

“Síntesis de híbridos de Pulegona para el tratamiento de *Monilinia fructicola* en frutos con carozo”

Tesis para obtener el grado de licenciado/a en Obstetricia y Puericultura.

Profesor Guía

Dr. Alejandro Madrid Villegas.

Estudiantes

Daniela Marín Molina, Constanza Reyes Vera, Valentina Salgado Zapata, Valentina Silva

Pedrerros, Daniel Soto Chávez, Nicolás Toledo Godoy.

Viña del Mar, 2021

AGRADECIMIENTOS

- *Agradecemos al proyecto FONDECYT Regular 1190424 por hacer posible esta investigación.*
- *A la Escuela de Obstetricia y Puericultura de la Universidad de Valparaíso.*
- *Al Laboratorio de Productos Naturales y Síntesis Orgánica de la Universidad de Playa Ancha.*
- *Al Profesor Dr. Alejandro Madrid por la oportunidad de permitirnos el trabajo en el laboratorio y por los conocimientos entregados.*
- *A Susana Flores, que sin duda nos ayudó en cada cosa que no sabíamos y fue un gran apoyo para el desarrollo de este proyecto*
- *A nuestros padres, abuelos, familia, amigos y que nos observan, sostienen, comprenden, escuchan y actúan en post de nuestro desarrollo profesional y personal.*
- *Al staff de LPNSO, que día a día nos animaron y apoyaron para cumplir nuestras metas.*

Tabla de contenido

RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
ABSTRACT	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	11
1.1 Marco conceptual.....	14
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS E HIPÓTESIS	22
2.1 Objetivo General.....	22
2.1.1 Objetivos Específicos	22
2.2 Operacionalización de Objetivos	23
2.3 Hipótesis	26
CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODO	27
3.1 Enfoque y alcance.....	27
3.2 Diseño general	27
3.3 Población y muestra	27
3.4 Fuentes de información	28
3.4.1 Unidad de estudio.....	28
3.4.2 Unidad informante.....	28
3.4.3 Unidad referencial	28
3.5 Instrumento/s de Recolección de Datos	28
3.6 Consideraciones Éticas.....	29
3.7 Análisis de Datos.....	29
3.8 Materiales.....	29
3.8.1 Compuestos usados para la síntesis de los híbridos de pulegona	29
3.8.2 Reactivos y solventes utilizados para la síntesis y purificación de híbridos de pulegona	30
3.8.3 Insumos utilizados para la síntesis y purificación de híbridos de pulegona	30
3.8.4 Equipos utilizados para la síntesis y purificación de híbridos de pulegona	31
3.9 Métodos utilizados en la síntesis de híbridos de pulegona	32
3.9.1 Síntesis	32
3.9.2 Identificación	35
3.9.3 Pruebas biológicas	36

CAPÍTULO 4: RESULTADOS	37
CAPÍTULO 5: DISCUSION Y CONCLUSIONES	42
5.1 Discusión.....	42
5.2 Conclusión.....	46

GLOSARIO

Actividad de una molécula: la concentración requerida de una molécula para dar cierta respuesta en una sustancia.

Chalconas: son cetonas aromáticas α,β -insaturadas de origen natural o sintético, denominadas también como benciledenterpencetonas, estiril-fenil-cetonas, benzalacetofenonas, diarilpropenonas o 1,3-difenil-2-propen-1-onas según la IUPAC. Son compuestos de una gran reactividad debido a la presencia de dos centros electrofílicos

EC₅₀: Se define como la concentración media máxima eficaz en relación a la concentración de un fármaco, anticuerpo o tóxico que induce una respuesta a medio camino entre la línea de base y la máxima después de un tiempo de exposición específico.

Reacción de Claisen Schmidt: Método clásico para la obtención de chalconas que consiste en un mecanismo de reacción de condensación, que es similar a la condensación aldólica y que comprende la adición nucleofílica de un ion enolato de éster al grupo carbonilo de una segunda molécula éster.

Resistencia fúngica: resistencia adquirida que sólo se establece en una población determinada que está bajo el uso de un plaguicida de manera continua, produciendo una pérdida de la sensibilidad de este en el patógeno.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1: Estructura Aldehídos.....	20
Tabla 2: Resultados Pruebas Biológicas.....	40

Figuras

Figura 1: Estructura Geraniol.....	18
Figura 2 Estructura Limoneno.....	18
Figura 3 Estructura Mentol.....	18
Figura 4 Estructura Pulegona.....	18
Figura 5 Estructura general de las chalconas.....	19
Figura 6 Columna Cromatográfica.....	34
Figura 7 Estructura (S,Z)-2-bencilideno-3-metil-6- (propan-2-ilideno) ciclohexano-1-ona.....	37
Figura 8 Estructura (S,Z)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona.....	37
Figura 9 Estructura (S,Z)-2-(3,4-dimetoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona.....	38
Figura 10 Estructura (S,Z)-2-(4-hidroxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona.....	38
Figura 11 Estructura (S,Z)-2-(3-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexan-1-ona.....	38
Figura 12 Estructura (S, Z)-2- (4-metoxibencilideno) -3-metil-6- (propan-2-ilideno) ciclohexano-1-ona.....	39
Figura 13 Estructura (S,Z)-2-(2-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona.....	39
Figura 14 Estructura (S,Z)-2-(3-hidroxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona)....	39
Figura 15 Estructura (S,Z)-2-(4-hidroxi-3-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona.....	40

RESUMEN

La producción y comercialización de carozos a nivel mundial se ha visto afectada por distintos factores que influyen en la precosecha, postcosecha o durante su almacenamiento. Uno de ellos es la presencia de la *Monilinia fructicola*, hongo fitopatógeno más conocido por causar la enfermedad moniliasis, comúnmente llamada “podredumbre parda”. Su hospedero principal es el género de árboles *Prunus* spp. Los conidios se esparcen durante la primavera para crear fuentes de inoculación en canchales, frutos momificados y ramillas atizonadas.

Para el control de esta plaga se usan fungicidas que tienen como ingrediente activo el benzimidazol o Benomilo, que, si bien son útiles, a la actualidad ya se han presentado varios casos a nivel mundial donde la *Monilinia* ha presentado resistencia especialmente a estos ingredientes. Sumado a esto, es sabido que la *M. fructicola* tiene una alta variabilidad genética, lo que generaría más problemas en este ámbito.

Cabe destacar que está demostrado que el benzimidazol es tóxico, ya que en diversos estudios realizados en ratones les ha provocado náuseas, sensibilidad cutánea, dermatitis, entre otros a corto plazo, así mismo se demostró que a largo plazo generaron en esta hepatotoxicidad, aumento de proliferación celular, y apariciones de tumores benignos. También se ha evidenciado que en humanos es un potente teratógeno causando por ejemplo leucemia y malformaciones como anoftalmia y/o craneoencefalías.

Debido a los grandes cultivos y la poca fiscalización del uso de elementos de protección personal en agricultores y temporeros, no se sabe exactamente la magnitud del riesgo de estar expuestos a estos fungicidas en realidad. En el país, estudios demuestran que los hijos de mujeres temporeras han tenido efectos neurotóxicos como un coeficiente intelectual más bajo, efectos genotóxicos y carcinógenos, además de un aumento del riesgo de 3 a 4 veces mayor de tener cáncer de mama; y un aumento en la incidencia de fisura de labio palatina no sindrómica.

Tras lo expuesto anteriormente surge como posible solución la investigación y experimentación con plantas aromáticas y medicinales, ya que, sus principios activos tienen como características ser antioxidantes, antifúngicos, antibacterianos entre otros. Estudios

describen que a moléculas derivadas de plantas como la pulegona se le atribuyen propiedades carminativas, efectos antimicrobianos, y además cuenta con ventajas terapéuticas como menores efectos secundarios, menor vida media, e inhibición el crecimiento de la mayoría de las cepas en menores concentraciones en comparación con otros compuestos.

El propósito de esta investigación es sintetizar, caracterizar y determinar la actividad fungicida de los híbridos de pulegona contra *Monilinia Fructicola* en pruebas *in vitro*. En primer lugar se realizó la síntesis de los híbridos a partir de pulegona y una serie de aldehídos, luego mediante cromatografía en columna y en cromatografía en capa fina las moléculas fueron separadas y purificadas y posteriormente fueron caracterizadas mediante la técnicas espectroscopias complementarias de Infrarrojo (FT-IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Masas (MS) y sus propiedades físicas como punto de fusión y rotación óptica.

Finalmente, las moléculas fueron evaluadas en pruebas *in vitro* en carozos cuyos resultados fueron favorables en los compuestos con valores de EC50 2,5 a 8,72 $\mu\text{g} / \text{mL}$, en donde se comprobó que su actividad antifúngica era capaz de actuar sobre la *M. fructicola* en rangos de infección entre 75% y 100% sobre carozos.

Palabras claves: Carozos, podredumbre parda, fungicidas, benzaldehídos, pulegona, actividad antifúngica.

ABSTRACT

The production and marketing of stone fruit worldwide has been affected by different factors that influence pre-harvest, post-harvest and storage. One of them is the presence of *Monilinia fructicola*, a phytopathogenic fungus best known for causing the moniliasis disease commonly known as "brown rot". Its main host is the tree genus *Prunus* spp. Conidia spread during spring to create inoculation sources in cankers, mummified fruits and stunted twigs.

To control this pest, fungicides with active ingredients such as benzimidazole or Benomyl are used, which, although they are useful, there have already been several cases worldwide where *Monilinia* has shown resistance to these ingredients. In addition to this, it is known that *M. fructicola* has a high genetic variability, which would generate more problems in this area.

It should be noted that it has been demonstrated that benzimidazole is toxic, since in several studies carried out on mice it has caused nausea, skin sensitivity, dermatitis, among others in the short term, and it was also demonstrated that in the long term it generated hepatotoxicity, increased cell proliferation and the appearance of benign tumors in these mice. It has also been shown that in humans it is a potent teratogen causing, for example, leukemia and malformations such as anophthalmia and/or cranioencephaly.

Due to the large crops and the lack of control of the use of personal protective equipment in farmers and seasonal workers, it is not known exactly the magnitude of the risk of being exposed to these fungicides. In the country, studies show that the children of seasonal women have had neurotoxic effects such as a lower IQ, genotoxic and carcinogenic effects, as well as a 3 to 4 times higher risk of breast cancer, and an increase in the incidence of non-syndromic cleft lip and palate.

After the above mentioned, research and experimentation with aromatic and medicinal plants is a possible solution, since their active principles have the characteristics of being antioxidants, antifungal, antibacterial and others. Studies describe those molecules derived from plants such as pulegone are attributed carminative properties, antimicrobial effects,

and have therapeutic advantages such as lower side effects, shorter half-life, and inhibition of the growth of most strains in lower concentrations compared to other compounds.

The purpose of this research is to synthesize, characterize and determine the fungicidal activity of pulegone hybrids against *Monilinia fructicola* in in vitro tests. First, the hybrids were synthesized from pulegone and a series of aldehydes, then by column chromatography and thin layer chromatography the molecules were separated and purified and subsequently characterized by complementary techniques of Infrared spectroscopy (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Mass (MS) and their physical properties such as melting point and optical rotation.

Finally, the molecules were evaluated in in vitro tests and in pits whose results were favorable for all compounds with EC50 values (drug concentration that produces 50% of the maximum effect) 2.5 to 8.72 $\mu\text{g/mL}$, where it was proved that their antifungal activity was able to act on *M. fructicola* in infection ranges between 75% and 100% on pits.

Key words: stone fruit, brown rot, fungicides, benzaldehyde, pulegone, antifungal activity.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La alimentación es parte fundamental de la vida del ser humano. Dentro de las recomendaciones de la organización mundial de la salud para la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, llevar una dieta saludable ayuda a prevenir la malnutrición y las consecuencias de esta, como la diabetes, cardiopatías o accidentes cerebro vasculares, entro otros [1 ,2].

Las dietas altas en frutas y verduras están ampliamente recomendadas ya que constituyen una fuente importante de nutrientes como vitaminas, minerales, antioxidantes y fibra [3], influyendo favorablemente en la salud de las personas. Sin embargo, estos son productos perecederos y susceptibles a microorganismos patógenos, como lo son los hongos fitopatógenos que a través de diferentes mecanismos invaden a su huésped [4].

La producción y comercialización de frutas tiene una gran variedad de factores que influye en el proceso de precosecha, postcosecha o durante su almacenamiento, disminuyendo aún más su vida útil y provocando grandes pérdidas en los cultivos [4]. Aumentando su precio comercial, dificultando su adquisición por parte de la población y amenazando la salud pública por la contaminación producida por estos microorganismos patógenos [5,6].

Uno de estos hongos fitopatógenos es la *Monilinia fructicola*, causante de la podredumbre parda o moniliasis que afecta a las frutas con carozo alrededor del mundo, específicamente en su hospedero principal *Prunus* spp. Este hongo se presenta en lugares donde existe una alta humedad, lluvia frecuente y temperaturas cálidas (sobre los 20°C) que favorecen su aparición y estadía [7], comienza en la primavera con los conidios que tendrán su fuente de inoculo en canchales en ramillas, frutos momificados y ramillas atizonadas [8].

El control de esta plaga depende de la utilización de fungicidas, pero estos no están exentos de fallas, se han registrado casos aislados de resistencia por parte de *M. fructicola*, como es el caso de los benzimidazoles que por su uso prolongado en el tiempo provocó que se desarrollara resistencia y por consiguiente pérdida de eficacia en el control [9]. Además *M.*

fructicola sostiene una alta variabilidad genética logrando producir población resistente o de alta virulencia [7].

Este es un problema para la industria alimentaria ya que incluso puede provocar pérdidas del total de la cosecha, pues afecta al cultivo produciendo atizonado de flores, muerte de ramas y podredumbre de las frutas, dificultando el control de este fitopatógeno si las condiciones ambientales son favorables [10].

En Chile la llegada de esta plaga se detectó el año 2009 y se registró el 2010 como *Monilinia frutícola* causante de la moniliasis o la podredumbre parda/morena [11] y tiene el estado de plaga cuarentenaria presente según el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

Por otro lado, los pesticidas utilizados actualmente en agricultura se asocian a toxicidad como el Benzimidazol o “Benomilo®” [12] según un estudio en ratas, con efectos agudos como náuseas, sensibilidad cutánea, dermatitis, y efectos a largo plazo como hepatotoxicidad, aumento en la proliferación celular y aparición de tumores benignos; además demostró que puede resultar en efectos teratogénos produciendo craneoencefálicas. En humanos también demostró ser teratogénico, según un estudio realizado en Costa Rica, se observó clara relación entre los progenitores y el desarrollo de leucemia en su descendencia, y estudios realizados en Nueva Zelanda, Australia, Inglaterra y Estados Unidos presentaron una preocupante tasa de malformaciones como anoftalmia [13].

A pesar de existencia de políticas reguladoras que exigen el uso de elementos de protección personal en la agricultura, debido a la escasa fiscalización y grandes extensiones de cultivos de la industria agronómica, no se conoce la magnitud del riesgo de exposición a pesticidas, debido a la utilización de estos en los cultivos, ya que cada cierto tiempo se realiza un cambio del componente activo de los pesticidas no pudiendo realizar estudios a largo plazo para determinar su efecto en la población [14].

Sin embargo, algunos estudios realizados en Chile indican que estos tienen efectos neurotóxicos, como, por ejemplo, en niños un coeficiente intelectual más bajo a lo esperado para su edad. Efectos genotóxicos y carcinógenos que se reflejan un riesgo entre 3 a 4 veces mayor al grupo control para daño genético y cáncer de mama. Y efectos reproductivos con un riesgo seis veces mayor para malformaciones en hijos de mujeres temporeras [15].

Un estudio retrospectivo realizado en Chile analizó la incidencia de Fisura Labio palatina no sindrómica estudio los factores de la madre que prevalecían en la presencia de esta patología en sus hijos durante 12 años. El estudio determinó que en mujeres entre 21 a 39 años, un 67,74% pertenecían al rubro agrícola expuestos a pesticidas, por lo que pueden ser las causas del desarrollo de fisura labio palatina en los hijos de estas mujeres [16].

Es de vital importancia la creación de nuevas alternativas para combatir estos patógenos, debido a que los tratamientos para los patógenos que afectan a las plantas suelen ser dañinos para la salud, ya que se acumulan en el cuerpo causando enfermedades y afecciones, sobre todo en las mujeres gestantes, que desarrollan disrupciones en la embriogénesis.

Es por esto por lo que las plantas aromáticas y medicinales surgen como fuentes atractivas de búsqueda por su contenido de principios activos que exhiben bioactividades como la antioxidante, antifúngica, antibacteriana, entre otras [17].

A partir de las plantas se pueden obtener terpenos, que son compuestos de hidrofóbicos que participan en casi todas las interacciones biológicas: plantas y microorganismos o entre las mismas plantas, actuando como fitoalexinas, antialimentarios de insectos o agentes de defensa.

Un exponente de lo mencionado es que hay estudios que describen moléculas derivadas de plantas, como la Pulegona, que tiene efectos antimicrobianos, y además cuenta con ventajas terapéuticas como; menores efectos secundarios, menor vida media, e Inhiben el crecimiento de la mayoría de las cepas en menores concentraciones en comparación con otros compuestos [18].

1. Marco conceptual.

Desde mediados del siglo XX que el reino fúngico ha estado bajo observación de múltiples investigadores y científicos a nivel mundial debido a sus potentes características. Compuestos por células eucariotas capaces de formar estructuras tanto unicelulares (levaduras) y multicelulares (hifas), con una alimentación a base de sustancias carbonadas que pueden desarrollarse en ambientes ricos en oxígeno diatómico, y de manera extraordinaria sin estos [19]. Debido a esto y más han sido organismos más que competentes para colonizar aguas, tierras e incluso el aire.

Este estudio se centrará en el hongo de interés patológico llamado *Molinilia fructicola*, relacionándose la resistencia de este microorganismo a sus fungicidas. La *M. fructicola* es un patógeno que afecta a carozos tales como duraznero, nectarín, ciruelo, cerezos, entre otros. Está ampliamente distribuida a nivel global, se caracteriza por marchitar, momificar y destruir las flores y frutos de dichos árboles. Su ciclo de vida es a través de esporas, conocidas como conidios que se transmiten por viento, a través de insectos o por la lluvia, donde la proliferación dependerá de las condiciones favorables del ambiente, como lo son la temperatura entre 4°C a 30°C, siendo la óptima a los 24°C, y con una humedad relativa entre el 70%-85%, produciéndose la infección entre 3 a 6 días y posterior descomposición de la fruta [20], presentándose un estado de latencia en frutos momificados siendo este origen de inoculaciones futuras en cada ciclo productivo [21].

Perteneciente a la Clase Ascomycetes, Orden Helotiales, de la familia Sclerotiniaceae. Sus principales hospedantes *Prunus avium* (Cerezo), *Prunus domestica* (Ciruelo), *Prunus persica* (Duraznero), *Prunus nucipersica* (Nectarino), *Prunus salicina* (Ciruelo japonés), la podredumbre parda produce en este daño en los frutos como presencia de pudrición acuosa, moho superficial de coloración parda/marrón o abundante esporulación parda/marrón [22].

A nivel global se aplican distintos tipos de mecanismos de control para esta enfermedad, principalmente se utilizan fungicidas químicos, que son altamente tóxicos tanto para la salud de los humanos, animales y el medioambiente. A su vez, a medida que pasa el tiempo se ha implementado el uso de fungicidas biológicos que funcionan a base de microorganismos controladores, que, mediante la competencia nutricional, parasitismo o secreción de metabolitos inhibitorios, como toxinas, ralentizan el crecimiento y/o generan la muerte del patógeno [23]. La idea es seleccionar un hongo que no esté en el fruto, introducirlo y de manera natural que desplace al más perjudicial favoreciendo el control del hongo causante de la podredumbre [24].

Otro mecanismo de control son los plaguicidas o pesticidas se pueden definir de diferentes maneras por los usos y aplicaciones que tendrá en el cultivo. En este estudio utilizaremos la definición “compuesto químico, orgánico o inorgánico, o sustancia natural que se utilice para combatir malezas o enfermedades o plagas potencialmente capaces de causar perjuicios en organismos y objetos” [25]. Estos se conforman de un grupo heterogéneo; se puede clasificar según, su fórmula química del principio activo, mecanismo de acción y espectro de acción. Además, su actividad específica de cada plaguicida se puede clasificar en: insecticidas, raticidas, herbicidas, nematocidas, moluscocidas, acaricidas y fungicidas. Con usos variados como en el ámbito agrícola, sanitario o domésticos [14].

Al ser aplicados en hongos, el plaguicida o fungicida (compuesto natural o sintéticos) pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo y alterando su viabilidad.

En 1966 Chile reconoce la existencia de *Monilinia* en el valle central de Chile, desde la provincia de Santiago hasta Valdivia [20]. El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) ha implementado un listado de fungicidas a utilizar para el control de la *M.fructicola* dentro de los cuales se utilizan como ingrediente activo el trifloxytrobin, pyrimetanilo, tebuconazol, fenhexamid, propiconazol, iprodiona, miclobutanilo, captan80 wp (o wg), boscalid,

piraclostrobina, ciprodinilo, fludioxonil, clorotalonilo, azoxistrobina, difenoconazol, fenbuconzol, *Bacillus subtilis* cepa qst713 [26].

Pero dado el uso continuo de los plaguicidas antifúngicos se produce una problemática relacionada a la resistencia fúngica, que en este caso se clasifica como una resistencia fúngica adquirida ya que sólo se establece en una población determinada que está bajo el uso de este antifúngico de manera continua, produciendo una pérdida de la sensibilidad de este, sobre el hongo patógeno, reduciendo las posibilidades de controlar la plaga [27]. Según la FRAC (Fungicide Resistance Action Committee 2019), clasifica a *Monilinia* sp. como un patógeno que presenta un riesgo medio en generar resistencia a los fungicidas.

Debido a la alta variabilidad genética que presenta la *M. fructicola*, el aumento de frecuencia y dosis de fungicidas en ciertas temporadas del año, han contribuido a la aparición de cepas resistentes que no tardaron en aparecer en países como EE. UU. y China [23].

Algunos de estos mecanismos de resistencia que interfieren en el mecanismo de acción de los antifúngicos son; alteración de las enzimas relacionadas con la síntesis del ergosterol y la alteración en las bombas de expulsión y facilitadores mayores [26], otras formas se asocian con las mutaciones de genes específicos que se relacionan con las dianas de las distintas clases de antifúngicos. Existen grupos de fungicidas sistémicos (benzimidazoles, dicarboximidas e inhibidores de la demetilación) utilizados para controlar la *M. fructicola* en España., para ello , se determinó la resistencia al metiltiofanato (TM), iprodiona (I), y ciproconazol (CPZ), en donde dió como resultado más del 95% de los aislados de *M. fructicola* resultaron altamente resistentes a TM; más del 50 % de los aislados de *M. fructicola* resultaron resistentes a I; manteniéndose estas resistencias a lo largo de los cinco años de muestreo, y (c) algunos aislados resistentes a CPZ en la población a partir de 2008 [28].

Luego de 10 años desde el primer caso detectado en España, se estudió la diversidad genética sobre la población de *M. fructicola* resistente a becimidazoles, dicarboximidas e inhibidores de la demetilación. El estudio incluyó 110 aislados de *M. fructicola* que presentaban diferentes fenotipos de resistencia a fungicidas. Los resultados mostraron unos niveles de variabilidad inesperadamente altos para un patógeno introducido hace relativamente poco en España. Existe evidencia sobre la recombinación de fenotipos resistentes que permitió que los aislados de *M. fructicola* combinaran y potenciaron su resistencia, ya que habían desarrollado esta de manera independiente [28].

No hay datos existentes en la actualidad de variables resistentes en Chile, pero la evidencia muestra que probablemente ocurra lo mismo, ya que se utilizan los mismos agentes activos para el control de esta plaga [23].

El desarrollo de mecanismos de resistencia de *M. frutícola* ha llevado a buscar nuevas alternativas contra el tratamiento de este fitopatógeno, por lo que para el desarrollo de este experimento se utilizaron compuestos derivados de plantas que presentaran actividades biológicas.

En este sentido aparecen en la investigación los terpenos, que tienen amplia actividad antibacteriana, antifúngica y antiprotozoaria. Estos compuestos son los responsables de dar el aroma característico de las plantas; geraniol (**Figura 1**), por ejemplo, se encuentra en la mayoría de los cítricos, al igual que el limoneno (**Figura 2**). Ambos corresponden a los aromas característicos de naranja y limón respectivamente. El mentol (**Figura 3**) es el responsable de darle el aroma característico a las plantas del género *Mentha* [29].

Dentro de este grupo podemos destacar la pulegona (**Figura 4**); una cetona monoterpenoide cíclica derivada de los aceites esenciales de plantas como *Mentha piperita* (menta), y *Mentha pulegium* (poleo). Investigaciones afirman que pulegona posee efectos en la disminución de las biopelículas y de la MFC (concentración mínima fungicida) de diversos hongos [30].

Una de las fuentes de pulegona es *Mentha pulegium* (poleo) una hierba siempreverde que mide entre 20 a 50 cm de altura, finamente vellosa y con aroma intenso característico, usada tradicionalmente para el tratamiento de trastornos del aparato digestivos como las flatulencias, dispepsia, cólicos intestinales y también usados como emenagogos y en los trastornos del ciclo menstrual [31].

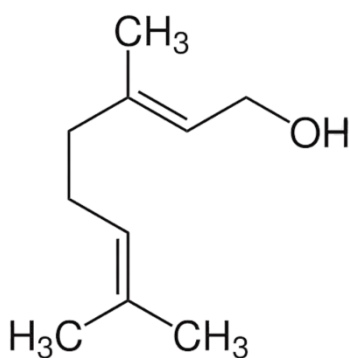


Figura 1. Estructura Geraniol

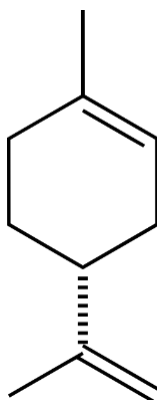


Figura 2. Estructura Limoneno

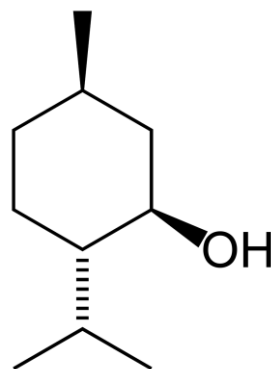


Figura 3. Estructura Mentol

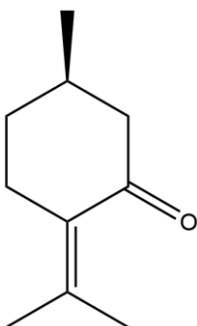


Figura 4. Estructura pulegona

Esta planta posee altas propiedades antimicrobianas debido a que su aceite esencial posee gran contenido de pulegona, que avala su empleo en productos de higiene bucodental, desinfectantes ambientales o preservantes de alimentos, pero en dosis altas puede generar efectos adversos como: epigastralgia, náuseas, vómitos, diarrea, letargo o agitación, fiebre, entre otros. Por esto no se recomienda su uso en el embarazo [31]. Estudios realizados en ratas, mencionan que en dosis de 80 a 160 mg / kg de peso administradas, generaban atonía, disminución de la creatinina en sangre, peso corporal terminal y cambios histopatológicos en el hígado y sustancia blanca del cerebelo [32]. Por lo cual, podría generar estos efectos a mediano y largo plazo en los seres humanos con la constante administración de pulegona.

Uno de los productos a obtener en la síntesis son las chalconas que son cetonas aromáticas alfa – beta insaturadas con estructura: 1, 3 difenil, 2-propen, 1-ona en un sistema carbonilo con dos anillos aromáticos. Estas moléculas constituyen a un subgrupo de metabolitos secundarios que sintetizan las plantas para protegerse contra diversos patógenos. Son precursores de cadena abierta de flavonoides que forman parte de los mecanismos de defensa de las plantas contra las especies reactivas del oxígeno (ion superóxido, ion hidroxilo) con el fin de sobrevivir a situaciones de peligro para la planta, ya sea por insectos o producto del ambiente [33].

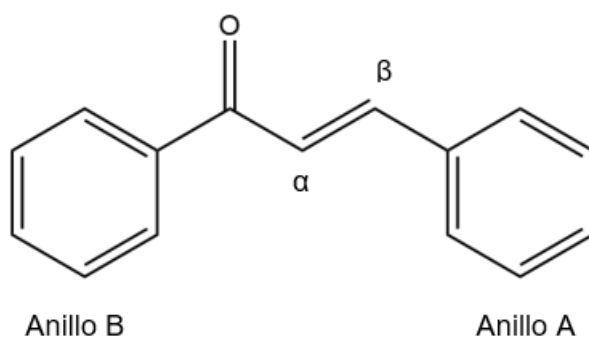
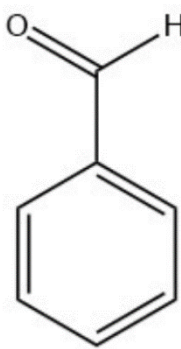
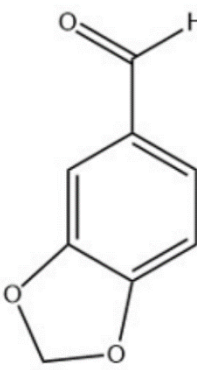
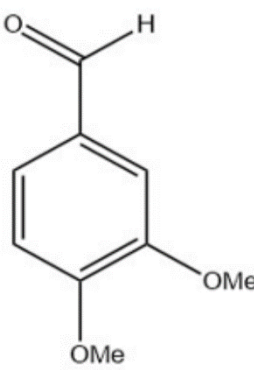
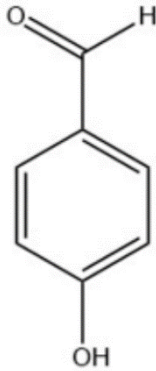
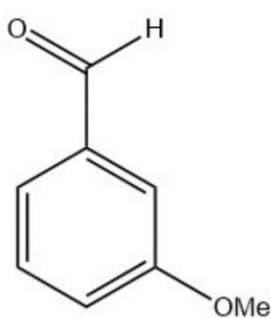
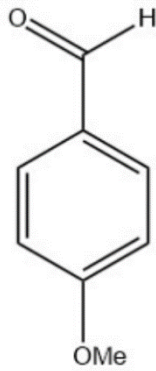
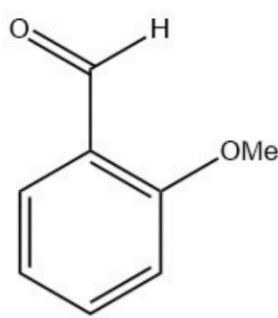
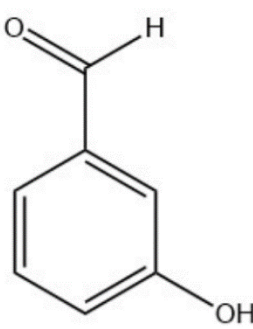
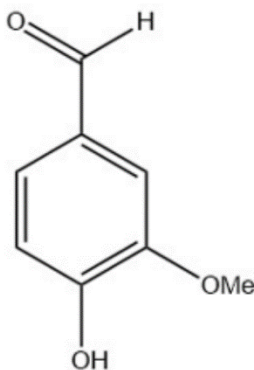


Figura 5. Estructura general de las chalconas

Estas moléculas son formadas a través de la reacción de Claisen Schmidt, que consiste en un mecanismo de reacción de condensación, que es similar a la condensación aldólica y que comprende la adición nucleofílica de un ion enolato de éster al grupo carbonilo de una segunda molécula éster. La diferencia de la reacción de Claisen Schmidt de una cetona con un aldehído y la condensación aldólica de una cetona y un aldehído es en el intermediario tetraédrico, en donde en el resultado de la última es protonada para dar como resultado un alcohol, mientras tanto que en la reacción de Claisen Schmidt de una cetona y un aldehído el intermediario tetraédrico en la reacción expulsa un grupo saliente alcóxido para generar un producto de sustitución en el grupo acilo, exactamente similar al comportamiento en los esteres [34].

En la síntesis de híbridos de pulegona donde existe una modificación o biotransformación de la estructura, permite mejorar el metabolismo de los productos naturales y/o convertirlos en productos bioactivos con propiedades aumentadas y menor toxicidad [35]. Un ejemplo, es la biotransformación de las cetonas a través de hongos filamentosos obtenidos de la piel capaces de hidrogenar la cetona para obtener alcoholes quirales, un método de generar fragancias [36].

Para esto es indispensable contemplar los aldehídos que intervendrán en la síntesis de híbridos de pulegona, estos (RCHO) son compuestos carbonílicos usados como intermediarios en la síntesis de agentes farmacéuticos, en rutas biológicas y procesos industriales, suelen utilizarse, además, como materias primas para preparar otros compuestos [34]. Los aldehídos que serán de interés para nuestra investigación son los presentes en la **Tabla 1**: Benzaldehído (**1.a**), Piperonal (benzo[d][1,3]dioxol-5-carbaldehído) (**1.b**), 3,4- dimetoxibenzaldehído (**1.c**), 4- hidroxibenzaldehído (**1.d**), M- anisalaldehído (3-metoxibenzaldehído) (**1.e**), P- anisalaldehído o (4- metoxibenzaldehído) (**1.f**), 2-metoxibenzaldehído (**1.g**), 3- hidroxibenzaldehído (**1.h**) y Vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) (**1.i**).

 1.a Estructura Benzaldehído	 1.b Estructura Piperonal (benzo[d][1,3]dioxol-5-carbaldehído)	 1.c Estructura 3,4-dimetoxibenzaldeído
 1.d Estructura 4-hidroxibenzaldehído	 1.e M- anisaldehído (3- metoxibenzaldehído)	 1.f Estructura p- anisaldehído o (4- metoxibenzaldehído)
 1.g Estructura 2-metoxibenzaldehído	 1.h Estructura 3-hidroxibenzaldehído	 1.i Estructura Vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído)
TABLA 1. ESTRUCTURAS ALDEHÍDOS		

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

Determinar actividad fungicida de los híbridos de pulegona contra *Monilinia fructicola* en pruebas *in vitro*.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar híbridos de pulegona.
- Evaluar la actividad antifúngica de híbridos de pulegona en cepas de *M. fructicola*.
- Comparar la actividad antifúngica de los híbridos de pulegona con los usados en el mercado actual.

2.2 Operacionalización de Objetivos

Variable	Definición	Dimensiones	Indicadores	Subindicadores
Objetivo 1 Sintetizar y caracterizar híbridos de pulegona	El objetivo de esta investigación es obtener un híbrido de pulegona que junto a un aldehído determinado debe formar una chalcona. Las chalconas son cetonas aromáticas α,β-insaturadas de origen natural o sintético, denominadas también como benciledenterpencetonas, estilil-fenil-cetonas, benzalacetofenonas, diarilpropenonas o 1,3-difenil-2-propen-1-onas según la IUPAC. Las orto-hidroxichalconas son precursores para la síntesis de flavonas 3, pigmentos naturales ampliamente difundidos. (Awad, El-Neweihy y Selim, 1960). Algunas chalconas presentan actividad antimalárica, antileishmaniasis, antituberculosa,	Síntesis de híbridos de pulegona: • Medio ácido/base: Ph • Temperatura • Reactivos • Tipo de solvente • Medio ácido/base de la reacción • Purificación a través de CCF Caracterización de híbridos de pulegona: • Ensayos espectroscópicos	• Cantidad obtenida de producto • Espectros RMN, IR y Masas	20 mg

	antifúngica, antibacterial y antitumoral. (Parvesh, Amit y Vipin, 2014) . Son compuestos de una gran reactividad debido a la presencia de dos centros electrofílicos, los cuales pueden actuar como una sola unidad o de manera independiente lo que permite para estos sistemas el ataque de nucleófilos y la posibilidad de sufrir una adición 1,2- (adición directa) o 1,4- (adición conjugada)			
Objetivo 2 Evaluar actividad antifúngica de pulegona en <i>Monilinia fructicola</i>	Antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de <u>producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica</u> que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los	Cepas • <i>Molinilia fructicola</i> Actividad de las moléculas, Híbridos de pulegona: • Propiedades estructurales • Propiedades fisicoquímicas	EC50	Porcentajes de supervivencia

	sistemas de defensa del huésped. Actividad de una molécula: la concentración requerida de una sustancia para dar una cierta respuesta.			
Objetivo 3 Comparar la actividad antifúngica de los híbridos de pulegona con los usados en el mercado actual.	Antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.	Cepas: - <i>Monilinia fructicola</i> Actividad antifúngica de los compuestos en el mercado: - Mystic R - BC-1000	EC50	Porcentajes de supervivencia.

2.3 Hipótesis

Moléculas híbridas obtenidas a partir de la monoterpencetona pulegona y una serie de benzaldehídos presentarían una potente capacidad antifúngica ante el agente infeccioso *Monilinia fructicola*.

CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Enfoque y alcance

El presente estudio posee un enfoque cuantitativo y de carácter experimental, ya que se pretende realizar síntesis de moléculas híbridas de pulegona, a través de diferentes técnicas, para luego evaluar su actividad contra *Monilinia fructicola*.

3.2 Diseño general

Esta investigación tiene un diseño experimental exploratorio debido a que se centra en la síntesis de moléculas híbridas de pulegona a través de diferentes técnicas. El propósito de esta investigación es sintetizar, caracterizar y determinar la actividad fungicida de los híbridos de pulegona contra *Monilinia fructicola* en pruebas *in vitro*. En primer lugar, se realizó la síntesis de los híbridos a partir de pulegona y una serie de aldehídos, luego mediante cromatografía en columna y en cromatografía en capa fina las moléculas fueron separadas, purificadas y posteriormente fueron caracterizadas mediante las técnicas espectroscopias complementarias de Infrarrojo (FT-IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Masas (MS) y sus propiedades físicas como punto de fusión y rotación óptica.

3.3 Población y muestra

Para la investigación se utilizó una población de 9 híbridos de pulegona y 9 aldehídos; los cuales son: benzaldehído, 2 metoxibenzaldehído, meta-anisaldehído, P-anisaldehído, piperonal, 3,4 dimetoxibenzaldehído, , 3 hidroxibenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, y vainillina, más la pulegona.

La muestra utilizada para el estudio son 9 moléculas sintetizadas híbridas de pulegona, los cuales son: 2-bencilideno-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona, 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona, 2-(3,4-dimetoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona, 2-(4-hidroxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona, 2-(3-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona, 2-(4-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona, 2-(3,4-dimetoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona, 2-(4-hidroxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona, 2-(3-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona.

-3-metil-6- (propan-2-ilideno) ciclohexano-1-ona, 2-(2-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona, 2-(3-hidroxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona), 2-(4-hidroxi-3-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona.

Asimismo, se aplicaron criterios de inclusión y exclusión con los compuestos híbridos que fueron sintetizados. Se excluyeron aldehídos que no reaccionaron con pulegona, a pesar de utilizar diferentes métodos, por ejemplo, 2- hidroxibenzaldehído.

3.4 Fuentes de información

3.4.1 Unidad de estudio

Moléculas híbridas de pulegona y su actividad sobre hongo *Monilinia frutícola*.

3.4.2 Unidad informante

Información y datos recogidos durante la experimentación.

3.4.3 Unidad referencial

Laboratorio de Productos Naturales y Síntesis Orgánica (LPNSO) en Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Playa Ancha, Subida Leopoldo Carvallo N° 270, Playa Ancha, Valparaíso.

3.5 Instrumento/s de Recolección de Datos

En esta investigación se recopiló información desde la experimentación realizada en el Laboratorio de Productos Naturales y Síntesis Orgánica (LAPSO) en Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Playa Ancha. Además, se revisaron distintos artículos científicos y libros para orientar el trabajo en laboratorio.

3.6 Consideraciones Éticas

La experimentación de hemisíntesis de pulegona se realizará solo en laboratorios y no en otros hechos científicos que involucren la praxis con seres vivos. Por esto, no se aplicarán consentimientos informados. No existen conflictos de interés en esta investigación.

3.7 Análisis de Datos

El análisis es de tipo exploratorio ya que se estudia la probabilidad de que los híbridos de pulegona tienen capacidad antifúngica frente a *Monilinia Frutícola* y se realizará a través de un software estadístico y análisis de modelación.

3.8 Materiales

A continuación, se describirán los materiales y métodos utilizados para la síntesis y purificación de híbridos de pulegona, junto con los métodos usados para su identificación.

3.8.1 Compuestos usados para la síntesis de los híbridos de pulegona

- (R-) pulegona.
- Aldehídos:
 - 1) Benzaldehído
 - 2) P- anisaldehído o (4- metoxibenzaldehído)
 - 3) M- anisaldehído (3- metoxibenzaldehído)
 - 4) 2- metoxibenzaldehído
 - 5) Piperonal
 - 6) 3,4- dimetoxibenzaldehído
 - 7) 3- hidroxibenzaldehído
 - 8) 4- hidroxibenzaldehído
 - 9) Vainillina

3.8.2 Reactivos y solventes utilizados para la síntesis y purificación de híbridos de pulegona

- Hexano
- Acetato de etilo
- Diclorometano
- Acetona
- Etanol
- Sulfato de sodio anhidro
- Ácido sulfúrico
- Yodo para revelar
- Bicarbonato de sodio
- KOH en metanol
- Agua destilada
- Silica gel

3.8.3 Insumos utilizados para la síntesis y purificación de híbridos de pulegona

- Guantes de procedimiento Top Glove®.
- Matraz balón de fondo plano de 50mL y 100 mL
- Balones de 250mL, 500mL y 1000mL
- Matraz de Erlenmeyer
- Morteros
- Espátulas
- Propipetas
- Pipetas de 1mL y 5mL
- Micropipeta Biopette®, modelos p10, p100 y p200
- Puntas micropipetas de 10, 100 y 1000 µL
- Embudos de decantación
- Papel pH
- Embudos de vidrio

- Columnas cromatográficas
- Silicagel
- Probetas de 10mL, 25mL, 50 mL y 100 mL
- Viales ámbar.
- Viales transparentes
- Papel de aluminio
- Cámaras cromatográficas
- Placas para cromatografía en capa fina
- Soportes universales
- Capilares*
- Pipeta Pasteur
- Tubos ependorf
- Algodón
- Termómetro
- Cristalizador

3.8.4 Equipos utilizados para la síntesis y purificación de híbridos de pulegona

- Rotavapor
- Campana extractora de gases ESCO®
- Balanza analítica ML204 Mettler Toledo
- Ultrasonido
- Bombas de presión
- Placas de agitación VELP® Scientifica
- Refrigerador PROGRESS 3100 Tenza®
- Revelador con luz UV Espectroline® Model CM10A
- Horno convección mecánica Venticell® Eco line

3.9 Métodos utilizados en la síntesis de híbridos de pulegona

3.9.1 Síntesis

En este estudio se realizaron diversos métodos para la síntesis de los distintos híbridos que se evaluaron luego de cada reacción. Se usaron los siguientes métodos:

Método A: En un balón se agregan 1,0 equivalente molar de pulegona con 1,1 equivalentes del aldehído sustituido y se adicionan 10 ml de solución de hidróxido de potasio (KOH) en metanol al 20% m/v, esto se realiza en proporción 1:1:2 La Mezcla se agita por 48 hrs a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se neutraliza el medio de reacción usando una solución de HCl al 5%, y se extrae con acetato de etilo (EtOAc) (3x 50 mL) y la fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidrido, filtrada y concentrada a presión reducida y con rotavapor.

Método B: En un balón se agregan 1,0 equivalente molar de acetofenona con 1,1 equivalentes del aldehído sustituido y se adicionan 10 ml de etanol y 0,5 equivalentes de H₂SO₄. La mezcla se agita por 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se neutraliza el medio de reacción usando una solución de NaHCO₃ al 5%. Luego, se extrae con EtOAc (3x50 mL) y la fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidrido, filtrada y concentrada a presión reducida con rotavapor.

Método C (triflato de iterbio): En un balón se agregan pulegona, 3 hidroxibenzaldehído (aldehído) y triflato de iterbio (Yb) en una proporción de 1:2:0.5, sin solventes. La mezcla es llevada a columna de reflujo y es agitada por 6 horas a 90°C. Transcurrido el tiempo, se agrega agua destilada, se extrae con EtOAc (3x50 mL) y la fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidrido, filtrada y concentrada a presión reducida con rotavapor [37].

3.9.1.1 Purificación y separación

Luego de haber realizado la síntesis de híbridos de pulegona, se procedió a la etapa de purificación y separación de los compuestos. Para esto, se utilizó cromatografía. Esta es una técnica de separación que data de 1903, siendo hoy en día de uso muy común. Existe una gran variedad de técnicas cromatográficas, pero, todas se basan en conceptos de fase móvil, que es la mezcla por separar en un disolvente y fase estacionaria, que es un material absorbente [38]. En esta investigación se utilizó la cromatografía en capa fina (CCF) para analizar las moléculas sintetizadas y cromatografía en columna para su purificación.

3.9.1.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

Técnica rápida y sencilla utilizada para el monitoreo de reacciones y análisis de sus componentes. En el caso de esta investigación se utilizaron placas para CCF, que consisten en una lámina de aluminio con sílica gel actuando como absorbente y fase estacionaria. A través de capilares se depositaron muestras del compuesto en la placa, para luego ser llevada a una cámara cromatográfica con eluyentes como hexano y acetato de etilo en concentraciones dependientes del aldehído, estos eluyentes ascienden funcionando como la fase móvil de la técnica y que separan los compuestos según su polaridad en la placa de CCF. Se extrae la placa desde la cámara para observar los compuestos separados en luz UV, luego de esto es necesario revelar la placa cromatográfica con reactivos como ácido sulfúrico y/o yodo, aplicando calor para carbonizarla.

Como resultado se observan diversas manchas de colores, correspondientes a compuestos y elementos de la reacción, donde se esperaba encontrar e identificar el híbrido de pulegona sintetizado [39].

3.9.1.3 Cromatografía en columna

Esta técnica de purificación consiste en un recipiente de vidrio vertical llamado columna que puede ser de diversos tamaños (**Figura 6**), a esta se le adiciona un algodón en el fondo para que el absorbente, en este caso sílica gel, no filtre. Este absorbente tiene como función ser la fase estacionaria para la purificación de la sustancia, se vierte en la columna la cantidad de sílica gel que requiera la muestra, y se compacta debido a que la elución debe

ser uniforme, para esto se utiliza una bomba de aire. En la parte superior, es puesta la mezcla a separar, preparada como una papilla seca en silica gel o líquida en un disolvente. En esta investigación, para la elución se utilizaron los disolventes hexano y acetato de etilo en gradientes que descendían a través de la columna, separando los compuestos. Estos fueron recogidos en viales rotulados para su posterior análisis por medio de cromatografía en capa fina.



Figura 6. Columna cromatográfica

3.9.1.4 Cromatografía en capa fina preparativa

Técnica de purificación que se realiza con mayores tamaños de placa de CCF. En el caso de esta investigación, se utilizaron placas de silica gel de 20x20 cm donde se depositaron mayores cantidades de muestra para luego ser llevadas a una cámara cromatográfica de mayor tamaño con eluyentes como acetato de etilo y hexano. Se observó esta placa en luz ultravioleta marcando con lápiz los distintos compuestos de interés para luego ser barridos con una espátula de la placa de CCF. La silica gel extraída de estas zonas fue puesta en un embudo con papel filtro para extraer el compuesto con acetona. Estos fueron recogidos en viales para su análisis con cromatografía en capa fina.

3.9.2 Identificación

Estos métodos permiten establecer la pureza, identificar y caracterizar los híbridos de pulegona que se obtuvieron a través de las reacciones y posterior purificación.

3.9.2.1 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica muy usada en química para la determinación estructural de las moléculas orgánicas. Además, las técnicas de espectroscopia de masas y de infrarrojo que sirve para determinar grupos los funcionales de las moléculas, junto con RMN realizan un mapeo de la estructura de carbono – hidrogeno de la molécula [38].

3.9.2.2 Espectroscopia infrarroja (FT – IR)

Es una técnica usada en la química orgánica para determinar la estructura de una molécula. Las moléculas poseen energía y están en constante movimiento, en donde sus enlaces se estiran y contraen, y ocurren otras vibraciones moleculares. Estas contracciones y energías no son variables de forma continua, por lo que poseen frecuencias específicas que corresponden a niveles de energías fijos. Entonces al irradiar la molécula por medio de radiación electromagnética, la energía se absorbe si la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia de vibración. Cada frecuencia absorbida por una molécula corresponde a un movimiento molecular específico, por lo que esto puede determinar un enlace o grupo funcional en específico midiendo su espectro IR [34]. La región infrarroja (IR) cubre el intervalo de entre $7,8 \times 10^{-7}$ m a aproximadamente 10^{-4} m, pero su porción media que va desde $2,5 \times 10^{-6}$ m a $2,5 \times 10^{-5}$ m es utilizada en la química orgánica [34].

3.9.2.3 Espectroscopia de Masa (EM).

Esta técnica es utilizada para medir la masa molecular de la muestra estudiada obteniendo en el proceso más información de ella. Los espectrómetros de masa tienen 3 partes esenciales: una fuente de ionización para la molécula, un analizador de masas donde se separan los iones por su relación de masa a carga y un detector en el que se registran los iones separados [34]. De esta forma, se puede determinar la masa molecular, la estructura de la molécula, la presencia de unidades estructurales y una formula molecular posible [33].

3.9.2.4 Punto de fusión

Este es considerado un método físico que establece un claro criterio de pureza sobre el compuesto a evaluar ya que, la técnica se basa en establecer un equilibrio entre la fase sólida y líquida a una presión y temperatura determinada, sumado a que cada compuesto tiene un cambio de estado a una determinada temperatura/presión y este se ve afectado cuando existen impurezas en el compuesto.

3.9.3 Pruebas biológicas

La bibliografía encontrada nos revelaba una alta capacidad antifúngica por parte de la pulegona, pero se desconocía la posible actividad de los híbridos de pulegona que se sintetizaron en la investigación por lo que las pruebas biológicas se realizaron para determinar la actividad de las moléculas sintetizadas a partir de pulegona frente al patógeno *Monilinia fruticola*.

Las pruebas para realizar en esta ocasión son pruebas in vitro con *Monilinia fruticola*, estos estudios son realizados fuera del organismo, es decir a través de la manipulación con el material de laboratorio como placas Petri, tubos de ensayo, bandeja de cultivo celular, o cualquier otro recipiente usado, siempre y cuando contenga el organismo de interés intacto. Luego de esto el compuesto a probar sintetizado en esta investigación, es decir, los híbridos de pulegona, se ponen en contacto con un sistema biológico [40].

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Las moléculas sintetizadas se demuestran con sus estructuras en la siguiente gráfica: (S, Z)-2-bencilideno-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona (**Figura 7**), (S,Z)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona (**Figura 8**), (S,Z)-2-(3,4-dimetoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona (**Figura 9**), (S,Z)-2-(4-hidroxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona (**Figura 10**), (S,Z)-2-(3-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona (**Figura 11**), (S, Z)-2-(4-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona (**Figura 12**), (S,Z)-2-(2-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona (**Figura 13**), (S,Z)-2-(3-hidroxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona (**Figura 14**) y (S,Z)-2-(4-hidroxi-3-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona (**Figura 15**).

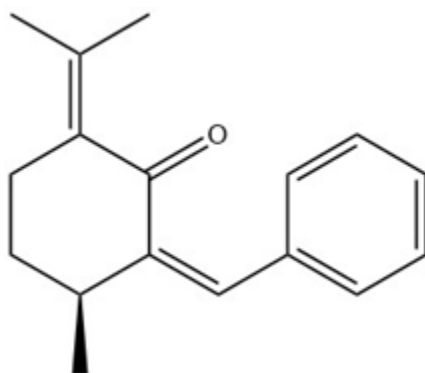


Figura 7. Estructura de (S, Z)-2-bencilideno-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona

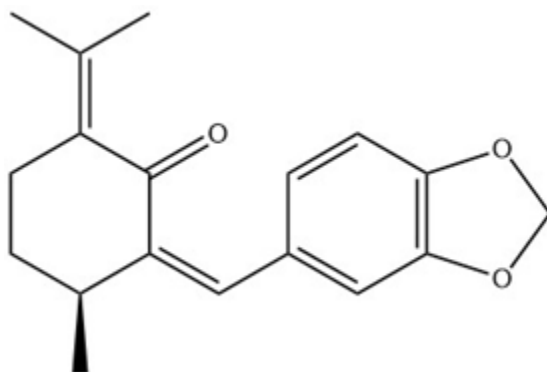


Figura 8. Estructura (S,Z)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona

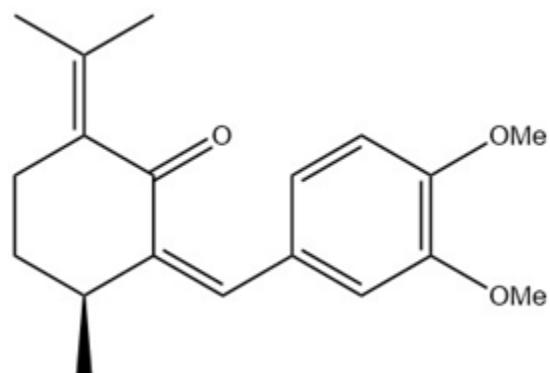


Figura 9. Estructura (S,Z)-2-(3,4-dimetoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona

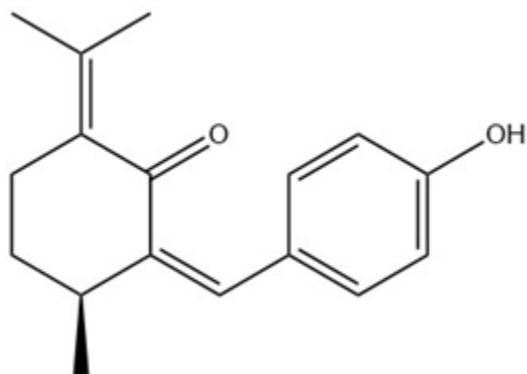


Figura 10. Estructura (S,Z)-2-(4-hidroxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona

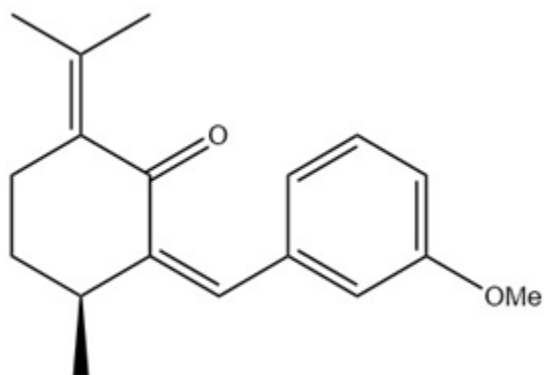


Figura 11. Estructura (S,Z)-2-(3-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexan-1-ona

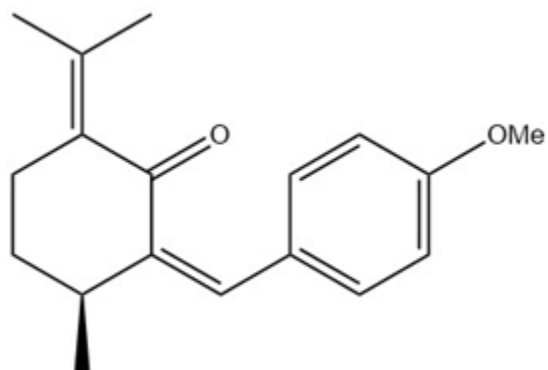


Figura 12. Estructura (S, Z) -2- (4-metoxibencilideno) -3-metil-6- (propan-2-ilideno) ciclohexano-1-ona

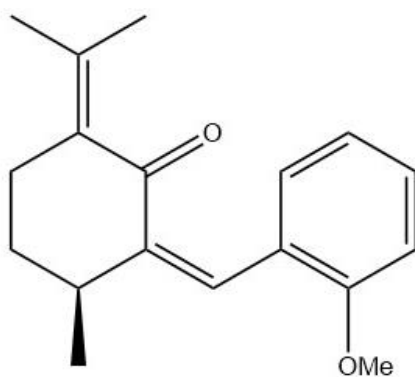


Figura 13. Estructura (S,Z)-2-(2-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona

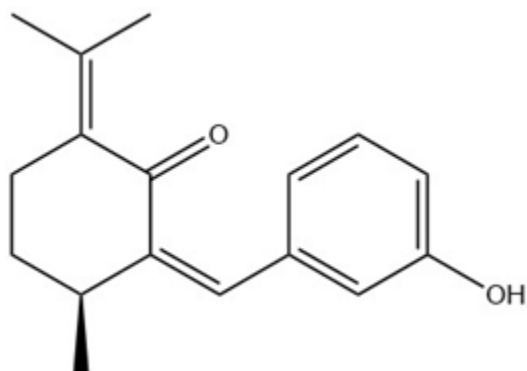


Figura 14. Estructura (S,Z)-2-(3-hidroxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona

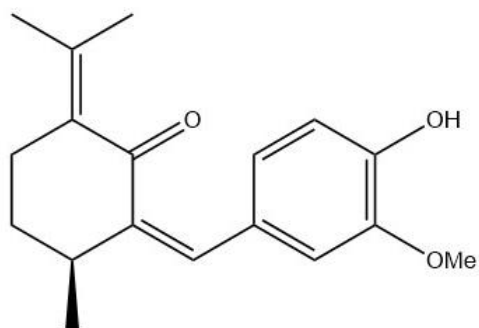


Figura 15. Estructura (S,Z)-2-(4-hidroxi-3-metoxibencilideno)-3-metil-6-(propan-2-ilideno)ciclohexano-1-ona

4.1 Pruebas Biológicas en *Monilinia fruticola*

Los resultados obtenidos luego de las pruebas biológicas son los siguientes:

Tabla 2: Resultados pruebas biológicas.

Compuesto	<i>Monilinia fruticola</i> EC50 ug/mL	<i>Conidias</i> EC 50 ug/mL
Figura 7	40,11	50
Figura 8	35,35	<10
Figura 9	6,71	<10
Figura 10	6,69	<10
Figura 11	2,5	<10
Figura 12	8,72	<10
Figura 13	7,22	<10
Figura 14	7,15	50
C + Mystic R	8,38	<10
C + BC- 1000	10,55	110

Las moléculas se entregaron para pruebas biológicas en carozos cuyos resultados fueron favorables en los compuestos 7.5 A (EC50 2,5 ug /ml); 7.6 A (EC50 8,72 ug /ml)-7.7 A (EC50 7,22 ug /ml) -7.9 A (EC50 7,15 ug /ml), en donde se comprobó que su actividad antifúngica

era capaz de actuar sobre la *M. Fructicola* en rangos de infección entre 75% y 100% sobre carozos.

CAPÍTULO 5: DISCUSION Y CONCLUSIONES

5.1 Discusión

Lo obtenido en esta investigación fue el resultado de los análisis de diferentes métodos de síntesis y purificación en general, el mecanismo de reacción es Claissen Schmidt; método clásico para la síntesis de chalconas.

Fueron probados cuatro métodos distintos, estos se obtuvieron de la bibliografía disponible, donde finalmente se escogió el método B y C para aldehídos hidroxilados y el método A para no hidroxilados y los metoxilados, por presentar mejor rendimiento y/o menor tiempo de reacción.

El cambio de método fue debido a que los compuestos hidroxilados debido a que, en los compuestos hidroxilados, el método B y C entregaron mejores resultados y rendimientos comparados con el método A, ya que en el método B y C se usaba un medio ácido en ves del básico, lo cual al monitorear la reacción daba un rendimiento mayor, y, por ende, mayor masa al separarlos. Sin embargo, al tener un tiempo de reacción de 48 hrs, hacia más lento el proceso de purificación posteriormente.

En cuanto a la neutralización del medio de la reacción, para las del método A y B, se neutralizaban mejor al usar en primera instancia agua corriente y luego agregando ácido clorhídrico o bicarbonato de sodio respectivamente.

En el caso de la síntesis con el benzaldehído, esta reacción no requirió llevar a cabo una columna, debido a que, al realizar la neutralización, Work Up y posteriormente su reducción por medio de un rotavapor, esta arrojó un precipitado, para lo cual determinamos que la molécula se encontraba en un estado puro y pudimos obtener un mejor rendimiento de reacción, mucho mayor a las demás reacciones, las cuales se tuvo que separar mediante columna cromatográfica.

Respecto a la purificación, la técnica de elección es cromatografía en columna, la cual en una primera instancia presenta distintas dificultades con respecto a la purificación teniendo

que ser corregida la calidad de los solventes y del absorbente con el objetivo de obtener mejor purificación de los compuestos.

El rendimiento de la purificación cromatográfica puede verse alterado a causa del solvente, para este caso, un factor determinante en la obtención de los resultados esperados fue el tratamiento de los solventes con sulfato de sodio anhidro como desecante por sus propiedades hidrosfópicas, ya que estos contenían un porcentaje de hidratación, y al ser solventes inmiscibles en agua alteraron el resultado de la cromatografía, generando que los compuestos no pudiesen ser purificados, obligando a repetir el procedimiento de cromatografía.

Se tomaron medidas adicionales en contra de los agentes deliquescentes, entre ellos el precalentado del absorbente sílica gel a utilizar en columna, a 40°C durante 20 minutos sumado a la destilación de los solventes utilizados en este caso hexano y acetato de etilo para luego ser tratados con sulfato de sodio anhidro, de esta forma aseguramos la obtención y purificación del compuesto esperado.

Luego, para mejorar la calidad de la muestra objetivo; las moléculas obtenidas fueron adicionalmente purificadas a través de cromatografía en columna preparativa, lo que permitió alcanzar mejores resultados de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, esta técnica no podía ser usada con más de 40 mg de muestra, por lo que, los rendimientos usando cromatografía en columna preparativa significa una mayor purificación, pero menor masa obtenida del compuesto puro.

La purificación de los compuestos metoxilados fue de mejor rendimiento que la de los hidroxilados, dado que su purificación era desde los gradientes 1 al 20% aproximadamente de acetato de etilo / Hexano, comparada con los compuestos hidroxilados que la mayoría aparece desde el 30% de gradiente acetato de etilo / Hexano, esto debido a su polaridad, ya que estos tendían a ser más polares que los metoxilados. Sin embargo, debido a la problemática presenciada por los solventes hidratados, significó un retraso en la síntesis y purificación de los compuestos, ya que estos no se separaban.

Además, dentro de la experimentación se intentaron distintos procedimientos para una mejor observación y análisis de los compuestos a través de CCF. Por ejemplo, este fue el caso del compuesto derivado de la síntesis de pulegona y 3 hidroxibenzaldehído. En un principio, al momento de realizar las placas de CCF para observar la purificación de los compuestos, se utilizaban eluyentes a un gradiente del 30% de acetato de etilo y 70% de hexano, depositando la placa solo una vez dentro de la cámara cromatográfica. Pero, se observó un mejor resultado de separación de las muestras al realizar este procedimiento dos veces con un gradiente de 15% de acetato de etilo. Esto permitió determinar cuál era el compuesto buscado, pudiendo diferenciarlo del aldehído en la mezcla para poder proceder con su purificación.

Con respecto a las pruebas *in vitro* de los compuestos sintetizados durante la investigación, se determinó su actividad antifúngica mediante pruebas *in vitro*, de los cuales resultaron que el compuesto más efectivo fue con el aldehído 3 metoxibenzaldehído, el cual generó respuesta en una dilución de 2,5 ug/l (revisar) comparado con sus controles C + Mystic R que es un fungicida en formato de suspensión concentrada, con dos componentes activos, el pirimetanilo y trifloxistrobina usado para el control preventivo de enfermedades fúngicas en manzanos, perales, durazneros, durazneros conserveros, nectarinos, entre otros [38], y C + BC + 1000, que es un bactericida y fungicida de origen natural a base de cítricos, que posee muy baja toxicidad para el humano y los animales, es usado generalmente como control de *Botrytis cinerea* en la vid, berries, tomate, pimentón y hortalizas, sus componentes son mayoritariamente 50% de extracto de semilla y pulpa de cítricos (2,5%p/v equivalente de ácido ascórbico) [41].

Para evaluar la capacidad antifúngica de los compuestos sintetizados, se evaluó el EC 50 o concentración eficaz media máxima que es la concentración del fármaco o compuesto químico que produce el 50% de la respuesta máxima, que codifica la actividad del fármaco, es decir, la concentración eficaz para obtener una respuesta del 50% [39].

Es por esto por lo que es de vital importancia hacer una revisión sistemática amplia de la bibliografía disponible, con el propósito de contar con la mayor información posible para experimentar o mejorar los métodos que se utilizan en el proceso de obtención de la molécula objetivo.

5.2 Conclusión

Luego de realizar la investigación y las pruebas en laboratorio, se puede concluir que estos compuestos poseen gran actividad biológica para eliminar el hongo *M. fruticola* y detener la propagación de la enfermedad. Estos, pueden ser utilizados como un antifúngico efectivo derivado de compuestos naturales, que, además, ayudaran a la preservación de las cosechas, a tener una buena producción y menores pérdidas por moniliasis mejorando las ventas y rendimientos en las empresas productoras, beneficiando de igual manera a las familias que consumen estas frutas en su dieta diaria.

Además, concluimos que con las características estructurales del hongo *M. fruticola*, los compuestos serian efectivos igualmente en diferentes hongos fitopatógenos como *Monilinia laxa*. Sumado a esto, *M. fruticola* es del filo *Ascomycota*, el cual, posee características sexuales, morfológicas y estructurales similares a hongos como *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, hongos patógenos para el ser humano los cuales se suelen asociar a pacientes inmunodeprimidos o con compromiso inmunológico, por lo cual, los híbridos de pulegona pueden ser usados posteriormente en formulaciones farmacológicas en seres humanos tales como: fármacos de uso respiratorio, endovenoso o tópico para las micosis orales, vaginales, cutáneas, y sistémicas.

Por eso por medio de esta investigación de que los híbridos de pulegona son potentes antimicóticos contra hongos fitopatógenos y también contra hongos que causan micosis en los seres humanos.

Referencias bibliográficas

1. Gargantilla Madera P. Alimentación sana. 2003;206.
2. Guías Alimentarias L. GUÍAS ALIMENTARIAS PARA LA POBLACIÓN CHILENA.
3. Slavin JL, Lloyd B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. Adv Nutr [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2021 Dec 13];3(4):506–16. Available from: <https://academic.oup.com/advances/article/3/4/506/4591497>
4. Trigos Á, Ramírez K, Salinas A. Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. Rev Mex Micol [Internet]. 2008 [cited 2021 Dec 13];28(SPE):125–9. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000300015&lng=es&nrm=iso&tlng=es
5. Obrerá T. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos [Internet]. Rev Cubana Salud Pública v.30 n.3. 2004 [cited 2021 Dec 14]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662004000300016
6. Gil A, Morón de Salim A, Gaesrte Y. Calidad microbiológica en frutas de conchas comestibles expendidas en mercados populares de los municipios Valencia y San Diego, estado Carabobo, Venezuela. Rev la Soc Venez Microbiol [Internet]. 2010 [cited 2021 Dec 14];30(1):24–8. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562010000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
7. Dowling ME, Bridges WC, Cox BM, Sroka T, Wilson JR, Schnabel G. Preservation of Monilinia fructicola genotype diversity within fungal cankers. Plant Dis [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Dec 14];103(3):526–30. Available from: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-05-18-0800-RE>
8. Latorre B, Agr I. Manejo asociado a la presencia de Monilinia fructicola en Chile.
9. Malandrakis AA, Kavroulakis N, Chrysikopoulos C V. Use of silver nanoparticles to counter fungicide-resistance in Monilinia fructicola. 2020 [cited 2021 Dec 14]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141287>
10. Malvarez G, Rodriguez A, Aguilar C, Perez E. (PDF) Identificación de especies de

Monilinia sp., en aislamientos obtenidos de Prunus spp. por PCR con Primers específicos. [Internet]. Agrociencia. 2001 [cited 2021 Dec 14]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/271206578_Identificacion_de_especies_de_Monilinia_sp_en_aislamientos_obtenidos_de_Prunus_spp_por_PCR_con_Primers_especificos

11. Zolezzi M V, Agrónomo Sc IM, Abarca PR, Antúnez Ing Agrónomo AB, La Platina Carlos Quiroz Ing Agrónomo IE, Hirzel Ing Agrónomo JC, et al. Coordinadores responsables: Encargado regional convenio INIA-INDAP, Región de O'Higgins.
12. Observación latinoamericana de conflictos ambientales. Lista pesticidas PLAGUICIDAS CON SOLICITUD DE PROHIBICION [Internet]. [cited 2021 Dec 14]. Available from: <https://www.olca.cl/oqa/plaguicidas/plag04.htm>
13. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. DOCUMENTACIÓN TOXICOLÓGICA PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL LÍMITE DE EXPOSICIÓN PROFESIONAL DEL BENOMILO. Doc limites expsición .
14. Rojas R A, Ojeda B ME, Barraza O X. Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas. Rev Med Chil [Internet]. 2000 [cited 2021 Dec 14];128(4):399–404. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872000000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
15. Zúñiga-Venegas L, Saracini C, Pancetti F, Muñoz-Quezada MT, Lucero B, Foerster C, et al. Exposición a plaguicidas en Chile y salud poblacional: urgencia para la toma de decisiones. Gac Sanit. 2021 Sep 1;35(5):480–7.
16. Erita C, Giovanna M, Iris E, Roberto P. Estudio Retrospectivo de Fisuras Labio-Máxilo-Palatina en Chile, 12 Años de Seguimiento Retrospective Study of Cleft Lip and Palate in Chile, 12-Year Follow Up. Int J Odontostomat. 2021;15(1):88–93.
17. Osorio M. Synthesis and antibiotic activity of prenylated flavonoids View project. USM Desarro Pestic menos tóxicos en base a compuesto Nat para uso en Agron [Internet]. [cited 2021 Dec 14]; Available from: <http://www.noticias.usm.cl/2016/02/29/usm>
18. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del

- aceite esencial de las hojas de *Minthostachys Mollis* (muña). *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2008 [cited 2021 Dec 20];25(3):298–301. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342008000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
19. Cano-Estrada A, Romero-Bautista L. Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Rev Chil Nutr* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2021 Dec 20];43(1):75–80. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182016000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 20. Pinto A, English H, Alvarez M. Principales enfermedades de los frutales de hoja caduca.pdf. Santiago, Chile; 1994. p. 54–64.
 21. Mitidieri MS, Castillo JA. Manejo de la podredumbre Morena (*Monilinia fructicola* y *M. laxa*) en huertos frutales de Uruguay, Chile, Bolivia, Brasil y Argentina. 2014 [cited 2021 Dec 14];35-4–86. Available from: <http://repositorio.inta.gob.ar:80/handle/20.500.12123/4631>
 22. Torres F, Subdepartamento sanidad vegetal. Plaga Cuarentenaria *Monilinia fructicola*. 2012;1–2.
 23. Castro M. Biofungicida bacteriano para control del hongo fitopatógeno *Monilinia fructicola* - Universidad Santo Tomás [Internet]. 2017 [cited 2021 Dec 14]. Available from: <https://www.ust.cl/proyecto/biofungicida-bacteriano-control-del-hongo-fitopatogeno-monilinia-fructicola/>
 24. Proctor RH, McCormick SP, Kim HS, Cardoza RE, Stanley AM, Lindo L, et al. Evolution of structural diversity of trichothecenes, a family of toxins produced by plant pathogenic and entomopathogenic fungi. *PLoS Pathog*. 2018 Apr 1;14(4).
 25. Ulibarry PG. Plaguicidas Antecedentes generales Autor. Bibl del Congr Nac Chile [Internet]. [cited 2021 Dec 14]; Available from: <http://bcn.cl/26jqf>
 26. Patiño M, Fonseca J. Control biológico de la pudrición parda (*Monilinia fructicola*) (G. Winter) Honey, con dos cepas de *Bacillus subtilis* en duraznero [Internet]. Escuela de Ciencia Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente - ECAMPA Especialización en

- Biotecnología Agraria. 2020 [cited 2021 Dec 14]. Available from: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/35153/mjpatinop.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
27. Acuña LE, Aguirre C, Burdyn L, Carbajo Romero MS, Cocco M, Colodner A, et al. Manual de poscosecha de frutas : manejo integrado de patógenos. 2019 [cited 2021 Dec 14];58. Available from: https://inta.gob.ar/sites/default/files/manual_poscosecha_frutas.pdf
 28. Egüen Recuero B. Aspectos epidemiológicos de la resistencia de monilinia fructícola y M. laxa a fungicidas en huertos de melocotonero y nectarino del valle del Ebro. 2016 [cited 2021 Dec 14]; Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=185355&info=resumen&idioma=ENG>
 29. Pérez-Palma LD, Andrade-Ochoa S, Levario-Gómez A, Cantú-Solis E, Sánchez-Aldana D, Nevárez-Moorillón GV, et al. Evaluación de la propiedad antimicrobiana y antiadherente del sulfato de cobre (Cu₂SO₄) y monoterpenos sobre Lactobacillus acidophilus y Streptococcus mutans. Acta Univ [Internet]. 2019 Oct 2 [cited 2021 Dec 14];29:1–14. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-62662019000100180&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 30. Cláudia Boni G, Nataly Busato De Feiria S, De P, Santana L, Anibal PC, Fabiano M, et al. African Journal of Plant Science Antifungal and cytotoxic activity of purified biocomponents as carvone, menthone, menthofuran and pulegone from Mentha spp. 2016 [cited 2021 Dec 14];10(10):203–10. Available from: <http://www.academicjournals.org/AJPS>
 31. Gobierno de Chile. Poleo / Menta poleo Mentha pulegium L. [cited 2021 Dec 14]; Available from: <http://www.mountainvalleygrowers.com/images/>
 32. Thorup I, Würtzen G, Carstensen J, Olsen P. Short term toxicity study in rats dosed with pulegone and menthol. Toxicol Lett. 1983 Dec 1;19(3):207–10.
 33. Bel S, Gonz F, Gu P, Villegas AM. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Química Carrera de Pedagogía en Química y Ciencias Hemisíntesis de oxialquilchalconas y su eficacia como agentes anti-oomicete para el control de *Saprolegnia parasitica*. 2015;

34. Mcmurry J. QUÍMICA ORGÁNICA. 2008;7°:686–95.
35. Quintero V. Biotransformación De Limoneno: Uso de Sistemas Biológicos Para Llevar a Cabo Modificaciones Químicas Limonene Biotransformation: Using Biological Systems to Carry Out Chemical Modifications.
36. Aparecido Minini dos Santos R, de Oliveira Souza F, Jorge Pilau E, Porto C, Eduardo Gonçalves J, José Braz de Oliveira A, et al. Biocatalysis and Biotransformation Biotransformation of (+)-carvone and (–)-carvone using human skin fungi: A green method of obtaining fragrances and flavours Biotransformation of (p)-carvone and (À)-carvone using human skin fungi: A green method of obtaining fragrances and flavours. 2017 [cited 2021 Dec 14]; Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ibab20>
37. Wang L, Sheng J, Tian H, Han J, Fan Z, Qian C. A convenient synthesis of α,α' -bis(substituted benzylidene)cycloalkanones catalyzed by Yb(OTf)₃ under solvent-free conditions. *Synthesis (Stuttg)*. 2004 Dec 17;(18):3060–4.
38. Angurell I, Casamitjana N, Caubet A. Operaciones Básicas en el Laboratorio de Química. Cromatografía. Cromatografía en Capa Fina y en Columna [Internet]. [cited 2021 Dec 15]. Available from: http://www.ub.edu/oblq/oblq_castellano/cromatografia_tipus.html
39. Brunton L, Bruce C, Bjorn K. Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas De La Terapéutic, 13e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical [Internet]. 13° edición. McGraw Hill Medical; [cited 2021 Dec 15]. Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2457>
40. Acevedo Fernández JJ, Santos J, Chimal A, Rivera HM, Lucía V, López P, et al. Capítulo 2 Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. [cited 2021 Dec 15]; Available from: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.38>
41. CHEMIESA. FICHA TÉCNICA PRODUCTO: BC-1000.