director: Prof. Rolando Martínez Jorquera
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Andrés Bello

Co-Director: Dr. Héctor Carrasco Altamirano

Co-Director: Dra. Katy Díaz Peralta

CLAUDIA ANDREA SEDÁN CHACÓN

Viña del Mar, Chile.

AGOSTO, 2019.

Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

“SINTESIS DE DERIVADOS DE 2-ALILFENOL CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIFUNGICA SOBRE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* RANDS”

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología.

Director: Prof. Rolando Martínez Jorquera
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Andrés Bello

Co-Director: Dr. Héctor Carrasco Altamirano
Facultad de Ingeniería
Instituto de Química Aplicada
Universidad Autónoma de Chile

Co-Director: Dra. Katy Díaz Peralta
Departamento de Química
Universidad Técnica Federico Santa María

CLAUDIA ANDREA SEDÁN CHACÓN

Viña del Mar, Chile.

AGOSTO, 2019.

Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

"SINTESIS DE DERIVADOS DE 2-ALILFENOL CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIFUNGICA SOBRE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* RANDS"

CLAUDIA ANDREA SEDÁN CHACÓN

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Memoria de Título, Profesor Rolando Martínez Jorquera. Laboratorio de Síntesis y productos naturales, Universidad Andrés Bello. (Y co-dirigida por el Dr. Héctor Carrasco Altamirano., Instituto de Química Aplicada, Universidad Autónoma de Chile y Dra. Katy Díaz Peralta., Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María)

Prof. Rolando Martínez J.	Dr. Héctor Carrasco A.	Dra. Katy Díaz P.
Director	Co- Director de Tesis	Co- Director de Tesis

Dr. Juan Carlos Velásquez	Mg. María Soledad Campano R.
Comisión Evaluadora	Comisión Evaluadora

Dra. María Isabel Oliver P.

Directora de Carrera Ingeniería en Biotecnología

Viña del Mar, Chile. Agosto 2019

Agradecimientos:

Agradezco al profesor Rolando Martínez J. al Dr. Héctor Carrasco A. y al Dr. Andrés Olea C. por haberme formado como profesional, por brindarme todo el apoyo posible dentro de este tiempo y por haber confiado en mí en todos estos años siendo parte de su grupo de investigación. Sin duda, todo este tiempo me hizo crecer como persona y profesional en el área de la investigación, son un gran pilar para mí.

A la Universidad Nacional Andrés Bello, junto con la facultad de Ingeniería en Biotecnología, ya que me brindaron el espacio para que esta investigación se realizara y también por todo el apoyo posible que me entregaron dentro de mi vida universitaria.

A la Dra. Katy Diaz P. Por el apoyo brindado en la realización de la investigación en el área Biológica, como también en el apoyo de otros aspectos de esta investigación.

A mis padres y hermana, que sin duda son un pilar fundamental en mi vida y les agradezco por estar siempre presente. A mis padres que sin su apoyo moral y económico no hubiera llegado nunca a la realización como profesional. Gracias por creer en mí y nunca dejarme caer.

Finalmente, quiero agradecer a Mario Thomas E. mi compañero y pololo durante todo este paso universitario. Ha sido mi soporte en esta vida universitaria, mi contención y mi cómplice. Estaré siempre agradecida de todo el cariño y compañerismo que me has brindado tanto en mi vida universitaria como personal.

INDICE: **Pág.**

1. Resumen **9**

Abstract **10**

2. Introducción **11**

2.1 Productos naturales y antifúngicos 12

2.2 Antecedentes de *Ginkgo biloba* y 2-alilfenol 12

2.3 Síntesis orgánica 13

2.4 Técnicas espectroscópicas 14

2.5 Problemática de la enfermedad provocada por *Phythophthora cinnamomi* Rands la "Tristeza del palto" 16

2.6 Hipótesis 19

3. Materiales y métodos **20**

3.1 Materiales 20

3.2 Metodología 22

3.2.1 Síntesis 2-alil-6-nitrofenol (C2) y Síntesis 2-alil-4,6-dinitrofenol (C5) 22

3.2.2 Síntesis 2-alilfenol acetato (C7) 23

3.2.3 Síntesis 2-alil-4-nitrofenil acetato (C8) y Síntesis 2-alil-6-nitrofenil acetato (C9) 23

3.2.4 Síntesis 1-alil-2-metoxibenceno (C4) 24

3.2.5 Síntesis 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno (C3) 25

3.2.6 Síntesis 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno (C6) 25

3.2.7 Síntesis 2-alil-4-nitrofenol (C10) 26

3.3 Ensayo de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* en *Phytophthora cinnamoni* Rands. 27

4. Resultados **28**

4.1 Síntesis química 28

4.1.1 Análisis espectroscópico de los compuestos sintetizados 28

4.2 Actividad Biológica: 31

4.2.1 Inhibición crecimiento micelial en *Phytophthora cinnamomi* Rands *in vitro* 31

4.2.1.1 Bioensayo de la inhibición del crecimiento radial *de Phytophthora cinnamomi* de los compuestos sintetizados a diferentes concentraciones. 31

4.2.2 Valores de EC50 33

5. Discusión **34**

6. Conclusión y proyecciones **38**

7. Referencias **39**

INDICE IMÁGENES Y TABLAS **Pág.**

Figura 1: Espectro electromagnético 14

Figura 2: Frecuencias de absorción de infrarrojo 15

Figura 3: (A) Necrosis del tallo provocado por *Phytophthora cinnamomi* Rands y (B) Necrosis de raíz provocado *por Phytophthora cinnamomi* Rands 17

Figura 4. Derivados 2-alilfenol. 18

Figura 5. (a) 2-alil-6-nitrofenol y (b) 2-alil.4, 6-dinitrofenol. 22

Figura 6. 2-alilfenol acetato 23

Figura 7. (a) 2-alil-6-nitrofenil acetato y (b) 2-alil-4-nitrofenil acetato 23

Figura 8. 1-alil-2-metoxibenceno 24

Figura 9. 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno 25

Figura 10. 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno 25

Figura 11. 2-alil-4-nitrofenol 26

Figura 12. Efecto in vitro de algunos derivados de 2-alilfenol 31

Tabla 1: Porcentaje de inhibición sobre *Phytophthora cinnamomi* Rands *in vitro.* 32

Tabla 2: Valores de EC_{50} 33

ANEXO **44**

Espectro RMN ^{1}H 2-Alil-6-nitrofenol 45
Espectro RMN ^{13}C 2-Alil-6-nitrofenol 46
Espectro IR 2-Alil-6-nitrofenol 47
Espectro RMN ^{1}H 2-alil-4,6-dinitrofenol 48
Espectro RMN ^{13}C 2-alil-4,6-dinitrofenol 49
Espectro IR 2-alil-4,6-dinitrofenol 50
Espectro RMN ^{1}H 2-alilfenol acetato 51
Espectro RMN ^{13}C 2-alilfenol acetato 52
Espectro IR 2-alilfenol acetato 53
Espectro RMN ^{1}H 2-alil-4-nitrofenil acetato 54
Espectro RMN ^{13}C 2-alil-4-nitrofenil acetato 55
Espectro IR 2-alil-4-nitrofenil acetato 56
Espectro RMN ^{1}H 2-alil-6-nitrofenil acetato 57
Espectro RMN ^{13}C 2-alil-6-nitrofenil acetato 58
Espectro IR 2-alil-6-nitrofenil acetato 59
Espectro RMN ^{1}H 1-alil-2-metoxibenceno 60
Espectro RMN ^{13}C 1-alil-2-metoxibenceno 61
Espectro IR 1-alil-2-metoxibenceno 62
Espectro RMN ^{1}H 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno 63
Espectro RMN ^{13}C 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno 64
Espectro IR 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno 65
Espectro RMN ^{1}H 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno 66
Espectro RMN ^{13}C 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno 67
Espectro IR 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno 68
Espectro RMN ^{1}H 2-alil-4-nitrofenol 69
Espectro RMN ^{13}C 2-alil-4-nitrofenol 70
Espectro IR 2-alil-4-nitrofenol 71

ABREVIATURAS

CCF o TLC	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
°C	Grados Celsius
cm^{-1}	Centímetros a la menos 1
d	Doblete
DMAP	Dimetilaminopiridina
EC_{50}	Concentración que causa una inhibición del 50% del crecimiento del micelio
g	Gramos
h	Horas
Hz	Herz
IR	Espectroscopia infrarroja
J	Constante de acoplamiento
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mmol	Milimoles
m	Multiplete
MHz	Mega Herz
PDA	Agar papa dextrosa
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAG	Servicio Agrícola Ganadero
Sp.	Especie
ug	Microgramos
δ	Desplazamiento químico

Resumen

Phytophthora cinnamomi, es considerada hoy en día como uno de los fitopatógenos que causa uno de los mayores daños en la producción del palto, principalmente debido a su rápida y fácil propagación, causando graves daños a la industria agrícola y forestal en muchos países del mundo. Actualmente hay muchos compuestos químicos que inhiben el crecimiento de *Phytophthora*, así como la infección que causa en sus huéspedes. De estos compuestos, los que han demostrado una mayor efectividad contra *P. cinnamomi* son las fenilaminas como el metalaxil y los fosfitos como fosetil-Al. Sin embargo, hoy en día la sociedad demanda cada vez más el uso de nuevos pesticidas que sean menos nocivos para el medio ambiente y la sociedad, por lo tanto, esto ha llevado a la reconsideración por parte de la industria agrícola, a incentivar el uso de insumos con un alto potencial ecológico. En esta investigación, se sintetizaron 9 derivados de 2-alilfenol, siendo sus estructuras confirmadas por espectroscopia infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN). Para evaluar la actividad antifúngica se realizó el ensayo *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial, donde los compuestos 2-alil-4,6-dinitrofenol (C5), 2-alil-4-nitrofenol (C10) y 2-alil-4-nitrofenil acetato (C8) inhiben el crecimiento micelial sobre *Phytophthora cinnamomi* presentando un EC_{50} de 8,7; 10,3 y 10,4 µg / mL respectivamente, indicando que la presencia de grupos nitro en la posición “para” respecto al grupo hidroxilo aumenta la actividad antifúngica de estos derivados. Por lo tanto, los resultados expuestos sugieren que algunos de estos compuestos podrían ser de interés agrícola debido a su actividad antifúngica contra *P. cinnamomi.*

Abstract

Phytophthora cinnamomi, is considered today as one of the phytopathogens that causes one of the greatest damages in avocado production, mainly due to its rapid and easy spread, causing serious damage to the agricultural and forestry industry in many countries of the world. Currently there are many chemical compounds that inhibit the growth of *Phytophthora,* as well as the infection it causes in its hosts. Of these compounds, those that have demonstrated greater effectiveness in *P. cinnamomi* are phenylamides such as metalaxyl and phosphites such as fosetyl-Al. However, today society increasingly demand the use of new pesticides that are less harmful to the environment and society, therefore this has led to reconsideration by the agricultural industry, encouraging the use of inputs with a high ecological potential. In this research, 9 derivatives of 2-allylphenol were synthesized, their structures being confirmed by infrared spectroscopy (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR). To evaluate the antifungal activity, the in vitro test of inhibition of mycelial growth was carried out, where the compounds 2-allyl-4,6-dinitrophenol (C5), 2-allyl-4-nitrophenol (C10) and 2-allyl-4- nitrophenyl acetate (C8) inhibits mycelial growth on Phytophthora cinnamomi presenting an EC_{50} of 8.7; 10.3 and 10.4 µg / mL respectively, indicating that the presence of nitro groups in the "para" position with respect to the hydroxyl group increases the antifungal activity of these derivatives. Therefore, the exposed results suggest that some of these compounds could be of agricultural interest due to their antifungal activity against *P. cinnamomi.*

2. INTRODUCCION:

2.1 Productos naturales y antifúngicos:

El ser humano desde su origen ha procurado su bienestar y una gran parte lo ha encontrado en la naturaleza buscando soluciones a distintas problemáticas del vivir, debido a esto el estudio científico y el uso adecuado de sustancias de origen natural con fines terapéuticos, ha sido de gran ayuda para lograr este fin.

El término "*producto natural*", se aplica a aquellos compuestos orgánicos de origen natural que son específicos de un organismo o que son comunes a un pequeño grupo de organismos estrechamente relacionados. Los productos naturales son compuestos que el hombre emplea en diversos ámbitos, ya sea como medicina, estimulante, narcótico, alucinógeno, antibiótico, insecticida, herbicida, fungicida, entre otros (1). Los fungicidas, son sustancias tóxicas que se emplean para impedir el crecimiento o eliminar hongos y mohos perjudiciales para las plantas y animales (2). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos ha provocado resistencias en los fitopatógenos, es decir, una reducción adquirida y heredable de la sensibilidad de un hongo a un principio activo antifúngico específico (3), por lo cual los patógenos obtienen la habilidad de adaptación a diferentes condiciones agronómicas normalmente adversas, y por lo tanto pueden sobrevivir. Por esto es necesario encontrar una nueva alternativa para el control de los fitopatógenos ofreciendo seguridad para el medio ambiente y una eficiente opción agronómica (4) a través del uso de metabolitos secundarios de plantas que poseen propiedades biológicas con importancia contra plagas de hongos (5). Las plantas seleccionadas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como fungicidas naturales, deben ser de fácil cultivo y con principios activos potentes, con alta estabilidad química y de óptima producción (6). Un gran número de productos medicinales han sido desarrollados a partir de extractos obtenidos de plantas, y en base a esta experiencia se considera que éstas constituyen una fuente importante de compuestos con actividad biológica (7). Estos compuestos son generalmente metabolitos secundarios, los cuales son sustancias químicas no nutricionales que controlan la biología de otras especies en el entorno (8). Muchos de estos poseen actividad insecticida, antifúngica y antibacteriana (9,10). Así, en la búsqueda de alternativas más económicas y efectivas para el tratamiento de las enfermedades producidas por hongos en cultivos de gran importancia económica, como lo es el palto, el estudio de metabolitos secundarios se ha convertido en un área de investigación de creciente interés. En los últimos años se han aislado, identificado y estudiado una serie de metabolitos secundarios que han mostrado interesante

actividad biológica, entre ellas actividad anti-cancerígena (11), anti-diabética (12), hepatoprotectiva (13), anti-bacterial (14), entre otras. Con respecto a la actividad biológica sobre fitopatógenos, se encuentran estudios sobre *Botrytis cinerea,* donde se demostró la actividad antifúngica de drimenol, un sesquiterpeno extraído desde el Canelo (*Drymis winteri*) un árbol nativo de Chile, así como derivados hemisínteticos de este, tales como: nordrimenona, drimenol acetato y drimenol-epoxi-acetato. En dicho estudio, el drimenol fue el compuesto que presentó una mayor actividad, con un EC_{50} de 80 ppm en el ensayo de inhibición del crecimiento micelial, el cual fue el más cercano en comparación al control positivo (BC-1000) sobre *B. cinerea* (15). En estudios realizados por Carrasco *et. al* en el año 2019, se demostró que Eugenol (metabolito secundario extraído a partir del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)), así como sus derivados hemisintéticos poseen actividad contra *B. cinerea* (16). Por otro lado, Madrid en el 2015 (17), demostró que el Bakuchiol, un exudado de 3 meroterpenos obtenido desde las hojas de culen (*Psoralea glandulosa*) y derivados de estos presentan actividad sobre *B. cinerea* y *P. cinnamomi.* Así mismo, en la investigación realizada por Diaz en el 2018, se demostró que el compuesto 3,14,15-trihídroxilabd-8-eno extraído desde el exudado reinoso de la melosa (*Media sativa*) logra una inhibición del 94,6% sobre *P.cinnamomi* (18). Estos antecedentes relevantes demuestran que diversos metabolitos secundarios extraídos de cortezas, hojas, etc. presentan actividad antifúngica relacionada a la inhibición miceliar en el hongo.

2.2 Antecedentes de *Ginkgo biloba* y 2-alilfenol.

El *Ginkgo biloba* es un árbol utilizado desde hace siglos en la medicina tradicional China, japonesa e Hindú. Es el árbol viviente más antiguo que existe, y es por esto por lo que es considerado por algunos como un precioso y tenue eslabón entre el presente y el remoto pasado. En el libro de medicina más antiguo que se conoce (Pents'ao), el emperador chino Shen Nun hacía referencia a sus bondades para el corazón y el pulmón debido a las propiedades terapéuticas conferidas a sus hojas (19).

Ginkgo tiene una amplia variedad de fitoquímicos, incluyendo alcanos, lípidos, esteroles, benzenoides, carotenoides, fenilpropanoides, carbohidratos, flavonoides y terpenoides (20). Los fenilpropanoides, se definen como un componente principal dentro de los metabolitos secundarios de las plantas, donde cumplen diversas funciones biológicas (21). Entre los compuestos más importantes, se encuentra el 2-alilfenol, el cual se extrae del exoesperma del fruto del *Ginkgo biloba,* siendo este, un compuesto con actividad anti-bacterial, antitumoral y antifúngica (22). Sin embargo, el 2-alilfenol se encuentra disponible en el comercio para su fácil

adquisición, teniendo un 99% de pureza (Merck KGaA,). Por otra parte, extractos de hoja de *Ginko biloba* presentan actividad sobre desórdenes neurológicos y daños neuronales (23), poseen efecto anti-inflamatorio (24), anti-ansiedad (25), anti-tumoral (26).

Si bien, los metabolitos secundarios extraídos de diversas plantas, frutos etc., presentan actividad biológica, ésta se puede ver potenciada mediante hemisíntesis, es decir construcción planificada de moléculas orgánicas mediante reacciones químicas de transformación (27). Dentro de la hemisíntesis las reacciones son variadas encontrando reacciones como nitración, reducción, metilación, acetilaciones entre otras, que pueden aumentar o mermar la actividad biológica frente a algún patógeno o línea celular. Por ejemplo, en un estudio reportado por Carrasco *et al* 2008 se demostró que en derivados hemisintéticos del Eugenol que presentan grupos nitro e hidroxilo, estos aumentan la actividad sobre líneas celulares cancerosas de próstata y carcinoma humano (28), así como también presentan actividad antifúngica sobre hongos humanos tales como *C. albicans, Candida spp, Cryptococcus neoformans* y dermatofitos (29).

2.3 Síntesis orgánica

La síntesis de compuestos es una construcción de moléculas orgánicas mediante distintas reacciones químicas, la cual tiene como objetivo principal la producción de una cantidad importante de producto puro de la forma más económica posible (30). Hay dos campos principales de investigación dentro del área de la síntesis orgánica: La síntesis total, que consiste en obtener la molécula objetivo utilizando como sintón de partida metano y la síntesis parcial, se habla de hemisintesis, que corresponde a un procedimiento sintético en que se utilizan como productos de partida, productos naturales que a su vez pueden obtenerse por procedimientos sintéticos o por degradación de otros productos (31).

Dentro de las reacciones de síntesis, es necesario tener en cuenta la sustitución electrofílica aromática, esta permite la introducción de grupos sustituyentes que luego pueden convertirse en otros, incluyendo anillos aromáticos adicionales. Cualquier grupo unido al anillo bencénico, afectará su reactividad y determinará la orientación en la estructura. Cuando el electrófilo ataca el anillo, el grupo ya enlazado establecerá la facilidad del ataque y en qué lugar sucederá. Cuando el sustituyente unido al anillo hace que este sea más reactivo, se le llama grupo activante y si hace que sea menos reactivo, es un grupo desactivante. Dichos grupos pueden orientar ataques en las posiciones orto y para (orientadores orto-para) o también facilitar la unión en posición meta (orientador meta) (32).

2.4 Técnicas espectroscópicas

Dentro de las técnicas que destacan en la espectroscopía para elucidar la estructura de un compuesto se encuentran, la espectroscopía infrarroja (IR) y la resonancia magnética nuclear (RMN). A pesar de ser técnicas distintas, todas ellas están basadas en la absorción de energía por una molécula y examinan cómo dicha molécula responde a esa absorción. Con respecto a la energía que absorbe la molécula, corresponde a la radiación electromagnética, la cual es un tipo de campo electromagnético variable, es decir, una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, que se propagan a través del espacio transportando energía de un lugar a otro. Cuando una molécula se expone a una radiación, puede absorber un fotón y aumentar así su energía. Las moléculas son muy selectivas con respecto a la frecuencia de la radiación que absorben, ya que los fotones de frecuencias específicas son absorbidos por la molécula dependiendo de su estructura molecular (33).

2.4.1 Infrarrojo (IR).

Si bien, la RMN proporciona más información sobre la estructura de un compuesto desconocido, el IR es de gran utilidad en la identificación de la presencia de ciertos grupos funcionales dentro de una molécula, lo que no realiza la RMN.

La radiación infrarroja es la porción del espectro electromagnético (Figura 1) entre las ondas microondas y la luz visible. La fracción de la región infrarroja de más uso para determinación de estructuras es entre 2,5 x 10^{-6} m y 16 x 10^{-6} m en longitud de onda (34).

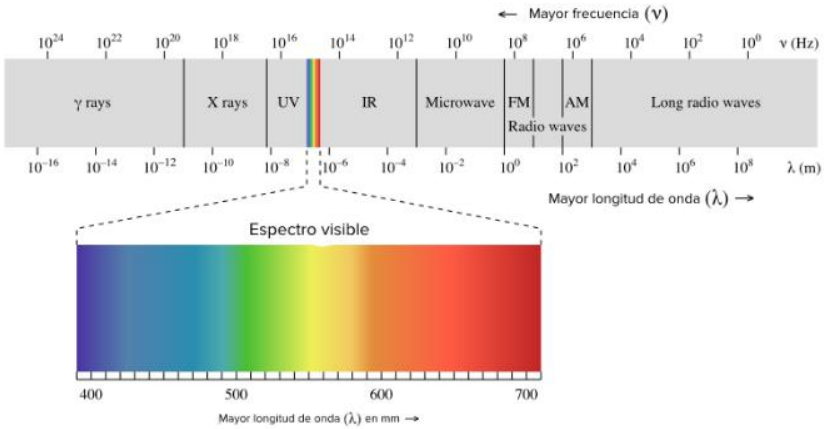


Figura 1. Espectro electromagnético. El espectro electromagnético se extiende desde la radiación de menor longitud de onda, como los rayos gamma y los rayos X, pasando por la radiación ultravioleta, la luz

visible y la radiación infrarroja, hasta las ondas electromagnéticas de mayor longitud de onda, como son las ondas de radio (34).

El equipo de IR registra la separación entre las energías de los estados de vibración de los enlaces que conforman las moléculas orgánicas. La absorción de un fotón de radiación IR excita a la molécula desde el lado vibracional más bajo (fundamental) hasta uno más alto. Estas vibraciones, incluyen las tensiones y flexiones de los enlaces. Al usar la espectroscopia de IR para la determinación de estructuras, por lo general, se destacan los intervalos entre 4000 a 1600 cm^{-1}, porque es en esta región en la cual se encuentran las vibraciones características de los grupos funcionales particulares. La región 1300 a 625 cm^{-1} se conoce como la región de huella dactilar, es aquí donde existe una variación entre un compuesto y otro. En la imagen 2 se encuentra una lista con las frecuencias (número de ondas) asociadas con una variedad de grupos encontrados por lo común en compuestos orgánicos (34).

TABLA 13.4 Frecuencias de absorción de infrarrojo de algunas unidades estructurales comunes

Unidad estructural	Frecuencia, cm^{-1}	Unidad estructural	Frecuencia, cm^{-1}
Vibraciones de alargamiento			
Enlaces sencillos		**Enlaces dobles**	
—O—H (alcoholes)	3 200 a 3 600		1 620 a 1 680
—O—H (ácidos carboxílicos)	2 500 a 3 600		
	3 350 a 3 500		
		Aldehídos y cetonas	1 710 a 1 750
sp C—H	3 310 a 3 320	Ácidos carboxílicos	1 700 a 1 725
sp^2 C—H	3 000 a 3 100	Anhídridos de ácido	1 800 a 1 850 y 1 740 a 1 790
sp^3 C—H	2 850 a 2 950	Halogenuros de acilo	1 770 a 1 815
sp^2 C—O	1 200	Ésteres	1 730 a 1 750
sp^3 C—O	1 025 a 1 200	Amidas	1 680 a 1 700
		Enlaces triples	
		—C≡C—	2 100 a 2 200
		—C≡N	2 240 a 2 280
Vibraciones de torsión con valor de diagnóstico			
Alquenos:		***Derivados sustituidos del benceno:***	
$RCH{=}CH_2$	910, 990	Monosustituidos	730 a 770 y 690 a 710
$R_2C{=}CH_2$	890	Orto-disustituidos	735 a 770
cis-RCH=CHR′	665 a 730	Meta-disustituidos	750 a 810 y 680 a 730
trans-RCH=CHR′	960 a 980	Para-disustituidos	790 a 840
$R_2C{=}CHR'$	790 a 840		

Figura 2. Frecuencias de absorción de infrarrojo de algunas estructuras comunes de química (34). Lista con las frecuencias (número de ondas) asociadas a una variedad de grupos.

2.4.2 Resonancia magnética nuclear (RMN).

La espectroscopia de RMN es hoy en día una de las herramientas analíticas más poderosas en investigación química empleada, principalmente, en la elucidación de estructuras moleculares. La RMN es una técnica espectroscópica que estudia la absorción y emisión de radiación electromagnética por los núcleos de ciertos átomos bajo la influencia de un campo magnético (35). Se basa entonces, en las transiciones entre los estados de espín nuclear. Al igual que el electrón, el protón tiene 2 estados de espín nuclear (+1/2 y -1/2) y normalmente entre ellos no hay diferencia de energía. La RMN genera un campo magnético externo capaz de alterar la energía de cada espín generando la diferencia de energía entre un estado y otro (36).

2.5 Problemática de la enfermedad provocada por *Phythophthora cinnamomi* la "Tristeza del palto"

Chile es el principal exportador de fruta fresca del hemisferio sur y uno de los más importantes del mundo con productos líderes como la uva, arándanos, cerezas, kiwis, paltas, ciruelas, nectarines entre otros (37). La fruta conforma el tercer sector más importante de la economía nacional, tanto por el empleo como por el nivel de inversiones generadas. En este contexto, el palto es uno de los principales productos exportados por Chile. En 2017, el volumen de palta exportada al mercado chino superó las 13.000 toneladas, sustituyendo a México como el mayor proveedor de este fruto para China y en 2018 podría alcanzar las 18.000 toneladas (38).

Desde el punto de vista fitosanitario, en nuestro país, el palto (*Persea americana Mill*) presenta escasa incidencia de agentes fitopatógenos en comparación a otros lugares de producción en el mundo. Sin embargo, en los huertos se ha determinado agentes que se manifiestan como enfermedad, dependiendo del estado fisiológico de los árboles y de las condiciones particulares del lugar de producción y que tienen importancia económica para este frutal (39).

El hongo *Phytophthora cinnamomi*, responsable de la tristeza del palto, la cual es la enfermedad más importante que afecta a esta especie frutal, tiene una distribución mundial y un rango de hospederos que se aproxima a 5,000 especies (40). Además de causar pérdidas económicas sustanciales en la agricultura, la silvicultura y la horticultura.

Phytophthora es un Oomycetes, una clase en *Phylum Pseudofungi* dentro del reino *Chromista* (40). Se define como *Chromista* debido a la producción de esporas asexuales móviles que poseen un flagelo adornado por pelos tubulares que son responsables del movimiento (41,42). Para

muchas especies de *Phytophthora*, las esporas móviles son el principal agente infeccioso que inicia la enfermedad de las plantas. La especie, se ha clasificado entre los 10 principales agentes patógenos de las plantas por su importancia científica y económica (43). El hongo infecta principalmente las raíces de absorción de hasta medio centímetro de diámetro, las cuales se tornan negras y quebradizas. Adicionalmente, se observa necrosis en el tronco (además se cree que el agua es fundamental para la diseminación de las esporas), mientras que las raíces pueden dañarse por la anoxia, lo que facilita la penetración y la invasión en las raíces por *P. cinnamomi* (Figura 3 A y B) (44).

A) **B)**

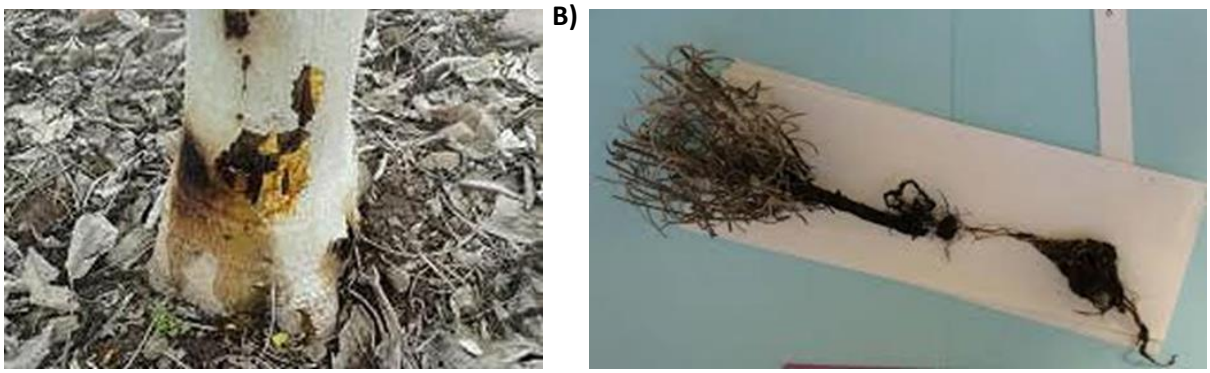


Figura 3. (A) Necrosis del tallo provocado por *Phytophthora cinnamomi* Rands y (B) Necrosis de raíz provocado por *Phytophthora cinnamomi* Rands (44)

El control de la pudrición de la raíz provocada por *Phytophthora* es compleja, ya que requiere prácticas culturales rigurosas y laboriosas tales como: Una combinación de estrategias diseñadas para reducir su actividad y/o aumentar la tolerancia del huésped durante el período de infección (45). Actualmente, para el control de este fitopatógeno se realiza la aplicación de fungicidas químicos y antibióticos. Los fungicidas que contienen fosfito y ácido fosforoso son muy móviles en las plantas y se cree que controlan *Phytophthora spp* (46). Sin embargo, hoy en día se han registrado cepas resistentes, las cuales limitan el uso de fungicidas, lo que ha provocado un aumento en la demanda por el descubrimiento de nuevos fungicidas basados en el uso de productos naturales como metabolitos secundarios, que se encuentran presentes en las plantas siendo potenciales candidatos como nuevos biofungicidas. Se ha demostrado, por ejemplo, que el uso de extracto de *Citronella mucronata* presentó una inhibición del crecimiento micelial sobre *P. cinnamomi* (47) y también en una investigación realizada por Chávez en el 2018, se demostró que una serie de derivados de geranilfenoles / metoxifenol se probaron *in vitro* como agentes inhibidores del crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi* y los resultados mostraron que

son tan activos como el metalaxil (48). Por lo tanto, en base a los antecedentes mencionados anteriormente, en este proyecto de investigación, se propone evaluar distintos derivados hemisintéticos del 2-alilfenol (Figura 4) sobre la inhibición del crecimiento micelial del hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands *in vitro.*

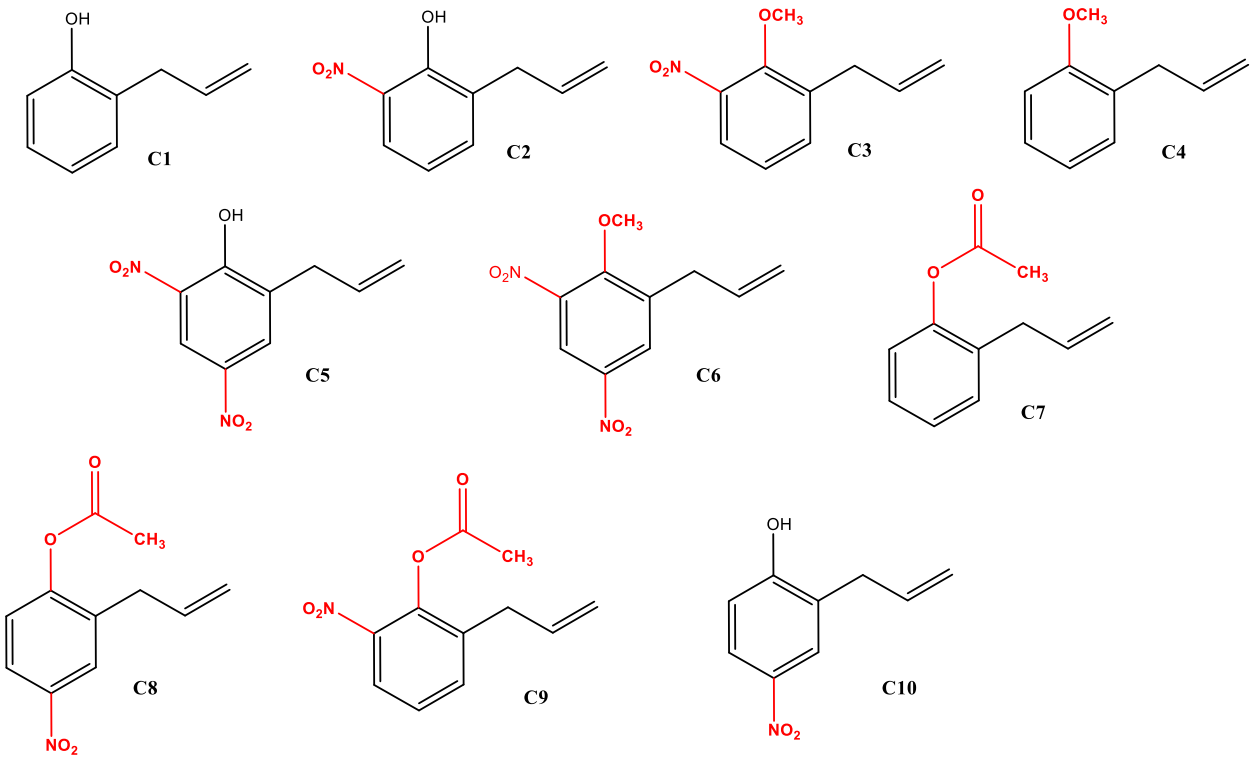


Figura 4. Derivados 2-alilfenol. Moléculas propuestas para evaluar la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi* Rands *in vitro.*

2.6 HIPOTESIS:

- 2-alilfenol y sus derivados hemisintéticos, presentan actividad antifúngica sobre *Phytophthora cinnamoni* Rands *in vitro.*

En base a esta hipótesis, se plantea el siguiente objetivo general:

- Sintetizar nuevos derivados de 2-alilfenol y evaluar su actividad antifúngica sobre *Phytophthora cinnamoni* Rands *in vitro.*

Para llevar a cabo este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar derivados de 2-alilfenol, compuestos C2 a C10 (Figura 4).
- Obtener y analizar los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN ^{1}H y ^{13}C) e infrarrojo (IR) de cada compuesto sintetizado con el fin de confirmar su estructura molecular.
- Evaluar la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi* Rands *in vitro* de los distintos derivados obtenidos de 2-alilfenol.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

- Cámara de revelado para TLC
- Columnas de vidrio de diferentes diámetros para cromatografía
- Embudos de decantación de 100 y 250 ml EM Hirschmann®
- Espátulas
- Frascos de penicilina vacíos, limpios y autoclavados de 8 ml
- Gafas protectoras
- Guantes de látex desechables
- Matraces Erlenmayer de 50, 100, 250 y 500 ml EM Hirschmann®
- Papel filtro Merck®
- Papel para cromatografía de capa fina (TLC) de 20x20 cm Merck®
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml EM Hirschmann®
- Pipetas aforadas de 10 y 25 ml EM Hirschmann®
- Pipeta pasteur
- Pinzas
- Propipetas
- Placas para crecimiento hongo
- Probetas de 10, 25 y 1000 ml Schott DURAN®
- Sílica Gel Geduran®
- Vasos precipitados de 50, 100 y 500 ml EM Hirschmann®

Equipos

- Agitador magnético calefaccionado VELP Scientifica®
- Balanza analítica modelo NewClassic ML204 Mettler Toledo®
- Cámara de flujo laminar clase 2 NUARE®
- Cámara oscura UV Cole-Parmer®
- Estufa de secado Memmert®
- Incubador CO_2 Memmert®
- Espectrofotómetro IR Prestige-21 SHIMADZU
- Máquina para hielo, modelo SKL-SN70, Ningbo Sklon Lab Instrument®
- Rotavapor modelo R-210 basic, BUCHI®

- RMN, bruker 400 ultrashield

Reactivos

- 2-alilfenol (número CAS 1745-81-9) Sigma Aldrich®.
- Acetato de etilo ($C_4H_8O_2$) Sigma-Aldrich®
- Acetona (C_3H_6O) Merck®
- Ácido acético ($C_2H_4O_2$) 1% Winkler LTDA®
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) Merck®
- Ácido nítrico (HNO_3) Merck®
- Anhídrido acético ($C_4H_6O_3$) Merck®
- Carbonato de potasio (K_2CO_3) Merck®
- Diclorometano (CH_2Cl_2) Sigma-Aldrich®
- Dimetilaminopiridina (DMAP; $C_7H_{10}N_2$) Merck®
- Etanol (C_2H_6O) al 99% de pureza Merck®
- Medio de cultivo PDA Difco™
- Metalaxil® ANASAC, Santiago, Chile
- Metanol (CH_4O) Merck®
- n-Hexano (C_6H_{14}) Sigma-Aldrich®
- Nitrato de sodio ($NaNO_3$) Winkler LTDA®
- Silica gel para cromatografía en columna
- Sulfato ácido de potasio ($KHSO_4$) 10% m/v Merck®
- Sulfato de dimetilo ($C_2H_6O_4S$) Merck®
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) Merck®

Cepa de Hongo:

- *Phytophthora cinnamomi* identificada por el servicio agrícola y ganadero (SAG) y facilitada por la Dra. Katy Díaz perteneciente al Departamento de Química de la UTFSM.

3.2 METODOLOGIA

La ruta sintética de derivados de 2-alilfenol consistió en la realización de un total de 9 derivados, los cuales fueron sintetizados mediante reacciones de nitración, metilación y acetilación. El 2-alilfenol (número CAS 1745-81-9) fue adquirido a través de Sigma Aldrich®.

3.2.1 Síntesis 2-alil-6-nitrofenol (C2) y Síntesis 2-alil-4,6-dinitrofenol (C5)

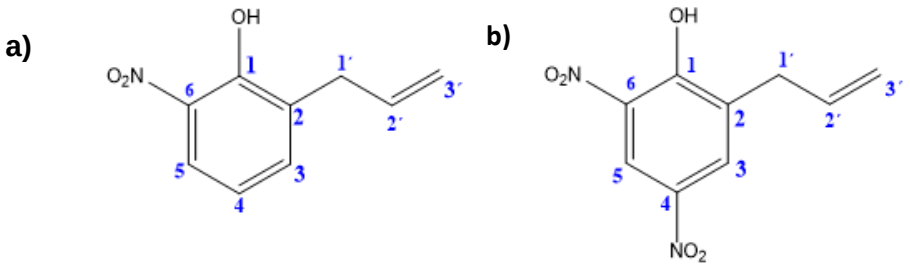


Figura 5. (a) 2-alil-6-nitrofenol y (b) 2-alil.4, 6-dinitrofenol

En un matraz Erlenmeyer de 100 mL en un baño de hielo se adicionó 1 g de 2-alilfenol (7,42 mmol) y se disolvió en 5 mL de diclorometano con agitación constante, luego se agregaron 2 mL de mezcla sulfonítrica (ácido nítrico y ácido sulfúrico). La reacción se da por finalizada con la desaparición del sustrato de partida, confirmado mediante cromatografía en capa fina (CCF) (1:3 acetato de etilo: hexano). Se agregó agua destilada (10 mL) para detener la reacción y separar las fases. La fase orgánica se lavó 3 veces con agua destilada (10 mL cada vez). El compuesto se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo una mezcla de ambos productos que se separaron y obtuvieron puros por cromatografía en columna (CC) (1:9 acetato de etilo: Hexano). Finalmente, los productos fueron pesados (0,285 g de 2-alil-6-nitrofenol (a) [21 % rendimiento] y 0,342 g de 2-alil-4.6-dinitrofenol (b) [20 % de rendimiento]). Los productos fueron caracterizados a través IR y RMN.

3.2.2 Síntesis 2-alilfenol acetato (C7)

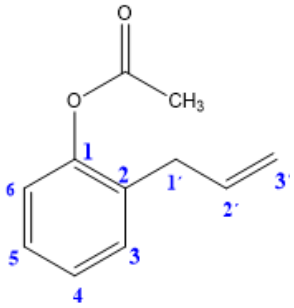


Figura 6. 2-alilfenol acetato (C7)

5 g de 2-alilfenol (37 mmol) se disolvieron en 50 mL de diclorometano, se agregó anhídrido acético (15,5 mL) y dimetilaminopiridina (DMAP; 0,487g o 3,98 mmol). La mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente y la desaparición del producto de partida se confirmó por cromatografía de capa fina (CCF; 1:3 acetato de etilo: hexano). Para detener la reacción se agregó sulfato ácido de potasio al 10% (50 mL) y se separaron las fases. La fase orgánica se dejó secando con sulfato de sodio anhidro, luego se filtró y concentró a presión reducida. El producto puro fue obtenido por columna cromatográfica (CC; Solo hexano) obteniéndose 6,31 g (96% de rendimiento). El producto fue caracterizado a través IR y RMN

3.2.3 Síntesis 2-alil-4-nitrofenil acetato (C8) y Síntesis 2-alil-6-nitrofenil acetato (C9)

a) **b)**

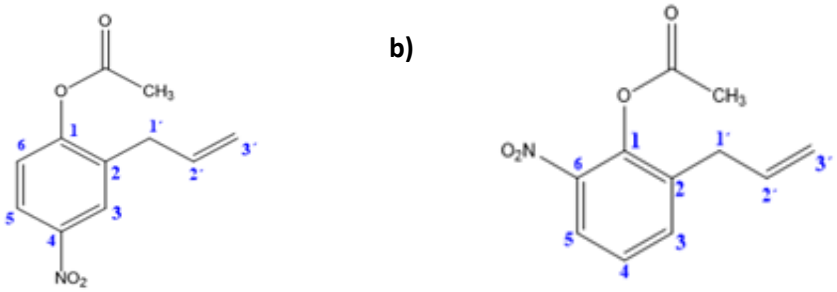


Figura 7. (a) 2-alil-4-nitrofenil acetato (C8) y (b) 2-alil-6-nitrofenil acetato (C9)

En un matraz Erlenmeyer de 100 mL en baño de hielo se adicionó 1 g de 2-alilfenol acetato (5,71 mmol) disuelto en 8 mL de diclorometano con agitación constante, luego se agregaron 2 mL de mezcla sulfonítrica (ácido nítrico y ácido sulfúrico). La reacción se dio por finalizada con la desaparición del sustrato de partida, confirmando mediante cromatografía en capa fina (CCF)

(1:3 acetato de etilo: hexano). Se agregó agua destilada (10 mL) para detener la reacción y separar las fases. La fase orgánica se lavó 3 veces con agua destilada (10 mL cada vez). El compuesto se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo una mezcla de ambos productos que se separaron y obtuvieron puros por cromatografía en columna (CC) (solo hexano). Finalmente, los productos se pesaron (0,087 g de 2-alil-4-nitrofenil acetato (b) [7% rendimiento] y 0,047 g de 2-alil-6-nitrofenil acetato (a) [4% rendimiento]. Los productos fueron caracterizados a través IR y RMN.

3.2.4 Síntesis 1-alil-2-metoxibenceno (C4)

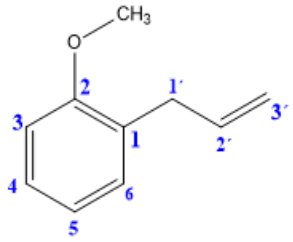


Figura 8. 1-alil-2-metoxibenceno (C4)

Se pesó 1 g de 2-alilfenol (7,42 mmol) disuelto en 120 mL de acetona y carbonato de potasio (5,5 g o 39,8 mmol). Luego se agregó 4,85 mL de sulfato de dimetilo y se dejó reaccionando durante toda la noche a 100°C y con sistema de reflujo. La reacción se da por finalizada con la desaparición del sustrato de partida, confirmado mediante cromatografía en capa fina (CCF) (1:3 acetato de etilo: hexano). Se filtró sobre un balón de decantación y se lavó los restos con acetona. Se agregó agua (50 mL) y se extrajo la fase orgánica con diclorometano, lavando 3 veces (50 mL cada vez). La fase orgánica se dejó secando con sulfato de sodio anhídrido. Se filtró y el solvente fue evaporado a presión reducida. El producto puro se obtuvo por CC (1:9 acetato de etilo: hexano) para finalmente ser pesado (0,735 g que equivalen a un 67% de rendimiento). El producto fue caracterizado a través de RMN e IR

3.2.5 Síntesis 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno (C3)

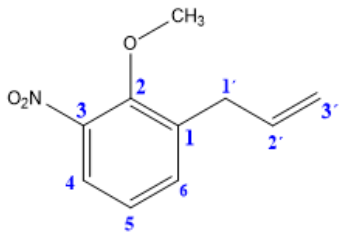


Figura 9. 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno (C3)

Se pesaron 0,5 g de 2-alil-6-nitrofenol (2,23 mmol) disueltos en 45 mL de acetona, a los cuales se agregó carbonato de potasio (2,5 g o 18,1 mmol). Luego se agregaron 2 mL de sulfato de dimetilo y se dejó reaccionando durante toda la noche a 100°C y con sistema de reflujo. La reacción se dio por finalizada con la desaparición del sustrato de partida, confirmado mediante cromatografía en capa fina (CCF) (1:3 acetato de etilo: hexano). Se filtró sobre un balón de decantación y se lavaron los restos con acetona. Se agregó agua (50 mL) y se extrajo la fase orgánica con diclorometano, lavando 3 veces (50 mL cada vez). La fase orgánica se dejó secando con sulfato de sodio anhídrido. Se filtró y el solvente fue evaporado a presión reducida. El producto puro obtenido por CC (1:9 acetato de etilo: hexano), se pesó (0,418 g que equivalen a un 78% de rendimiento). El producto fue caracterizado a través de RMN e IR

3.2.6 Síntesis 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno (C6)

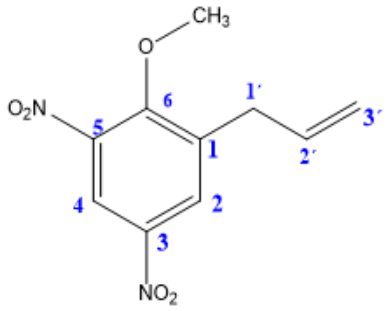


Figura 10. 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno (C6)

Se pesaron 0,530 g (2,37 mmol) disueltos en 30 mL de acetona y posteriormente se agregó carbonato de potasio (1,6 g o 11.8 mmol l) y 1,2 mL de sulfato de dimetilo y se dejó reaccionando durante toda la noche a 100°C con sistema de reflujo. La reacción se dio por finalizada con la desaparición del sustrato de partida, confirmado mediante cromatografía en capa fina (CCF) (1:3

acetato de etilo: hexano). Se filtró sobre un balón de decantación y se lavaron los restos con acetona. Se agregó agua (50 mL) y se extrajo la fase orgánica con diclorometano, lavando 3 veces (20 mL cada vez). La fase orgánica se dejó secando con sulfato de sodio anhídrido. Se filtró y el solvente fue evaporado a presión reducida. El producto puro obtenido por CC (1:9 acetato de etilo: hexano), se obtuvieron 0,380 g que equivalen a un 67% de rendimiento. El producto fue caracterizado a través de RMN e IR

3.2.7 Síntesis 2-alil-4-nitrofenol (C10)

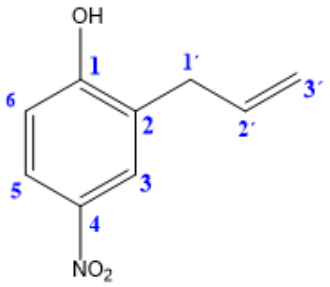


Figura 11. 2-alil-4-nitrofenol (C10)

Se pesaron 0,1 gr de 2-alil-4-nitrofenil acetato (0.452 mmol) disueltos en 5 ml de Metanol. Se le agregaron 0,014 gr (0,1 mmol) de Carbonato de potasio (K_2CO_3) y se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente por 4 horas. La reacción se dio por finalizada con la desaparición del sustrato de partida, confirmado mediante cromatografía en capa fina (CCF) (1:3 acetato de etilo: hexano). La mezcla se llevó a sequedad utilizando el rota vapor. Luego la mezcla se disolvió en acetato de etilo y se extrajo la fase orgánica con diclorometano, lavando 3 veces (10 mL cada vez). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhídrido. Se filtró y el solvente fue evaporado a presión reducida. Se obtuvieron 0,087g del producto puro obtenido por CC (1:9 acetato de etilo: hexano), (que equivalen a un 87% de rendimiento). El producto fue caracterizado a través de RMN e IR

3.3 Ensayo de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* frente a *Phytophthora cinnamoni* Rands

Para la preparación de la solución de stock se procedió de la siguiente manera: los miligramos (mg) disponibles de cada compuesto (rango estimado de 20-60mg), se disolvieron en 1 mL de etanol para luego diluir esta solución en agua destilada estéril hasta llegar a la concentración conocida, para ser aplicada a cada placa Petri según concentración final.

El bioensayo se llevó a cabo Mediante el Test de Difusión *in vitro* (49), también conocido como Test de Envenenamiento Radial, el cual consiste en sembrar un disco de inoculo (4mm) crecido del patógeno en el centro de la placa de Petri de 5 cm de diámetro, con medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa, Difco^{TM}) más los compuestos sintetizados y agregados con anterioridad, a 5 concentraciones distintas (10, 25, 50, 150 y 250 ug/mL) evaluadas de forma independiente y por triplicado. Las placas se incubaron en una incubadora a 24°C por 7 días. Posterior a estos días se evaluó el halo de crecimiento del patógeno en presencia de los compuestos para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo con respecto al control negativo.

Los controles utilizados en este ensayo corresponderán a: control negativo: crecimiento de la cepa *P. cinnamoni* en medio PDA más etanol al 1% y el control positivo, corresponde a crecimiento de *P. cinnamoni* en medio PDA en presencia del fungicida comercial Metalaxil ® (ANASAC, Santiago, Chile) a las mismas concentraciones evaluadas.

Para el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo, para cada tratamiento, se realizó mediante la siguiente formula.

$$\text{Porcentaje de inhibición de cada tratamiento: } \frac{c-t}{c} x100$$

Donde:

C: Promedio del área del crecimiento micelial de las 3 réplicas del control negativo.

t: Promedio del área del crecimiento micelial de las 3 réplicas en presencia del compuesto

A partir de los porcentajes de inhibición micelial y la concentración en (ug/mL), el valor de EC_{50} fueron calculados para cada compuesto usando análisis de regresión lineal con el software Origine 8.0.

4. RESULTADOS

4.1 Síntesis química.

4.1.1 Análisis espectroscópico de los compuestos sintetizados

Para conocer la estructura de los compuestos que se sintetizaron, una vez puros, se enviaron a analizar por métodos espectroscópicos al Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María.

Los resultados se muestran en Anexo como espectros de infrarrojo (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN) de protones (^{1}H) y de carbonos (^{13}C) Para obtener los espectros RMN, los compuestos se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl3) cuya señal se observa en δ = 7.26 ppm para ^{1}H (1 señal) y δ = 77.0 ppm para ^{13}C (3 señales).

- **2-alil-6-nitrofenol (C2)**

  IR (cm^{-1}): 3201 (OH); 3085 (=C-H); 2977 (C-H); 1609 (C=C); 1539 ($-NO_2$); 1448 (C=C); 1329 (N=O); 1249 (C-O-C).

  ^{1}HRMN δ ppm (400.1 MHz, CDCl3): 3.4 (2H, d, 6.52Hz, H1'); 5,51 (2H, m, H3'A, H3'B); 5.9 (1H, m, H2'); 6,9 (1H, m, H4); 7,4 (1H, d, 7,8 Hz, H3); 7.95 (1H, d, 8,56Hz, H5); 10,9 (O-H).

  ^{13}CRMN δ ppm (100.6 MHz, CDCl3): 53,60 (C1'); 116,79 (C3'); 119,46 (C4); 123,08 (C5); 131,40 (C2); 135,10 (C6); 137,46 (C3); 153,27 (C1) (Ver anexo)

- **2-alil-4,6-dinitrofenol (C5)**

  IR (cm^{-1}): 3218 (OH); 3105 (=C-H); 2921 (C-H); 1610 (C=C); 1331 ($-CH_2$); 1552 ($-NO_2$); 1432 (N=O) **^{1}HRMN** δ ppm (400.1 MHz, CDCl3): 11.40 (1H, s, O-H); 8.95 (1H, d, J= 2.7 Hz, H5); 8.34 (1H, d, J= 2.2 Hz, H3); 5.99 (1H, m, H2'); 5.23 (2H, m, H3′); 3.57 (2H, d, J = 6.6 Hz, H1′). **^{13}CRMN** δ ppm (100.6 MHz, CDCl3): 157.3 (C1); 139.7 (C4); 133.8 (C6); 133.2 (C2'); 130.9 (C3); 119.7 (C5); 118.7 (C3'); 33.6 (C1′). (Ver anexo).

- **2-alilfenol acetato (C7)**

  IR (cm^{-1}): 3076 (=C-H); 1756 (C=O); 1637 (C=C); 1367 ($-CH_2$); 1197 (C-O); 1168 (C-O-C).

  ^{1}HRMN δ ppm (400.1 MHz, CDCl3): 2,28 (3H, s, CH3-COO); 3.31 (2H, d, 6,60 Hz, H1'); 5.06 (2H, m, H3'A, H3'B); 5.9 (1H, m, H2'); 6,94 (2H, m, H4, H6); 7,2 (2H, m, H3, H5).**^{13}CRMN** δ ppm (100.6 MHz, CDCl3): 20,77 (CH3-COO); 34,56 (C1'); 111.6 (C6); 116,06 (C3'); 122,29

(C6); 126,05 (C5); 127,31 (C4); 130,27 (C3); 131,79 (C2); 135,79 (C2'); 148,88 (C1) (Ver anexo)

- **2-alil-4-nitrofenil acetato (C8)**

  IR (cm^{-1}): 1767(C=O); 1638 (C=C); 1521 (NO_2); 1344 (N-O); 1183 (C-O); 1166 (C-O-C).

  ^{1}HRMN δ ppm (400.1 MHz, CDCl3): 8.12 (2H, m, H3 y H5); 7.23 (1H, d, 8.8 Hz H6); 5.88 (1H, m, H2′); 5.15 (2H, m, H3′); 3.37 (2H, d, 6.6 Hz, H1'); 2.34 (3H, s, CH_3CO).**^{13}CRMN** δ ppm (100.6 MHz, CDCl3): 168.2 (CO); 153.6 (C4); 145.5 (C1'); 134.0 (C2'); 133.8 (C2); 125.6 (C3); 123.3 (C6); 122.8 (C5); 117.7 (C3'); 34.3(C1'); 20.8 (CH_3CO). (Ver anexo)

- **2-alil-6-nitrofenil acetato (C9)**

  IR (cm^{-1}): 1768(C=O); 1522 (NO_2); 1344 (N-O); 1184 (C-O); 1165 (C-O-C).

  ^{1}HRMN δ ppm (400.1 MHz, CDCl3): 7.95 (1H, dd, 6.6 Hz H5); 7.54 (1H, dd, 6.4 Hz H3); 7.32 (1H, t, 15,8 Hz, H4); 5.86 (1H, m, H2′); 5.13 (2H, m, H3'); 3.38 (2H, d, 6.6 Hz, H1′); 2.37 (3H, d, 9,64 Hz, CH_3CO). **^{13}CRMN** δ ppm (100.6 MHz, CDCl3): 168.3 (CO); 142.4 (C1'); 135.9 (C6); 135.5 (C3); 134.5 (C2'); 121.0 (C2); 117.5 (C3'); 34.4 (C1'); 20.7 (CH_3CO). (Ver anexo)

- **1-alil-2-metoxibenceno (C4)**

  IR (cm^{-1}): 3080 (=C-H); 1522 (C=C); 1344 (CH_3); 1184 (C-O); 1166 (C-O-C). **^{1}HRMN** δ ppm (400.1 MHz, CDCl3): 7.25 (1H, dd, 7.5 Hz H3); 7.18 (1H, t, 10.2 Hz, H5); 6.93 (1H, t, 7.4 Hz, H4); 6.88 (1H, d, 8.2, H6); 6.03 (1H, m, H2′); 5.09 (2H, m, H3′); 3.85 (3H, s, CH_3CO); 3.42 (2H, d, 6.6 Hz, H1'). **^{13}CRMN** δ ppm (100.6 MHz, CDCl3): 157.2 (C1); 137.0 (C2'); 129.7 (C5); 128.6 (C2); 127.3 (C3) (6); 120.5 (C4); 115.3 (C3'); 110.3 (C6); 55.3 (OCH_3); 34.2 (C1′). (Ver anexo)

- **1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno (C6)**

  IR (cm^{-1}): 3094 (=C-H); 2924 (C-H); 1593 (C=C); 1530 ($-NO_2$); 1477 (C=C); 1342 (N=O); 1264 (C-O-C). **^{1}HRMN** δ ppm (400.1 MHz, CDCl3): 8.57 (1H, d, 2.8 Hz H4); 8.30 (1H, d, 2.8 Hz H2); 5.96 (2H, m, H2'); 5.26 (1H, dd, 1.2 Hz, H3′); 3.98 (3H, s, OCH_3); 3.55 (2H, d, 6.6 Hz, H1'). **^{13}CRMN** δ ppm (100.6 MHz, CDCl3): 156,3 (C6); 143 (C3); 142,4 (C1); 138,4 (C2'); 133,9 (C5); 128,8 (C2); 119,5 (C4); 63 (O-C); 33,8 (C3'). (Ver anexo)

- **1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno (C3)**

  IR (cm^{-1}): 3085 (=C-H); 2937 (C-H); 1523 (C=C); 1602 ($-NO_2$); 1353 (N=O); **^{1}HRMN** δ ppm (400.1 MHz, CDCl3): 7,67(1H, d, 1,56 Hz H4); 7,43(1H, m, 10.2 Hz, H5); 7,15 (1H, t, 7.8 Hz,

H6); 5,95 (2H, m, H2'); 5,11 (2H, m, H3′); 3,88 (3H, s, CH_3CO); 3,48 (2H, d, 7,72Hz, H1') **^{13}CRMN** δ ppm (100.6 MHz, CDCl3): 151.4 (C2); 144.2 (C3); 136.4 (C-1); 135.7 (C-2′); 135.0 (C-6); 123.8 (C-5); 123.4 (C4); 117.0 (C-3′); 62.6 (OCH3); 33.5 (C1'). (Ver anexo)

- **2-alil-4-nitrofenol (C10)**

  IR (cm^{-1}): 3353 (O-H); 2929 (C-H); 2361 (C=C); 1586 (NO_2); 1493 (C=C); 1334 (N=O); 1280 (C-O). **^{1}HRMN** δ ppm (400.1 MHz, CDCl3): 8.07 (s, 1H, H3); 8.05 (1H, dd, 7.5 Hz H5); 6.88 (1H, d, 9.1 Hz H6); 6.00 (1H, m, OH); 6.00 (1H, m, H2′); 5.23 (2H, m, H3′); 3.46 (2H, d, 6.2 Hz, H1′); **^{13}CRMN** δ ppm (100.6 MHz, CDCl3): 159.7 (C1); 141.6 (C4); 134.6 (C2'); 126.4 (C2); 126.3 (C3); 124.3 (C5); 118.0 (C3'); 115.8 (C6); 34.6 (C1′). (Ver anexo)

4.2 Actividad biológica

4.2.1 Inhibición del crecimiento micelial frente a *Phytophthora cinnamomi* Rands *in vitro*

4.2.1.1 Bioensayo de actividad antifúngica frente a *Phytophthora cinnamomi*

La actividad antifúngica de los derivados de 2-alilfenol contra *Phytophthora cinnamomi* se determinó midiendo la inhibición del crecimiento del micelio en presencia de diferentes concentraciones de todos los compuestos sintetizados. Los resultados para los compuestos más activos que fueron C5, C10 y C8 se muestran en la figura 12, mientras que los otros compuestos evaluados no se muestran en la figura 12, ya que no presentan una actividad comparable respecto al control positivo Metalaxil.

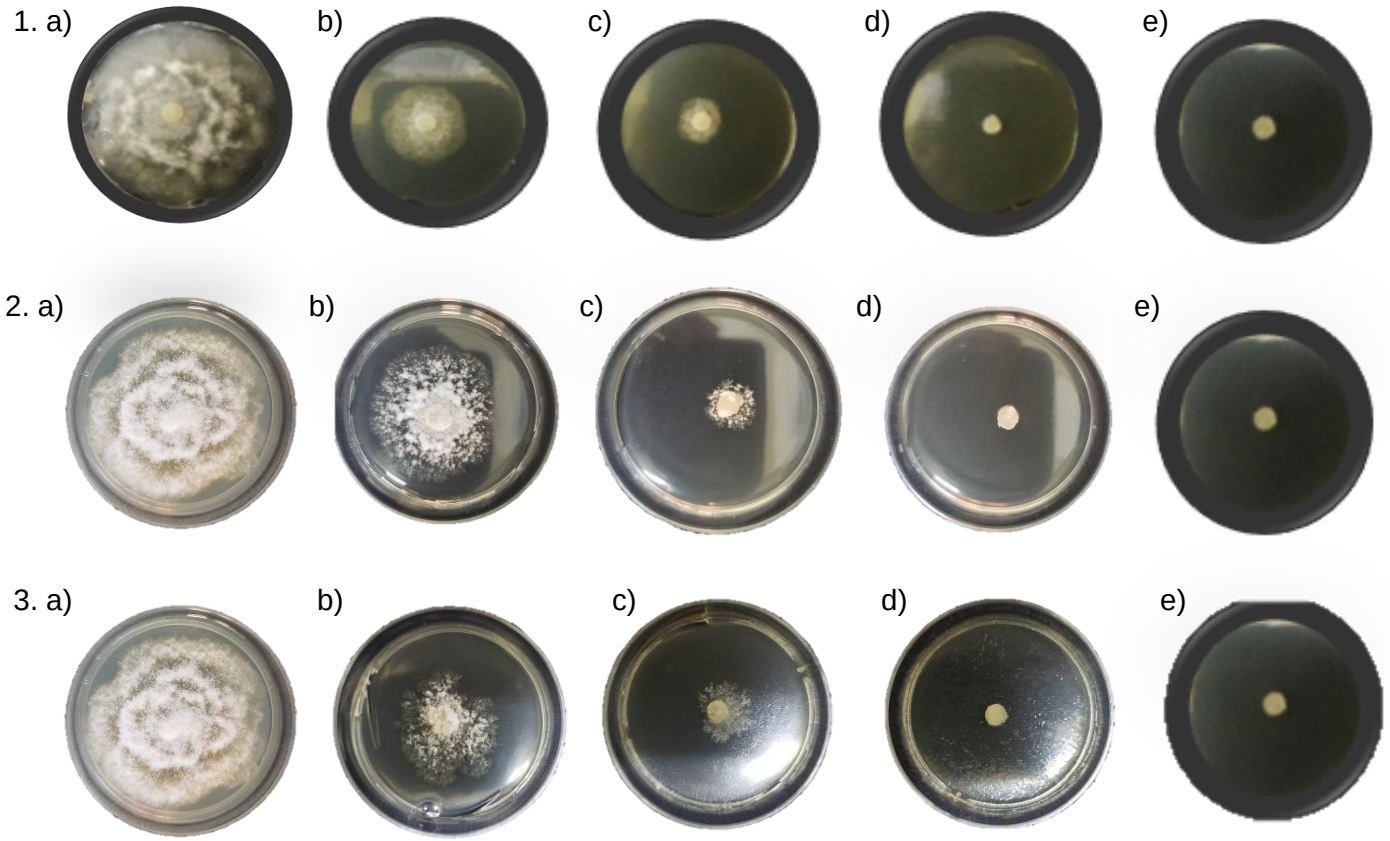


Figura 12. Efecto de derivados de 2-alilfenol más activos *in vitro*1) 2-alil-4.5-dinitrofenol (C5) 2) 2-alil-4-nitrofenol (C10) y 3) 2-alil-4-nitrofenil acetato (C8) sobre el crecimiento micelial de *P. cinnamomi* en diferentes concentraciones: (a) 0 µg / mL (control negativo); (b) 10 µg / mL; (c) 25 µg / mL; (d) 50 µg / ml; (e) Metalaxil a 10 µg / mL usado como control positivo.

El porcentaje de inhibición (% de inhibición) se calculó como se describió anteriormente en la sección de metodología por medio de la formula mencionada. Los valores para todos los compuestos se muestran en la tabla 1 incluyendo el valor del control positivo Metalaxil.

Tabla 1. Efectos de los derivados de 2-alilfenol sobre la inhibición del crecimiento micelial contra *Phytophthora cinnamomi* Rands *in vitro.*

	Porcentaje de inhibición del micelio sobre *Phytophthora cinnamomi (%)*				
Compuestos	**10 µg/mL**	**25 µg/mL**	**50 µg/mL**	**150 µg/mL**	**250 µg/mL**
C1	10±5,0	15±5,8	25±2,5	44±0,0	67±2,5
C7	0±2,5	8±2,5	22±1,8	29±1,3	44±2,5
C4	4±6,28	7±6,28	11±6,28	18±6,28	17±3,27
C2	0±0,3	4±0,3	20±3,8	11±3,8	98±3,8
C9	2±2,2	9±2,2	8±2,5	75±2,5	98±2,5
C2	11±0,5	20±0,5	22±2,51	33±2,51	40±2,8
C8	51±6,28	72±2,51	100±0.0	100±0.0	100±0.0
C10	30±3,8	100±0.0	100±0.0	100±0,0	100±0.0
C5	56±2,5	83±2,5	98±2,5	98±1,3	98±0,8
C6	0±0,5	0±0,5	6±0,9	98±1,3	100±1,3
Metalaxil® (C+)	83±6,3	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0

4.2.2 Valores de EC50

Las concentraciones que causan una inhibición del 50% del crecimiento del micelio (EC_{50}) se obtuvieron al ajustar el porcentaje de inhibición contra la concentración a una curva de dosis-respuesta. Los valores de EC_{50} para todos los compuestos incluyendo el control positivo, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de EC50 de los derivados de 2-alilfenol para la inhibición del crecimiento micelial sobre *P. cinnamomi.*

Compuestos	EC_{50} (µg/mL) ± DS	^{c} r
C1	154.6 ± 1,45	0.9404
C2	179.9 ± 1,42	0.9327
C5	8.7 ± 1,77	0.9805
C7	357.1 ± 1,27	0.9312
C8	10.4 ± 1,43	0,9976
C9	105.0 ± 1,70	0.9327
C4	*i*	*i*
C6	79.5 ± 2,00	0.9996
C3	*i*	*i*
C10	10.3 ± 1,23	0.9973
Metalaxil® (C+)	1.9 ± 0,64	0.8862

EC_{50}: concentración que causa una inhibición del 50% del crecimiento del micelio. ^{c} r: coeficiente de correlación. *i*: compuesto inactivo. DS: desviación estándar.

5. Discusión

5.1 Síntesis química

Las síntesis propuestas consistieron en la incorporación de grupos nitros, acetilos y metilos mediante la utilización de reacciones de nitración, acetilación y metilación, las cuales son altamente utilizadas en hemisintesis (50). Si bien son reacciones de rutina, los rendimientos no son siempre los esperados, como, por ejemplo, en las reacciones de nitración con mezcla sulfonítrica, en la que se obtienen productos con muy bajo rendimiento, por ejemplo, en la reacción de nitración del compuesto 2-alilfenol acetato, obteniéndose entre un 4 y un 7% respectivamente de los productos esperados. Esto se produce debido a que se obtienen más subproductos de la reacción, ya que sobre la reacción influyen varios factores como lo son temperatura, agitación, concentración de la mezcla, etc. que actúan sobre la cinética de la reacción, produciendo mayor energía en el sistema (51), por el contrario, se encuentran las reacciones de nitración utilizando condiciones más suaves que generalmente se utilizan cuando se desea nitrar una posición del anillo aromático en un sitio especifico. Esta reacción comprende la utilización de nitrato de sodio y sulfato ácido de potasio, los cuales le otorgan un ambiente más suave al sistema, incorporando el grupo nitro en lugares específicos de la molécula (52) por ende obteniendo un mayor rendimiento en la reacción.

La reacción de acetilación es una transformación comúnmente utilizada en síntesis orgánica tanto para obtener derivados de ácidos carboxílicos como para proteger hidroxilos (alcoholes) en reacciones de síntesis. Esta segunda utilización permite que solo se acetilen grupos OH dentro de la molécula (53), a su vez, las reacciones de acetilación suelen llevarse a cabo en presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador a pesar de la toxicidad de esta. La baja nucleofilicidad de los grupos hidroxilo en los carboxilos conduce a la necesidad de activación de los agentes acilantes mediante la adición de catalizadores para acelerar la reacción, tal como el DMAP (54), lo que facilita la adición del grupo acetato obteniendo mayores rendimientos como es en el caso de los derivados de 2-alilfenol ya que estos derivados presentan un solo grupo hidroxilo que puede ser acetilado. Sin embargo, vale recordar que el rendimiento no solo se verá afectado por los reactivos que se utilizan en una reacción, si no también, por la molécula que se quiere modificar.

Con respecto a la interpretación de espectros IR (ver anexo) se debe tener claro que cada señal entregada en unidades de frecuencia corresponde a un grupo funcional característico. Para los compuestos nitrados su señal característica vendría siendo el grupo nitro el cual presenta una señal entre 1600 y 1530 cm^{-1}. Los compuestos acetilados presentan una señal característica del

carbonilo (C=O) entre 1761 y 1540 cm^{-1} y los compuestos metilados, su señal característica es a 1380 cm^{-3}. Además, el 2-alilfenol y algunos derivados presentan el grupo funcional hidroxilo el cual tiene una señal ancha entre 3500 y 3200 cm^{-1} (55). Con respecto a los derivados del 2-alilfenol presentados en este proyecto, los derivados que contienen el grupo nitro como lo son los compuesto C2, C3, C5, C6, C8, C9 y C10 presentan la banda característica del grupo NO_2 entre 1552 y 1521 cm^{-1}. Los derivados que contienen grupos OH dentro de su estructura como lo son C2, C5 y C10 poseen una banda característica cerca de 3200 cm^{-1}. Los compuestos que presentan un grupo carbonilo como lo son C7, C8 y C9 poseen una banda característica entre 1770 y 1750 cm^{-1}. Finalmente, los compuestos que fueron metilados como lo son C3, C4 y C6 presentan la banda característica del grupo metilo cerca de 1385 y 1370 cm^{-1}. Por lo tanto, las señales presentadas de los derivados del 2-alilfenol concuerdan con las señales ya descritas por la bibliografía, siendo un dato importante para la caracterización de las moléculas propuestas. Sin embargo, el IR solo detecta la presencia de grupos funcionales en la molécula, pero no la estructura final y detallada de la molécula, debido a esto se recurrió a al uso del RMN.

Los espectros de RMN (Anexo, espectros RMN ^{1}H, ^{13}C), tanto de protones (^{1}H) como de carbono (^{13}C), son más difíciles de analizar. De un espectro de puede obtener información sobre el desplazamiento químico, sobre la constante de acoplamiento (informa la vecindad entre núcleos; J Hz) y sobre la integración. Hay que tener en cuenta, además, la frecuencia a la cual mide el equipo (MHz) y el solvente utilizado. El desplazamiento químico se puede ver afectado tanto por la sustitución y el tipo de enlace involucrados como la electronegatividad del elemento vecino, creando un efecto de apantallamiento (56). Para los grupos funcionales de las moléculas, en general, los desplazamientos químicos más comunes para RMN de protones son los del grupo –OH (alcohol) unido a anillo aromático (fenol) entre 4 y 7 ppm y los protones del anillo aromático entre 6 y 9 ppm. Cabe mencionar que el desdoblamiento resultante del acoplamiento del protón del O-H de los alcoholes, no se observa normalmente, porque el protón del hidroxilo sufre un rápido intercambio intermolecular con otras moléculas de alcohol, lo que lo “desacopla” de otros protones de la molécula. Por otra parte, en los espectros de carbono 13, las señales características de los carbonos con hibridación sp2 del grupo cetona (C=O) se encuentran entre 200 y 230 ppm, los del anillo aromático (C=C) entre 110 y 140 ppm, los carbono sp3 del enlace C-N entre 60 y 80 ppm y los del metoxilo (CH_3-O-) entre 50 y 60 ppm. Adicionalmente, el pico del cloroformo deuterado ($CDCl_3$) que se utiliza para disolver las muestras, se observa a δ =7.26 ppm para ^{1}H y δ =77.0 ppm para ^{13}C, respectivamente (57).

Estas son justamente las señales que se describen en la sección de resultados síntesis química.

5.2 Evaluación antifúngica:

La forma de determinar en este estudio la actividad antifúngica de los compuestos sobre el hongo se realizó mediante el ensayo *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial. Este ensayo, consiste en poner en contacto directo el fungicida y/o compuestos con posible potencial fungicida con el hongo para ver cómo afecta a su crecimiento (58). Teniendo esto en consideración se realizó el ensayo de inhibición del crecimiento micelial, donde se obtuvo distintos datos para cada compuesto evaluado, sin embargo 3 compuestos presentaron una alta actividad con respecto a los otros. Los compuestos 2-alil-4,5-dinitrofenol (C5), 2-alil-4-nitrofenol (C10) y 2-alil-4-nitrofenol acetato (C8) a una concentración de 10 y 25 µg/mL presentaron una inhibición del crecimiento micelial de 8,7; 10,3 y 10,4 µg / mL respectivamente con respecto al control negativo, pero no tan efectiva con respecto al control positivo (1,9 µg/mL de metalaxil). Sin embargo, al utilizar 50 µg/mL de los compuestos señalados anteriormente se obtuvo la misma inhibición del control positivo (Figura 12). Mediante este ensayo también se obtuvo el promedio de los porcentajes de inhibición de cada compuesto a las concentraciones de: 10, 25, 50, 150 y 250 µg / mL respectivamente (Tabla 1). Con estos promedios se procedió a calcular el EC_{50} que corresponde a la concentración que causa la inhibición del 50% del crecimiento del micelio. Se discutirá en base a los compuestos C5, C10 y C8, ya que los otros no presentan un EC_{50} cercano al control positivo, (lo que se discutirá posteriormente en la sección relación estructura actividad de la discusión). C5 presentó un EC_{50} de 8,7 µg / mL siendo el más activo frente a C10 y C8 (EC_{50}: 10,3 y 10,4 respectivamente), sin embargo, el control positivo metalaxil presentó un EC_{50} de 1,9 µg / mL (Tabla 2). En consideración con estos resultados y lo que ya se ha investigado el 2-alilfenol ha sido evaluado contra varios patógenos fúngicos de plantas y sus valores de EC_{50} varían de 8 µg/mL en *Rhizoctonia cerealis* a 49 µg / mL en *B. cinerea* (22). Sin embargo, según nuestro conocimiento, este es el primer informe de la actividad del 2-alilfenol contra *P. cinnamomi* y el valor de EC_{50} (tabla 2, compuesto C1) obtenido en este trabajo es tres veces superior al medido para *B. cinerea.* Esta variabilidad en la actividad antifúngica sugiere que el mecanismo de acción del 2-alilfenol cambia de una especie de hongo a otra. Con respecto al control positivo utilizado, este es un fungicida empleado en el área de la agronomía a base de metalaxil perteneciente al grupo químico de la acilalaninas (derivado del aminoácido alanina). Es hidrosoluble, por ende, la planta lo incorpora por medio de las raíces, tallos y hojas. El metalaxil inhibe la síntesis de proteína en los hongos al interferir con la RNA polimerasa I en la síntesis del RNA ribosomal (59, 60), además se ha descrito que el mecanismo de acción que actúa sobre este tipo de hongos (*oomycetes*) podría estar más influenciado por la alteración en la biosíntesis de la membrana que en el proceso de respiración del patógeno (60). En lo que respecta a la toxicidad de este antifúngico comercial,

el metalaxil según datos del servicio agrícola y ganadero (SAG) y de su distribuidor ANASAC (61) es moderadamente toxico para peces y microcustacios acuáticos y se debe tener un especial cuidado al momento de la incorporación del producto por medio de quien lo administra (no inhalar, no ingerir, no permitir el contacto con la piel ni ojos, etc.) (61). En cambio, los derivados hemisintéticos del 2-alilfenol presentan una toxicidad reducida respecto a las células sanas observado frente a líneas celulares de célula epitelial de colon humano normal (CoN) (Datos no publicados)

5.3 Relación estructura actividad

Respecto a la relación estructural de los derivados y su actividad antifúngica se cree que la actividad de inhibición del crecimiento cambia al unir grupos sustituyentes al anillo aromático o por medio de la modificación química del grupo hidroxilo que posee el 2-alilfenol. En los compuestos C7 y C4, estas moléculas fueron acetiladas o metiladas, respectivamente, La actividad antifúngica disminuye respecto al 2-alilfenol, pero su actividad se ve aumentada completamente al incorporarle grupos nitros al anillo aromático. La incorporación de grupos nitro en el anillo aromático de los derivados C7 y C4 en posición “orto” y/o “para” produjo efectos de disminución del EC_{50}, de lo cual se infiere una mayor actividad antifúngica (comparación compuesto C9 y C6). Cuando el grupo nitro se encuentra en posición “para” al grupo hidroxilo, la actividad antifúngica se ve aumentada (comparación compuesto C1 y C10). También se observa, un aumento de la actividad antifúngica en derivados nitro donde el grupo hidroxilo ha sido reemplazado por un grupo acetilo o metoxilo. Por ejemplo, el derivado C4 es completamente inactivo, pero se vuelve más activo incorporándole grupos nitros en posición orto y para.

Para los derivados de acetilo, el isómero “para” en temas de magnitud es más activo que el isómero “orto” (comparar los compuestos C8 y C9). Por lo tanto, posiblemente esta configuración estructural de derivados nitro de 2-alilfenol potenciaría la actividad antifúngica, independiente de la presencia de un grupo hidroxilo.

Estos resultados de actividad antifúngica sugieren que las características estructurales de los derivados de 2-alilfenol no están asociadas a la presencia o ausencia de un grupo particular, sino principalmente a la distribución de los grupos sustituyentes en el anillo aromático. Esta distribución de grupos sustituyentes, también se ha evidenciado en un estudio realizado por Chávez en el 2018 (48) donde una serie de fenoles geranilados con variadas modificaciones, presentaron resultados similares para la inhibición sobre *P. cinnamomi*.

6. Conclusión y proyecciones

Este trabajo permite concluir que, algunos derivados del 2-alilfenol que fueron evaluados sobre *P. cinnamomi* mostraron ser tan efectivos como el metalaxil, el cual es un fungicida comercial comúnmente usado, para inhibir el crecimiento micelial de *P. cinnamomi.* Los compuesto C5, C10 y C8 fueron los más activos con valores de EC_{50} de 8,7; 10,3 y 10,4 µg / mL respectivamente. Esta actividad se atribuye a la unión de grupos aceptores de electrones al anillo aromático o la modificación química del grupo hidroxilo. Además, esta actividad está fuertemente reforzada en aquellas moléculas en las que los grupos nitro e hidroxilo adoptan una configuración para. Sin embargo, a pesar de que metalaxil presente un EC_{50} de 1,9 µg / mL, los valores de los compuestos más activos siguen siendo prometedores por su carácter semi natural. Por lo tanto, los resultados obtenidos convierten a estos derivados en productos potencialmente útiles para aplicaciones agrícolas, específicamente en la infección causada por *P. cinnamomi.*

Como proyección de esta investigación, primero se deberá evaluar el mecanismo de acción de los compuestos más activos sobre *P. cinnamomi*, analizando mediante ensayos de expresión de genes, porcentaje de germinación, ROS, entre otros, con el fin de elucidar un mecanismo de acción detallado, Además es necesario evaluar la actividad *in vitro* en otros hongos, para analizar si la actividad de las moléculas propuestas en esta investigación también son activas en otros hongos, tales como *Botrytis cinérea, colletotrichum gloeosporioides,* entre otros. Por otra parte, los compuestos más activos al ser posibles candidatos a agentes antifúngicos deberán ser evaluados como posibles formulaciones. Sin embargo, los compuestos al no ser solubles en agua deberán ser tratados o incluidos en polímeros hidrosolubles para que dichos compuestos adquieran solubilidad en agua y así poder obtener un posible antifúngico comercial con actividad frente a *P. cinnamomi*.

7. Referencias

(1) Anaya, A. L. Ecología química México, (2003). DF Plaza y Valdez 349p.

(2) Barioglio, C. F. Diccionario de las ciencias agropecuarias. Editorial Brujas. (2006).

(3) Beckerman, J. L. Detection of Fungicide Resistance. Chapter 11. Fungicides–Showcases of integrated Plant Disease Management from Around the World. (2013). ISBN, 953–978.

(4) Weis, A. E., & Berenbaum, M. R. Herbivorous insects and green plants. Plant-Animal Interactions, (1989). 123–162.

(5) Céspedes, C. L., Calderón, J. S., Lina, L., & Aranda, E. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela spp*. (*Meliaceae*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2000). 48(5), 1903–1908.

(6) Silva, A., Lagunes, T., Rodríguez, M., & Rodríguez, L. Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. (2002).

(7) Cragg, G. M., & Newman, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, (2013). 1830(6), 3670–3695.

(8) Torssell, K., & Torssell, K. B. G. Natural product chemistry: a mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. Wiley Chichester, UK. (1983).

(9) Martínez Aguilar Yordan, Soto Rodríguez Fernando, Almeida Saavedra Manuel, Hermosilla Espinosa Robinson, Martínez Yero Orlando. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de Anacardium occidentale L. (marañón). Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2012 Dic [citado 2019 Jun 20]; 17(4): 320-329.

(10) Montes-Belmont, R. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista mexicana de micología, 29, 73-82. (2009).

(11) Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., & Beliveau, Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFκB by edible berry juice. Anticancer Research. (2007). 27(2), 937–948.

(12) Valcheva-Kuzmanova, S., Kuzmanov, K., Tancheva, S., & Belcheva, A. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Aronia melanocarpa fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, (2007). 29(2), 101–106.

(13) Valcheva-Kuzmanova, S., Borisova, P., Galunska, B., Krasnaliev, I., & Belcheva, A. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. Experimental and Toxicologic Pathology, (2004). 56(3), 195–201.

(14) Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H.-L., & Oksman-Caldentey, K.-M. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. Applied Microbiology and Biotechnology, (2005). 67(1), 8–18.

(15) Robles-Kelly, C., Rubio, J., Thomas, M., Sedán, C., Martinez, R., Olea, A. F., Carrasco, H., Taborga, L y Silva-Moreno, E. Effect of drimenol and synthetic derivatives on growth and germination of *Botrytis cinerea*: Evaluation of possible mechanism of action. Pesticide biochemistry and physiology, (2017). 141, 50-56.

(16) Olea, A. F., Bravo, A., Martínez, R., Thomas, M., Sedan, C., Espinoza, L., Zambrano, E., Carvajal, D., Silva-Moreno, E., Carrasco, H. Antifungal Activity of Eugenol Derivatives against *Botrytis Cinerea*. Molecules, 24(7), 1239. (2019).

(17) Madrid Villegas, A., Díaz Peralta, K., González Tapia, C., Catalán Marín, K., & Espinoza Catalán, L. Antiphytopathogenic activity of *Psoralea glandulosa* (Fabaceae) against *Botrytis cinerea* and *Phytophthora cinnamomi*. Natural product research, (2015). 29(6), 586-588.

(18) Díaz, K., Espinoza, J., Espinoza, L., González, C., & Madrid, A. Labdanes: antifungal compounds isolate from the resinous exudate of *Madia sativa* against *Phytophthora cinnamomi* Rands. Natural product research, 1-5. (2018).

(19) Aguaviva, B. G. Monográfico del ginkgo biloba. Medicina Naturista, (2011). 5(2), 93–99.

(20) Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99(1), 191–203. (2006).

(21) Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 50(1), 5–18. (2000).

(22) Gong, S., Hao, J., Xia, Y., Liu, X., & Li, J. Inhibitory effect of bionic fungicide 2-allylphenol on *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) in vitro. Pest Management Science, (2009). 65(12), 1337–1343.

(23) Kleijnen, J., & Knipschild, P. Ginkgo biloba for cerebral insufficiency. British Journal of Clinical Pharmacology, (1992). 34(4), 352–358.

(24) Houghton, Pherbal products. II: Ginkgo. Pharmaceutical Journal, (1994). 253(6799), 122–123.

(25) White, H. L., Scates, P. W., & Cooper, B. R. Extracts of *Ginkgo biloba* leaves inhibit monoamine oxidase. Life Sciences, 58(16), 1315–1321. (1996).

(26) Ha, S. W., Chun, J. Y., Cho, C. K., Cho, M. J., Shin, K. H., & Park, C.-I. Enhancement of radiation effect by Ginkgo biloba extract in C3H mouse fibrosarcoma. Radiotherapy and Oncology, (2006).

(27) Spegazzini, E., Debenedetti, S. L., & Wilson, E. (n.d.). Farmacognosia (2009)

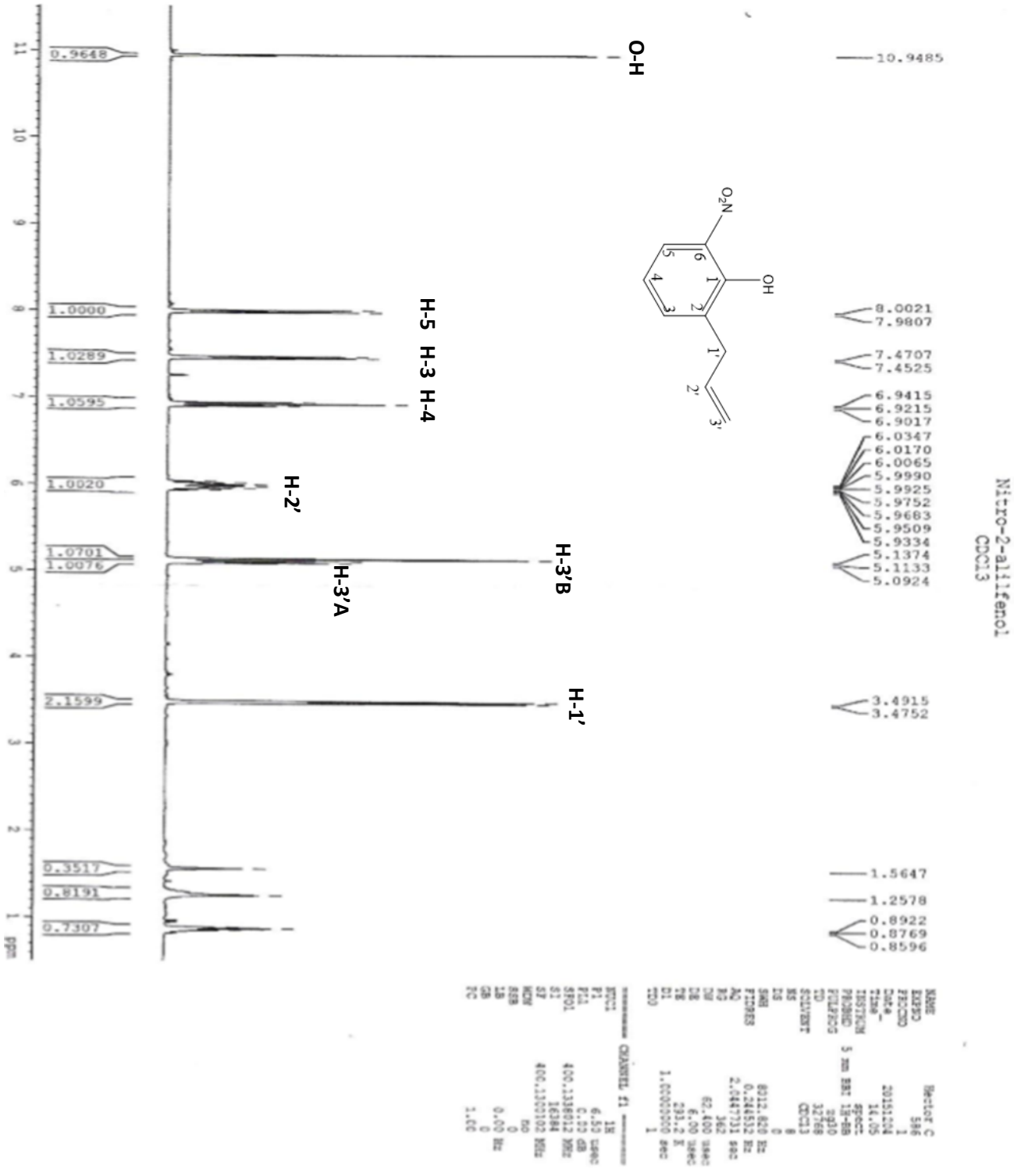
(28) Carrasco, H., Espinoza, C., Cardile, V., Gallardo, C., Cardona, W., Lombardo, L., Catalan, K., Cuellar, M y Russo, A. Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cells (Part I). Journal of the Brazilian Chemical Society, 19(3), 543-548. (2008).
(29) Carrasco, H.; Raimondi, M.; Svetaz, L.; Liberto, M.D.; Rodriguez, M.V.; Espinoza, L.; Madrid, A.; Zacchino, S. Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. Molecules (2012) 17, 1002-1024.
(30) Juergen-Hinrich, F., Guangtao Li., Penzler, G. Organic Synthesis: Concepts and Methods / Edition 3 ISBN-13: 9783527302734 Wiley, (2003).
(31) Carey Francis A. Química Orgánica. (pp 370-451). 3° Edición. Madrid: Mc Graw Hill/Interamericana (1999). España, S.A.U
(32) Carey Francis A. Química Orgánica. (pp 792-846). 3° Edición. Madrid: Mc Graw Hill/Interamericana (1999). España, S.A.U.
(33) Harvey, D., & Rodríguez, L. C. Química analítica moderna (Vol. 570). McGraw-Hill. (2002).
(34) Carey Francis A. Química Orgánica. Capítulo 13. 3° Edición. Madrid: Mc Graw Hill/Interamericana (1999). España, S.A.U.
(35) Faraldos, M., & Goberna, C. Técnicas de análisis y caracterización de materiales. Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2011).
(36) Espinoza, L. Introducción a la resonancia nuclear magnética de alta resolución 1D y 2D. Chile: Universidad Técnica Federico Santa María (2004)
(37) Eduardo Moraga Vásquez. Temporada 2018-2019: Exportaciones de Frutas, mejor que las expectativas. El mercurio. Publicado el martes, 12 de marzo de 2019 a las 8:30. Disponible en https://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Noticias/2019/03/12/Temporada-20182019-Exportaciones-de-Frutas-mejor-que-las-expectativas.aspx?disp=1
(38) Comité palta hass. Palta chilena seduce al paladar chino. Palta hass. Publicado el 10 de septiembre del 2018. Disponible en http://www.paltahass.cl/noticias-palta/10/09/2018/palta-chilena-seduce-al-paladar-chino/
(39) Instituto de investigación agropecuaria (INIA). Pautas y Manuales de Producción. Disponible en http://www.inia.cl/manuales-de-produccion/ sección número 13, Pauta de chequeo palto, Manual del cultivo del palto (2012)
(40) Hee, W. Y., Torreña, P. S., Blackman, L. M., & Hardham, A. R. *Phytophthora cinnamomi* in. *Phytophthora*: A Global Perspective, 2, 124. (2013).
(41) Beakes, G. W., Glockling, S. L., & Sekimoto, S. The evolutionary phylogeny of the *oomycete* "fungi." Protoplasma, (2012). 249(1), 3–19.

(42) Hardham, A. R. *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology6(6), 589–604. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x, (2005).
(43) Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D. G., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J. D., … Panabières, F. The Top 10 *oomycete* pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, (2015). 16(4), 413–434.
(44) Wilcox, W. F. Pudrición radical y del cuello en frutales causada por *phytophthora. Aconex*. (43): 5-12, 1994.
(45) Bekker, T. F. Efficacy of water-soluble silicon for control of *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. University of Pretoria Pretoria, South Africa. (2007).
(46) Red agrícola. Fosfitos: Consolidados en fruticultura como efectivos fungicidas. Publicado en marzo 2017. Disponible en http://www.redagricola.com/cl/fosfitos-consolidados-fruticultura-efectivos-fungicidas/
(47) Vásquez, U. G. Evaluación de Principios Activos de Origen Botánico para el Control de Hongos y Algas de Importancia Agrícola. (2018).
(48) Chavez, M., Soto, M., Cimino, F., Olea, A., Espinoza, L., Díaz, K., & Taborga, L. *In vitro* antifungal activity of new and known geranylated phenols against *Phytophthora cinnamomi* Rands. International journal of molecular sciences, 19(6), 1601. (2018).
(49) Bartner, A.; Pfeifer, K.P.; Bartner, H. Applicability of disc diffusion methods required by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds. Pharmazie 1994, 49, 512–516.
(50) Hidalgo, María E., De la Rosa, Carlos., Carrasco, Héctor., Cardona, Wilson., Gallardo, Claudio., y Espinoza, Luis., Antioxidant capacity of eugenol derivatives. Química Nova, 32(6), 1467-1470. (2009).
(51) Smith, J. M. (1968). Ingeniería de la cinética química. México: Compañía Editorial Continental.
(52) Carrasco, A., Espinoza, C., Cardile, V., Gallardo, C., Cardona, W., Lombardo, L., Catalan, K., Cuellar, M y Russo, A. Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cells (Part I). Journal of the Brazilian Chemical Society, 19(3), 543-548. (2008).
(53) Caglieri, S. C., & Macaño, H. R. Acetilación de aminas alifáticas y aromáticas: estudio teórico. Información tecnológica, (2016). 27(2), 105-110.
(54) Migliorero, M. B. C., Santiago, C. C., y Ponzinibbio, A. Actividad catalítica de Peg-So3h en reacciones de acetilación. Investigación Joven, (2015). 2(2).
(55) Espinoza, L. Introducción a la resonancia nuclear magnética de alta resolución 1D y 2D. Chile: Universidad Técnica Federico Santa María (2004)

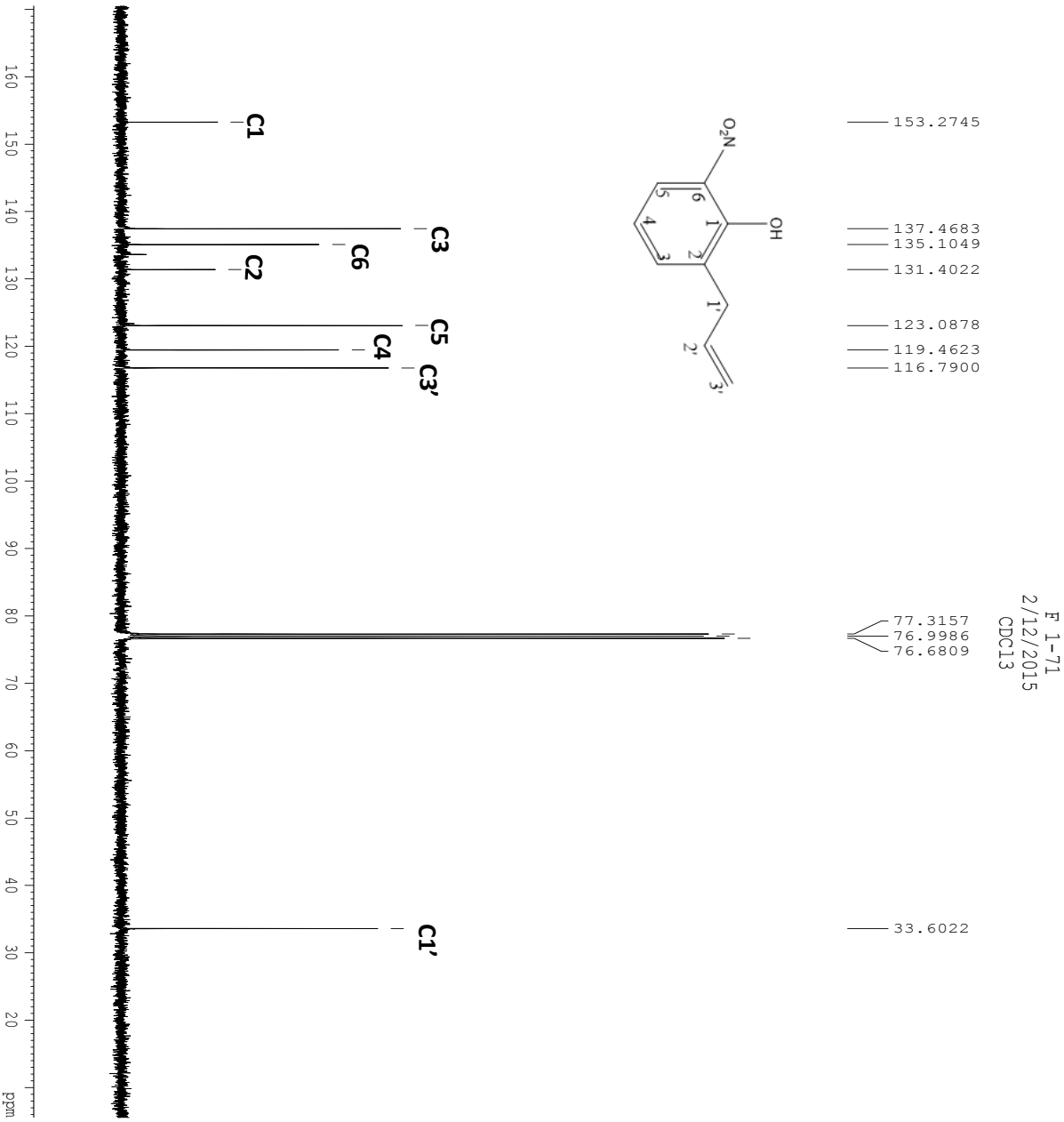
(56) Wiberg, E., Wiberg, N., & Holleman, A. F. Inorganic Chemistry p. 1655. (2001).
(57) Silverstein, R. M., & Bassler, G. C. Spectrometric identification of organic compounds. Journal of Chemical Education, (1962). 39(11), 546. Capítulo 3 y 4.
(58) Gonzales, A. Ensayos de efectividad de fungicidas in vitro frente a hongos de suelo. Utilidad para el conocimiento de las resistencias y el establecimiento de una pauta terapéutica adecuada. Ejemplos prácticos. PHYTOHEMEROTECA [Internet]. 2005 [cited 26 May 2019];(173). Available from: https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/173-noviembre-2005/ensayos-de-efectividad-de-fungicidas-in-vitro-frente-a-hongos-de-suelo-utilidad-para-el-conocimiento-de-las-resistencias-y-el-establecimiento-de-una-pauta-teraputica-adecuada-ejemplos-prcticos
(59) Meyer, M., Bueno, C., Souza, N., Yorinori, J. Effect pf doses of fungicides and plant resistance activators on the control of *Rhizoctonia foliar* blight of soybean and *Rhizoctonia solani* AG1-IA in vitro development. Crop protection. (2006). Vol 25. Pag: 848-854
(60) Kerkenaar, A., & Sijpesteijn, A. K. Antifungal activity of metalaxyl and furalaxyl. Pesticide Biochemistry and Physiology, 15(1), 71-78. (1981).
(61) 2. Metalaxil MZ 58 WP [Internet]. 2019 [cited 27 May 2019]. Available from: http://www.anasac.cl/agropecuario/wp-content/uploads/Etiqueta-04-Metalaxil-Mz-58-WP.pdf

ANEXO

Espectro RMN ^{1}H 2-Alil-6-nitrofenol



Espectro RMN ^{13}C 2-Alil-6-nitrofenol

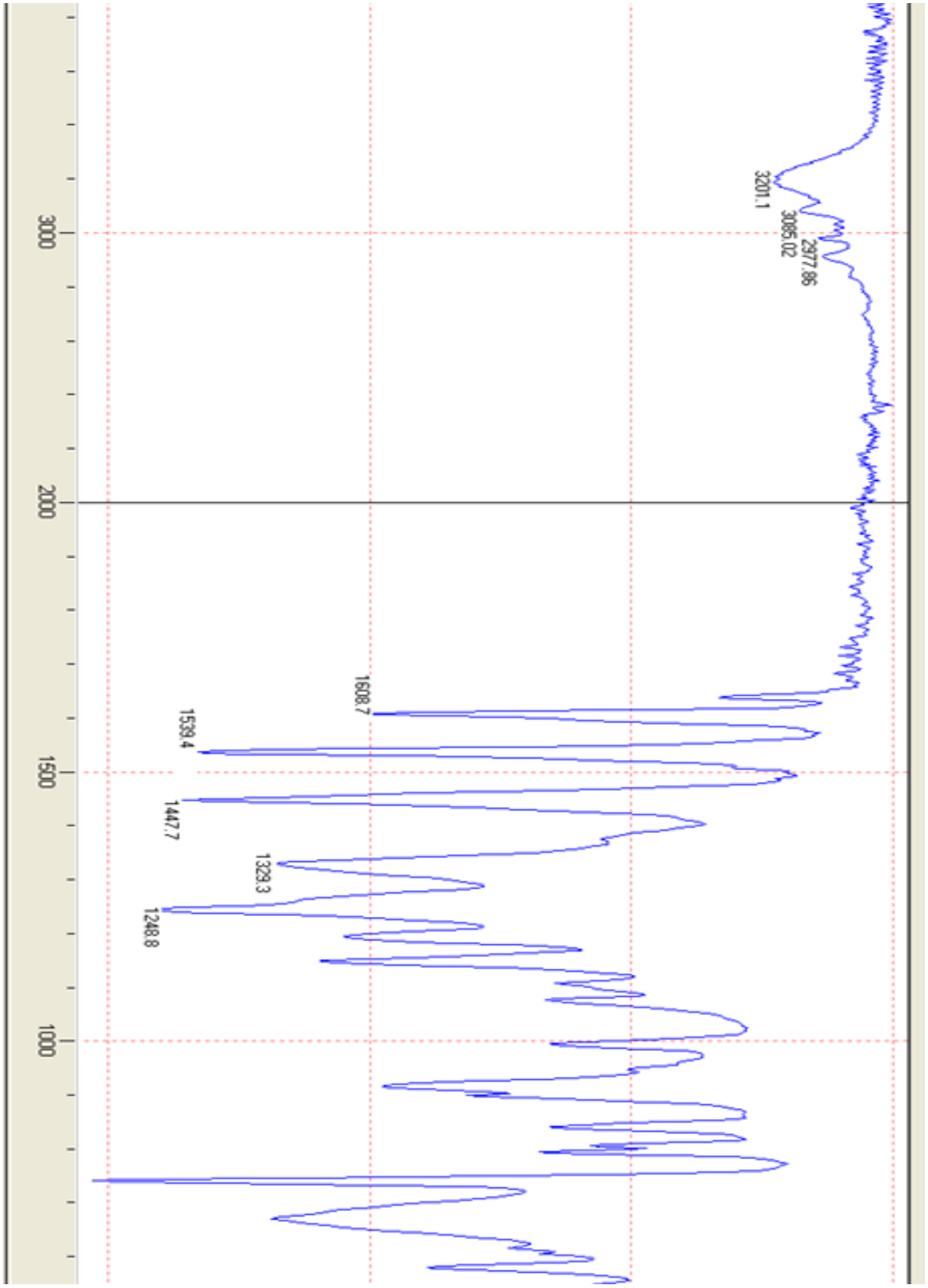



```
NAME                                    Hector C
EXPNO                                        606
PROCNO                                         1
Date_                                   20160119
Time_                                       15.29
INSTRUM                                     spect
PROBHD                 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG                                 zgpg30
TD                                          32768
SOLVENT                                     CDCl3
NS                                            512
DS                                              0
SWH                                     23980.814 Hz
FIDRES                                      0.731836 Hz
AQ                                      0.6832628 sec
RG                                          574.7
DW                                      20.850 usec
DE                                       6.00 usec
TE                                      299.2 K
D1                                      2.00000000 sec
D11                                     0.03000000 sec
TD0                                             1

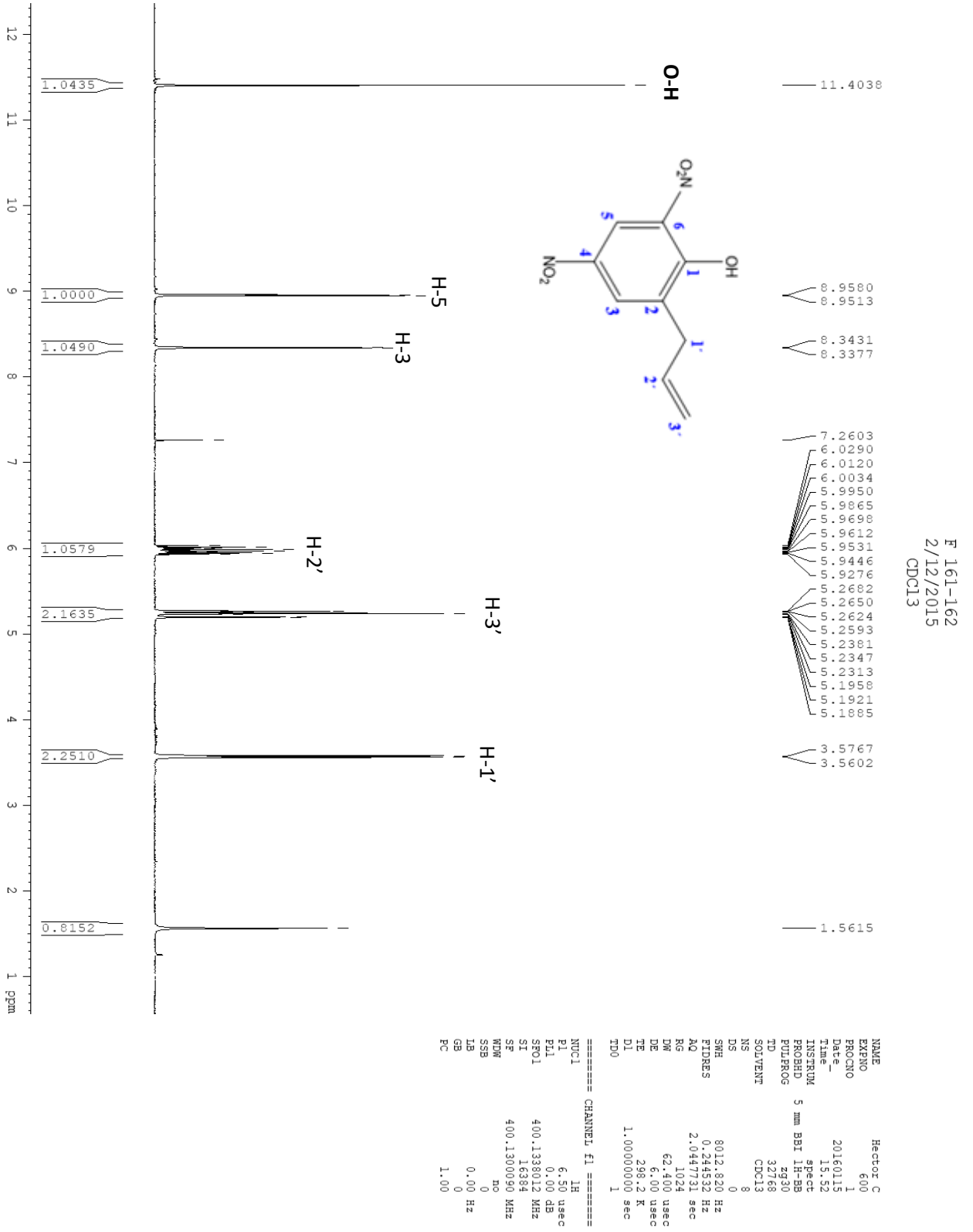
======== CHANNEL f1 ========
NUC1                                          13C
P1                                      14.00 usec
PL1                                     -6.00 dB
SFO1                                    100.6242995 MHz

======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2                                     waltz16
NUC2                                          1H
PCPD2                                   85.00 usec
PL2                                      6.00 dB
PL12                                    23.00 dB
PL13                                    23.00 dB
SFO2                                    400.1316005 MHz
SI                                          32768
SF                                      100.6127704 MHz
WDW                                           EM
SSB                                             0
LB                                      1.00 Hz
GB                                              0
PC                                      1.40
```

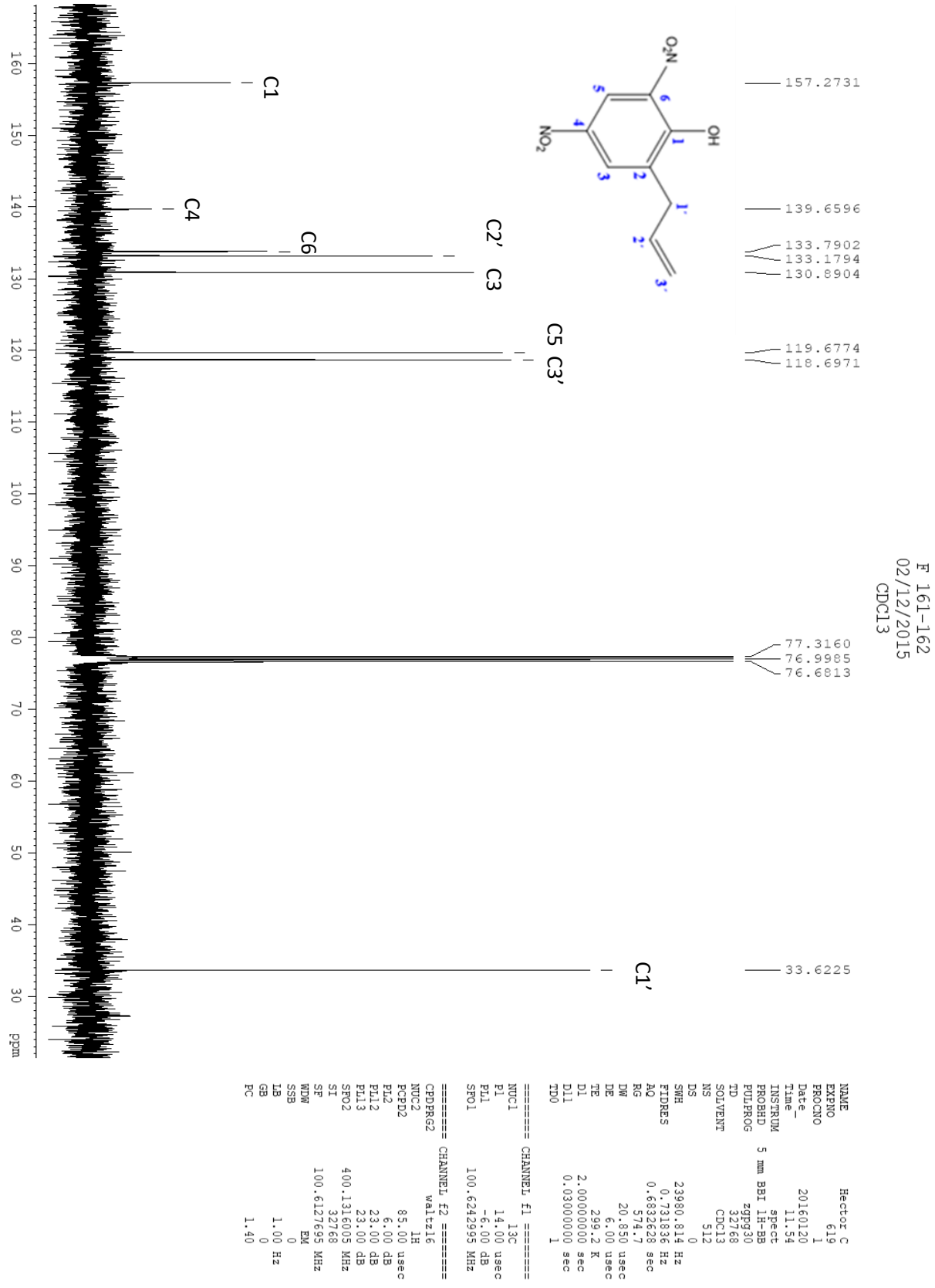
Espectro IR 2-Alil-6-nitrofenol



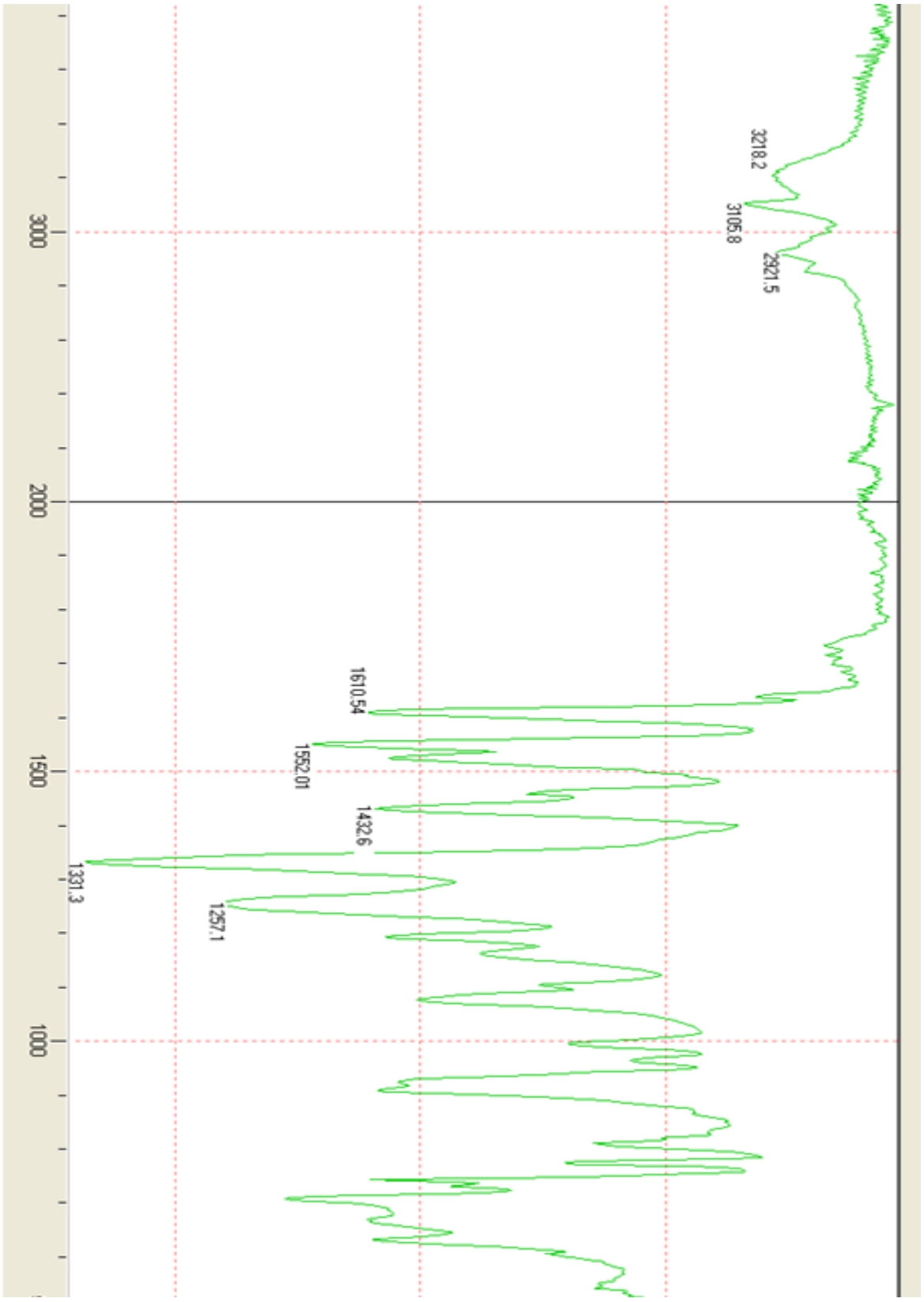
Espectro RMN ^{1}H 2-alil-4,6-dinitrofenol



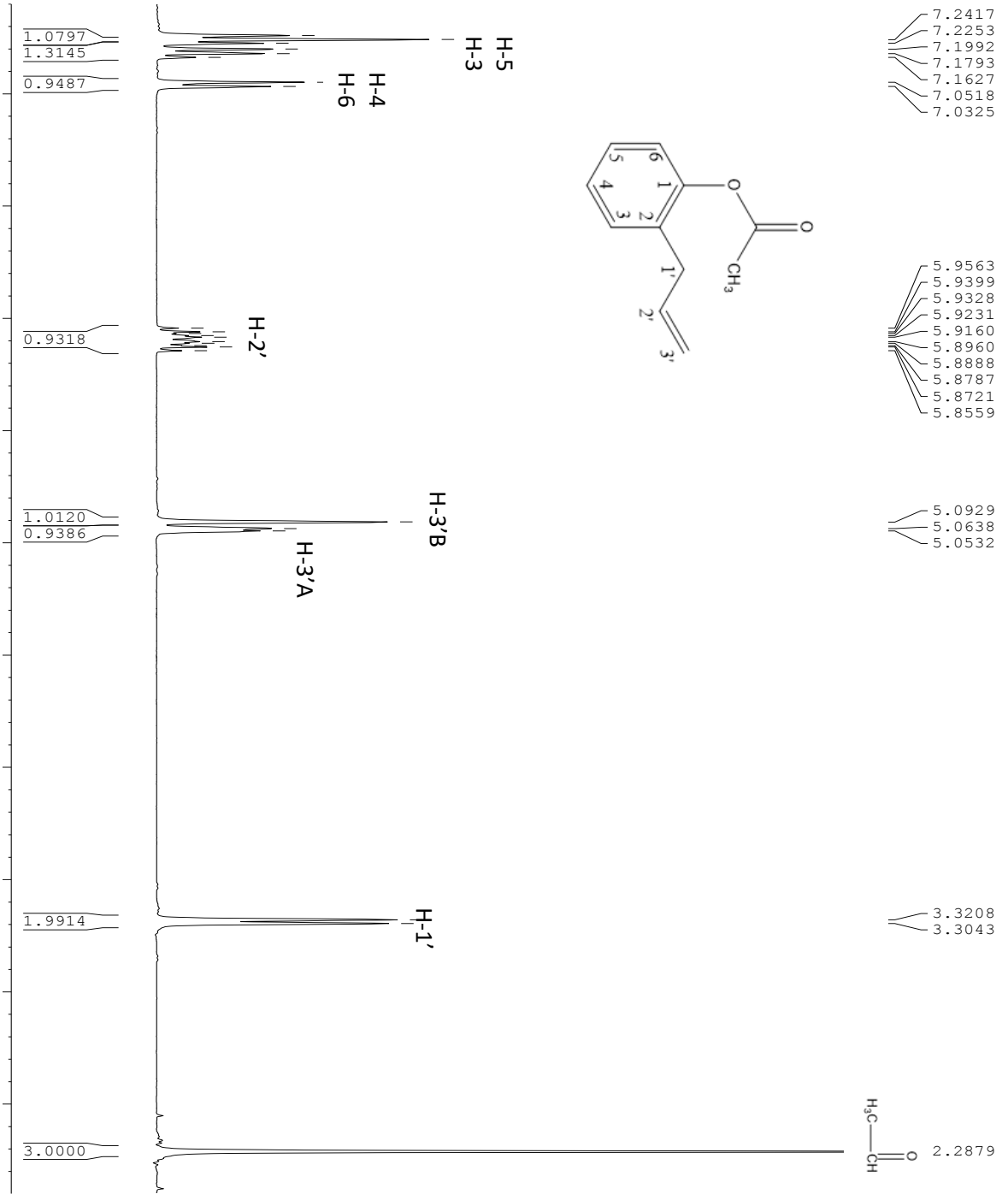
Espectro RMN ^{13}C 2-alil-4,6-dinitrofenol



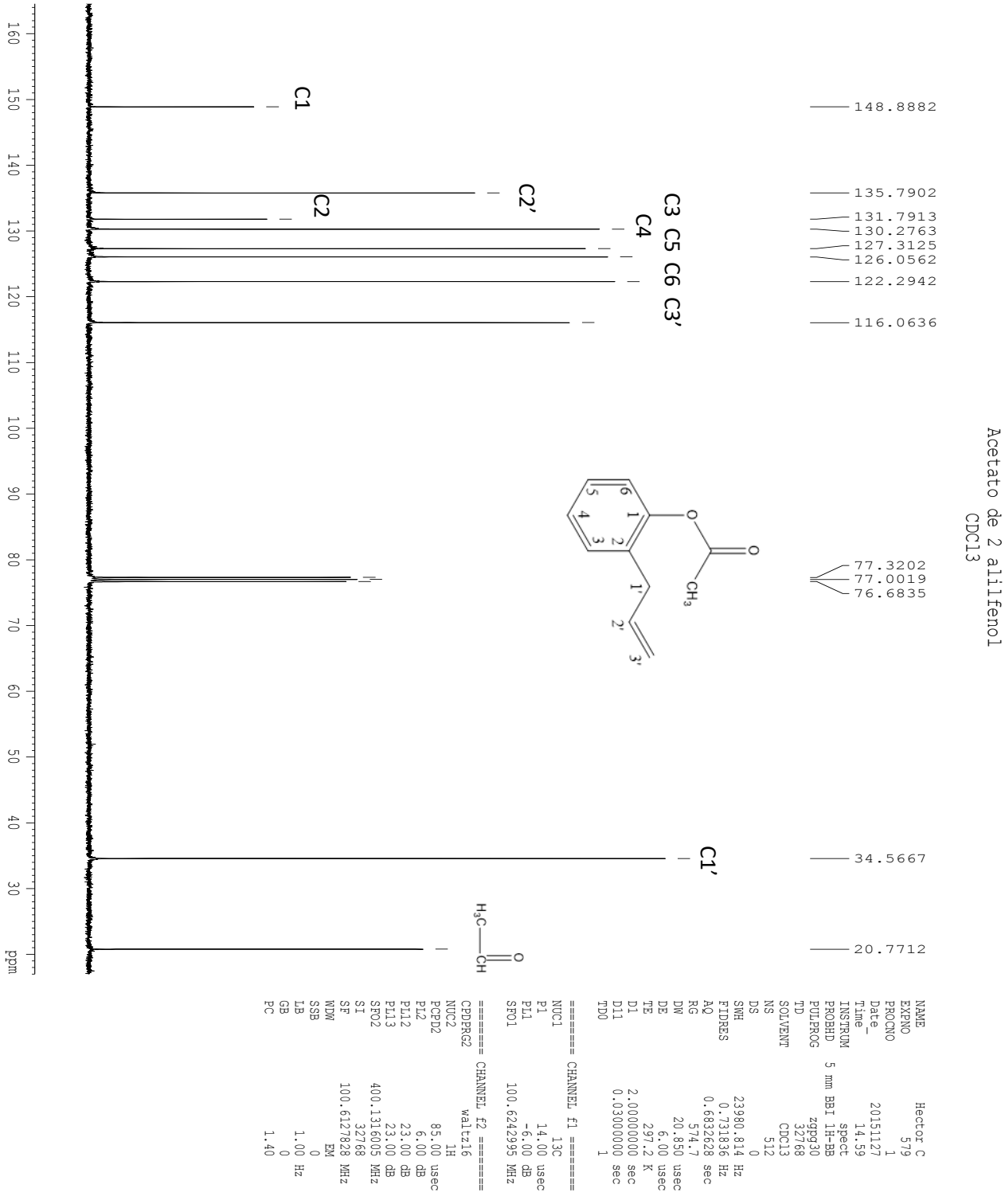
Espectro IR 2-alil-4,6-dinitrofenol



Espectro RMN ^{1}H 2-alilfenol acetato



Espectro RMN ^{13}C 2-alilfenol acetato

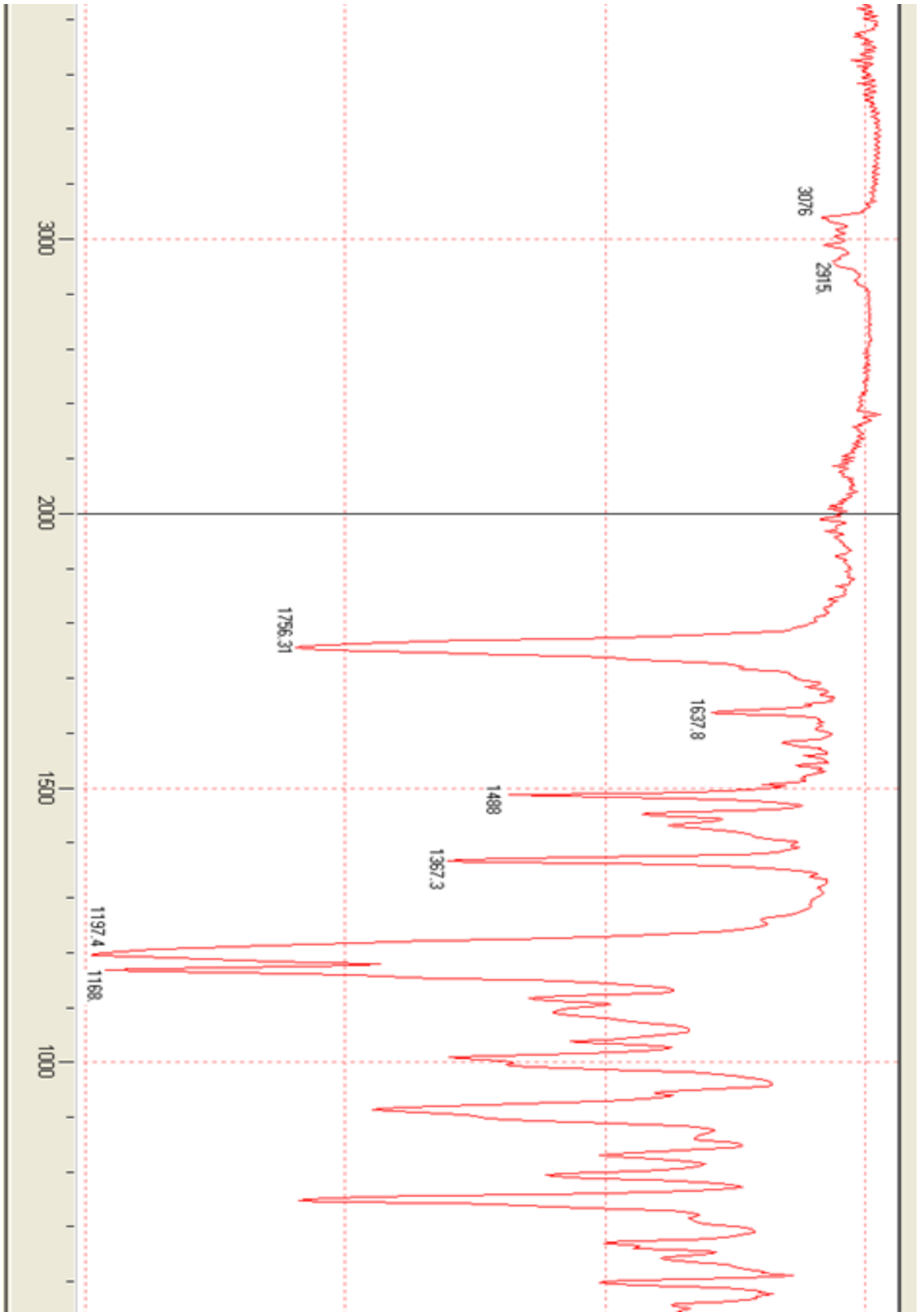



```
NAME                                    Hector C
EXPNO                                        579
PROCNO                                         1
Date_                                   20151127
Time_                                      14.59
INSTRUM                                     spect
PROBHD                 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG                                 zgpg30
TD                                       32768
SOLVENT                                  CDCl3
NS                                         512
DS                                           0
SWH                                23980.814 Hz
FIDRES                              0.731836 Hz
AQ                                  0.6832628 sec
RG                                       574.7
DW                                    20.850 usec
DE                                     6.00 usec
TE                                     297.2 K
D1                                 2.00000000 sec
D11                                0.03000000 sec
TD0                                          1

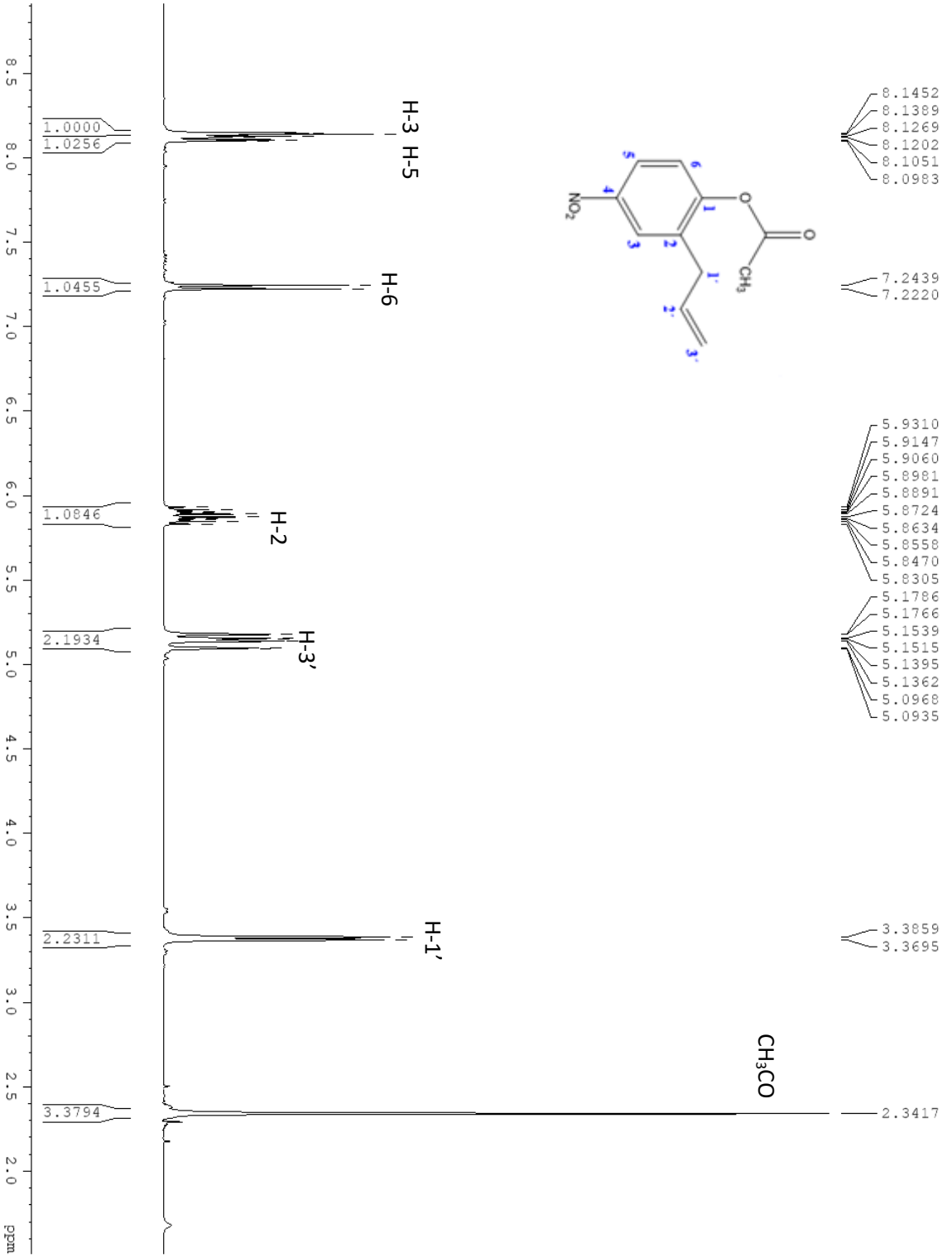
======== CHANNEL f1 ========
NUC1                                       13C
P1                                       14.00 usec
PL1                                      -6.00 dB
SFO1                          100.6242995 MHz

======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2                                waltz16
NUC2                                       1H
PCPD2                                  85.00 usec
PL2                                      6.00 dB
PL12                                    23.00 dB
PL13                                    23.00 dB
SFO2                          400.1316005 MHz
SI                                       32768
SF                            100.6127828 MHz
WDW                                       EM
SSB                                        0
LB                                      1.00 Hz
GB                                         0
PC                                      1.40
```

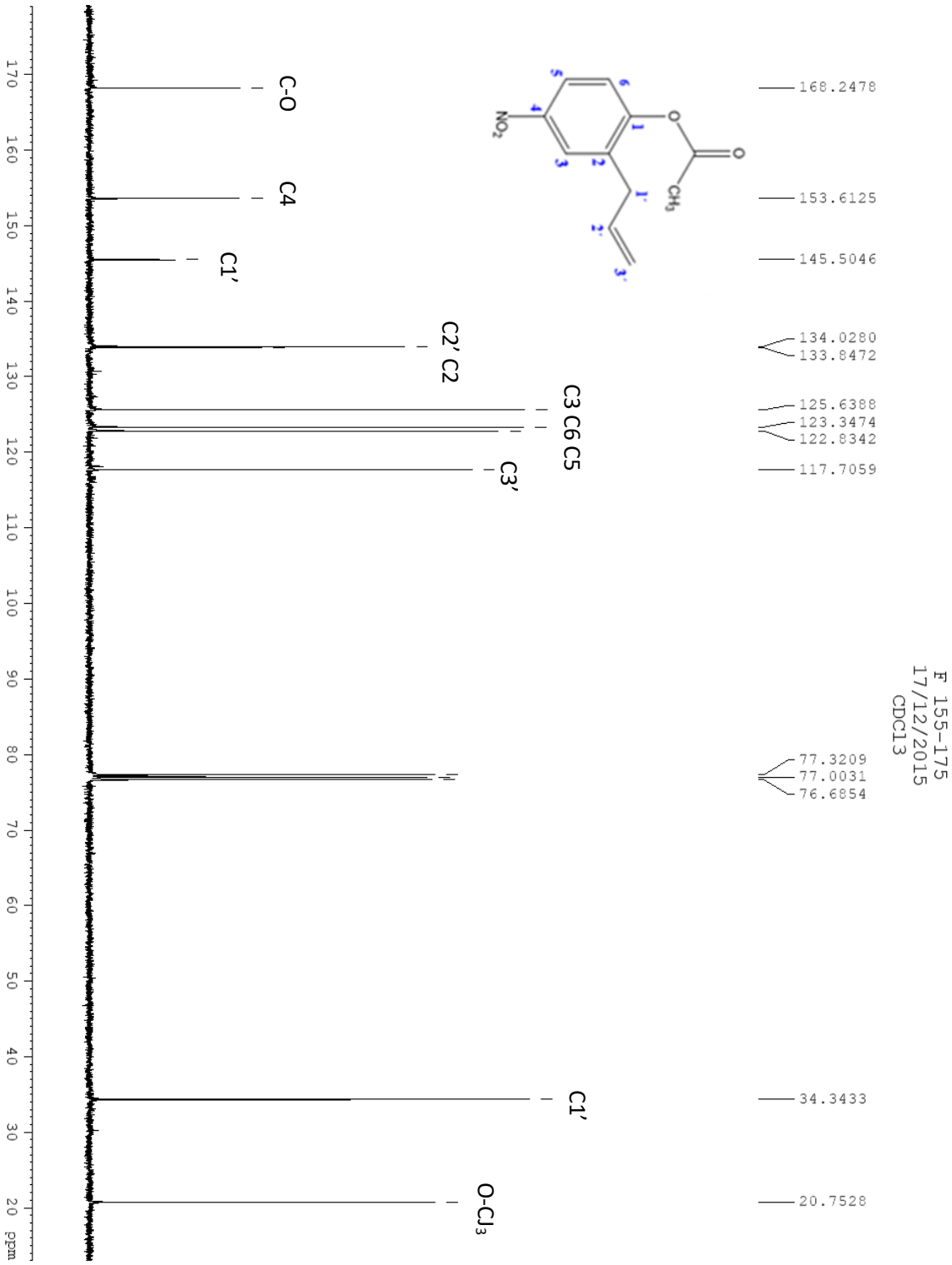
Espectro IR 2-alilfenol acetato



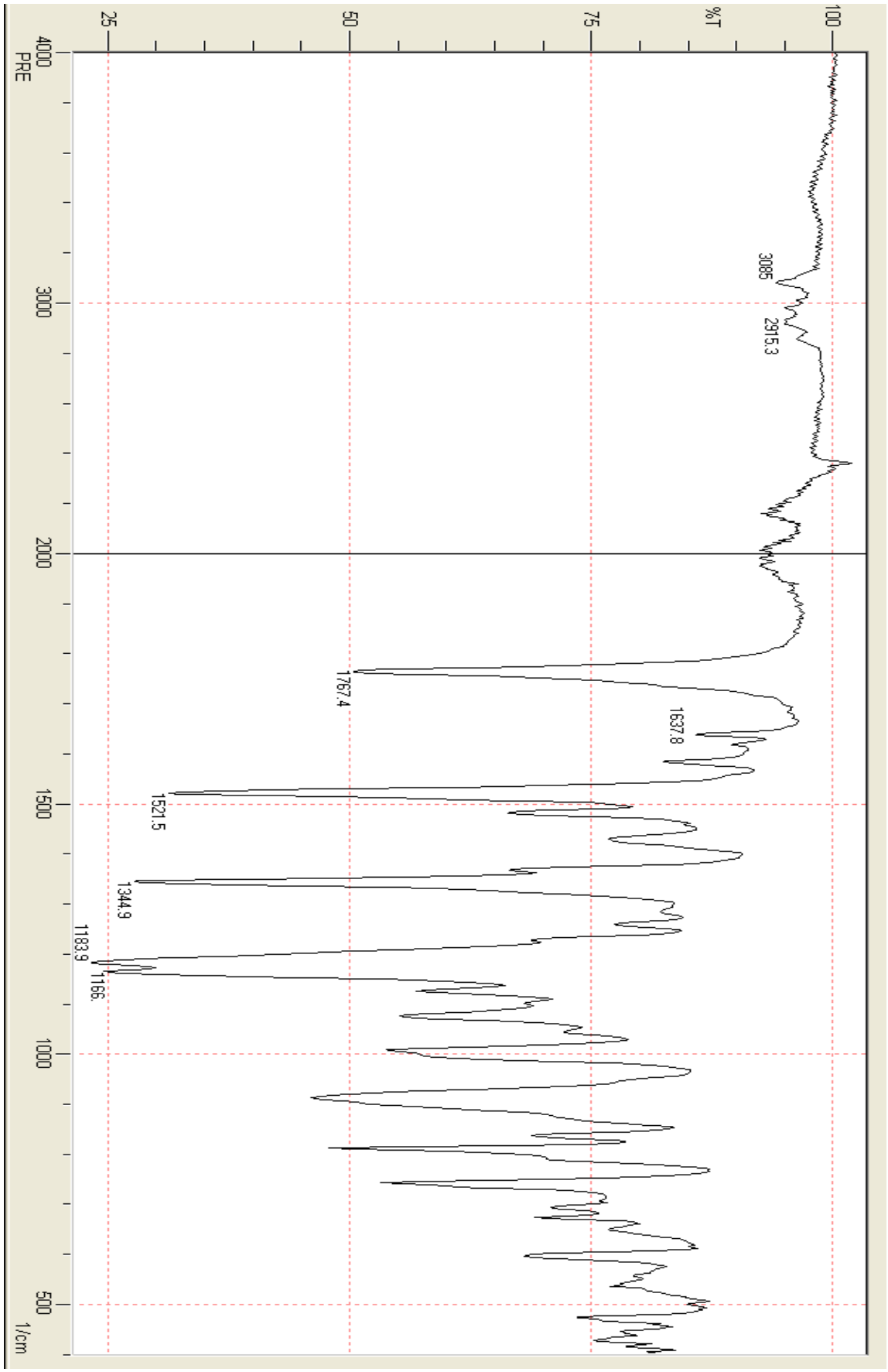
Espectro RMN ^{1}H 2-alil-4-nitrofenil acetato



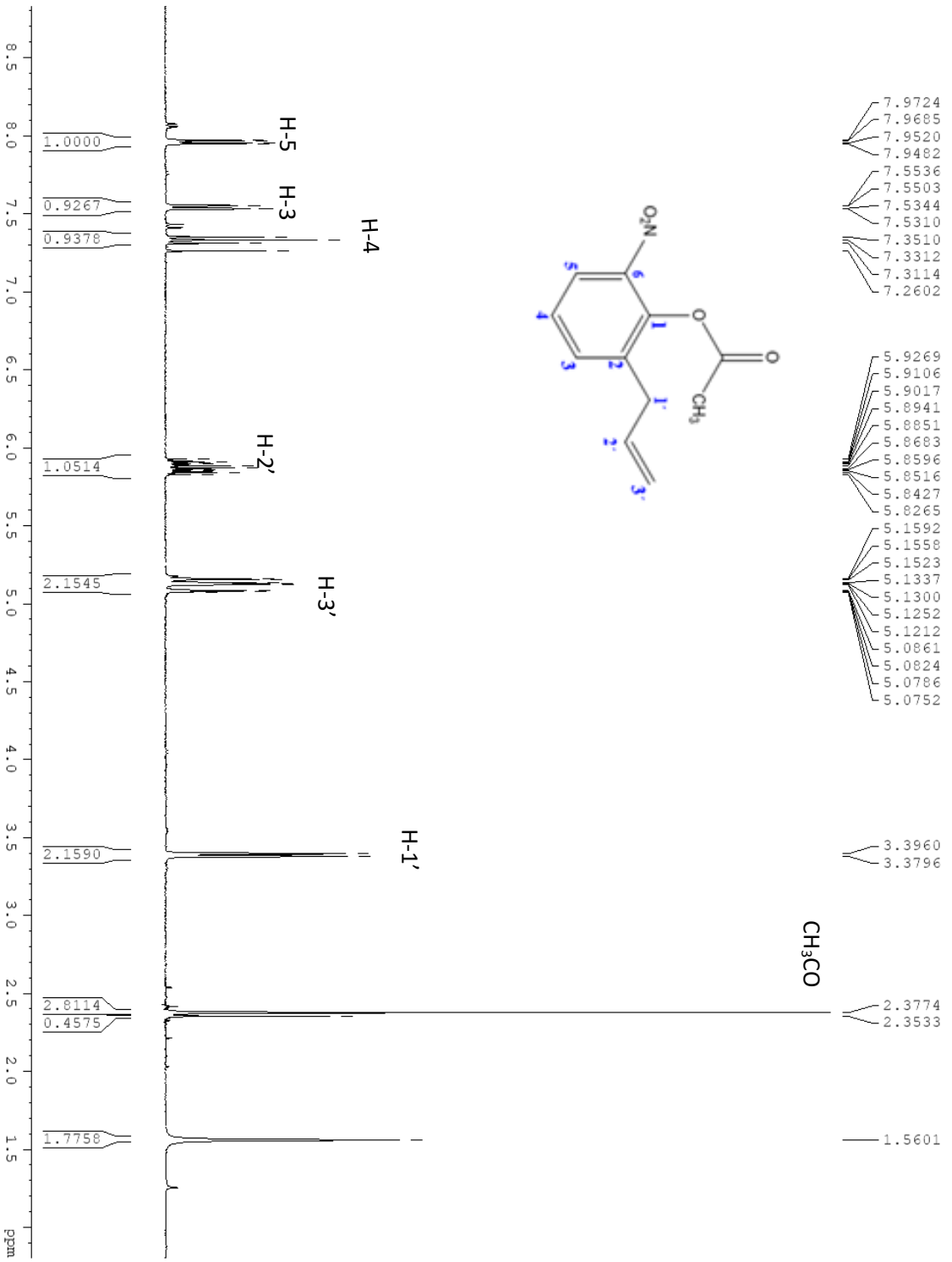
Espectro RMN ^{13}C 2-alil-4-nitrofenil acetato



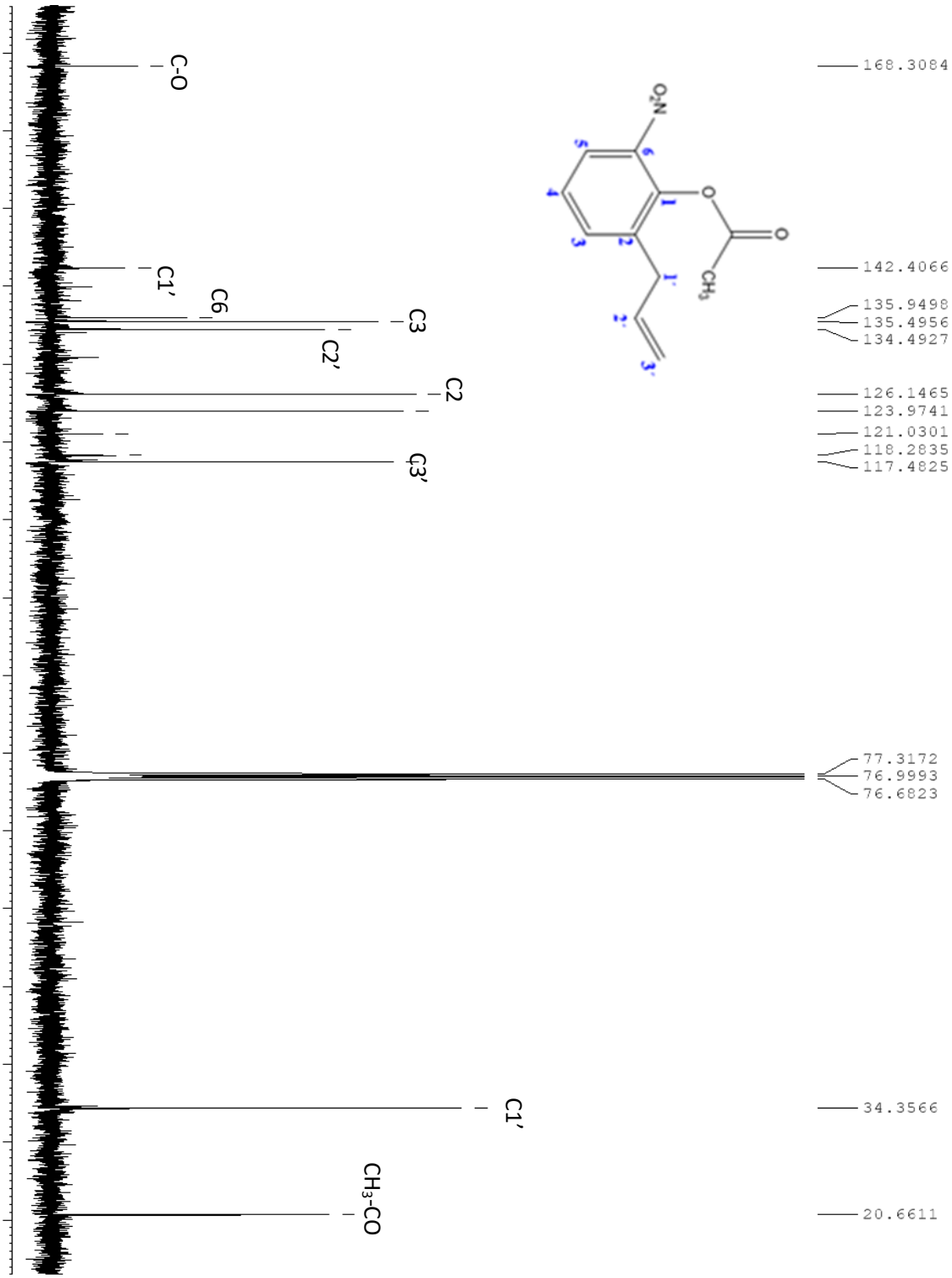
Espectro IR 2-alil-4-nitrofenil acetato



Espectro RMN ^{1}H 2-alil-6-nitrofenil acetato



Espectro RMN ^{13}C 2-alil-6-nitrofenil acetato

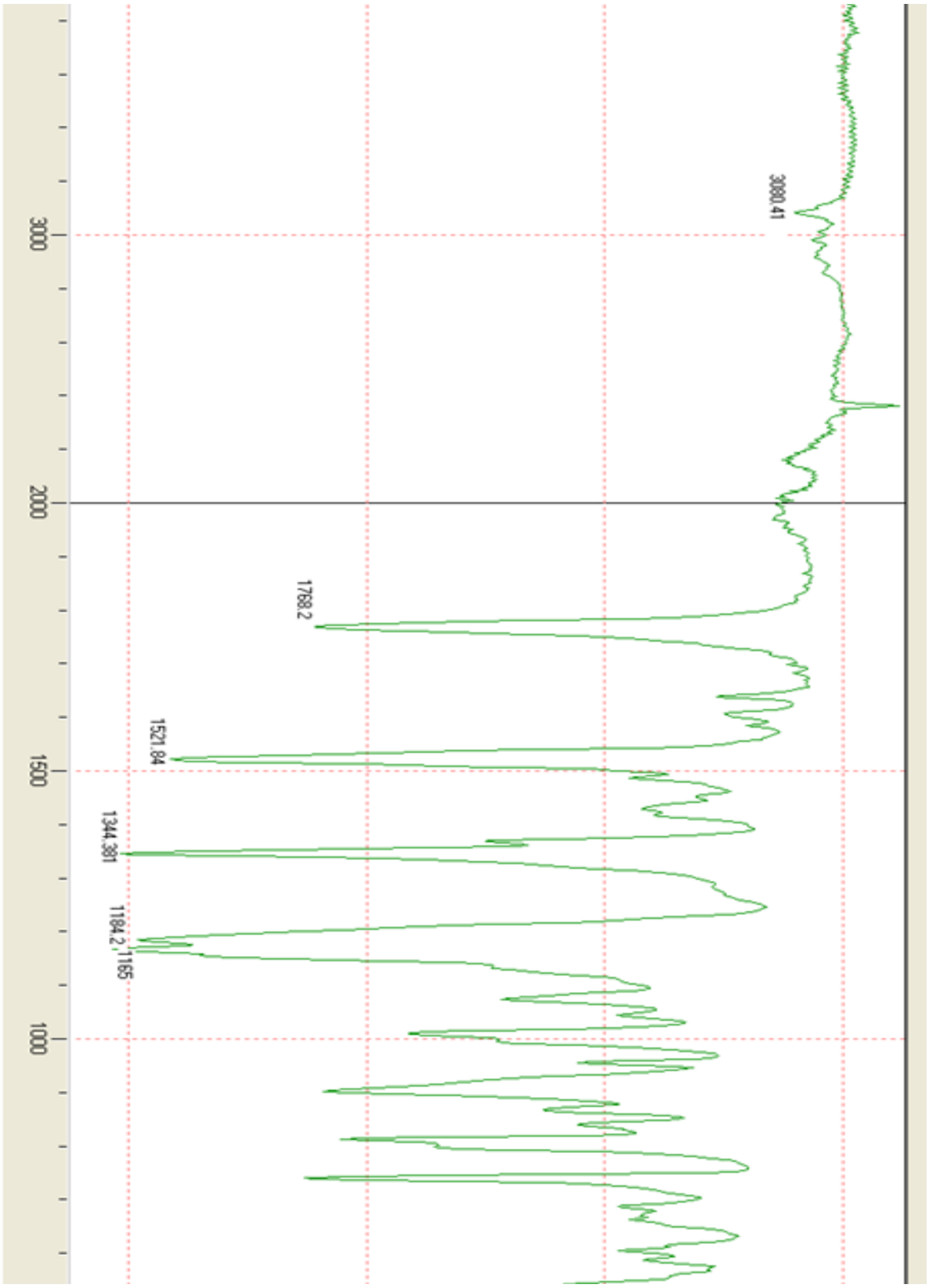


NAME Hector C
EXPNO 611
PROCNO 1
Date_ 20160119
Time 16.26
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 9024
DS 0
SWH 23980.814 Hz
FIDRES 0.731836 Hz
AQ 0.6832628 sec
RG 574.7
DW 20.850 usec
DE 6.00 usec
TE 299.2 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

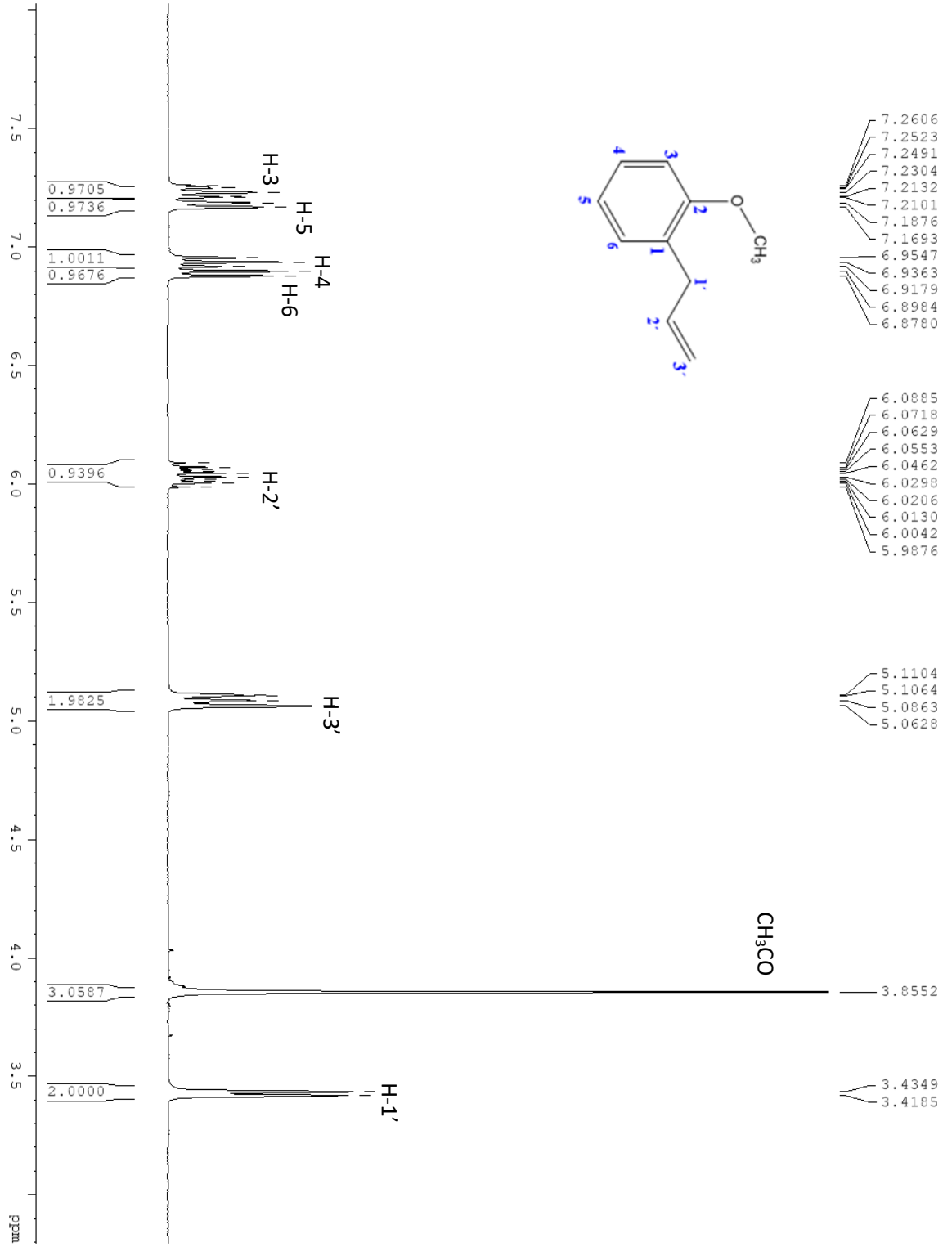
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 14.00 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6242995 MHz

======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 85.00 usec
PL2 6.00 dB
PL12 23.00 dB
PL13 23.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz
SI 32768
SF 100.6127686 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

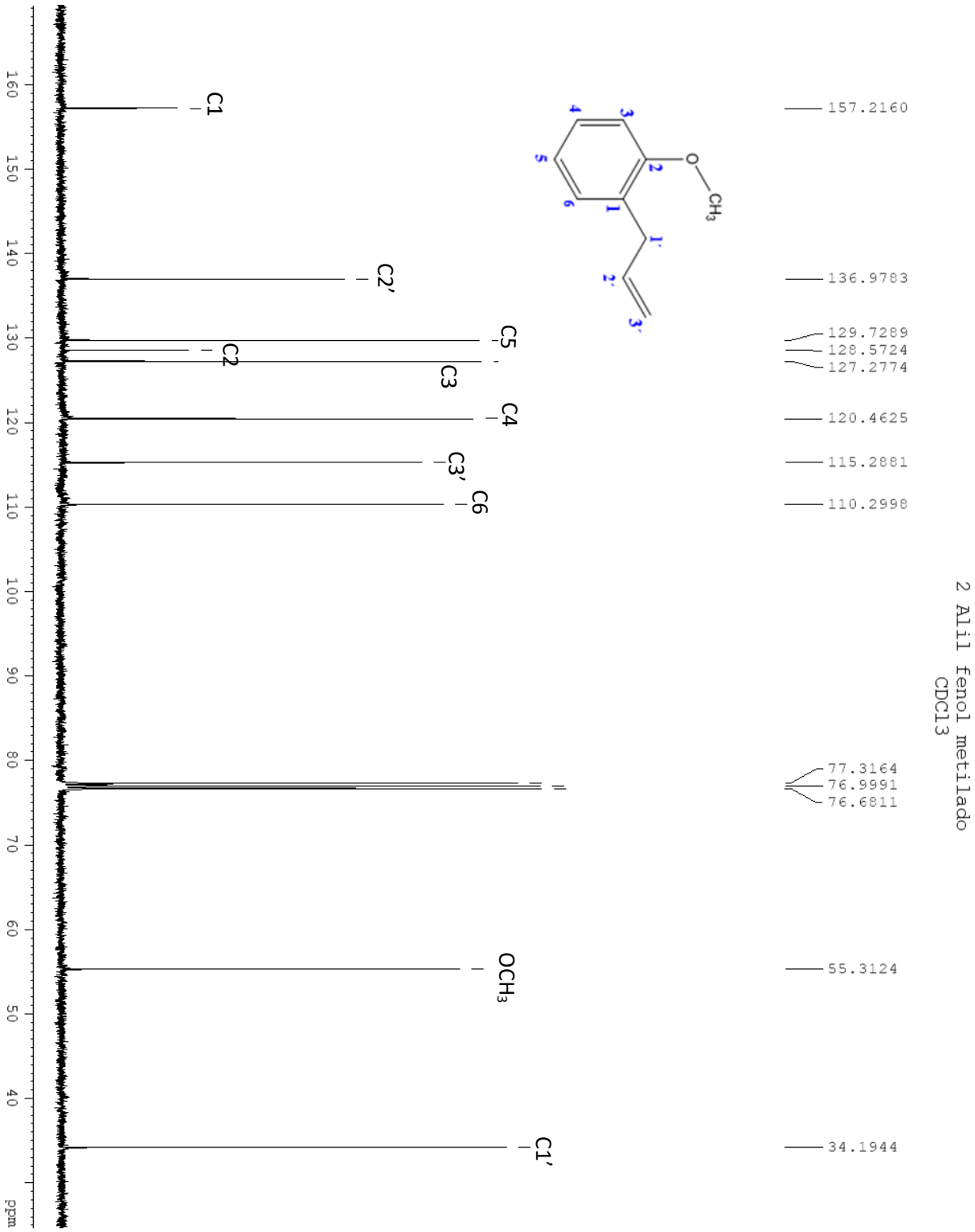
Espectro IR 2-alil-6-nitrofenil acetato



Espectro RMN ^{1}H 1-alil-2-metoxibenceno



Espectro RMN ^{13}C 1-alil-2-metoxibenceno

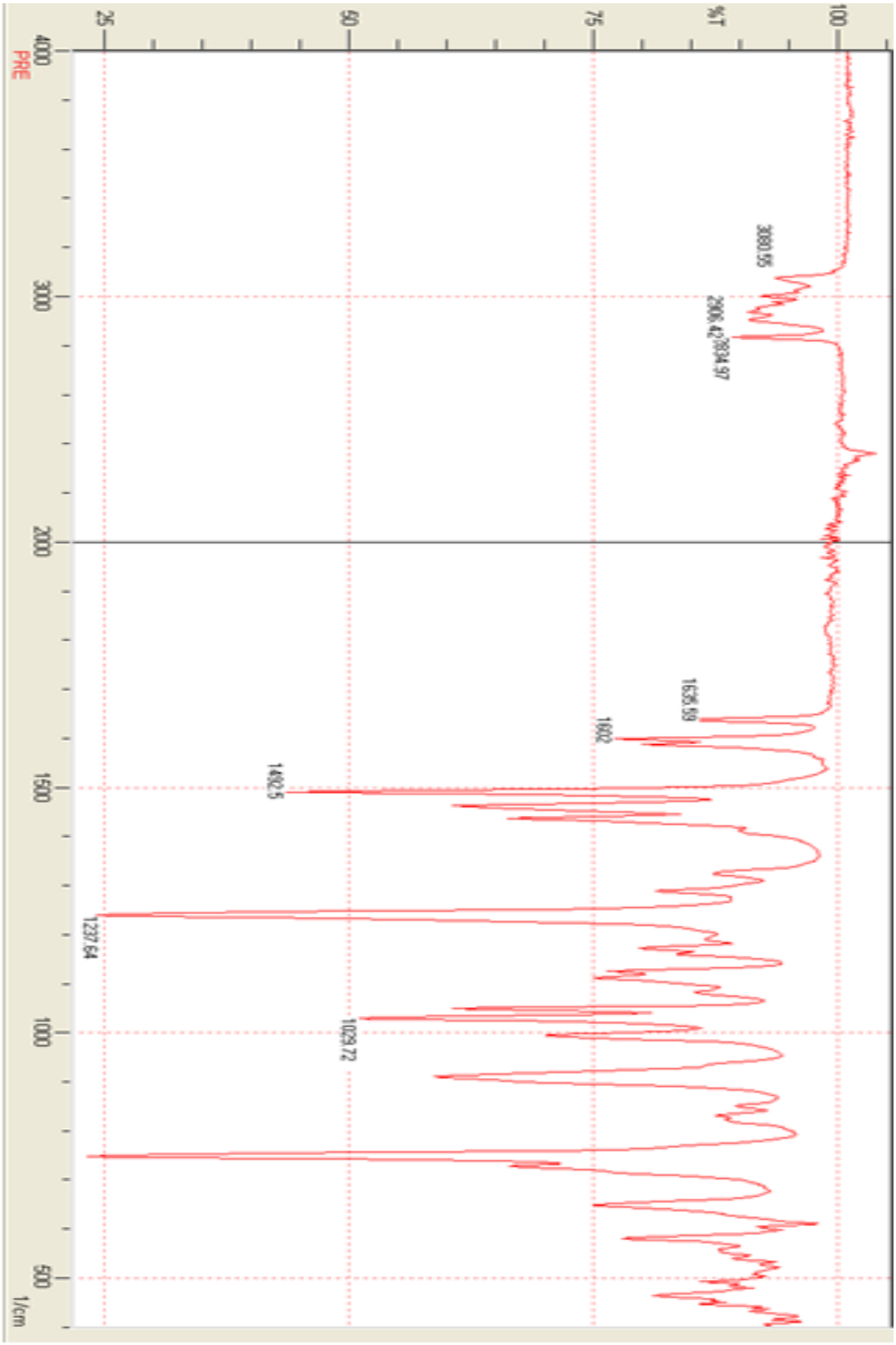


NAME Hector C
EXPNO 649
PROCNO 1
Date_ 20160518
Time_ 17.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 512
DS 0
SWH 23980.814 Hz
FIDRES 0.731836 Hz
AQ 0.6832628 sec
RG 574.7
DW 20.850 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

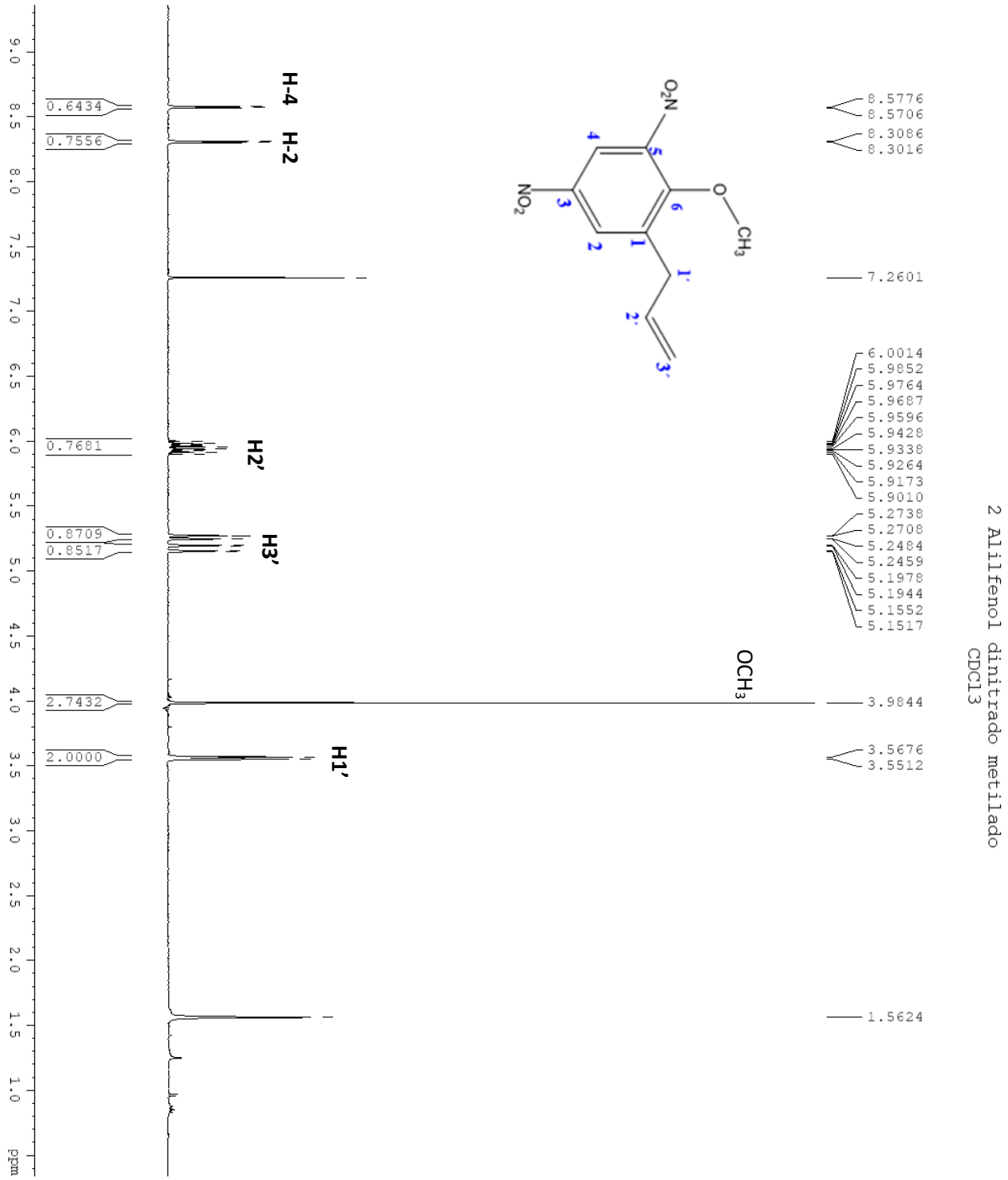
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 14.00 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6242995 MHz

======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 85.00 usec
PL2 6.00 dB
PL12 23.00 dB
PL13 23.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz
SI 32768
SF 100.6127748 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Espectro IR 1-alil-2-metoxibenceno



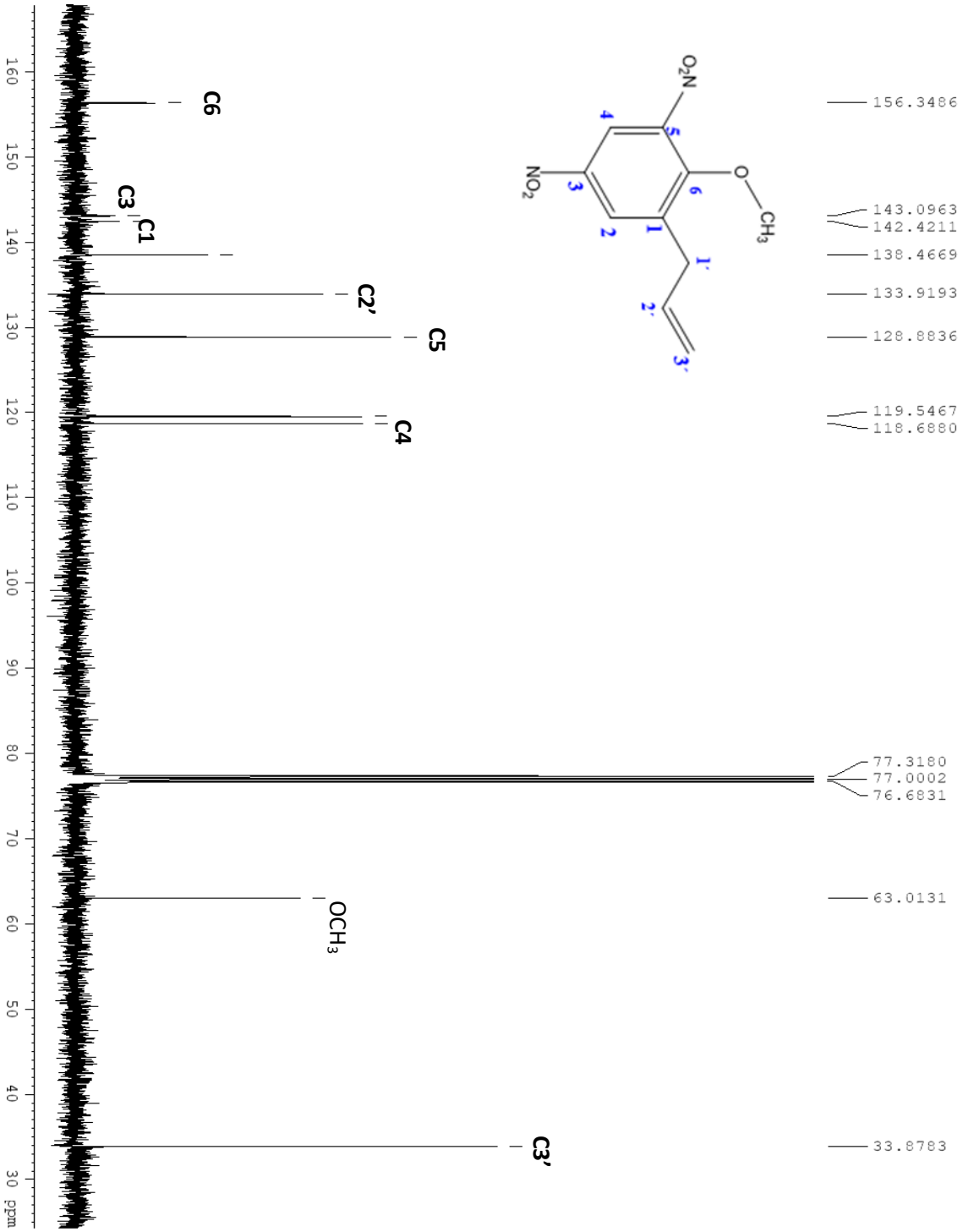
Espectro RMN ^{1}H 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno



NAME Hector C
EXPNO 853
PROCNO 1
Date_ 20190114
Time_ 13.35
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 2
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447731 sec
RG 3251
DW 62.400 usec
DE 6.00 usec
TE 1645.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 16.87 usec
PL1 4.00 dB
SFO1 400.1338012 MHz
SI 16384
SF 400.1300098 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

Espectro RMN ^{13}C 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno

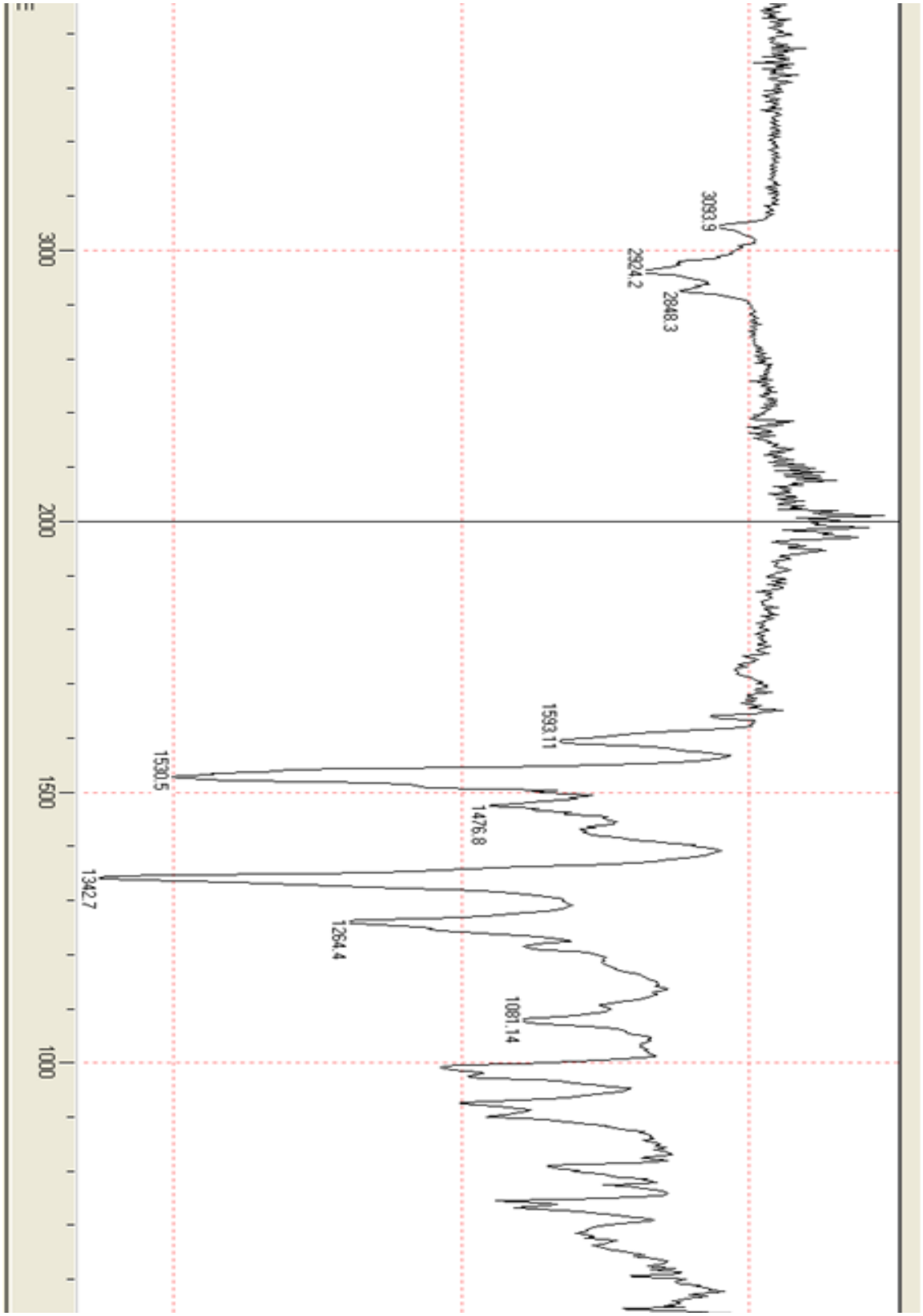



```
NAME                                  Hector C
EXPNO                                    726
PROCNO                                     1
Date_                               20170703
Time                                   12.46
INSTRUM                                spect
PROBHD                 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG                             zgpg30
TD                                   32768
SOLVENT                              CDCl3
NS                                    3058
DS                                       0
SWH                              23980.814 Hz
FIDRES                            0.731836 Hz
AQ                                0.6832628 sec
RG                                     812.7
DW                                    20.850 usec
DE                                      6.00 usec
TE                                    292.2 K
D1                                2.00000000 sec
D11                               0.03000000 sec
TD0                                        1

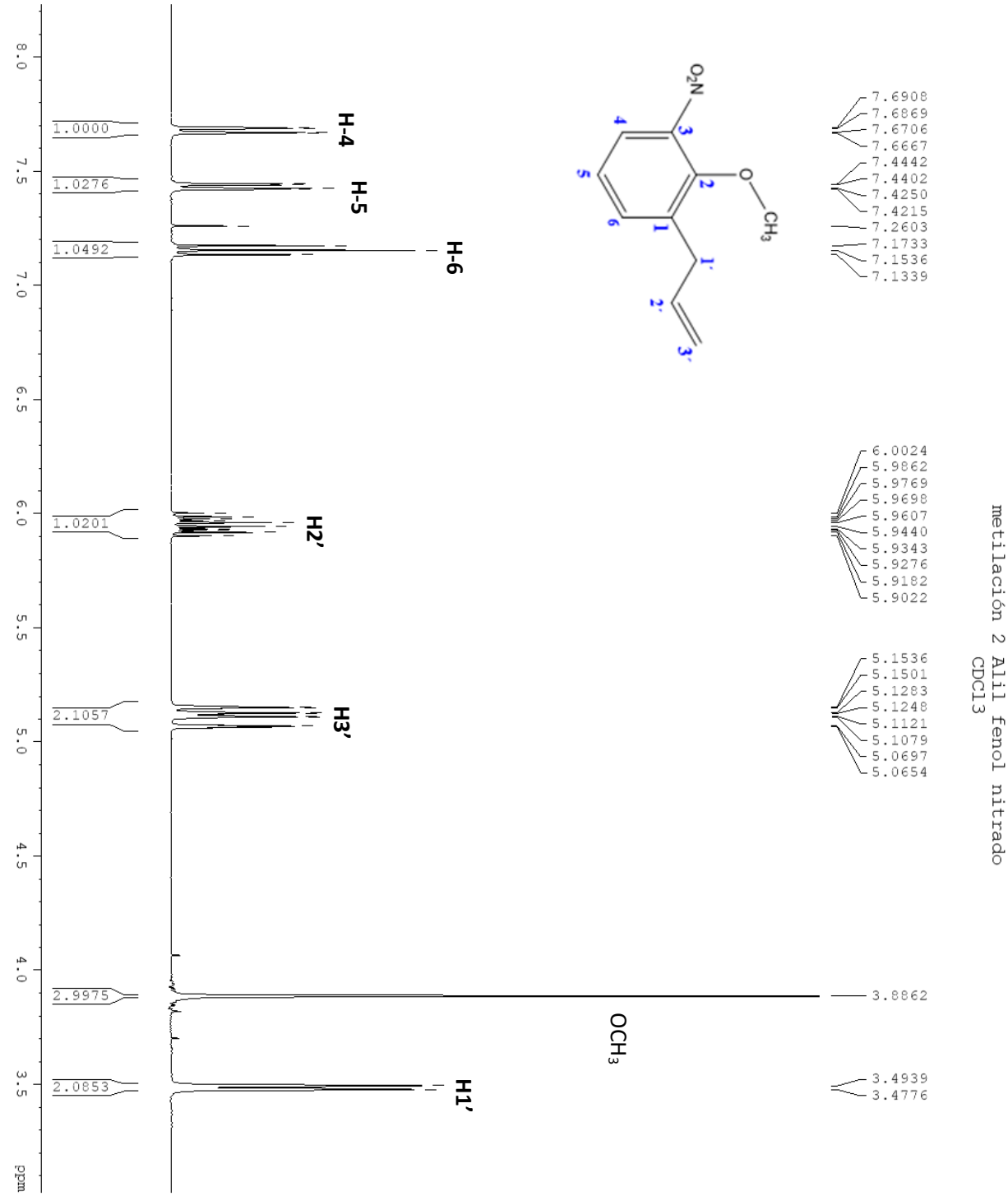
======== CHANNEL f1 ========
NUC1                                     13C
P1                                     14.00 usec
PL1                                    -6.00 dB
SFO1                        100.6242995 MHz

======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2                             waltz16
NUC2                                     1H
PCPD2                                 85.00 usec
PL2                                    6.00 dB
PL12                                  23.00 dB
PL13                                  23.00 dB
SFO2                        400.1316005 MHz
SI                                   32768
SF                          100.6127715 MHz
WDW                                     EM
SSB                                      0
LB                                    1.00 Hz
GB                                       0
PC                                    1.40
```

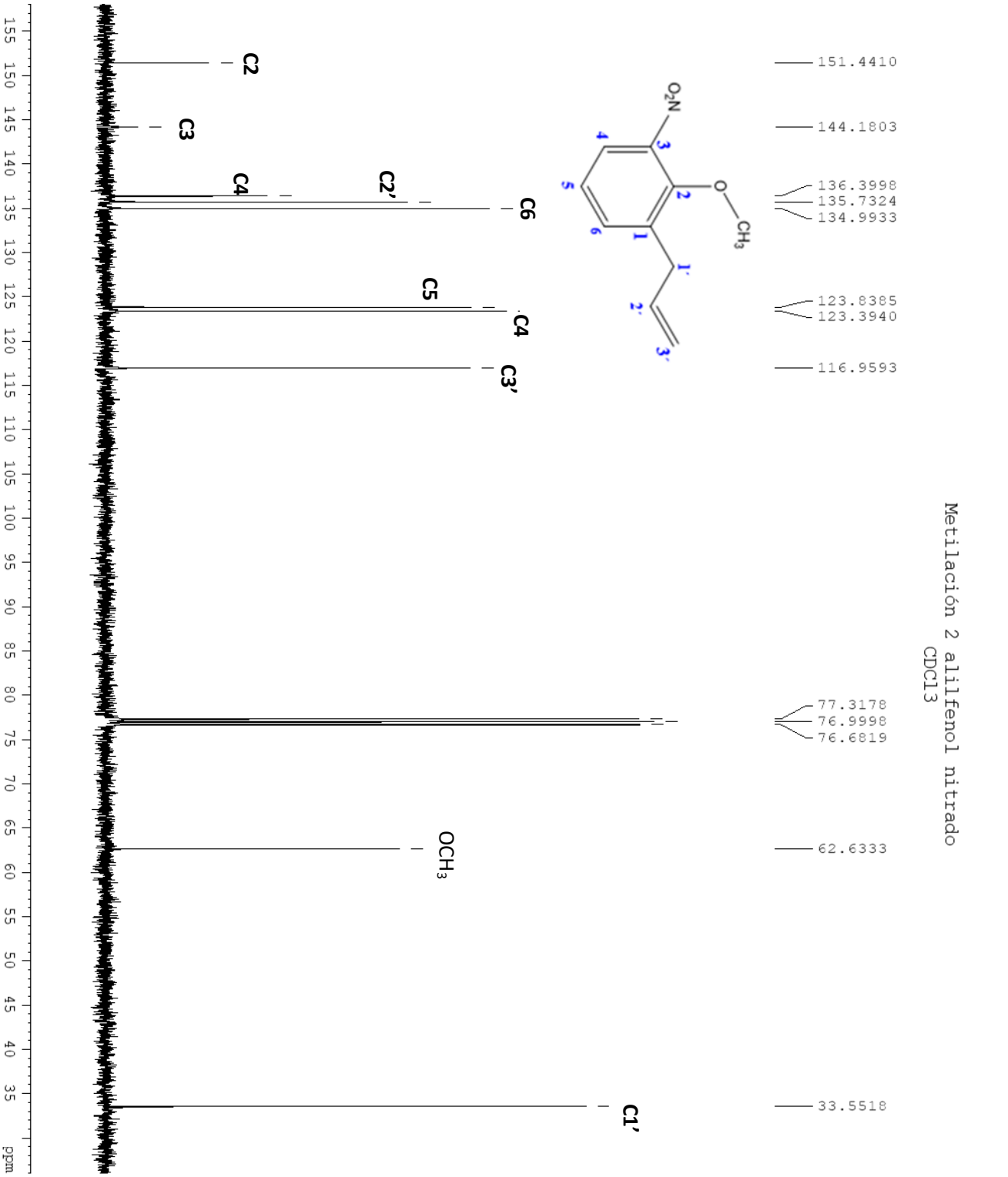
Espectro IR 1-alil-6-metoxi-3,5-dinitrobenceno



Espectro RMN ^{1}H 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno



Espectro RMN ^{13}C 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno

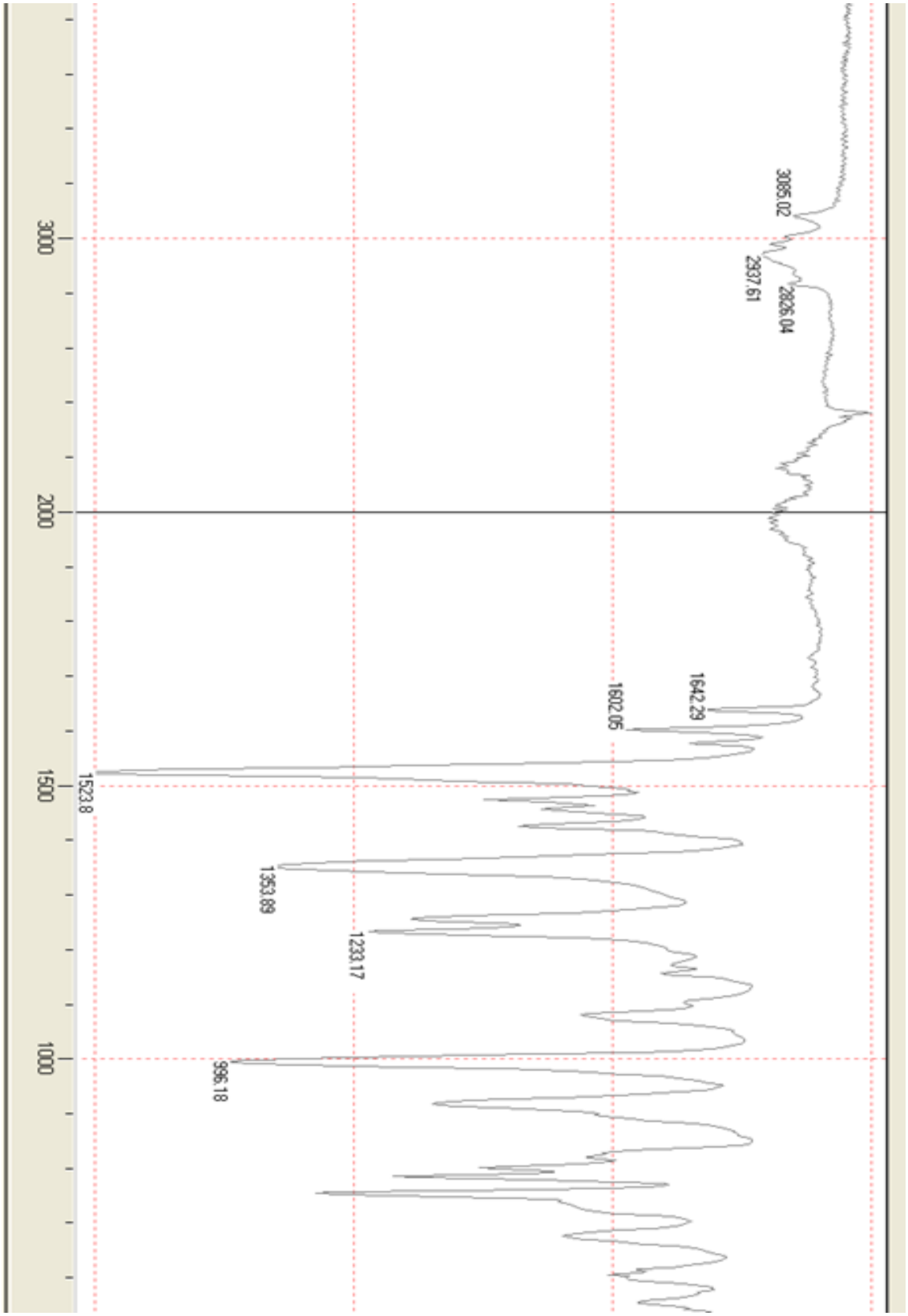


NAME Hector C
EXPNO 655
PROCNO 1
Date_ 20160609
Time_ 16.12
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 256
DS 0
SWH 23980.814 Hz
FIDRES 0.731836 Hz
AQ 0.6832628 sec
RG 512
DW 20.850 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

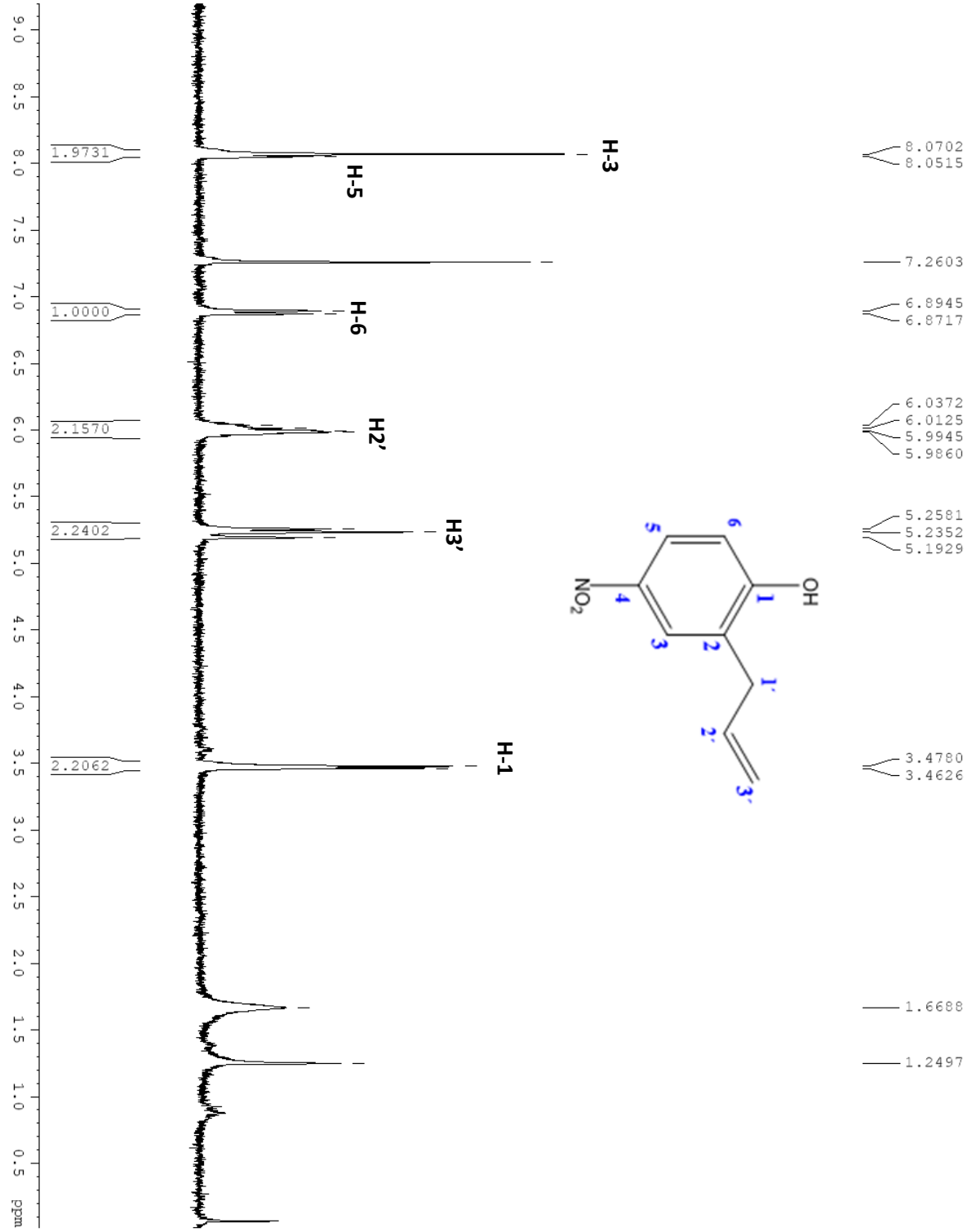
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 14.00 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6242095 MHz

======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 85.00 usec
PL2 6.00 dB
PL12 23.00 dB
PL13 23.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz
SI 32768
SF 100.6127735 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Espectro IR 1-alil-2-metoxi-3-nitrobenceno



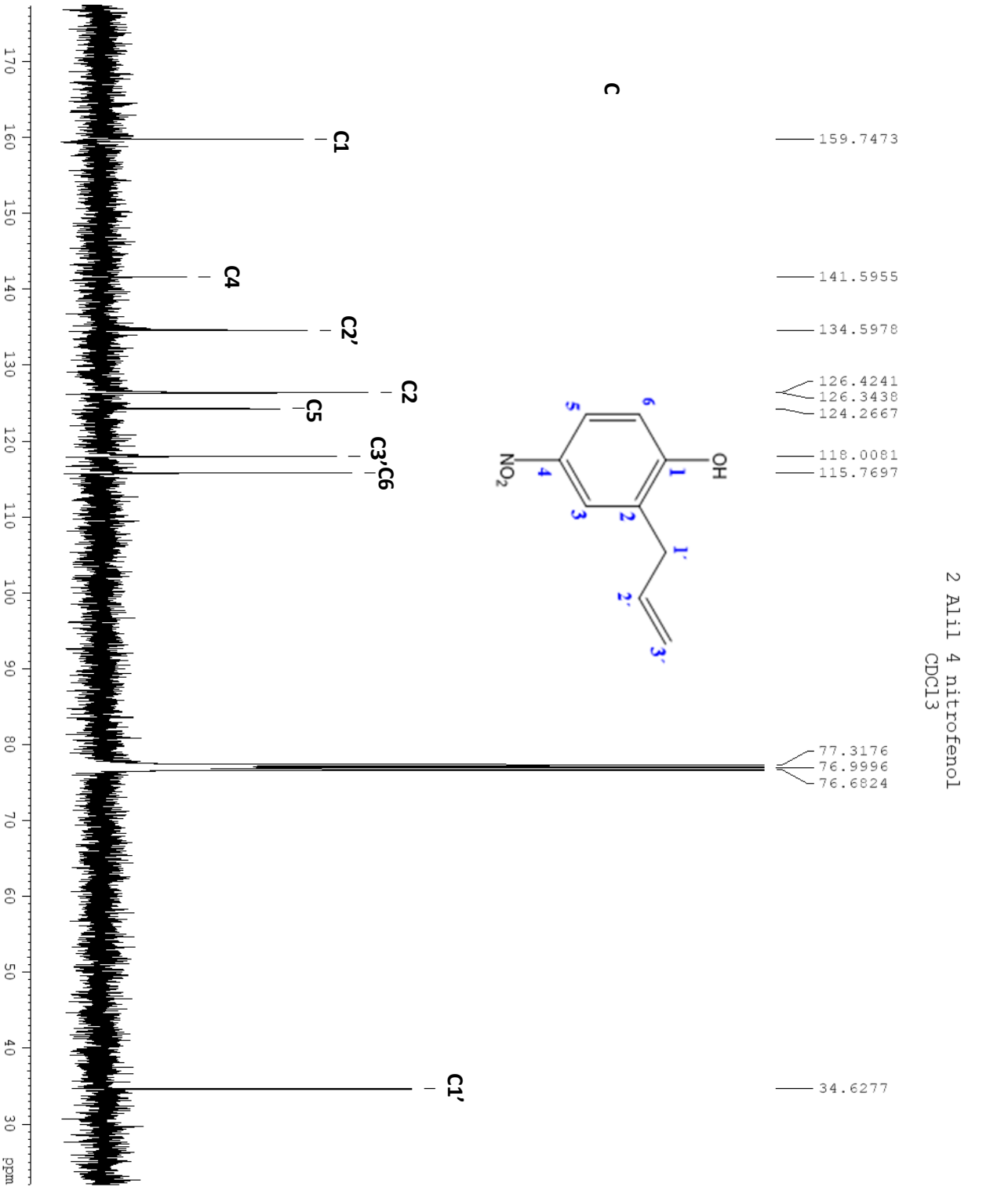
Espectro RMN ^{1}H 2-alil-4-nitrofenol




```
NAME                  Hector C
EXPNO                      850
PROCNO                       1
Date_               20181204
Time_                   14.11
INSTRUM                 spect
PROBHD     5 mm BBI 1H-BB
PULPROG                 zg30
TD                     32768
SOLVENT               CDCl3
NS                         8
DS                         4
SWH                8012.820 Hz
FIDRES                0.244532 Hz
AQ                 2.0447731 sec
RG                      11585.2
DW                     62.400 usec
DE                      6.00 usec
TE                     1645.2 K
D1                 1.00000000 sec
TD0                        1

======== CHANNEL f1 ========
NUC1                      1H
P1                      6.50 usec
PL1                     4.00 dB
SFO1           400.1338012 MHz
SI                     16384
SF             400.1300097 MHz
WDW                       no
SSB                        0
LB                      0.00 Hz
GB                         0
PC                      1.00
```

Espectro RMN ^{13}C 2-alil-4-nitrofenol




```
NAME                                    Hector C
EXPNO                                        851
PROCNO                                         1
Date_                                   20181206
Time_                                      12.19
INSTRUM                                     spect
PROBHD     5 mm BBI 1H-BB
PULPROG                                  zgpg30
TD                                       32768
SOLVENT                                  CDCl3
NS                                        8192
DS                                           0
SWH                                  23980.814 Hz
FIDRES                                0.731836 Hz
AQ                                    0.6832628 sec
RG                                         574.7
DW                                        20.850 usec
DE                                         6.00 usec
TE                                       1645.2 K
D1                                    2.00000000 sec
D11                                   0.03000000 sec
TD0                                           1

======== CHANNEL f1 ========
NUC1                                        13C
P1                                        14.00 usec
PL1                                       -6.00 dB
SFO1                            100.6242995 MHz

======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2                                 waltz16
NUC2                                        1H
PCPD2                                     85.00 usec
PL2                                        6.00 dB
PL12                                      13.45 dB
PL13                                      23.00 dB
SFO2                            400.1316005 MHz
SI                                       32768
SF                              100.6127722 MHz
WDW                                        EM
SSB                                         0
LB                                       1.00 Hz
GB                                          0
PC                                       1.40
```

Espectro IR 2-alil-4-nitrofenol

