

Universidad Técnica Federico Santa María

Departamento de Química

Valparaíso-Chile



**“Actividad Biológica de Extractos y Metabolitos
Secundarios de *Drimys winteri* Continental Contra
Hongos Fitopatógenos”**

Nicol Andrea López Wastavino

Tesis de grado para optar al título de Magister en Ciencias, mención Química

Profesor guía:

Dr. Lautaro Taborga Morales

Resumen

La agricultura es una de las actividades más importantes para la humanidad (Mazoyer and Roudart 2006). Debido a la gran demanda existente es que para el aumento de la producción se requirió de la utilización de tecnologías, así como el uso de fertilizantes y químicos para el control de plagas (Fernández Arias 2003).

Este último nace de la necesidad de disminuir las pérdidas producidas por microorganismos, tales como hongos patógenos, los cuales pueden afectar directamente el crecimiento de los cultivos (Oerke 2006). Especies como *Botrytis* y *Phytophthora*, han sido responsables de provocar la pudrición de grandes cantidades de cultivos de interés económico (Lamour 2013; Fillinger and Elad 2016), por lo que el control químico ha jugado un rol importante en el tratamiento de estas enfermedades (Russell 2005).

El control químico ha contribuido en gran medida al aumento en la producción de alimentos. No obstante, ha venido ligado al incremento de cepas de patógenos resistentes a los tratamientos químicos (Ishii 2006), a problemas en la salud de animales y humanos, y el impacto al medio ambiente (OMS 2016; SAG 2013). Lo que ha provocado la reprobación social y por ende la restricción en el uso de estos (Gullino and Kuijpers 1994; Leroux 2007; Carreño and Alvarez 1990), dando lugar a una agricultura más ecológica (Badgley et al. 2007). Por otra parte, las plantas han utilizado sus metabolitos contra las plagas, desde antes que comenzara el control químico (Hernandez et al. 2007; Ávalos and Pérez 2009).

Especies nativas como *Drimys winteri* han sido estudiadas por sus características naturales, mostrando actividades como insecticida, antiinflamatoria, analgésica, entre otras (Tratsk et al. 1997). Los resultados presentados por diversos estudios, permiten suponer que *D. winteri* podría presentar actividad inhibidora del crecimiento de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*.

A raíz del potencial presentado por la especie *D. winteri*, es que se realizó la maceración, con solvente en polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y etanol), de corteza proveniente de Valdivia y Chiloé. Como resultado se obtuvieron tres extractos de *D. winteri* Valdivia y tres extractos de *D. winteri* Chiloé, los cuales fueron evaluados contra los hongos fitopatógenos *B. cinerea* y *P. cinnamomi*. Posteriormente, y con la finalidad de

obtener metabolitos con una actividad potencial, se realizó la separación del extracto de acetato de etilo proveniente de corteza valdiviana.

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas biológicas, se determinó que todos los extractos presentaban algún grado de actividad, siendo los provenientes desde la corteza de *D. winteri* Chiloé los que sobrepasaron el 50% de las actividades en ambos patógenos.

Por otra parte, y a raíz de la separación del extracto se descubrió la presencia de nuevos metabolitos con la estructura base de un sesquiterpeno drimano y se confirmó la presencia de drimenol y poligodial, compuestos característicos de la especie.

Índice.

Resumen.....	I
Índice.....	III
Índice de Figuras.....	V
Índice de Tablas.....	VI
Índice de Diagramas.....	VII
Capítulo 1. Marco Teórico.....	8
1.1. La Agricultura.....	8
1.1.1. Escenario Mundial.....	8
1.1.2. Escenario Nacional.....	8
1.1.3. Problemas de la agricultura.....	8
1.2. Factores Bióticos.....	9
1.2.1. Fitopatógeno: <i>Botrytis</i>	10
1.2.2. Fitopatógeno: <i>Phytophthora</i>	12
1.2.3. Respuesta Vegetal Frente al Patógeno.....	13
1.2.4. Control Químico.....	15
1.2.5. Problemas del Control Químico.....	20
1.2.6. La Agricultura Orgánica.....	22
1.3. Los Productos Naturales.....	22
1.3.1. Estudio de Productos Naturales.....	23
1.3.2. Actividad de Extractos y Metabolitos.....	24
1.4. Posibilidades para Chile.....	28
1.4.1. <i>Drimys</i>	28
Capítulo 2. Hipótesis.....	36
Capítulo 3. Objetivos.....	37
3.1. Objetivo general.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
Capítulo 4. Desarrollo Experimental.....	38
4.1. Materiales y Método.....	38

4.1.1.	Materiales.....	38
4.1.1.1.	Parte Química.....	38
4.1.1.2.	Parte biológica.....	39
4.1.2.	Métodos Químicos.....	40
4.1.2.1.	Extracción.....	40
4.1.2.2.	Separación, Purificación y caracterización.....	42
4.1.3.	Métodos Biológicos.....	47
4.1.3.1.	Pruebas Biológicas contra <i>B. cinerea</i>	47
4.1.3.2.	Pruebas Biológicas contra <i>Phytophthora cinnamomi</i>	47
4.1.3.3.	Análisis de Resultados.....	49
4.2.	Resultados y Discusión.....	49
4.2.1.	Extracción.....	49
4.2.2.	Pruebas biológicas de extractos.....	50
4.2.2.1.	Pruebas contra <i>B. cinerea</i>	50
4.2.2.2.	Pruebas contra <i>P. cinnamomi</i>	52
4.2.3.	Separación, Purificación y Caracterización.....	53
4.2.3.1.	Columna Cromatográfica.....	53
4.2.3.2.	Separación por Fraccionamiento liquido-liquido.....	60
4.2.3.3.	Metabolitos encontrados.....	61
4.2.4.	Pruebas Biológicas de Metabolitos.....	70
4.2.4.1.	Pruebas en <i>P. cinnamomi</i>	70
Capítulo 5.	Conclusiones y Recomendaciones.....	72
Capítulo 6.	Bibliografía.....	73
Anexos.....		87
1.	Abreviaturas y Glosario.....	87
2.	Mercurio Orgánico.....	89
3.	Preparación de Sílica con Nitrato de Plata.....	89
4.	Diagrama de Extracción y Separación Completo.....	90
5.	Tablas Pruebas Biológicas.....	91
6.	Espectros.....	92

5.1.	Drimenol	92
5.2.	Poligodial	94
5.3.	Mezcla Poligodial y 9desoximuzigadial.....	96
5.4.	Dímero	97
5.5.	Lactona.....	99
5.6.	Drimanal.....	101

Índice de Figuras.

Figura 1, Hormonas vegetales relacionadas con la defensa frente a patógenos.....	14
Figura 2, Fitoalexinas generadas en respuesta a <i>B. cinerea</i>	14
Figura 3, Metabolitos con actividad contra <i>B. cinerea</i>	26
Figura 4, Metabolitos con actividad contra <i>P. cinnamomi</i>	28
Figura 5, Flavonoides aislados desde <i>Drimys winteri</i>	31
Figura 6, Lignanos y esterol aislados desde <i>D. winteri</i>	32
Figura 7, Sesquiterpenos drimano y terpeno aislados desde <i>Drimys winteri</i>	33
Figura 8, Diagrama de maceración.....	42
Figura 9, Cálculo de Rf.....	42
Figura 10, Esquema Básico de Columna Cromatográfica	44
Figura 11, Resultados de actividad de extractos de <i>D. winteri</i> Valdivia contra <i>B. cinérea</i>	51
Figura 12, Resultados de actividad de extractos de <i>D. winteri</i> Chiloé contra <i>B. cinérea</i>	51
Figura 13, Resultados de actividad de extractos de <i>D. winteri</i> Valdivia contra <i>P. cinnamomi</i>	52
Figura 14, Resultados de actividad de extractos de <i>D. winteri</i> Chiloé contra <i>P. cinnamomi</i>	53
Figura 15, Interacciones NOESY.....	62
Figura 16, Estructura reportada	63
Figura 17, Estructura reportada	63

Figura 18, Interacciones HMBC más importantes	66
Figura 19, Interacciones NOESY.....	66
Figura 20, Estructura reportada como producto de síntesis.	67
Figura 21, TOCSY H - 9, con D9 = 0,08 [s].....	68
Figura 22, TOCSY H - 9, con D9 = 0,24 [s].....	68
Figura 23, TOCSY H - 13, con D9 = 0,08 [s].....	68
Figura 24, TOCSY H - 13, con D9 = 0,24 [s].....	68
Figura 25, TOCSY H - 14, con D9 = 0,08 [s].....	69
Figura 26, TOCSY H - 14, con D9 = 0,24 [s].....	69
Figura 27, Interacciones HMBC más importantes.	70
Figura 28, Interacciones NOESY.....	70
Figura 29, Resultados de actividad de Drimenol y Poligodial	71
Figura 30, HSQC y HMBC Drimenol	93
Figura 31, HSQC y HMBC Poligodial	95
Figura 32, HSQC y HMBC Dímero	98
Figura 33, HSQC Lactona.....	100
Figura 34, HSQC y HMBC Drimanl.....	103
Figura 35, Experimento NOESY Drimanal.....	104
Figura 36, Experimento TOCSY Drimanal.....	105

Índice de Tablas.

Tabla 1, Estudios de Extractos Naturales contra <i>B. cinerea</i>	24
Tabla 2, Estudios de Extractos Naturales Contra <i>P. cinnamomi</i>	26
Tabla 3, Estudio realizados con <i>D. winteri</i>	30

Tabla 4, Masas y rendimientos de extracción.....	50
Tabla 5, Rendimientos de Reacción de Separación C1.....	54
Tabla 6, Diferencias espectroscópicas entre epipoligodial y poligodial.....	59
Tabla 7, Señales características de la mezcla de dialdehídos.....	63
Tabla 8, Resultados de actividad biológica de extractos de <i>d. winteri</i> Valdivia.....	91
Tabla 9, Resultados de actividad biológica de extractos de <i>d. winteri</i> Chiloé.....	91

Índice de Diagramas.

Diagrama 1, Evolución histórica del control químico.	17
Diagrama 2, Fungicidas de Contacto	19
Diagrama 3, Fungicidas Sistémicos.....	21
Diagrama 4, Método de extracción.....	41
Diagrama 5, Proceso de fraccionamiento líquido-líquido.....	45
Diagrama 6, Proceso general de obtención de compuestos.	46
Diagrama 7, Separación de F4-C1.....	55
Diagrama 8, Separación de F5-C1.....	57
Diagrama 9, Separación de F10'-C1.....	58
Diagrama 10, Separación de F6'-C1.....	59
Diagrama 11, Diagrama de Extracción y Separación.....	90

Capítulo 1. Marco Teórico

1.1. La Agricultura.

1.1.1. Escenario Mundial

La agricultura es una de las actividades económicas más importantes para el desarrollo humano. Según estudios históricos, su comienzo se remontan al Neolítico (hace 10.000 años atrás), periodo en que sólo se desarrollaban pequeños cultivos en regiones aisladas del mundo (Mazoyer and Roudart 2006). Desde entonces, la agricultura, se ha mantenido en una constante evolución, marcando sus mayores hitos durante el periodo posterior a 1950, el cual fue denominado la “revolución verde”, producto del aumento en el potencial y volumen de producción, como resultado de la combinación de los recursos tecnológicos disponibles en la época, como el uso de fertilizantes, el control químico de plagas, la mecanización de la agricultura y la generación de nuevas variedades de plantas y animales más productivas (Fernández Arias 2003).

1.1.2. Escenario Nacional

En Chile, la agricultura es uno de los sectores más productivos y con mayor generación de empleos. Debido a su importancia, se ha mantenido en un constante progreso a través de la innovación y mejoras en los procesos productivos, generando así, una mayor eficiencia en el uso de los recursos, lo que se ha materializado en una exitosa diversificación de los productos agrícolas y posicionándose en los mercados internacionales (ODEPA 2015). Económicamente, el sector alcanzó a 2,63% del PIB durante el 2015 y 884 MMUS\$ en términos de exportaciones en el año 2016, lo que equivale al 62,8% del sector silvoagropecuario (ODEPA 2016).

1.1.3. Problemas de la agricultura

La producción agrícola mundial, está directamente relacionada con el crecimiento de la población, el cual ha tenido una larga evolución, experimentando la mayor alza desde el año 1960 al 2000 donde casi se duplico la población mundial (FAO 2015). El incremento en

la producción se enfrenta a una serie de obstáculos, como las pérdidas de cultivos potenciales causadas por factores abióticos (temperatura, sequía entre otros) y bióticos (insectos, enfermedades de las plantas y/o malezas) (Oerke 2006).

Chile posee un alto prestigio fitosanitario, tanto por sus condiciones geográficas como por el cuidado de su patrimonio sanitario. Sin embargo, no se encuentra ajeno a los problemas ocasionados por patógenos vegetales, los que han aumentado su presencia en el territorio nacional, producto de la economía abierta al mundo, la que representa una amenaza latente en el ingreso de nuevas especies y eventualmente plagas (INIA).

1.2. Factores Bióticos.

En la naturaleza no existe organismos que vivan en un total aislamiento, sino que constituyen sistemas en los cuales interactúan con el medio ambiente (abióticos) y con otros seres vivos (bióticos). Estas relaciones, pueden afectar a los componentes del sistema de forma positiva o negativa. En el caso de los cultivos, las interacciones negativas se traducen en grandes pérdidas en el rendimiento de producción, en este sentido, los factores bióticos son los que poseen un mayor impacto (Lugo et al. 2015; Oerke 2006; Thacker 2002). Los factores bióticos se pueden dividir en tres categorías principales (Oerke 2006).

1. Mala hierbas, este grupo contiene:
 - a. Monocotiledóneas.
 - b. Dicotiledóneas.
 - c. Malezas parasitas.
2. Plagas animales, la cual abarca:
 - a. Insectos.
 - b. Nematodos.
 - c. Ácaros.
 - d. Aves.
 - e. Roedores.

3. Patógenos, esta clasificación está constituida por:
 - a. Bacterias.
 - b. Virus.
 - c. Hongos.

De esta última categoría, los patógenos, poseen la capacidad de generar diferentes daños a la planta afectando la tasa metabólica y directamente el crecimiento de la planta, mediante la reducción en la disponibilidad de: luz; dióxido de carbono y agua, (Boote et al. 1983). De los diversos microorganismos patógenos, los hongos son el grupo que más enfermedades ocasionan, originando grandes pérdidas, las cuales no sólo son económicas sino también biológicas. Los hongos por lo general son capaces de establecer diferentes tipos de relaciones con la especie hospedante (Agrios 1995; Lugo et al. 2015; Maestro-Durán et al. 1993), estas relaciones pueden ser clasificadas en:

1. Mutualismo: relación en la que los individuos se benefician.
2. Amensalismo: esta relación contiene:
 - a. Competencia: uno de los organismos prevalece sobre otro.
 - b. Antibiosis: una especie actúa inhibiendo el crecimiento de otra.
3. Parasitismo: donde uno recibe los beneficios, mientras que el otro se perjudica, esta se puede sub-dividir en:
 - a. Necrotróficos o necrótrofos: matan al hospedante mientras obtienen sus nutrientes.
 - b. Biotróficos o biótrofos: cuando no matan al hospedante.

Los hongos que afectan a las plantas (fitopatógenos), por lo general, establecen relaciones parasitarias, las cuales según el mecanismo de infección pueden ser necróticas o biotróficas. Entre estos patógenos es posible encontrar los géneros *Botrytis* y *Phytophthora*.

1.2.1. Fitopatógeno: *Botrytis*

El género *Botrytis* fue erigido por Micheli en el año 1729, su nombre en griego significa “montón de bayas de uva” (Rosslenbroich and Stuebler 2000). Las especies de *Botrytis* son conocidas por provocar grandes pérdidas en cultivos económicamente importantes e infectan a 170 familias de cultivos. La mayoría de las especies de *Botrytis* tienen una gama

limitada de huéspedes, a excepción de *Botrytis cinerea* Pers, la cual posee un amplio abanico de huéspedes, siendo capaz de infectar a más de 200 tipos de cultivos, considerando sólo las regiones templadas y subtropicales (Rosslénbroich and Stuebler 2000; Mesejo 2015; Williamson et al. 2007; Fillinger and Elad 2016). Esta especie es responsable de generar grandes pérdidas en cultivos a campo abierto e invernadero, tanto en pre como en post cosecha (Mesejo 2015; Williamson et al. 2007; Elad 1997). En Chile se ha descrito como patógeno en numerosos cultivos anuales y perennes (Latorre 2007).

B. cinerea se caracteriza por ser capaz de infectar semillas, tallos, hojas, flores y frutas. Además, este fitopatógeno puede viajar largas distancias por el aire, hasta que encontrar las condiciones óptimas para su germinación y desarrollo, por lo general, invade los tejidos vegetales directamente a través de heridas y órganos senescentes o muertos, generando la enfermedad del “moho gris”. Existen casos en que se ha presentado la invasión en tejidos jóvenes. Se piensa, que la enfermedad es producto de la generación de una serie de enzimas degradantes, sintetizadas por el hongo, que inducirían la muerte celular programada como estrategia de invasión (Williamson et al. 2007; Mesejo 2015; Doss et al. 1993; Fillinger and Elad 2016; Elad 1997; Musiet Soto 2015).

La invasión del patógeno, sobre las hojas del huésped, causa lesiones necróticas, y durante epidemias graves puede destruir todo el follaje de la especie atacada. En los tallos de las plantas la infección puede ocurrir, ya sea por la invasión del hongo a través del peciolo o por infección directa de las heridas después de la poda y la cosecha, si llegase a rodear el tronco podría matar a la planta. Su presencia es a menudo la razón para terminar un cultivo antes de lo previsto (Elad and Shtienberg 1995). Esta infección es un problema económico serio en cultivos tales como uvas de mesa, vid, fresas, frambuesas, lechugas, pepinos, judías, tomates, flores y plantas forestales en cautiverio (Elad 1997). Las plantaciones forestales más afectadas, por este hongo, son las de especies de *Pinus radiata* D. Don y *Eucalyptus globulus* Labill. Esta última es una de las más susceptibles, en viveros forestales chilenos (Zaldua and Sanfuentes 2010). Los problemas causados por *B. cinerea* se han observado en la mayoría de los viveros forestales del hemisferio sur, con diferentes niveles de incidencia y severidad, causando en algunos casos pérdidas superiores al 50% (Butin and Peredo 1986). Además, en los últimos años, ha causado graves problemas de descomposición de

madera, lo que ha sido asociado con las altas temperaturas y la elevada humedad relativa, requeridas para este sistema de producción vegetal (Zaldua and Sanfuentes 2010).

1.2.2. Fitopatógeno: *Phytophthora*.

El género *Phytophthora* está estrechamente relacionado con lo que ahora se conoce como la “hambruna irlandesa de la patata”, ocurrida entre los años 1845 y 1846 (Lamour 2013). En esos años no se concebía el hecho de que la plaga fuese provocada por un hongo, pese a ello el reverendo Miles de Berkeley (1846) fue el primero en reconocer formalmente que la plaga era producida por hongos, su publicación describe la causa de la plaga como un hongo del género *Botrytis*. No fue sino hasta 1876 que Anton de Bary, denominó al tizón de la papa como hongo *Phytophthora* que en griego significa “el destructor de plantas”, en esta época además, comenzó la fitopatología (Lamour 2013).

Las especies de *Phytophthora* son uno de los hongos más abundantes en el suelo. Puede infectar tanto por la raíz como por la parte aérea, causando principalmente la podredumbre de la raíz y la parte basal del tallo e hiriendo la corteza del tallo, especialmente en especies leñosas (Del Río et al. 2003). En particular la especie *Phytophthora cinnamomi* Rand, es reconocida por haber causado daños generalizados a ecosistemas nativos vulnerables y sistemas agrícolas en todo el mundo (Barrett et al. 2004). Fue aislada por primera vez desde crancos de la raya de los árboles de canela en Sumatra (Chee and Newhook 1965). La especie pertenece a la Clase de Oomicetos o “mohos acuáticos” del Reino Chromista. Su crecimiento, reproducción y propagación son favorecidos por el agua libre en el suelo o encharcamiento sobre la superficie (Hardy et al. 2001). *P. cinnamomi*, al estar en contacto con la especie hospedera penetra en la epidermis y en la corteza; crece en la estela, matando floema y cambium, y se extiende a lo largo de las raíces. A veces las raíces de cuello o grandes son penetradas directamente a través de heridas, generando lesiones necróticas (Weste and Marks 1987). *P. cinnamomi*, es considerado uno de los patógenos más devastadoras del mundo, y es el único oomiceto incluido en el top 100 de peores plagas de especies exóticas en el mundo (Lamour 2013). Es la especie más asociada a la pudrición grave de raíz en *Pinus radiata* D. Don y otros anfitriones en Nueva Zelanda (Newhook 1958). Además, está asociado con la enfermedad del *Pinus echinata* Mill en el sureste de Estados Unidos, de las piñas en Hawái, de la quina en Malaya (Chee and Newhook 1965), y la

pudrición de la raíz de paltos en las Filipinas (Avenido 2009). En Chile, el primer registro del patógeno data de 1959, en la comuna de Quillota (Zentmyer 1959; Latorre et al. 1989). En la actualidad es conocido por ser el responsable de la denominada “tristeza del palto”, enfermedad que afecta a paltos de la especie *Persea americana* Miller (Latorre et al. 1989; Sepúlveda et al. 2010), limitando la producción de paltas en la mayoría de los países productores (Lamour 2013). Por otra parte, ha sido el responsable de generar un gran daño ambiental en Australia, llegando a infectar 2500 especies nativas (Barrett et al. 2004; Allardyce et al. 2013; Lamour 2013). Es un patógeno importante para más de 125 especies (Chee and Newhook 1965) y su control en el medio natural es difícil y las opciones existentes para ello limitadas. (Allardyce et al. 2013). Motivo por el cual, ha sido descrito como una amenaza para la estabilidad del ecosistema y la biodiversidad (Hill et al. 2009; Lamour 2013).

1.2.3. Respuesta Vegetal Frente al Patógeno.

En general, las plantas están rodeadas por un gran número de enemigos, de los cuales no pueden escapar. Su sensibilidad, depende tanto de la relación específica que se genere con el patógeno como del estado fisiológico en el que se encuentra la planta, siendo la maduración de los frutos, una de las etapas con mayor susceptibilidad (Ramírez and Rodríguez 2012).

Frente a los ataques de patógenos, la plantas poseen como única forma de protección la síntesis de compuestos que actúen como defensa (Taiz and Zeiger 2006; Muckenschnabel et al. 2003). Algunos mecanismos de defensa, se relacionan con hormonas de respuesta al estrés como, el etileno **1** (ET), el ácido jasmónico **2** (JA), el ácido salicílico **3** (SA) y el ácido abscísico **4** (ABA) (Mesejo 2015; Díaz et al. 2002) (Ver figura 1). Los resultados obtenidos en estos estudios demuestran que hormonas como el JA constituyen una señal celular clave, en la activación de respuestas inmunes a muchos insectos y microorganismos necrotróficos. Esta señal estaría relacionada con la información tanto externa como interna de la planta, la cual iniciaría a la síntesis de JA (Ballare 2011).

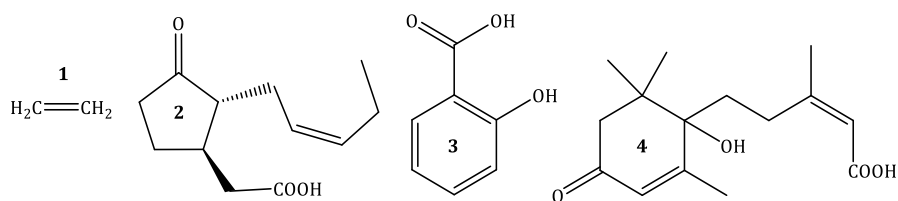


Figura 1, Hormonas vegetales relacionadas con la defensa frente a patógenos.
1: Etileno (ET), **2:** Ácido Jasmónico (JA), **3:** Ácido Salicílico (SA) y **4:** Acido Abscísico (ABA).

Adicionalmente, existe una serie de estudios que relacionan el contenido de fenoles con la resistencia de los vegetales, a estos compuestos se les denominó Fitoalexinas (ver Figura 2), que en griego significa protectoras de plantas. En la actualidad se sabe que las Fitoalexinas, es un grupo conformado por moléculas de bajo peso molecular, en su mayoría de naturaleza fenólica, que no se encuentran en tejidos sanos, sino que se forman cuando la planta sufre algún daño y se acumulan en lugares próximos a la infección, restringiendo el avance del patógeno (Maestro-Durán et al. 1993; García M. R. and Pérez L. R. 2003). En *Capsicum annum* (pimiento), la inducción de Fitoalexinas, Capsidiol **5**, es un factor protector contra la infección por *B. cinerea* (Adikaram et al. 1988). En variedades de uva resistentes a *B. cinerea* se ha estudiado la presencia y metabolismo de las Fitoalexinas resveratrol **6** y viniferina **7**, del tipo estilbeno (Maestro-Durán et al. 1993). La presencia de *B. cinerea*, induce tanto la biosíntesis de moléculas como estilbenos, antocianidinas, saponinas, como la generación de barreras estructurales y modificaciones en la pared celular (Muckenschnabel et al. 2003).

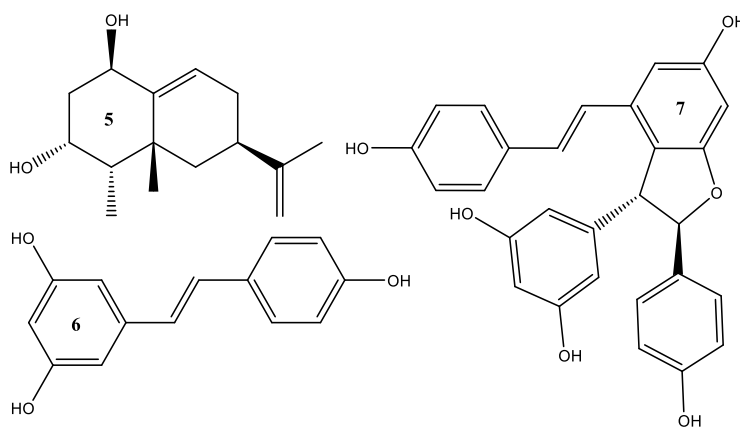


Figura 2, Fitoalexinas generadas en respuesta a *B. cinerea*
5: Capsidiol, **6** Resveratrol y **7** Viniferina

Investigaciones realizadas respecto a las defensas de las plantas, han revelado que la respuesta de los vegetales, frente a los patógenos, mejora cuando estos ya han sido atacados anteriormente. Esto indicaría, que el patógeno anterior sería el responsable de inmunizar a la planta. A esta respuesta se le denomina Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) (Camarena-gutierrez and De la Torre-Almaráz 2007). Algunos estudios, sugieren que el ácido Salicílico sería un factor importante en la resistencia adquirida, tanto a nivel local como sistémico (Durrant and Dong 2004), y que además, estaría implicado en la activación de defensas contra biótrosos, hemibiótrosos, y en algunos casos contra necrótrofos (Mesejo 2015).

En estudios sobre las especies reactivas de oxígeno (ROS) de las plantas, han demostrado su importancia como mecanismo de defensa frente patógeno. Estos muestran, que la planta eleva sus niveles de ROS cuando es atacada (Ramírez and Rodríguez 2012). A menudo la invasión de *B. cinerea* coincide con un estallido oxidativo, que implica la generación de ROS, los cuales comúnmente confieren resistencia a un amplio abanico de patógenos. Sin embargo, el estallido oxidativo no es eficaz contra *Botrytis*, debido a que este se beneficia con el aumento de las especies reactivas de oxígeno (Fillinger and Elad 2016).

Por otra parte, el estudio del efecto causado por *Phytophthora*, en dos variedades de castaño, una sensible (cv. Judía) y una resistente a la infección por *P. cinnamomi* (híbrido Ca90, *C. crenata* x *C. sativa* progeny), han demostrado que la especie insensible aumenta en un 50% el nivel de fenoles totales, incrementa las azúcares solubles y disminuye el contenido de almidón (Dinis et al. 2011). Por lo que se asocia la resistencia a la enfermedad, fundamentalmente al contenido fenólico en la especie, ya que la mayoría de ellos presentan actividad fungicida (Fitoalexina). En el caso de castaño resistente predomina el ácido gálico (Barbosa Mendes De Vasconcelos et al. 2009). Sin embargo, poco se sabe acerca de la respuesta temprana, al ataque de patógenos, en las variedades de castaño (Dinis et al. 2011).

1.2.4. Control Químico.

En la mayoría de los casos las defensas generadas por las plantas no son suficientes para evitar una infección determinada. Por lo que la utilización de plaguicidas es un factor clave para el control de los cultivos de interés económico (Russell 2005). En sí, los

plaguicidas son productos químicos que se utilizan en la agricultura para proteger a los cultivos contra insectos, hongos, malezas y otras plagas (OMS 2016).

El uso de tratamiento químico, para el control de las enfermedades causadas por hongos en cultivos, comenzó con el uso de fungicidas de contacto hace más de un siglo. La primera generación de fungicidas se caracterizaba por el uso de productos químicos inorgánicos tales como el cobre y el azufre. El Caldo bordelés, está constituido por una solución de sulfato de cobre neutralizado con cal hidratada, su uso se remonta al año 1885, por lo que ha sido considerado uno de los primeros fungicidas preparados por el hombre (Cruz 2004; Hernando Fernandez 1976). A principios del siglo XX, se desarrolló el tratamiento de semillas con mercurio orgánico (ANEXO 2), seguido por el desarrollo de los primeros fungicidas ditiocarbamatos. En la década de 1930 fue el turno de compuestos orgánicos de estaño. Esta segunda generación de fungicidas incluye los productos químicos orgánicos que actúan como protectores de superficie. Hasta la década de 1940 el control de enfermedades químicas en la horticultura se basó en preparaciones químicas inorgánicas (Oerke 2006).

Después de esta época, y producto del creciente daño en los cultivos, tanto la industria de protección de cultivos como la investigación para descubrir nuevos métodos se expandieron rápidamente. Entre los nuevos materiales desarrollados, fueron los fungicidas sistémicos o de tercera generación los que ofrecieron una importante oportunidad en el control de enfermedades, (Diagrama 1) (Vega et al. 2009; Russell 2005). Su mecanismo de acción se basa en la penetración de los tejidos, siendo capaces de controlar las infecciones de una manera curativa (Oerke 2006; Russell 2005). El uso de pesticidas modernos contribuyó a reducir el daño causado por una variedad amplia de enfermedades, aumentando el rendimiento de los cultivos. (Ishii 2006).

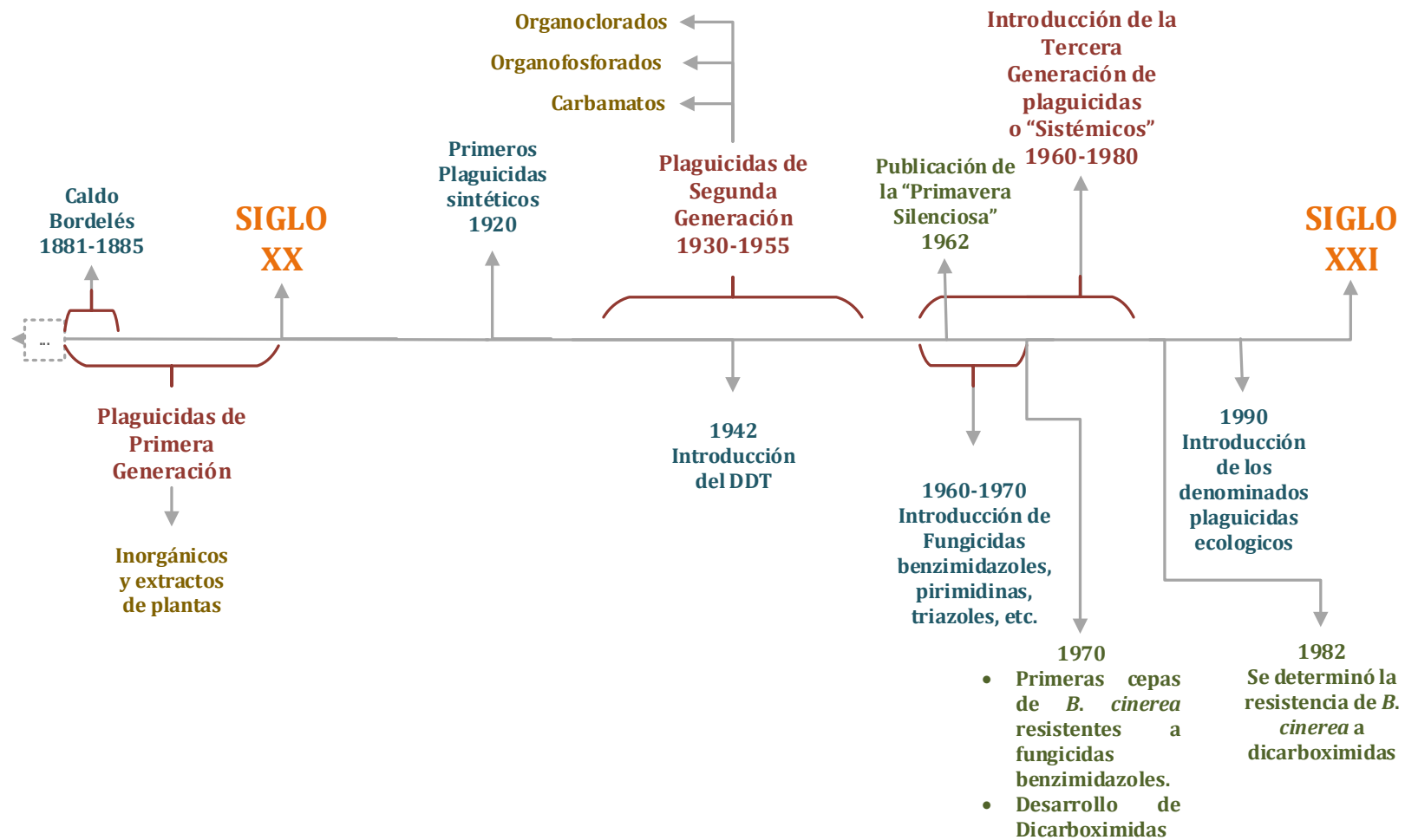


Diagrama 1, Evolución histórica del control químico.
 Fuente: Elaboración propia a partir de (Hernando Fernandez 1976)

▪ **Control químico de *B. cinerea***

El control de *B. cinerea*, se ha basado principalmente en el monitoreo constante de los cultivos, eliminación de plantas con síntomas, eliminación de cultivos infectados, y especialmente mediante la aplicación de fungicidas con diferentes formas de acción, (Diagrama 2 y 3) (Musiet Soto 2015). En cultivos de uva de mesa, el patógeno es controlado químicamente mediante varias aplicaciones de fungicidas. Los botricidas más eficientes, y por ende los más usados, son los benzimidazoles, dicarboximidas, dicloran **(10)** y captan **(8)**, (Carreño and Alvarez 1990). Durante el año 1969, uno de los fungicidas más utilizado fue el Benomyl **(18)**, pertenece al grupo de los benzimidazoles, fue utilizado para controlar *B. cinerea* en geranio. En el año 1970, se observó que el patógeno era resistente a las aplicaciones del fungicida (Bollen and Scholten 1971). El uso intensivo de benzimidazoles generó la aparición de cepas resistentes. A principios de 1980, las dicarboximidas entraron como un potencial reemplazó a los fungicidas del tipo benzimidazoles (Pappas 1997). Las dicarboximidas, que incluyen iprodiona **(17)** y vinclozolin **(15)** fueron desarrolladas a principio de la década de los 70, y ya en el año 1977 existían cepas de *B. cinerea* totalmente resistentes a diclozolina **(16)**, dicloran **(10)**, quintozeno **(11)**, vinclozolin y iprodiona (Leroux et al. 1977). En el año 1982, se determinó resistencia a las dicarboximidas, iprodione, vinclozolin y procimidone en cepas de *B. cinerea* aisladas de cultivos de pepino, tomate, frutillas y berenjenas en invernadero (Katan 1982). En 1983 en Nueva Zelanda, se informó la resistencia a dicarboximidas, dicloran y quintozeno, en aislados obtenidos en invernaderos de diversas hortalizas (Hartill et al. 1983). En los campos de este mismo país, específicamente en cultivos de vid, kiwi y frutillas, se encontraron cepas resistentes a los fungicidas del tipo dicarboximidas, determinándose además resistencia cruzada entre iprodiona con procimidone **(14)**, vinclozolin y dicloran (Beever and Brien 1983; Carreño and Alvarez 1990). Por otra parte, Dietofencarb **(19)**, es activo contra cepas de *B. cinerea* resistentes a benzimidazoles, pero incluso su uso limitado ha dado lugar a la aparición de insensibilidad (Elad and Shtienberg 1995). Debido a que benzimidazoles y dietofencarb, están en relación de “resistencia cruzada negativa” el uso de dietofencarb se ha aumentado contra poblaciones de *B. cinerea* resistentes a los fungicidas del tipo benzimidazoles (Leroux et al. 2002; Saito and Suzuki 2009). Si bien hay fungicidas que permiten controlar la enfermedad ocasionada por *B. cinerea*, muchas clases de fungicidas han fracasado debido a

la plasticidad genética del patógeno, la cual se traduce en la generación de resistencia frente a una amplia variedad de fungicidas (Williamson et al. 2007).

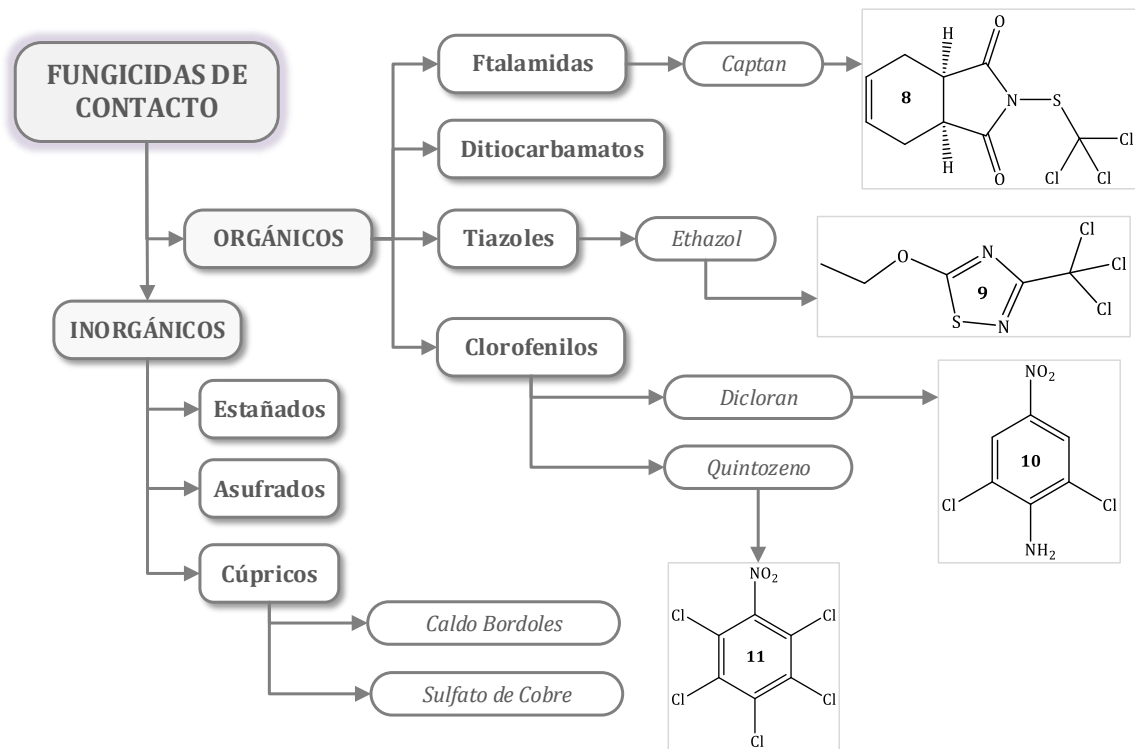


Diagrama 2, Fungicidas de Contacto
Fuente: (Gepp and Mondino 1990)

▪ **Control químico *P. cinnamomi*.**

El control químico de *P. cinnamomi*, es complicado debido al amplio rango de especies vegetales a las que puede atacar (Aleix Amurrio 2015). Varios productos químicos han sido probados en plantas *in vitro*, por ejemplo, en estudios realizados en paltos, se encontró que al ser tratados con Metalaxil (**13**), estos se recuperaban de la infección, mientras que al ser tratados con fosetil-Al (**20**) y Ethazol (**9**) no mostraban grandes mejoras (Darvas and Toerien 1979). En plantas de vid, la aplicación de bromuro de metilo o Metalaxil, ha reducido la podredumbre de las raíces, pero el patógeno se restableció en el suelo (Marais and Hattingh 1986). El fungicida sistémico, Metalaxil es capaz de inhibir las clamidosporas y la producción de esporangio, pero no afecta la germinación (Coffey et al. 1984). En viveros ornamentales, la enfermedad es controlada con Mefenoxam (**12**) (Hu et al. 2010). El fosfito químico ha demostrado ser particularmente eficaz en el control del patógeno, tanto en

sistemas agrícolas como en los naturales (King et al. 2010; Lamour 2013). Este puede actuar directamente o indirectamente sobre el patógeno, estimulando las respuestas de defensa del huésped para inhibir en última instancia su crecimiento (Barrett et al. 2004). Fertilizantes con Ca^{+2} , inhiben la producción de esporangios, clamidosporas y zoosporas pero no el crecimiento del micelio (Serrano et al. 2012).

Aunque el género *Phytophthora* y otros Oomicetos, tienen una morfología y estilo de vida similar, los fungicidas efectivos para estos últimos no son eficaces para el control de *Phytophthora spp.* Como consecuencia, el desarrollo de nuevas estrategias de control son un aspecto importante de la investigación sobre *P. cinnamomi* (Lamour 2013).

1.2.5. Problemas del Control Químico.

La incorporación de fungicidas modernos, en el control de plagas, ha contribuido en gran medida al aumento en la producción de alimentos. No obstante, su efectividad ha venido ligada a la aparición de cepas de patógenos resistentes a los tratamientos químicos (Ishii 2006). Los primeros casos, aparecieron con posterioridad a la introducción de los fungicidas sistémicos en 1962. Desde entonces este problema ha sido frecuente (Alvarez 1991; Carreño and Alvarez 1990). Esta insensibilidad del patógeno, es atribuida a la alta especificidad de los fungicidas sistémicos (Oerke 2006; Russell 2005).

Por otra parte, los plaguicidas también son potencialmente tóxicos para los animales y humanos (SAG 2013). Pueden tener efectos perjudiciales para la salud, por ejemplo, provocar cáncer o acarrear consecuencias para los sistemas reproductivos, inmunitario o nervioso (OMS 2016). La producción agrícola impacta directa o indirectamente al medio ambiente. Estos impactos tiene cada vez mayor relevancia a nivel mundial (SAG 2013).

Debido a los problemas que conlleva el uso de plaguicidas, en muchos países, las autoridades han restringido el uso de estos, mediante estrictas normas de tolerancia de residuos en productos importados (Gullino and Kuijpers 1994; Leroux 2007; Carreño and Alvarez 1990). Lo que se refleja en los requisitos y estándares de importación exigidos por los principales mercados de destino de los productos nacionales (SAG 2013; Departamento Económico y Social 2002). Replanteando la agricultura tradicional, hacia una nueva versión basada en la producción agroecológica (Badgley and Perfecto 2007).

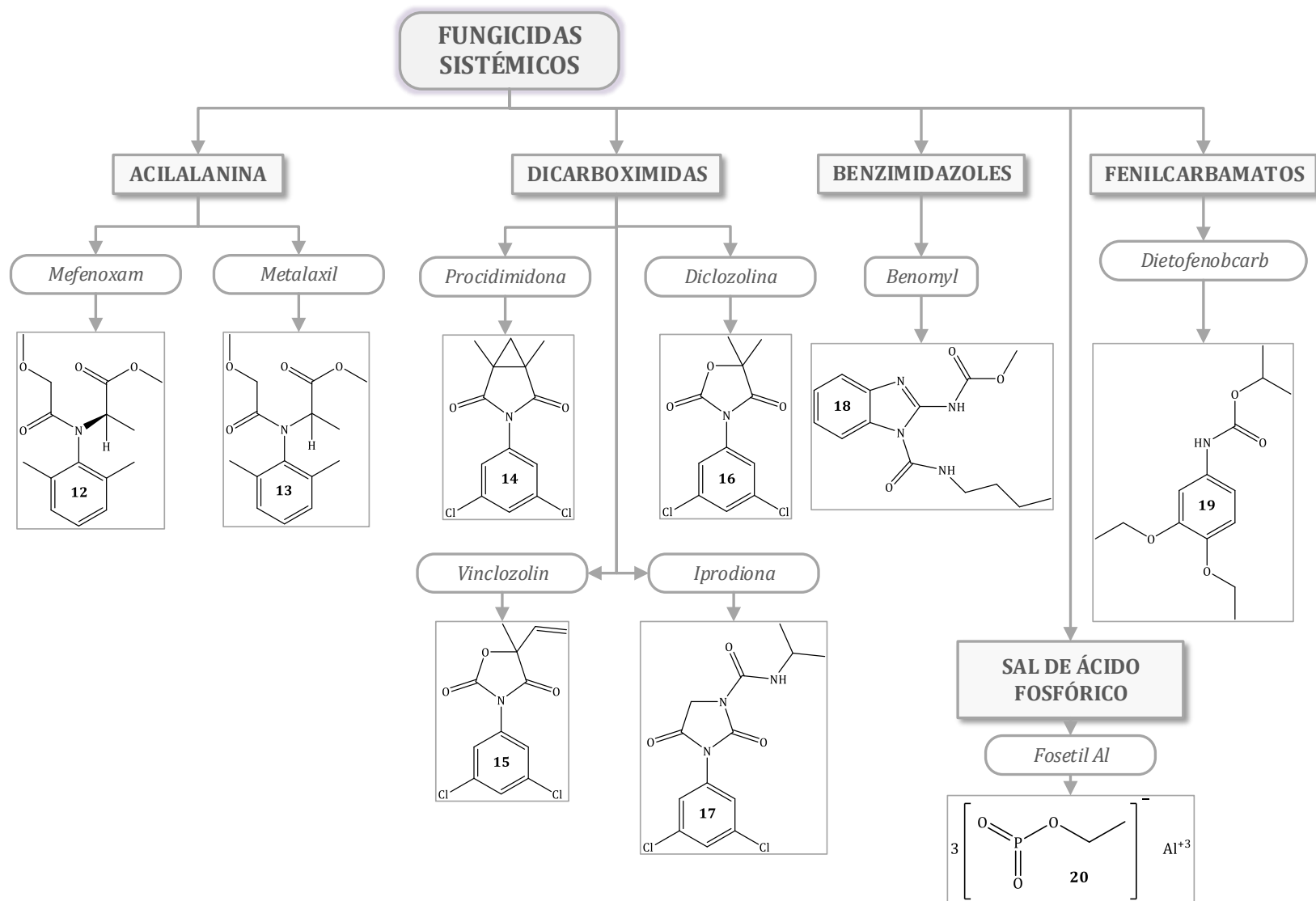


Diagrama 3, Fungicidas Sistémicos
Fuente: (Gepp and Mondino 1990)

1.2.6. La Agricultura Orgánica.

La agricultura orgánica o ecológica, es un sistema de producción, que busca mejorar la salud de los suelos, los ecosistemas y las personas. Se basa en la minimización en el uso de recursos no renovables, fertilizantes y plaguicidas de origen sintético que generen efectos adversos (FAO 2016; IFOAM 2016; SAG 2013). La agricultura orgánica combina tradición, innovación y ciencia para favorecer al medio ambiente y promover una buena calidad de vida para todos los que participan en ella (IFOAM 2016).

El fomento de la investigación científica, persigue el descubrimiento de insumos para la agricultura con un alto potencial ecológico, como es el caso de los productos de origen natural, los cuales representan una posible alternativa en el control de hongos fitopatógenos (Vengurlekar et al. 2012).

1.3. Los Productos Naturales

Las células vegetales, poseen una serie de procesos químicos y físicos que permiten la síntesis de los elementos que forman el organismo vegetal. Estos procesos se llevan a cabo mediante un conjunto de rutas sintéticas denominadas metabolismo, en las plantas, es posible diferenciar dos tipos de metabolismo el primario y el secundario. El metabolismo primario, abarca al conjunto de rutas sintéticas que generan compuestos vitales para el desarrollo y crecimiento vegetal, como son los aminoácidos, nucleótidos, azúcares o lípidos. Por otra parte, el metabolismo secundario genera moléculas que no tienen funciones reconocidas o directas en los procesos vitales de la planta (fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, entre otros), a estos compuestos se les denomina metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales (Ávalos and Pérez 2009; Pomilio 2012; Taiz and Zeiger 2006).

Estos compuestos, sin ser esenciales para la supervivencia de células individuales, tienen un papel importante en la vida y supervivencia del organismo en su entorno ecológico (Palacios et al. 2004). Se piensa, que el metabolismo secundario sintetiza estos compuestos como respuesta evolutiva a estímulos externos como estrés hídrico, estrés térmico, plagas, patógenos o simbiosis con otros organismos. (Pomilio 2012; Ávalos and Pérez 2009). A diferencia de los metabolitos primarios, los productos secundarios se distribuyen de manera restringida en el reino vegetal, es

decir, con frecuencia son encontrados en una sola especie o grupo de especies relacionadas (Taiz and Zeiger 2006).

Los productos naturales están involucrados en una multitud de funciones ecológicas, entre ellas las interacciones planta-microorganismos, planta-insectos, planta-planta e interacciones planta-vertebrados (Palacios et al. 2004). Específicamente, algunos pueden actuar como atrayentes o repelentes de animales; es el caso de pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores; otros, tienen funciones protectoras frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando sabores amargos o haciéndola venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos and Pérez 2009). En general, estos metabolitos secundarios pueden ser clasificados en: Terpenos, Alcaloides, Flavonoides, Compuestos Fenólicos y Taninos (Pomilio 2012)

1.3.1. Estudio de Productos Naturales.

Como se mencionó anteriormente, las plantas han sido capaces de protegerse de las plagas por sí mismas desde antes que el hombre jugara un rol activo en el control de plagas. Se conoce que sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con el mecanismo de defensa (Hernandez et al. 2007). Durante años los productos naturales, han sido una fuente de compuestos con esqueleto químico único y potencial bioactividad. Descubiertos desde diversas fuentes naturales, como plantas, productos marinos y microorganismos (Vengurlekar et al. 2012), estos metabolitos son de gran interés para el desarrollo de compuestos biológicamente activos (Pomilio 2012).

La obtención de metabolitos secundarios es variable. Las principales etapas requeridas, para su obtención, se basan en: la extracción, aislamiento, purificación y determinación estructural. (Pomilio 2012; Hernandez et al. 2007). Finalmente, se realizan pruebas de actividad biológica, los ensayos más comúnmente reportado corresponden a actividad antimicrobiana (Márquez et al. 2004).

1.3.2. Actividad de Extractos y Metabolitos.

Diversos productos derivados de plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Hernandez et al. 2007). Por su parte, los aceites esenciales están conformados por compuestos volátiles y sus constituyentes han sido usados como agentes biológicos por su actividad terapéutica y toxicidad contra insectos y hongos fitopatógenos (Barrera-Necha et al. 2009). Su modo de acción, no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos (Hernandez et al. 2007).

▪ *Extractos y metabolitos contra Botrytis cinerea*

La búsqueda incesante de compuestos activos que inhiban el desarrollo de *B. cinerea*, ha permitido encontrar una serie de extractos potenciales para el control de este fitopatógeno. En la Tabla 1, Estudios de Extractos Naturales contra *B. cinerea*., se presenta una recopilación de estudios realizados con extractos de origen natural frente a *B. cinerea*.

Tabla 1, Estudios de Extractos Naturales contra *B. cinerea*.

Especie	Extracto	Actividad	Referencia
<i>Pithecellobium dulce</i>	Extracto Acuoso de hojas de	Inhibición del crecimiento micelial entre un 50 y 78%	(Bautista-Baños et al. 2003)
<i>Satureja hortensis L.</i>	Extracto de hojas	Fungicida en todas las dosis	(Boyraz and Özcan 2006)
<i>Grapefruit seed extract (GSE)</i>	Extractos de semillas de pomelo	La exposición de esporas a 0,5% GSE inhibió la tasa de germinación en 14%. Después de 3 [d], a una concentración de 0,5%, inhibe el 65,1% del crecimiento micelial	(Xu et al. 2007)
<i>Geoffroea decorticans Burkart</i>	Extracto Acuoso	Concentraciones de 69,1 y 87,4% inhibirían en un 50 y 95% la germinación de conidios. A una concentración superior al 80% se inhibe el 80% del crecimiento del tubo germinativo	(Boiteux et al. 2015)
<i>Allium spp (4), Capsicum spp (15)</i>	Extracto frio del material vegetal	Después de 48 [h], entre un 90 y 99% de Inhibición de la germinación	
<i>Cymbopogon Martini y Thymus zygis</i>	Aceite esencial	100% de inhibición de la germinación, a una dilución del 0,78% por 40 [h]	(Wilson et al. 1997)
<i>Eugenia Caryophyllata</i>	Aceite esencial	100% de inhibición de la germinación, a una dilución del 0,78% por 24 [h]	
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Aceite esencial	100% de inhibición de la germinación, a una dilución del 1,56% por 40 [h]	
<i>Origanum Syriacum L. var bevanii</i>	Aceite esencial	A una concentración volátil de 0,2 [g/ml] se inhibió un 100% el crecimiento.	(Soylu et al. 2010)

		En pruebas de contacto, a una concentración de 12,8 [g/ml] se inhibe en un 100% el crecimiento	
<i>Lavandula stoechas L. vas stoechas</i>	Aceite esencial	A una concentración volátil de 1,6 [g/ml] se inhibió un 100% el crecimiento.	
<i>Rosmarinus defincinalis L</i>	Aceite esencial	A una concentración volátil de 1,6 [g/ml] se inhibió un 100% el crecimiento.	
<i>Salvia officinalis L</i>	Aceite esencial, fracciones de hidrocarburos y oxigenada	Mostraron actividad fungicida: el aceite esencial a una dosis de 2, 2 [g/L] y la fracción oxigenada 1,85 [g/L]. La fracción de hidrocarburos no presentó actividad	(Carta et al. 1996)
<i>Haplopappus taeda</i>	Extracto metanólico	A concentraciones de 4 y 16%, se observó un halo de inhibición de 0,45 y 0,5 mm, respectivamente	(Quiroz Bravo 2003)
<i>Thymus capitatus</i>	Extracto de aceite	A una concentración del 0,1% inhibió en un 100% tanto la germinación como el alargamiento del tubo germinativo	
<i>Syzygium aromaticum</i>	Extracto de aceite	A una concentración del 0,1% inhibió en un 67% la germinación y en un 93% el alargamiento del tubo germinativo	(Antonov et al. 1997)
<i>Prostanthera rotundifolia</i>	Extracto de aceite	A una concentración del 0,1% inhibió en un 65% tanto la germinación como el alargamiento del tubo germinativo	

Entre los metabolitos investigados, (ver Figura 3), se encuentra el ácido sálvico (**21**) y el ácido acetilsálvico (**22**), los cuales fueron aislados desde *Pseudognaphalium vira vira*. Estos diterpenos presentan una gran actividad inhibitoria del crecimiento micelial en *B. cinerea*. Adicionalmente, se observó que la cadena lateral está relacionada con la actividad del compuesto, ya que al reducir su tamaño se potencia la actividad contra el patógeno (Mendoza et al. 2009). En un estudio anterior sobre metabolitos de *P. vira vira* (compuesto **23** y **24**) se determinó una inhibición del 80,8% contra *B. cinerea* para el compuesto **24** (Cotoras et al. 2004). Por otra parte los diterpenos esclerol (**25**) y 13-*epi*-esclerol (**26**) obtenidos de una mezcla eutéctica de las hojas de *Nicotiana glutinosa*, se analizaron contra una serie de hongos fitopatógenos, las observaciones indicaron que si bien no impiden la germinación de las esporas, generan la reducción en la extensión radial de las colonias, a excepción de *B. cinerea*, donde sí provocaron la inhibición de la germinación (Bailey et al. 1974). En otro estudio, se comprobó que los metabolitos **25** y **26**, inhiben el crecimiento micelial de *B. cinerea* (Mendoza et al. 2015). Adicionalmente, se ha demostrado la actividad antifúngica, contra *B. cinerea*, de otros 4 sesquiterpenos obtenidos desde fuentes naturales (**27**, **28**, **29** y **30**) (Aleu et al. 1999, 2001). En una investigación realizada con Hinokitiol (**31**), compuesto aislado desde el extracto de raíz de *Hiba Arbovitae* se comprobó que este inhibe completamente la germinación de esporas de *B. cinerea*, a una concentración de 100 [µL/L]. En un trabajo realizado con derivados

hemisintéticos de β -Himachaleno, extraído de *Cedrus spp*, se demostró que uno de ellos (**32**) logró inhibir en un 91% el crecimiento de *B. cinerea*, después del sexto día de incubación (Daoubi et al. 2005).

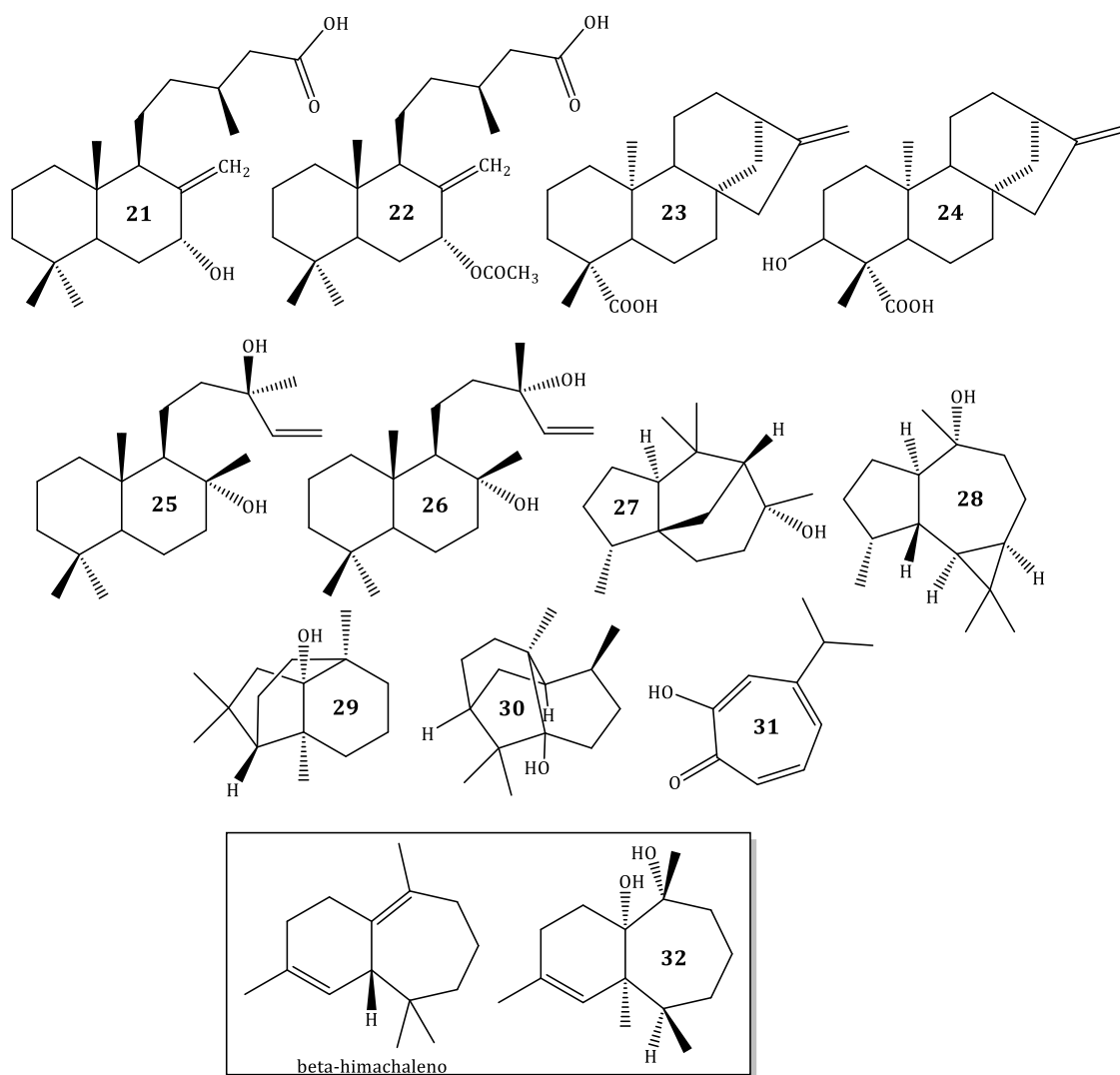


Figura 3, Metabolitos con actividad contra *B. cinerea*.

▪ **Extractos y metabolitos contra *Phytophthora***

Los estudios realizados en la búsqueda de extractos y metabolitos activos contra el patógeno *P. cinnamomi* no son tan abundantes como los reportados para *B. cinerea*, en la Tabla 2 se presentan los principales estudios realizados contra el patógeno.

Tabla 2, Estudios de Extractos Naturales Contra *P. cinnamomi*

Especie	Extracto	Actividad	Referencia
<i>Salvia Officinalis L.</i>	Aceite Esencial	Inhibe el crecimiento del patógeno en: un 14,7% a una concentración de 200 [ppm], 15,1% a 400 [ppm], 48,6% a 800 [ppm] y 92,5% a 1600 [ppm]	(Giamperi et al. 2002)
<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	Aceite Esencial	Inhibe el crecimiento del patógeno en: un 6,4% a una concentración de 100 [ppm]. 7,5% a 200 [ppm], 21,0% a 400 [ppm], 32,5% a 800 [ppm] y 74,1% a 1600 [ppm]	
<i>Origanum vulgare L.</i>	Aceite Esencial	Inhibe el crecimiento del patógeno en: un 20% a una concentración de 50 [ppm], 64,6% a 100 [ppm], 100% a 200 [ppm]. Fue fungicida a concentraciones de 400, 800 y 1600 [ppm]	
<i>Laurus nobilis L.</i>	Aceite Esencial	Inhibe el crecimiento del patógeno en: un 3,6% a una concentración de 100 [ppm]. 8,1% a 200 [ppm], 15,8% a 400 [ppm], 36,6% a 800 [ppm] y 61,5% a 1600 [ppm]	
<i>Coriandrum sativum L.</i>	Aceite Esencial	Inhibe el crecimiento del patógeno en: un 16,7% a una concentración de 50 [ppm], 24,3% a 100 [ppm] 54,1% a 200 [ppm], 84,2% a 400 [ppm], 100% a 800 [ppm]. Fue fungicida a 1600 [ppm]	
<i>Thymus vulgaris L.</i>	Aceite Esencial	Inhibe el crecimiento del patógeno en: un 29,6% a una concentración de 50 [ppm], 48,9% a 100 [ppm] 100% a 200 [ppm], 100% a 400 [ppm]. Fue fungicida a 800 y 1600 [ppm]	
<i>Mentha piperita L.</i>	Aceite Esencial	Inhibe el crecimiento del patógeno en: un 12,7% a una concentración de 50 [ppm], 22% a 100 [ppm] 39% a 200 [ppm], 80,2% a 400 [ppm], 100% a 800 [ppm]. Fue fungicida a 1600 [ppm]	
<i>Lavandula hybrid</i>	Aceite Esencial	Inhibe el crecimiento del patógeno en: un 21,8% a una concentración de 400 [ppm], 86,1% a 800 [ppm] y 100% a 1600 [ppm]	
<i>Persea americana var drymifolia</i>	Extracto de raíces	Inhibe un 100% del crecimiento micelial.	

En investigaciones recientes con extractos de *Olea europaea*, se observó actividad biológica contra *Phytophthora spp*, entre los principales componentes del extracto se encontro tirosol **(33)**, el cual presentó la mayor actividad, seguido de catequina **(34)** y oleuropeína **(35)** (Del Río et al. 2003). En el extracto de raíces de *Persea americana* var. *drymifolia*, se identificó como compuesto principal 3,5-dieno estigmastan **(36)**, el cual inhibió un 100% el crecimiento micelial de cultivos *in vitro* del patógeno, a una concentración de 100 [ppm] (Sánchez-Pérez et al. 2009). Por otra parte, Borbonol, una sustancia antifúngica aislada desde raíces y tallos de *Persea borbonia*, inhibe el crecimiento y producción de esporangio vegetativo de *P. cinnamomi* (Zaki et al. 1980). Finalmente, en un estudio realizado a microorganismos provenientes del suelo, se identificó un complejo

piranoso (**37**) producido por *Trichoderma koningii*, que afectó el crecimiento de fitopatógeno como *P. cinnamomi*. (Reino et al. 2008) (ver Figura 4).

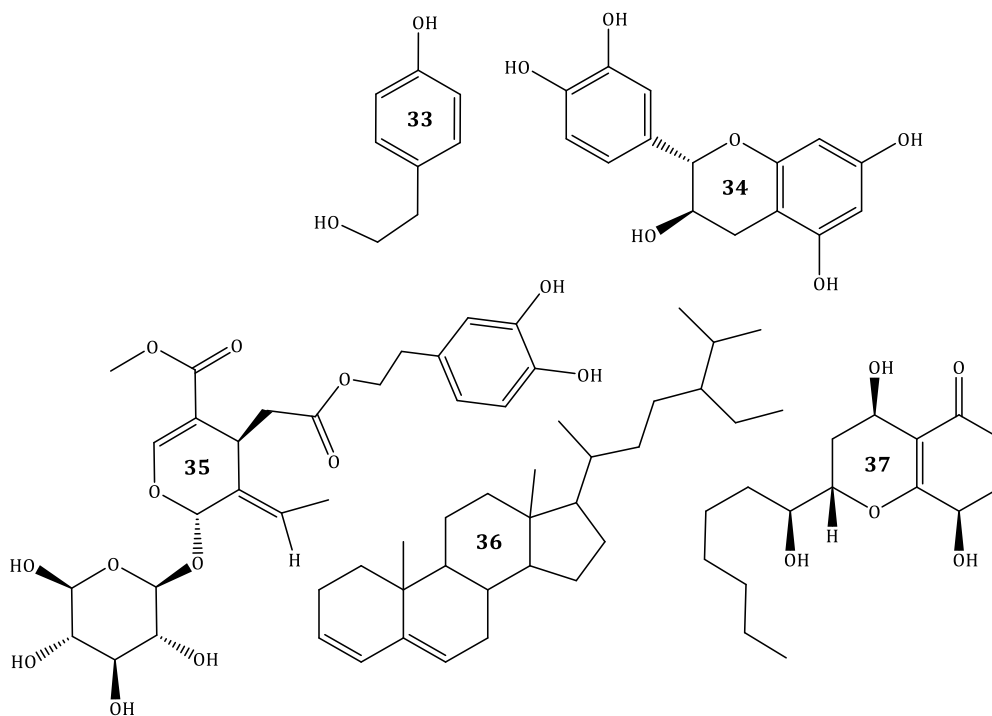


Figura 4, Metabolitos con actividad contra *P. cinnamomi*

1.4. Posibilidades para Chile.

Chile por su parte posee una gran diversidad de hábitats terrestres, marinos y de agua dulce, lo que sumado a las características climáticas y al relativo aislamiento geográfico del país, ha favorecido el desarrollo de una diversidad moderada en número de especies, pero con especies y ecosistemas únicos en el mundo (Manzur 2008; Villagran and Hinojosa 2005). La flora y fauna del país muestra alto niveles de endemismo, también existe una gran cantidad de especies nativas. A escala regional, la variación del clima es uno de los principales factores que determinan la variación espacial de la vegetación (Figueroa and Calfucura 2008).

1.4.1. *Drimys*

Entre las especies arbóreas nativa de Chile, se encuentra el género *Drimys*, de la cual se conocen tres especies *Drimys winteri* Forst, *Drimys andina* Reiche y *Drimys confertifolia* Phi. Esta última, sólo se encuentra en el Archipiélago de Juan Fernández (Hernandez et al. 1996).

D. winteri Forst, es conocida popularmente como “Canelo”. Árbol de hojas perennes, que se encuentra entre la zona del Río Limarí y Tierra del Fuego, en áreas que van desde el nivel del mar hasta la Cordillera de Los Andes (Quiroz Bravo 2003; Hernandez et al. 1996). Es considerado el árbol sagrado del pueblo mapuche (Muñoz et al. 2001). De la especie es posible encontrar dos variedades *D. winteri* var *winteri* y *D. winteri* var *chilensis* (Jara-Arancio et al. 2012). Desde 1970, se han llevado a cabo una serie de investigaciones químicas y biológicas, utilizando extractos, aceites esenciales y metabolitos obtenidos desde cortezas y hojas de Canelo, con las cuales se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas, antifúngicas, insecticidas, antiinflamatorias, antitumorales, entre otras (Muñoz et al. 2001). En la Tabla 3, se presentan los resultados de algunos estudios realizados con extractos y aceites esenciales de *D. winteri*.

Los aceites esenciales, de hojas y corteza, se encuentran compuestos principalmente por α y β -pineno, canfeno, α -cadineno, α -felandreno, limoneno, terpineno, drimenol, elemol, linalol, terpinol, citral, furfural, piperonal, aldehído veratríco, fenchona, entre otros (Muñoz et al. 2001).

Por otra parte, se ha evidenciado que los extractos de *D. winteri* contienen principalmente flavonoides y sesquiterpenos de tipo drimano (Malheiros et al. 2001). Estos últimos, han atraído un interés particular debido a su actividad antialimentaria, antimicrobiana, insecticida y regulador del crecimiento de la planta (Malheiros et al. 2001).

Tabla 3, Estudio realizados con *D. winteri*

Extracto	Actividad	Referencia
<i>Aceite esencial</i>	Produce un 100% de mortalidad de <i>Aegorhinus superciliosus</i> altas concentraciones, 40% v/v,	(Ramón et al. 2012)
<i>Aceites esenciales</i> (Hojas y Corteza)	A una concentración de 64 µL/L de Aceite de hojas causo la mortalidad de 68% de <i>Acyrtosiphon pisum</i> ; a la misma concentración el aceite de corteza causo un 63% de mortalidad.	(Zapata et al. 2010)
<i>Aceite esencial</i>	A una concentración del 100% del aceite se inhibió en un 100% el crecimiento de <i>B. cinerea</i> . Mientras que al 80% de concentración, se inhibió el 65%.	(Becerra and Hernandez 2010)
<i>Aceite esencial</i>	Muestra efectos fitotóxicos en la germinación de semillas de <i>Portulaca oleracea</i> a concentraciones por sobre 1µL/mL	(Verdeguer et al. 2011)
<i>Extracto N-hexano</i> (Corteza)	La aplicación del extracto al follaje de cuatro especies de malezas, a concentraciones de 800 a 6400 mg/L, redujo la altura, adicionalmente, causó la muerte de las especies <i>Cichorium intybus</i> , <i>Setaria pumila</i> y <i>Daucus carota</i> .	(Zapata et al. 2011b)
<i>Extracto N-hexano, acetona y metanol</i> (Corteza)	A concentraciones de 198 y 234 mg/L, de los extractos de n-hexano y acetona, respectivamente, se lograba una inhibición del 50% del crecimiento de <i>Gaeumannomyces graminis var tritici</i> . El extracto de metanol sólo inhibió un 33% del crecimiento a 800 [mg/L].	(Zapata et al. 2011a)
<i>Extracto N-hexano y aceite esencial</i> (Corteza)	(in vitro) El aceite esencial aplicado por contacto 932 mg/L y como volátil 30,27 mg/L inhibió un 50% el crecimiento de <i>Gaeumannomyces graminis</i> . (in vivo) Los inóculos de <i>G. graminis</i> en trigo fueron tratados con extracto, el cual a una dosis de 250 mg/kg mostro un control del daño causado por el hongo.	(Monsálvez et al. 2010)
<i>Corteza triturada</i>	La presencia de corteza triturada, en el medio de cultivo, inhibió hasta en un 90% el crecimiento micelial de <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. capsici</i> y <i>Sclerotinia cepivorum</i> .	(Blanco Torres 2009)
<i>Aceite esencial</i> (corteza)	A una concentración de 800 mg/L se inhibió un 79,2% y un 89,5% del crecimiento micelial de <i>P. cinnamomi</i> y <i>S. cepivorum</i> , respectivamente.	
<i>Extracto Acuoso</i> (corteza)	Inhibe la germinación de conidios de <i>Penicillium</i> spp. Con un halo de inhibición de 3,6 y 4,3 mm a concentraciones de 0,5% y 1%, respectivamente.	(Quiroz Bravo 2003)
<i>Extracto Metanólico</i> (corteza)	A una concentración de 16% inhibe en un diámetro de 6,35 mm a <i>B. cinerea</i> . A una concentración de 12% del extracto inhibe en un máximo de 3mm a <i>Penicillium</i> spp.	
<i>Extracto Hidroalcohólico</i> (Corteza)	Se estudió la contracción de mediadores implicados en el asma y la alergia. Demostrando que el extracto posee principios activos que interactúan a través de mecanismos distintos con varios mediadores que participan en el asma y la alergia	(El Sayah et al. 1997)
<i>Extracto Hidroalcohólico</i> (Corteza)	El objetivo del estudio comprendía evaluar las propiedades antiinflamatorias y antialérgicas del extracto. Encontrando las claras propiedades antiinflamatorias y antialérgicas de los principios activos presentes en la corteza de <i>D. winteri</i> .	(Tratsk et al. 1997)
<i>Extracto Hidroalcohólico</i> (Corteza)	Se encontró que existe soporte para una propiedad antihiperalgesica de larga duración para el(los) principio(s) activo(s) presente(s) en la corteza de <i>D. winteri</i>	(Mendes et al. 1998)

Entre los metabolitos aislados se encuentran flavonoides tales como cirsimarina (**38**), taxifolina (**39**), luteolina (**40**), kaempferol (**41**), astilbina (**42**), quercetina (**43**) y procianidinas, (ver Figura 5) (Muñoz et al. 2001). Las pruebas biológicas realizadas con estos metabolitos demostraron que poseían actividad antiinflamatoria. Taxifolina adicionalmente, presentó actividad anti-tumoral, in vivo, en leucemia linfocítica de ratón. Además, han sido aislados taninos y ácido ascórbico (Muñoz et al. 2001).

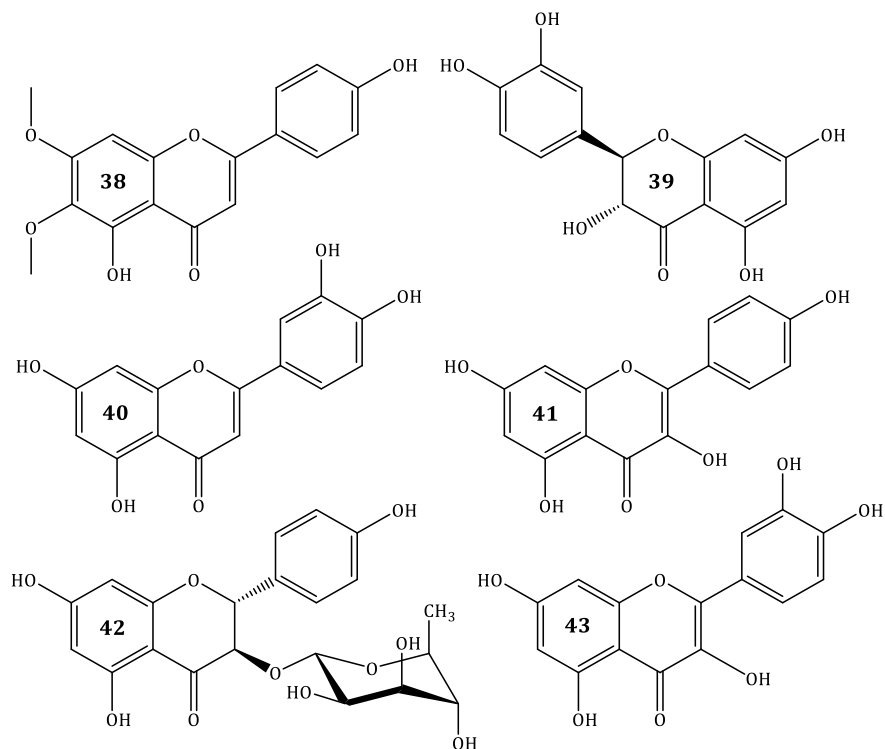


Figura 5, Flavonoides aislados desde *Drimys winteri*.

Adicionalmente se aislaron los lignanos sesamina (**44**), eudesmin (**45**) y cubebina (**46**), y su epímero (**47**) y el esteroide β -sitosterol (**48**) (ver Figura 6). (Muñoz and Gutierrez 2015).

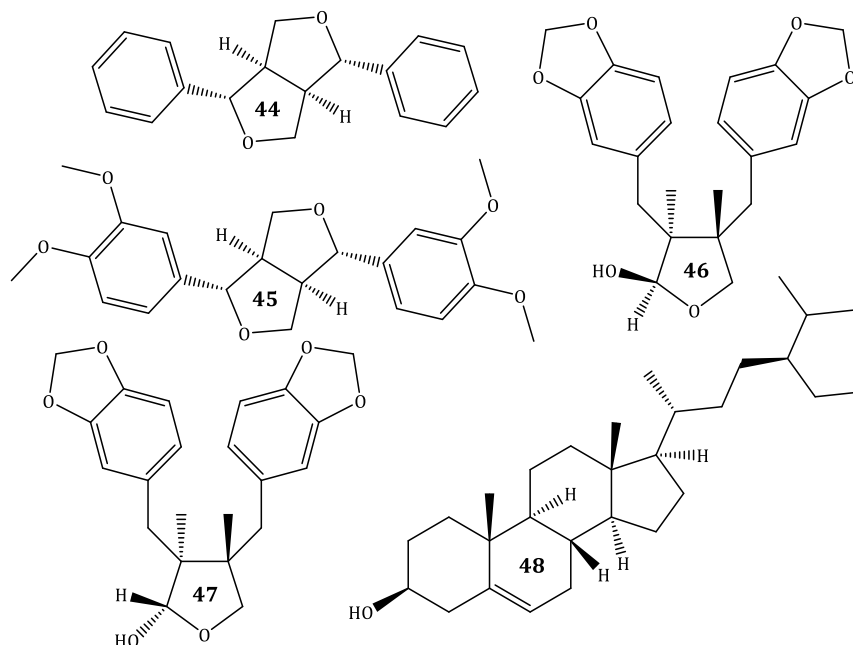


Figura 6, Lignanos y esterol aislados desde *D. winteri*.

Desde la corteza de *D. winteri* (continental, andina y de la Isla de Chiloé), se han obtenido una serie de sesquiterpenos, (ver Figura.7) (Cárcamo et al. 2014; Cechinel Filho et al. 1998; Paz Robles et al. 2014; Rodríguez et al. 2005; Muñoz and Gutierrez 2015; Calle et al. 1985; Appel et al. 1963; Brown 1995; Escobar and Wittke 1988). También, se han obtenido terpenos, ya descritos en otros dicotiledónea, entre ellos (-) ent-kaureno **(64)** (Muñoz et al. 2001).

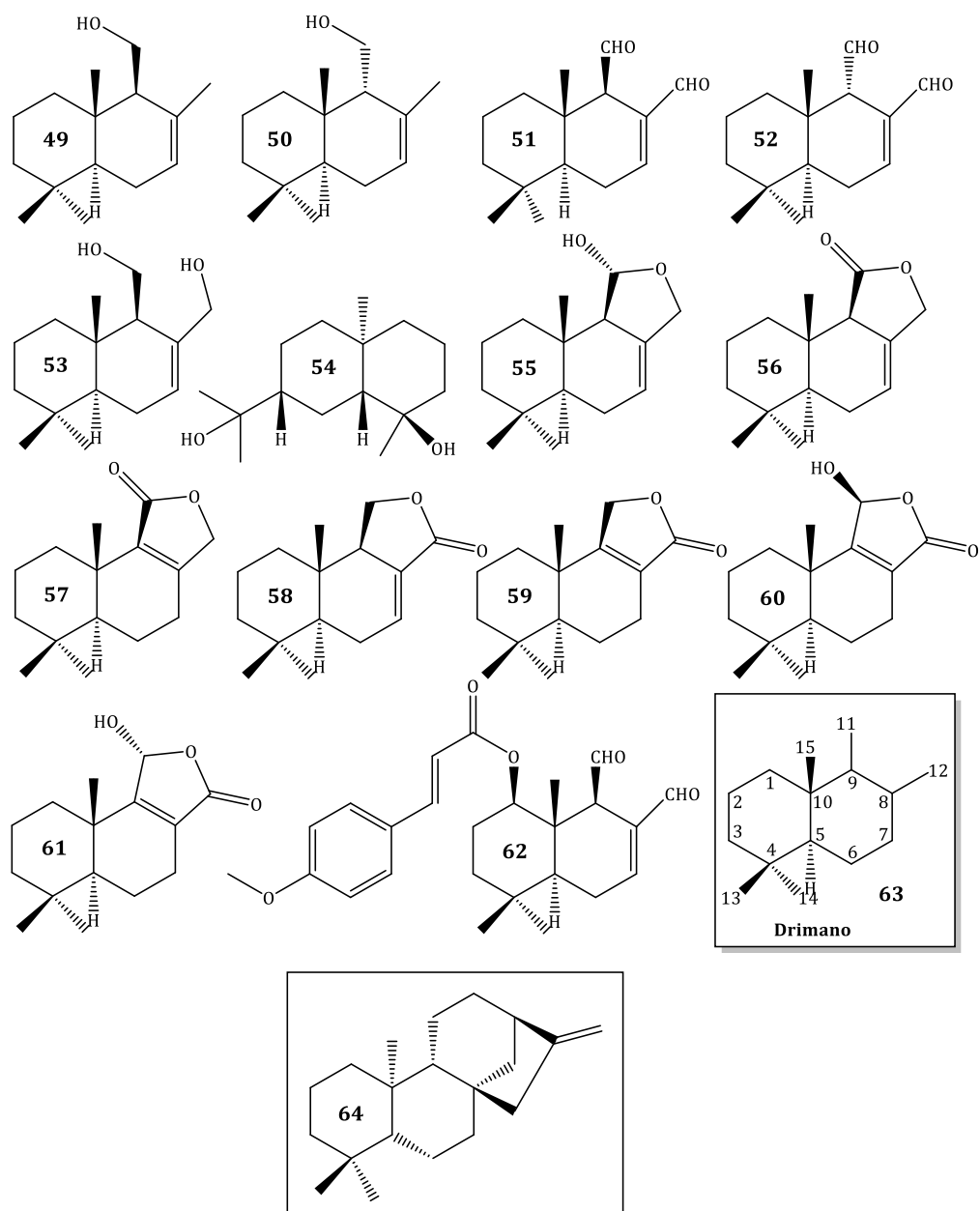


Figura 7, Sesquiterpenos drimano y terpeno aislados desde *Drimys winteri*.
49. Drimenol, **50.** Isodrimenol, **51.** Poligodial, **52.** Epipoligodial, **53.** Drimendiol, **54.** Proximadiol, **55.** Isodrimeninol, **56.** Drimenin, **57.** Isodrimenin, **58.** Canamolide, **59.** Cofertifolina, **60.** Valdiviolide, **61.** 11-epi-valdiviolide y **62.** 1- β -(p-metoxicinamoil) Poligodial y **64.** Ent-kaureno

De los sesquiterpenos encontrados en *D. winteri* destacan Drimenol (**49**), isodrimenol (**50**) y poligodial (**51**), por su actividad insecticida (Muñoz et al. 2001). Se ha estudiado la presencia de poligodial y drimenol en hojas y corteza de *Drimys* chilenas, mediante análisis de Cromatografía de Gases (GC) de los extractos de hexanos, observando que las concentraciones medias de Poligodial

en hojas era de 0,99% y las de drimenol de 0,011%. En contraste con el extracto obtenido de corteza, donde se observó un aumento en la concentración de drimenol (Muñoz-Concha et al. 2007).

Drimenol es un importante sesquiterpeno drimano, fue aislado por primera vez en 1948 desde corteza de *Drimys winteri* Forst, por Appel y sus colaboradores (Appel et al. 1959; Kuchkova et al. 2004). Por su parte, poligodial fue aislado originalmente de la planta *Polygonum hydropiper* (Barnes and Loder 1962) y, posteriormente, de *Warburgia ugandensis* y *Warburgia stuhlmannii* que presentan actividad antialimentaria en insecto (Kubo et al. 1976) y actividad antimicrobiana (Taniguchi et al. 1978) así como de *Pseudowintera colorata* que también presenta actividad antimicrobiana (McCallion et al. 1982).

Por otra parte, Poligodial se caracteriza por dar "sabor picante" en especias de la cocina japonesa tradicional (Kubo and Ganjian 1981). Y a diferencia de muchos otros agentes antifúngicos, posee actividad fungicida frente a levaduras y hongos filamentosos (Kubo and Taniguchi 1988). Estudios previos indican que esta actividad se debe a la presencia de un aldehído α,β -insaturado (Taniguchi et al. 1984). Sin embargo, investigaciones recientes llevadas a cabo en un grupo de sesquiterpenos y derivados indican que la actividad sólo se debe a la presencia del doble enlace entre el carbono 7 y 8, no siendo necesaria la presencia del aldehído (Derita et al. 2013). Observaciones sobre el mecanismo fungicida, de poligodial, sobre *Saccharomyces cerevisiae*, indican que induce la muerte celular por interrupción de la membrana plasmática (Taniguchi et al. 1988). Sin embargo, estos resultados apoyan una imagen más compleja de su efecto, ya que, un objetivo importante de poligodial, en levaduras, es inhibir la ATP sintasa mitocondrial. La reducción del suministro de ATP conduce a una supresión de la actividad ATPasa Pma1, impidiendo la respiración celular, y deteriora respuestas de adaptación a otras facetas de la inhibición celular de poligodial. Se debe considerar que los mutantes petite, son notoriamente menos sensibles debido a la ausencia de ADN mitocondrial (Lunde and Kubo 2000). Una de las ventajas de poligodial, es que a diferencia de otros sesquiterpenos no es mutagénico (Lunde and Kubo 2000).

Los sesquiterpenos forman un grupo de más de 5000 compuestos que tienen un amplio espectro de efectos biológicos y parecen desempeñar un papel importante entre los mecanismos de defensa de las plantas (Fraga 1998; Monsálvez et al. 2010). Las propiedades presentadas por extractos y metabolitos obtenidos desde *D. winteri* dan cuenta de la importancia y las

oportunidades que puede otorgar a la agroindustria el estudio de esta especie en el control de fitopatógenos asociados a grandes pérdidas de cultivos en Chile y el mundo.

Capítulo 2. Hipótesis

De acuerdo con los antecedentes bibliográficos, se plantea la siguiente hipótesis de investigación:

Los extractos de polaridad baja, intermedia y alta, y los metabolitos secundarios de *Drimys winteri* continental, presentaran actividad contra hongos fitopatógenos necrótrofos, que afectan cultivos de interés agroeconómico en Chile.

Capítulo 3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

Obtener extractos y metabolitos activos desde la corteza de *Drimys winteri* continental, y probar su actividad biológica contra hongos fitopatógenos necrotróficos, *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*

3.2. Objetivos específicos.

- Obtener extractos de hexano, acetato de etilo y etanol a partir de corteza de *D. winteri*.
- Evaluar la actividad biológica antifitopatógena de los distintos extractos en *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*.
- Separar, purificar y caracterizar metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos activos
- Evaluar la actividad biológica antifitopatógena de los metabolitos secundarios mayoritarios.

Capítulo 4. Desarrollo Experimental

4.1. Materiales y Método.

4.1.1. Materiales.

4.1.1.1. Parte Química.

- **Material Vegetal**
 - Corteza de *D. winteri* de Valdivia.
 - Corteza de *D. winteri* de Chiloé.
- **Solventes:**
 - Acetato de etilo
 - Acetona
 - Diclorometano
 - Etanol
 - Éter dietílico
 - Hexano
 - Metanol
- **Soportes:**
 - Silicagel Merck (0,032 -0,063 mm)
 - Sílica Merck (0,063- 0,2 mm)
 - Arena
- **Insumos**
 - Nitrato de Plata
 - Algodón
 - Fibra de vidrio
 - Ácido Sulfúrico

- **Materiales, Instrumentos y equipos:**

- Columnas cromatografías de diferentes diámetros
- Viales 20 [mL]
- Matraces Erlenmeyer
- Vasos Precipitados
- Recristalizador
- Pesa Analítica BEL engineering
- Cromatofolios (CCF)
- Rotavapor, Büchi R-100.
- Bomba de vacío, Büchi V-800.
- Estufa, Memmert UF 110.
- Macerador de acero inoxidable.
- Macerador de vidrio.
- Destiladores
- Equipo de espectroscopia de RMN, Bruker Avance 400 MHz.
- Equipo de espectroscopia de IR, ubicado en el Laboratorio del Dr. Guillermo Díaz, Universidad de Playa Ancha.
- Lámpara UV 254/365 Spectroline
- Placa Calefactora

4.1.1.2. Parte biológica.

- **Líneas celulares:**

- *Botrytis cinerea* B05.10, las cuales serán facilitadas por el laboratorio de la Dr. Evelyn Silva, de la Universidad Autónoma de Chile.
- *Phytophthora cinnamomi*, cepas facilitadas por el SAG de Valparaíso, a cargo de la Dr. Katy Díaz, de la Universidad Técnica Federico Santa María.

- **Solventes:**

- Diclorometano
- Etanol
- Agua destilada

- **Materiales:**
 - Placas Petri de 5 [cm] para cultivo
 - Botella Pyrex de 500 [mL]
 - Medio de cultivo Agar patata dextrosa (APD) DIFCOTM
 - Micropipeta 1000 [μ L]
 - Micropipeta 200 [μ L]
 - Sacabocado
 - Pinzas
 - Puntas para Micropipeta
 - Control positivo (*P. cinnamomi*) Fungicida químico Metalaxil
 - Control positivo (*B. cinerea*) Fungicida de origen natural BC1000®

- **Instrumentos y Equipos:**
 - Equipo de autoclave
 - Vórtex Dragon lab.
 - Campana de Bioseguridad NUARE
 - Cámara fotográfica
 - Balanza Analítica BEL engineering
 - Estufa MEMMERT 23°C

4.1.2. Métodos Químicos.

4.1.2.1. Extracción

Para la extracción se utilizó corteza de *D. winteri* proveniente de Valdivia y Chiloé, y tres solventes de extracción (Hexano, Acetato de etilo y Etanol). Para el procedimiento en primer lugar, se pesó el material vegetal, con el fin de determinar el rendimiento de extracción, posteriormente este fue introducido a un macerador de acero inoxidable. Una vez que el material vegetal fue colocado en el macerador se adicionó el primer solvente, el cual fue seleccionado considerando su polaridad, ya que la maceración se realizó utilizando solventes con polaridad creciente, es decir, siguiendo el orden Hexano, Acetato de etilo y Etanol, (Diagrama 4).

Cada extracción, se realizó a temperatura ambiente y por un periodo de 48 horas. Después de transcurrido el tiempo (t), se obtuvo el licor del macerado, el cual se concentró a presión reducida (Equipo de Rotavapor conectado a bomba de vacío), (ver Figura 8). Los solventes utilizados en la extracción fueron recuperados y posteriormente destilados.



Diagrama 4, Método de extracción
Fuente: Elaboración Propia.

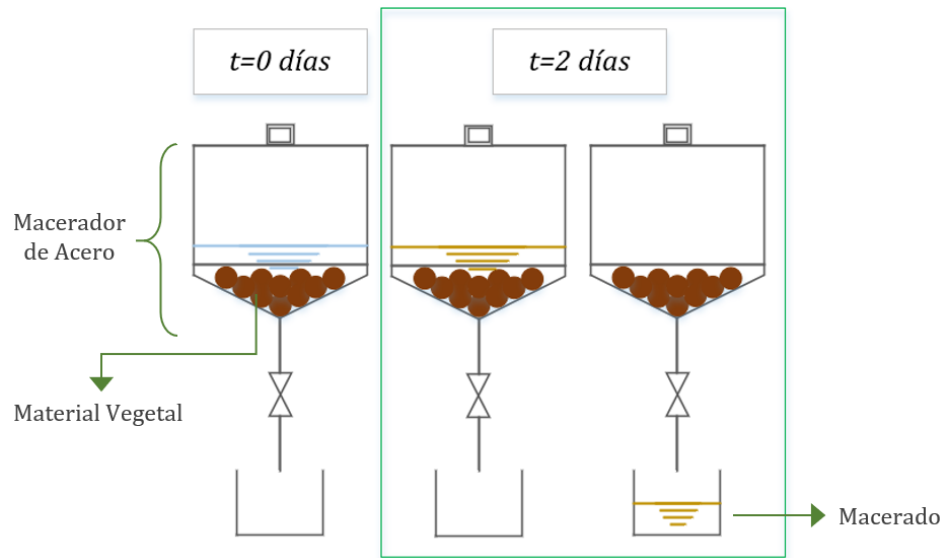


Figura 8, Diagrama de maceración.
Fuente: Elaboración Propia.

4.1.2.2. Separación, Purificación y caracterización.

- Separación en Columna Cromatográfica

Una vez obtenidos los extractos, estos fueron evaluados biológicamente frente a los fitopatógenos *B. cinerea* y *P. cinnamomi*. El extracto más activo, fue separado utilizando columnas cromatográficas. Las condiciones de separación se determinaron utilizando placas de cromatografía en capa fina (CCF) mediante el análisis de la relación entre las distancias recorridas por los compuestos por el recorrido del eluyente (R_f), (ver Figura 9). El R_f se utiliza para determinar a la polaridad y el orden de elución (retención) de los compuestos que componen la mezcla.

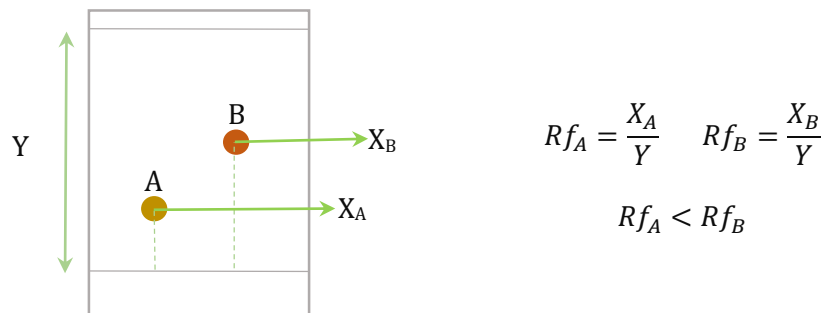


Figura 9, Cálculo de R_f .

Que $Rf_A < Rf_B$ significa que el compuesto A es mas polar que B y que por ende su retención es mayor en estas condiciones. Para determinar los eluyentes en las separaciones en columnas se consideran eluyentes que generen un Rf entre 0,3 y 0,5. Este estudio se realiza posterior al revelado de las placas el cual se realizará mediante lámpara UV para identificar compuestos cromóforos y posteriormente utilizando una solución acuosa de ácido Sulfúrico (H_2SO_4) al 20%v, solución en la cual se sumerge la placa de CCF para luego ser secada a altas temperaturas.

Una vez que las condiciones de separación han sido determinadas, se lleva a cabo la separación, dependiendo de la cantidad de masa se selecciona el diámetro de la columna a separar (mientras mayor masa mayor es el diámetro). La columna está compuesta por una serie de capas, (ver Figura 10), entre las que se encuentra:

- Soporte de sílica: en el mercado existen soportes granulares que impiden que la sílica salga de la columna mientras se realiza la separación. No obstante, esta puede como no puede ser utilizada, por lo general antes de agregar la sílica se pone una pequeña mota de algodón o de lana de vidrio, estos también permiten que el soporte permanezca estático.
- Fase estacionaria: para las separaciones se utilizaron principalmente sílica gel final, sílica gel gruesa y sílica gel fina impregnada con nitrato de plata (para ello se ocupó el método descrito en el **Anexo 3**)
- Siembra: para incorporar la mezcla de metabolitos a la columna se utilizaron dos métodos, el primero consiste en la generación de una papilla conformada por la mezcla de compuestos y sílica; el segundo método consistió en incorporar los metabolitos mediante una elución en este caso la mezcla se siembra principalmente en arena.

Las fracciones obtenidas, durante la separación, fueron estudiadas mediante cromatografía en capa fina (CCF), con el fin de determinar la presencia de metabolitos mayoritarios.

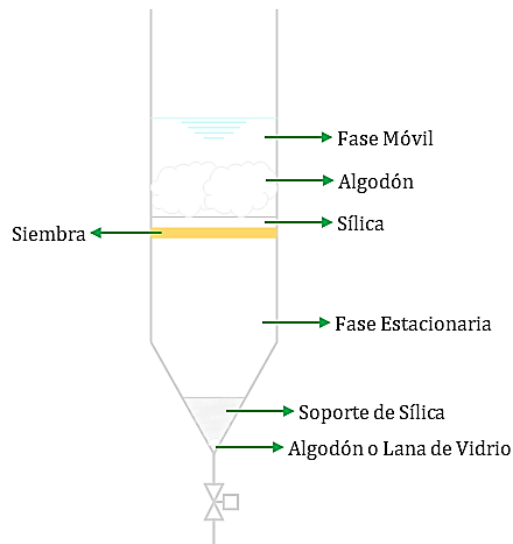


Figura 10, Esquema Básico de Columna Cromatográfica

- **Fraccionamiento Líquido-Líquido.**

El fraccionamiento líquido-líquido consiste en diluir el extracto con diferentes solventes, o mezclas de estos, de manera de ir aumentando la polaridad de estos. Con el fin de facilitar la purificación de metabolitos.

El procedimiento consiste en: tomar una cantidad de extracto a fraccionar en un matraz Erlenmeyer tarado, de manera de determinar la masa inicial del extracto, agregar un volumen determinado del primer solvente (hexano) cubrir la boquilla del matraz y dejar en agitación durante un tiempo t_1 . Transcurrido el periodo se debe extraer el sobrenadante (macerado), este es concentrado a presión reducida, mientras que a la parte insoluble del extracto se le agrega el segundo solvente (mezcla diclorometano-hexano (1:4)) y se coloca nuevamente en agitación durante un tiempo t_2 , pasado el tiempo se retira el sobrenadante y se concentra a presión reducida. Al igual que en el caso anterior, la fracción de extracto insoluble se seguirá macerando hasta que ya no queden compuestos insolubles. En total se realizaron 5 maceraciones utilizando hexano, diclorometano-hexano (1:4), hexano-diclorometano (1:1), diclorometano y finalmente acetato de etilo, (Diagrama 5).

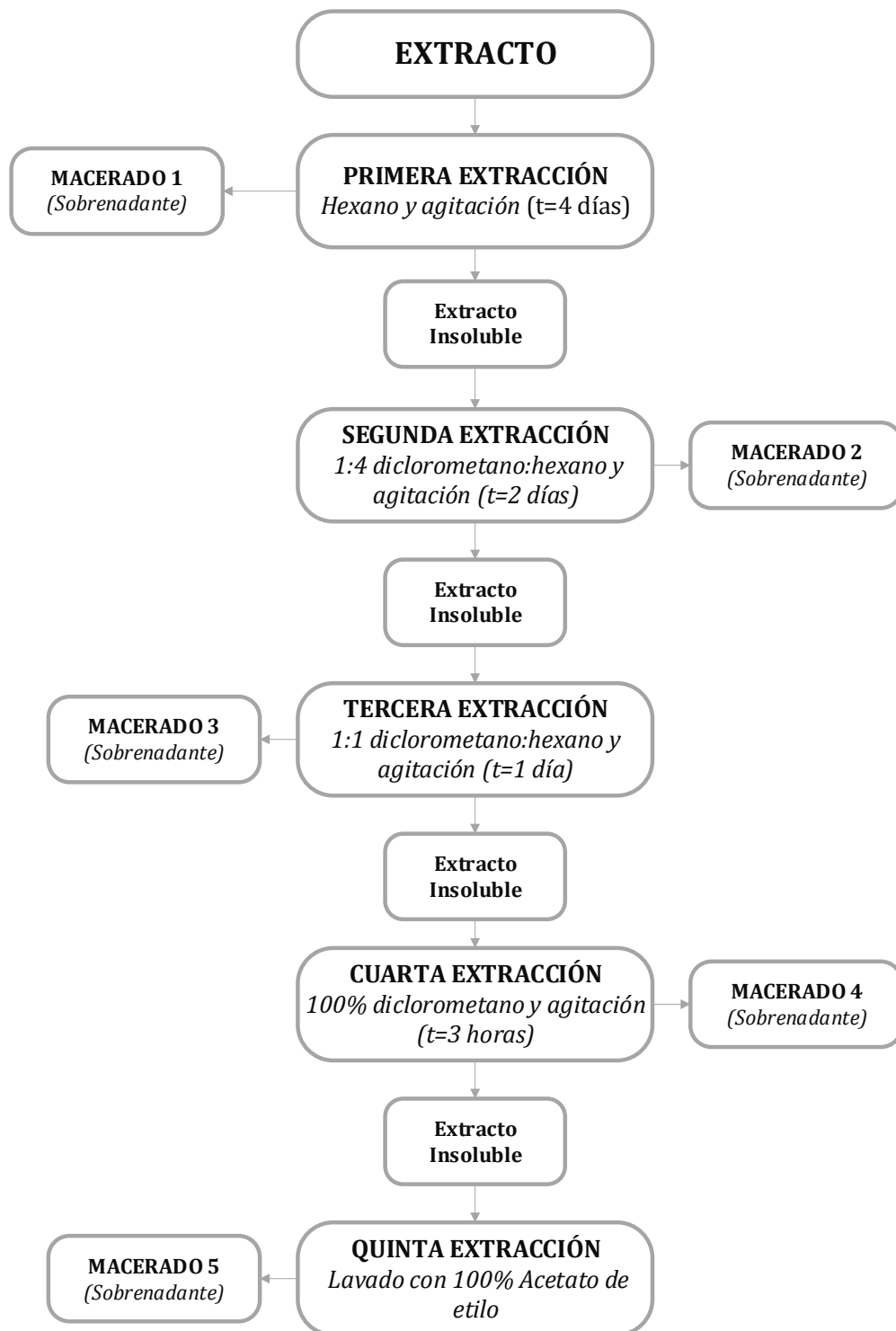


Diagrama 5, Proceso de fraccionamiento líquido-líquido.
Fuente: Elaboración Propia.

- **Purificación y Caracterización.**

Una vez fraccionados los extractos, se realizaron pruebas de polaridad, con el fin de determinar las condiciones (fase estacionaria y móvil) para el aislamiento de compuestos mediante cromatografía en columna (dependiendo de las características de las fracciones), (Diagrama 6).

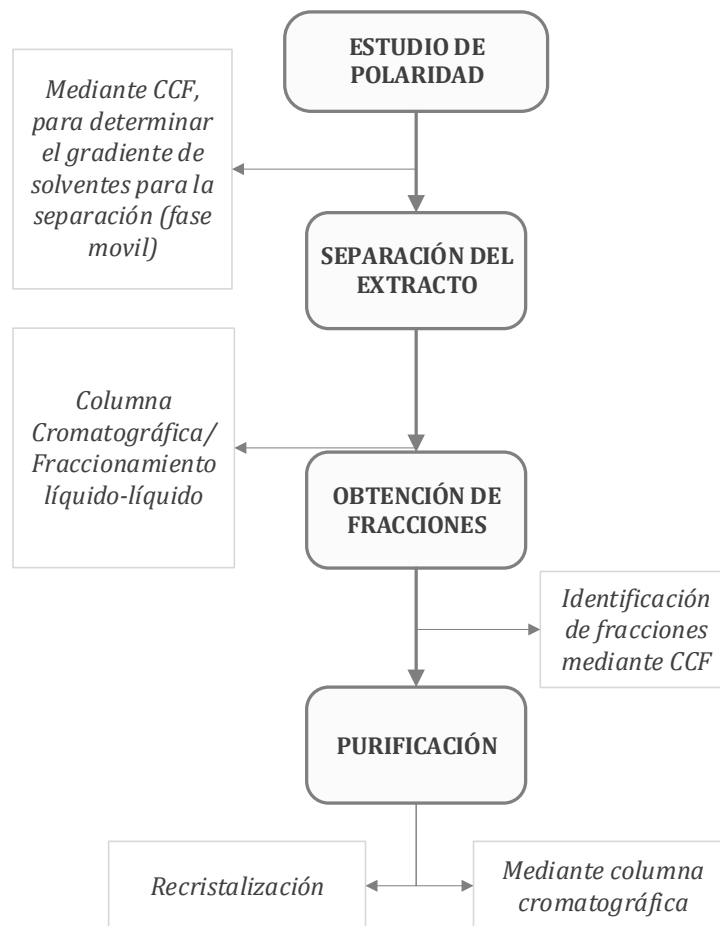


Diagrama 6, Proceso general de obtención de compuestos.
Fuente: Elaboración Propia.

La purificación de compuestos mediante recristalización. Esta técnica consiste en la eliminación de impurezas utilizando un disolvente a altas temperaturas, idealmente el compuesto deseado debe separarse en forma cristalina y todas las impurezas deben quedar disueltas. Si no se llega al resultado esperado, el proceso se repetirá. Para poder recristalizar, el solvente debe ser capaz de disolver la sustancia a purificar a elevadas temperaturas, generar buenos cristales del producto que se va a purificar, no debe reaccionar con el compuesto y debe ser fácil de eliminar.

Una vez realizada la aislación y purificación de metabolitos, la cual será previamente determinada por CCF, y confirmada con espectro de HRMN de rutina, se llevará a cabo la caracterización, para ello se utilizarán las herramientas espectroscópicas de RMN, IR y espectrometría de Masa (en caso de ser necesario).

4.1.3. Métodos Biológicos.

4.1.3.1. Pruebas Biológicas contra *B. cinerea*.

La evaluación biológica, tanto de extractos como de metabolitos frente a *B. cinerea* serán realizados en el Laboratorio de la Dr. Evelyn Silva de la Universidad Autónoma de Chile, Santiago.

▪ Microorganismo y medio de cultivos

Para el crecimiento del microorganismo se utilizó 100µL del stock de conidios de B05.10, almacenadas en glicerol, los cuales fueron inoculados en placas Petri con medio de cultivo Malta-Levadura (ML) e incubados a 20°C, en oscuridad al menos por 72 horas. Posteriormente, con ayuda de un sacabocado, se obtuvieron discos de 5mm de diámetro, estos fueron transferidos a otra placa con medio de cultivo con el fin de obtener el stock de micelio fresco para los ensayos.

▪ Medición de la actividad antifúngica

Para los ensayos se utilizaron placas de cultivo de 50[mm] de diámetro, a las cuales se les agregó 7mL de medio de cultivo. Tanto los extractos como los metabolitos se adicionaron al medio de cultivo de manera de evaluar concentraciones de 20, 40, 80 y 160 ppm, una vez preparadas las placas se inocularon con un disco de 5mm de diámetro de micelio. El crecimiento del hongo fue monitoreado a las 24, 48 y 72 horas después de la incubación. La actividad antifúngica del compuesto se expresó porcentaje de inhibición del compuesto.

4.1.3.2. Pruebas Biológicas contra *Phytophthora cinnamomi*.

Las pruebas biológicas, frente a *P. cinnamomi* fueron realizadas con la Dr. Katy Díaz en el Laboratorio de Fitopatógenos del Departamento de Química, de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso.

- **Solución Stock.**

La solución stock de cada **extracto y metabolitos secundarios** fue preparada con 20-40 mg de cada uno de ellos, disueltos en 500 µL de Etanol en el caso de *P. cinnamomi* y Diclorometano en las pruebas contra *B. cinerea*. Posteriormente, la solución stock fue diluída en 5mL de agua para obtener una solución stock de 5.000 ppm. De esta última se tomaron alícuotas para alcanzar concentraciones de 40, 80 y 160 ppm, en cada placa petri con medio de cultivo APD

- **Cultivo del Fitopatógeno**

El cultivo de *P. cinnamomi* se realizó en medio de agar en placas Petri estériles, a una temperatura de incubación de 23°C bajo régimen de oscuridad por un periodo de entre 6-7 días.

- **Test de Crecimiento Micelial *in vitro***

Para determinar la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* y *P. cinnamomi*, se utilizó el test de envenenamiento radial en medio de cultivo APD. Los compuestos fueron adicionados en el APD a distintas concentraciones (40, 80 y 160 ppm) a una temperatura de 50°C. Una vez solidificado el APD fueron sembrados los micelios del patógeno en el centro de la placa, con disco de 4 mm de diámetro. El experimento consta de un control negativo, el cual consiste en inocular el fitopatógeno en una placa Petri que sólo posee medio de cultivo APD y Etanol 1%. Además, se incluye un control positivo, el que consiste en el inóculo del fitopatógeno en medio de cultivo APD en presencia de fungicida, Metalaxil en el de *P. cinnamomi*, el fungicida deberá estar a las concentraciones evaluadas en extractos y metabolitos secundarios. Cada tratamiento será realizado por triplicado. El cultivo de los fitopatógenos se mantendrá a 23°C bajo un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas

Los cálculos de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) se realizarán 168 horas después de la inoculación de *P. cinnamomi*. Evaluando la medición del diámetro de crecimiento del hongo alrededor del disco para calcular el área de inhibición del crecimiento micelial del patógeno en comparación con los controles correspondientes.

- **Cálculo PICM**

El cálculo se realizó con la siguiente fórmula para el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial:

$$PICM \text{ por replica} = \left(\frac{AIC - AIT}{AIC} \right) * 100$$

Donde:

- AIC: es el área de inhibición del control
- AIT: es el área de inhibición del tratamiento.
- *PICM* promedio por tratamiento: Promedio de las tres réplicas de Área de Inhibición por tratamiento.

4.1.3.3. Análisis de Resultados.

Los resultados obtenidos para cada extracto fueron analizados mediante el método ANOVA, y las comparaciones entre extractos se realizó utilizando la prueba estadística t-student. Para ambos casos se consideró un porcentaje de confiabilidad del 98%.

4.2. Resultados y Discusión.

4.2.1. Extracción.

Las extracciones se realizaron utilizando el procedimiento descrito en el Diagrama 4. En primer lugar, se obtuvieron los tres extractos de 5 kg de corteza valdiviana, de estos el que presentó el mayor rendimiento (10,49%) es el extracto de acetato de etilo, Tabla 4. Posteriormente se realizó la extracción de 1,2 kg de material vegetal proveniente de Chiloé, siendo el extracto etanólico el que presenta el mayor rendimiento (4,95%). Las masas y rendimientos (η) obtenidos se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4, Masas y rendimientos de extracción
Fuente: Elaboración propia.

Extractos	<i>D. winteri</i> Valdivia		<i>D. winteri</i> Chiloé	
	Masa [g]	η [%]	Masa [g]	η [%]
Hexano	99,2	1,78	12,8	1,07
Acetato de Etilo	531,8	10,49	42,8	3,6
Etanol	270,0	5,24	59,5	4,95

En investigaciones anteriores se ha comprobado que el rendimiento cuantitativo y cualitativo de la extracción depende en gran medida de la polaridad de los solventes utilizados, además este puede variar por factores como la agitación, la temperatura, la presión, entre otros (Soto and Rosales 2016). Por lo que, la variación en los rendimientos puede ser producto de una mayor cantidad de metabolitos afines a la polaridad del solvente.

4.2.2. Pruebas biológicas de extractos.

Para la selección del extracto a separar, se probó el efecto inhibitor del crecimiento micelial de estos frente a hongos fitopatógenos, con el fin de determinar cuál presentaba la mayor actividad.

4.2.2.1. Pruebas contra *B. cinerea*.

En la Figura 11 se presentan los resultados de inhibición de crecimiento micelial para los extractos provenientes de Valdivia contra el fitopatógeno *B. cinerea*. En ellos se puede observar que en todos los casos aumenta la actividad del extracto al aumentar la concentración. Por otra parte, de los tres extractos el que presentó la menor actividad fue el etanólico, con un 29,66% \mp 3,14% a una concentración de 160 ppm, mientras que los extractos de hexano y acetato de etilo presentaron porcentajes de inhibición de 55,33% \mp 3,32% y 55,11% \mp 9,54%, respectivamente.

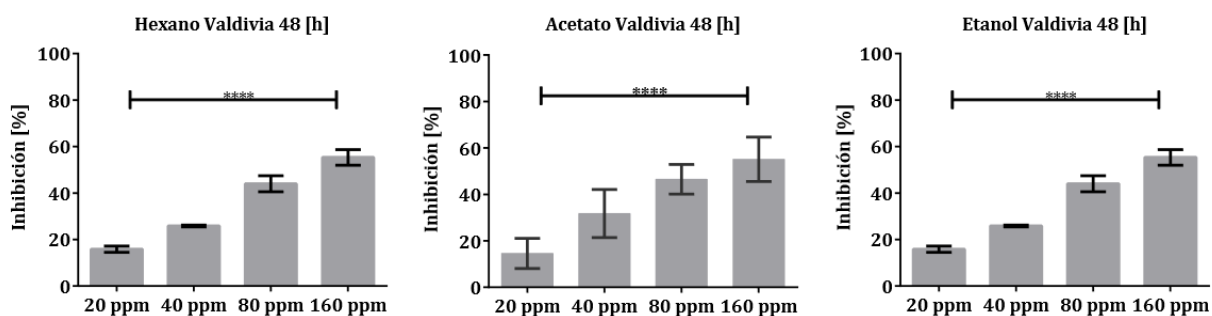


Figura 11, Resultados de actividad de extractos de *D. winteri* Valdivia contra *B. cinerea*

Al comparar los resultados obtenidos entre los extractos de acetato de etilo y hexano, a una concentración de 80 ppm, existe aproximadamente un 40% de probabilidades de coincidir en resultados y al realizar la misma comparación a una concentración de 160 ppm no existen diferencias significativas ($p < 0,96$). Cabe destacar que esta información es en base a la cantidad de datos disponibles

Por otra parte, en la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos con los extractos de Chiloé, desde ella se puede observar que en todos los casos al aumentar la concentración del extracto aumenta la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea*. a una concentración de 160 ppm el extracto etanólico es el que presenta la menor actividad ($24,50\% \pm 1,29\%$), seguida por el extracto de hexano ($26,50\% \pm 1,00\%$) y finalmente acetato de etilo ($69,56\% \pm 5,34\%$). En este caso las actividades obtenidas entre el extracto de hexano y etanol son similares, y al realizar la comparación se obtuvo que a 160 ppm la diferencia entre estos extractos es significativa ($p < 0,05$).

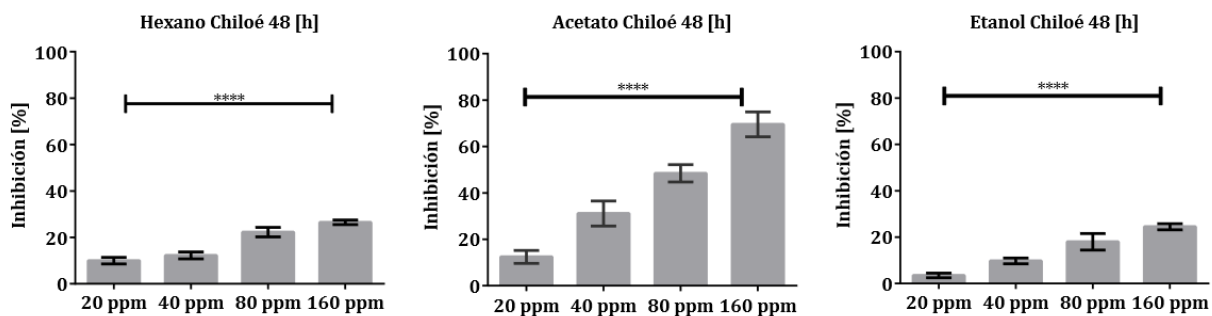


Figura 12, Resultados de actividad de extractos de *D. winteri* Chiloé contra *B. cinerea*

Al comparar los seis extractos obtenidos se puede observar que el extracto de Acetato de etilo de *D. winteri* Chiloé es el que presenta mayor actividad.

4.2.2.2. Pruebas contra *P. cinnamomi*.

En la Figura 13 se observan los resultados de los extractos obtenidos desde *D. winteri* Valdivia frente al fitopatógeno, en ellos se aprecia que el extracto de hexano no muestra aumento del porcentaje de inhibición al incrementar la concentración del extracto, por lo que no existen diferencias significativas entre el efecto inhibición/concentración ($p > 0,81$). Con respecto a los resultados obtenidos tanto para el extracto de acetato de etilo, como el extracto de etanol, a concentración de 160 ppm se obtuvieron porcentajes de inhibición de $34,65\% \pm 6,28\%$ y $30,19\% \pm 6,34\%$, respectivamente. A simple vista no se observan diferencias entre los ellos, la cual fue confirmada al comparar a una concentración de 160 ppm, demostrando que no existen diferencias significativas ($p > 0,31$) entre la inhibición generada por el extracto de acetato y el provocado por el extracto etanólico.

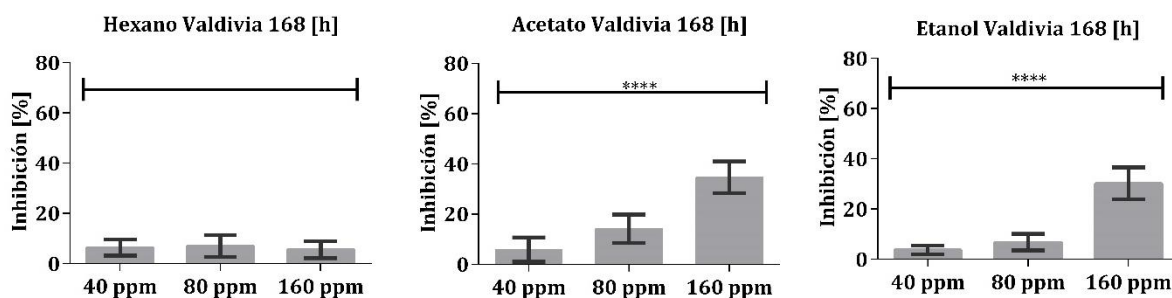


Figura 13, Resultados de actividad de extractos de *D. winteri* Valdivia contra *P. cinnamomi*

Por otra parte, los resultados obtenidos para los extractos de Chiloé presentan una mayor inhibición del crecimiento de *P. cinnamomi* que los extractos de Valdivia, Figura 14. Además, se puede observar que al aumentar la concentración de cualquiera de los extractos disminuye el crecimiento de *P. cinnamomi*.

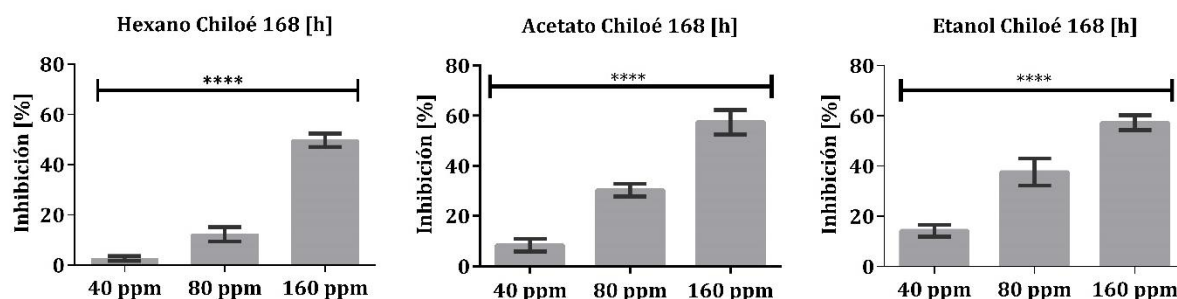


Figura 14, Resultados de actividad de extractos de *D. winteri* Chiloé contra *P. cinnamomi*

La inhibición generada por los extractos hexano, el de acetato de etilo y el etanólico, a una concentración de 160 [ppm], fueron de un 49,74% \pm 2,65%, 57,39% \pm 4,93% y 57,36% \pm 2,96%, respectivamente. Al comparar los resultados obtenidos entre los extractos, se determinó que el extracto de hexano y acetato de etilo presentan diferencias significativas ($p < 0,02$), el mismo resultado se obtuvo entre el extracto de hexano y etanol ($p < 0,02$). Sin embargo, al comparar el extracto de acetato de etilo y el de etanol no se presentan diferencias significativas entre los efectos provocados ($p > 0,98$).

4.2.3. Separación, Purificación y Caracterización.

Al momento de realizar las pruebas biológicas sólo se contaba con los extractos de corteza de *D. winteri* proveniente de Valdivia, y el fitopatógeno *B. cinerea*. Por lo que, la separación se comenzó tomando en consideración que el extracto de acetato de etilo era el que poseía una mayor actividad.

4.2.3.1. Columna Cromatográfica.

Las separaciones se realizaron siguiendo la metodología descrita en el Diagrama 11 del Anexo 4. La primera separación del extracto (C1), se realizó con el fin de fraccionar 53g, para ello, se utilizó como soporte sílica gel gruesa, y la fase móvil consistió en una mezcla hexano-acetato de etilo, la cual se agregó en volúmenes de 400mL en gradientes de polaridad creciente partiendo de 0% de acetato de etilo 100% hexano, hasta llegar a un 100% de acetato de etilo y 0% de hexano. En total se obtuvieron 5 fracciones, Tabla 5.

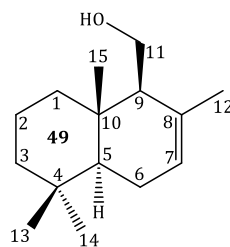
Tabla 5, Rendimientos de Reacción de Separación C1
Fuente: Elaboración propia a partir de los datos experimentales

<i>Fracción</i>	<i>Código</i>	<i>Masa [g]</i>	<i>Rendimiento [%]</i>	<i>Gradiente de Obtención</i>
F1	F1'-C1	17,1839	32,42	0-51%
F2	F4-C1	5,4487	10,28	52-58%
F3	F5-C1	10,2662	19,37	59-75%
F4	F6'-C1	8,6912	16,39	76-91%
F5	F10'-C1	9,9973	18,86	92-100%

- **Fracción F4-C1**

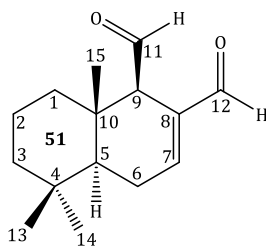
Una vez fraccionado el extracto inicial, se llevó a cabo la separación de la **fracción F4-C1**, separación **C2**, (Diagrama 7). para ello se utilizó sílica gel fina y una elución (fase móvil) de Hexano-Acetato de etilo en un gradiente de polaridad que comenzó con 0% acetato de etilo hasta llegar a 16% (subiendo de 1% a la vez) al llegar a este punto, se continuó con gradiente isocrático. En total se obtuvieron 10 fracciones, con un rendimiento global de 69,17%. Se deduce que la disminución del rendimiento puede ser producto de la retención de compuestos en la columna.

De las fracciones obtenidas se observó que **F5-C2** presentaba cristales, los cuales se aislaron utilizando la técnica de recristalización, obteniendo 500,1 [mg] de un cristal blanco e insoluble en hexano, el cual mediante CCF coincide con el RF del patrón de drimenol (**49**). El resultado observado en la placa de CCF fue corroborado por espectroscopia de RMN.



A continuación, se llevó a cabo la separación **C3**, la cual corresponde a la separación de la **fracción F8-C2**, para ello se utilizó sílica gel fina y una elución de Hexano-Acetato de etilo en un gradiente de polaridad que comenzó con 0% acetato de etilo hasta llegar a 12% (subiendo de 1% a la vez) al llegar a este punto, se continuó con gradiente isocrático. En total se obtuvieron 8 fracciones de las cuales la fracción **F3-C3** y **F5-C3** contenían un compuesto aceitoso, el cual por

placa de CCF presentaba el mismo RF que el patrón de poligodial. Los compuestos fueron analizados por ^1H RMN, con los espectros se confirmó que el compuesto era poligodial (**51**) y que además este no se encontraba puro.



Para la siguiente separación (**C4**) se utilizó la **fracción F7-C2**. El soporte utilizado fue sílica gel fina y la elución estaba conformada por una mezcla de hexano-diclorometano agregada inicialmente en gradientes de polaridad creciente hasta llegar a un 60% de diclorometano en donde se mantuvo isocrático hasta el final de la separación. El rendimiento global fue de un 47,38%, cabe destacar que la mayoría de las fracciones presentaban un metabolito con un RF similar al patrón de poligodial, no obstante, este se encontraba acompañado por otros compuestos, las **fracciones F10-C4** y **F11-C4** presentaban la menor contaminación. El estudio de ^1H RMN demuestra que las fracciones contienen poligodial (**51**) más algunas impurezas.

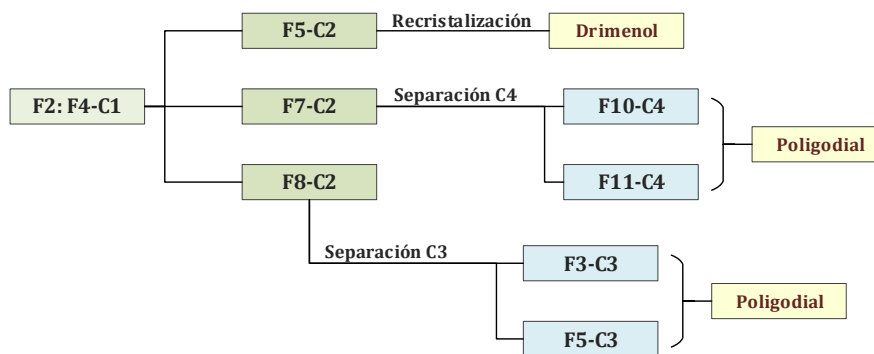
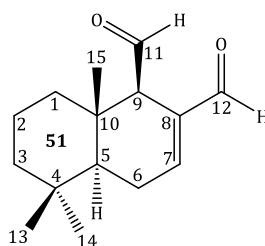


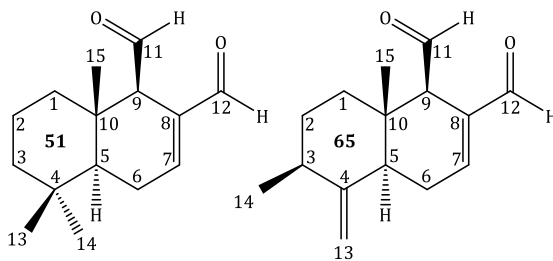
Diagrama 7, Separación de F4-C1

- **Fracción F5-C1**

Con el fin de obtener muestras puras de poligodial, se estudió la separación de la **fracción F5-C1**, fracción que presentaba por placa de CCF un metabolito mayoritario con Rf igual al patrón de poligodial. Para realizar esta separación (**C5**) se utilizó sílica gel fina impregnada con nitrato de plata y una elución de hexano-acetato de etilo, ya que esta mezcla de solventes presentaba un mejor resultado por CCF a la hora de separar poligodial de las impurezas.

Al realizar el estudio de las fracciones por CCF, era posible apreciar sólo un compuesto (poligodial); no obstante, al hacer el estudio por espectroscopia de RMN se presentaba un segundo compuesto el cual presentaba señales de aldehídos e insaturaciones similares a las de poligodial. Cabe destacar, que el espectro ^1H RMN realizado a la fracción **F5-C1** mostraba sólo la presencia de poligodial y algunas impurezas mínimas. Debido a ello se sospecha que la presencia del segundo aldehído quedaba minimizada por la concentración en la que se encuentra con respecto a poligodial, lo que impide que este sea observado en los espectros iniciales.

Con los desplazamientos químicos de ^1H RMN y ^{13}C RMN, más la ayuda de simulaciones se determinó que la estructura del segundo compuesto podría corresponder a 9-deshidroimizigadial (**65**). Adicionalmente, se complementó la información con publicaciones previas en las cuales se evidenciaban desplazamientos similares a los obtenidos.



A continuación, se realizó la separación (**C6**) de la fracción **F3-C5** compuesta principalmente por poligodial. Para realizar la separación se utilizó la misma técnica aplicada en **C4**. Obteniendo un rendimiento global de 32,95% y sin lograr aislar los compuestos. Al repetir esta técnica se observó que la retención de los compuestos aumentaba al trabajar bajo estas condiciones.

En paralelo a **C6** se llevó a cabo **C7**, en esta separación se buscaba aislar el compuesto **66**, por lo que se utilizó la fracción **F5-C5** la cual poseía una mayor concentración del compuesto. Se

utilizaron las mismas condiciones de separación que en **C6**. En este caso se obtuvo un rendimiento global de 30,93%, y al igual que en **C6** no fue posible aislar el compuesto objetivo.

De las fracciones obtenidas **F3-C7** era la que presentaba la mayor cantidad del compuesto desconocido, por lo que se decidió intentar aislarlo (**C7'**) utilizando sílica gel fina y la elución hexano-acetato de etilo, ya que esta presenta mejores resultados. En este caso no fue posible aislar los compuestos, y las cantidades resultantes no eran suficientes para seguir intentando, (Diagrama 8).

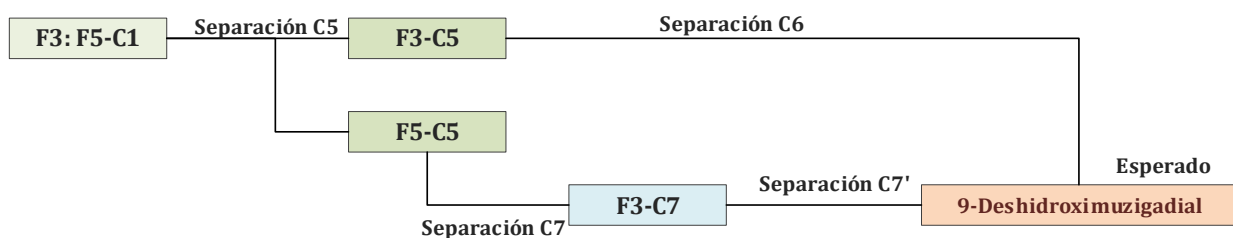
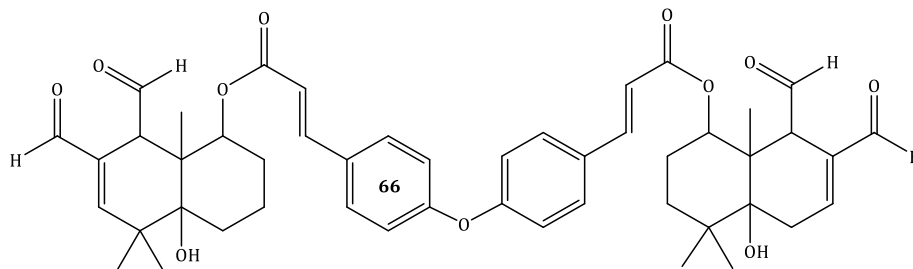


Diagrama 8, Separación de F5-C1

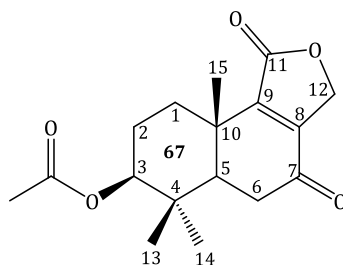
• Fracción F10'-C1

Al finalizar la separación **C1**, se encontró un compuesto sólido de color blanco que cristalizó en los últimos viales, el cual fue caracterizado llegando a la conclusión de que se trataba de un dímero (**66**).



El compuesto presenta un esqueleto molecular jamás reportado, por lo que se estudió la posibilidad de extraer una mayor masa desde la fracción más polar del extracto, **F10'-C1**, el estudio por CCF de la fracción no mostro la presencia del compuesto, debido a lo cual se decidió fraccionar la mezcla (**C8**). Para ello se utilizó sílica gel gruesa y una elución de Hexano-acetato de etilo en un gradiente de polaridad creciente. En total se obteniendo 10 fracciones, con un rendimiento global de 82,22%

La fracción **F6-C8** presentaba cristales, los cuales se aislaron utilizando la técnica de recristalización, obteniendo 30,7 [mg] de un cristal blanco e insoluble en hexano. Mediante $^1\text{HRMN}$ se determinó que el compuesto no presentaba impureza. La molécula fue caracterizada a través de técnicas de RMN e IR llegando a la estructura del compuesto (**67**).



Las fracciones **F7-C8** y **F8-C8** presentaban cristales, estos fueron aislados mediante recristalización utilizando éter dietílico, obteniendo 177,3 [mg] y 42,3 [mg], respectivamente. El sólido encontrado en ambas fracciones correspondía al mismo compuesto, según R_f y color de revelado en CCF, esta información fue confirmada por $^1\text{HRMN}$. El espectro de protón demostró que el cristal se descomponía. En base a lo observado, se podía inferir que la molécula correspondía a un glucósido, es decir, estaba compuesta por un glúcido y una parte no glúcido, debido a ello se decidió acetilar la molécula con el fin de disminuir su polaridad y aumentar su estabilidad. Para la acetilación se utilizó DMAP, anhídrido acético y diclorometano, como resultado se obtuvo una mezcla de compuestos, los cuales fueron separados utilizando sílica gel fina y una elución hexano-acetato de etilo. El compuesto mayoritario fue enviado a ^1H RMN, no obstante, el compuesto seguía descomponiéndose.

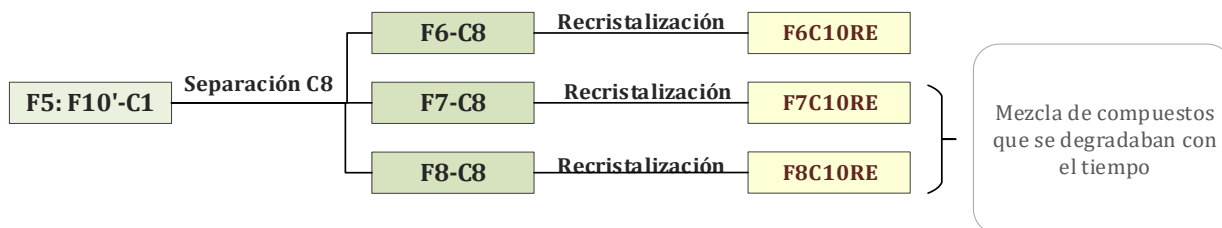


Diagrama 9, Separación de F10'-C1

Durante esta separación no fue posible identificar la presencia del compuesto **66**.

- **Fracción F6'-C1**

En la búsqueda de metabolitos, se decidió separar la **fracción F6'-C1 (C9)**, para ello se utilizó sílica gel fina y una elución hexano-acetato de etilo en un gradiente de polaridad creciente hasta llegar a un 8% de acetato de etilo. Entre las fracciones obtenidas **F20-C9** presentaba cristales, por lo que se realizó una recrystalización, de ella se obtuvieron 44,6 [mg] de un sólido blanco, el cual por pruebas de RMN se determinó que correspondía al compuesto **67 (Diagrama 10)**, el mismo que fue obtenido desde la fracción **F6-C8**.

Por otra parte, la fracción **F9-C9** presentaba un compuesto de apariencia oleosa y puro por CCF, por lo cual se realizaron pruebas de ¹HRMN, determinando a *priori* que se trataba de epipoligodial (**52**), (Diagrama 10), la información no pudo ser corroborada ya que su masa era insuficiente para realizar más pruebas.

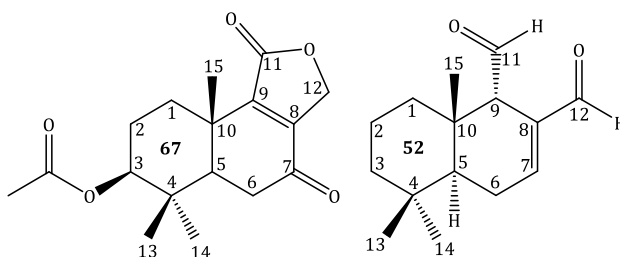


Tabla 6, Diferencias espectroscópicas entre epipoligodial y poligodial.

δ [ppm]	Asignación teórica (Rodríguez et al. 2005)
9,83	H-11 (epipoligodial)
9,51	H-11 (poligodial)
9,38	H-12 (epipoligodial)
9,44	H-12 (poligodial)
3,23	H-9 (epipoligodial)
2,81	H-9 (poligodial)

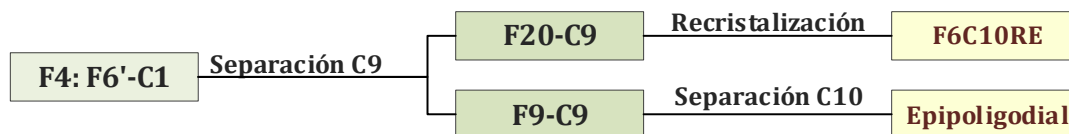


Diagrama 10, Separación de F6'-C1

- **Fracción F1'-C1**

Es la fracción más apolar del extracto y uno de las que poseía la mayor cantidad de metabolitos, según el estudio de CCF. Durante la investigación no se trabajó con ella por lo que se encuentra almacenada, al igual que todas las fracciones que no fueron utilizadas durante la investigación.

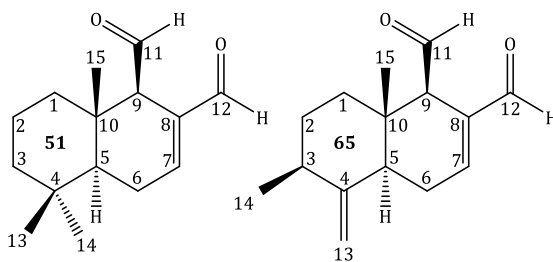
4.2.3.2. Separación por Fraccionamiento liquido-liquido.

EL fraccionamiento se realizó siguiendo el Diagrama 5. Inicialmente se utilizaron 100[g] de extracto, cada solvente o mezcla de estos se agregaron en un volumen de 500[mL] a excepción de acetato de etilo del cual sólo se utilizaron 300[mL]. En total se obtuvieron 5 fracciones (B1, B2, B3, B4 y B5).

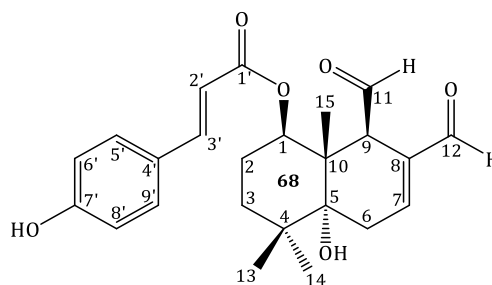
- **Fracción B4**

La fracción B4 fue separada por columna cromatográfica debido a que presentaba la menor cantidad de metabolitos por placa de CCF. La separación (**C10**) se llevó acabo utilizando sílica gel fina y una elución hexano-acetato de etilo. Al realizar el análisis de placa de CCF para obtener las fracciones, se determinó la presencia compuestos aparentemente puros por lo que se procedió a realizar ¹H RMN de los viales obtenidos. En ellos se encontró Drimenol (**49**) (*vial 25*), una mezcla de poligodial y otro metabolito (*vial 34*) (la mezcla es idéntica a la encontrada en **C5**, pero con una mayor concentración del metabolito desconocido) y un compuesto nuevo (*vial 94*).

- **Mezcla de Poligodial y metabolito desconocido.**



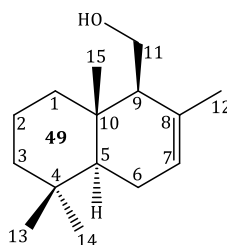
▪ **Compuesto Nuevo**



4.2.3.3. Metabolitos encontrados

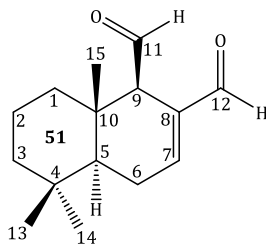
• **Fracción F4-C1**

Drimenol



$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5,54 (1H, s, H-7); 3,85 (1H, dd, $J = 2,34$ y $10,8$ Hz, H-11); 3,73 (2H, dd, $J = 14,72$ y $11,24$ Hz, H-11); 1,99 (2H, m, H-6); 1,86 (3H, m, H-9 Y H-6); 1,58 (3H, s, CH_3 -13); 1,39-1,47 (3H, m, H-2); 1,16-1,25 (1H, m, H-5 Y H-3); 1,06 (1H, m, H-1); 0,88 (3H, s, CH_3 -12); 0,86 (3H, s, CH_3 -14); 0,85 (3H, s, CH_3 -15). $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 132,9 (C, C-8); 124,1 (CH, C-7); 60,9 (CH_2 , C-11); 57,2 (CH, C-9); 49,8 (CH, C-5); 42,1 (CH_2 , C-3); 39,9 (CH_2 , C-1); 36,0 (C, C-10); 33,3 (CH_3 , C-12); 32,9 (C, C-4); 23,6 (CH_2 , C-6); 22,0 (CH_3 , C-13); 21,9 (CH_3 , C-14); 18,7 (CH_2 , C-2); 14,9 (CH_3 , C-15).

Poligodial (51)



$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9,52 (1H, d, $J = 4,32$ Hz, H-11); 9,45 (1H, s, H-12); 7,12 (1H, m, H-7); 2,82 (1H, s, H-9); 2,50 (1H, m, H-6); 2,33 (1H, m, H-6); 1,83 (1H, d, H-1); 1,53 (3H, m, H-2 Y H-3); 1,48 (1H, m, H-2); 1,38 (2H, td, H-1); 0,95 (3H, s, CH_3 -15); 0,94 (3H, s, $J = 6,3$ Hz, CH_3 -14); 0,91 (3H, s, CH_3 -13). $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 201,9 (C, C-12); 193,2 (CH, C-11); 154,2 (CH, C-7); 138,3 (C, C-8); 60,3 (CH, C-9); 48,9 (CH, C-5); 41,7 (CH_2 , C-3); 39,6 (CH_2 , C-1); 36,8 (C, C-10); 33,1 (CH_3 , C-15); 25,2 (CH_2 , C-6); 21,9 (CH_3 , C-13); 17,9 (CH_2 , C-2); 15,2 (CH_3 , C-14)

En la Figura 15 se observan las interacciones espaciales de los hidrógenos de la molécula, las cuales fueron determinadas utilizando el experimento de excitación selectiva de $^1\text{H } ^1\text{D NOESY}$. Los resultados del experimento, demuestran que H_1 y H_5 se encuentran en la misma orientación que H_9 (*beta* con respecto al plano), con ello se puede afirmar que el compuesto es poligodial y no epigodial.

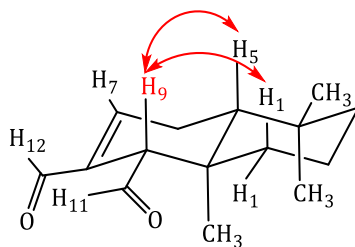
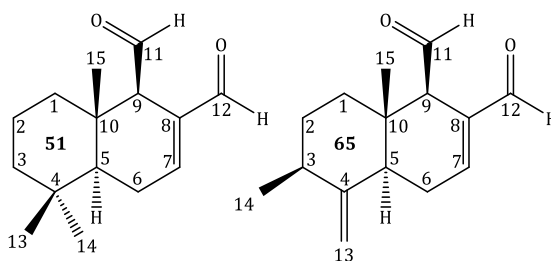


Figura 15, Interacciones NOESY

- **Fracción F5-C1**

Mezcla de dialdehídos



La mezcla presentaba señales características, las cuales se encuentran en la Tabla 7.

Tabla 7, Señales características de la mezcla de dialdehídos
Fuente: (Al-said et al. 1990a).

δ [ppm]	multiplicidad	Asignación
9,52	d	H-11
9,45	s	Aldehído de carbono 8
7,14-7,12		H-7
4,91	s	Señal de insaturación en carbono terminal
4,72	s	
3,00	s	H-9
2,81	s	H-9

A partir de los datos evidenciados en el espectro de la mezcla, se intentó determinar la estructura del dialdehído que se encontraba con poligodial a través de una simulación, considerando una insaturación en carbono terminal, posteriormente se buscó bibliográficamente la estructura, con el fin de comparar las señales que era posible determinar a simple vista. Siendo en todos los casos el hidrógeno del carbono 9 la guía utilizada en estos casos.

A continuación, se presentan las estructuras reportadas con sus respectivas asignaciones de $^1\text{H RMN}$.

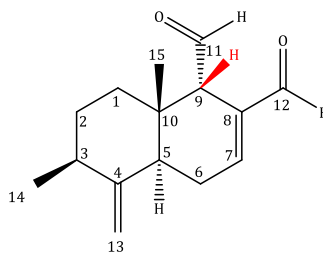


Figura 16, Estructura reportada
Fuente: (Ying et al. 1995b,a)

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ **9,91 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H-11)**; 9,44 (1H, s, H-12); 7,14 (1H, d, $J = 2,7$ y 4,1 Hz, H-7); 4,89 (1H, s, H-13a); 4,73 (1H, s, H-13b); **3,45 (1H, d, H-9)**; 2,48 (2H, m, H-6); 2,38 (1H, m, H-5); 1,95 (1H, m, H-3); 1,82 (1H, m, H-1b); 1,70 (1H, m, H-2b); 1,61 (1H, m, H-1a); 1,29 (1H, ddd, $J = 4,1$ y 2,4 Hz, H-2a); 1,08 (3H, d, CH_3 -14); 0,77 (3H, s, CH_3 -15);

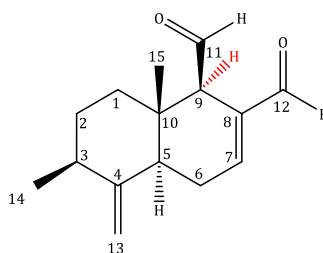


Figura 17, Estructura reportada

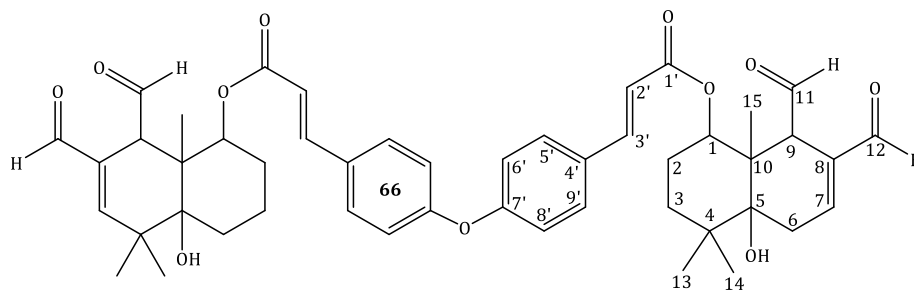
Fuente: (Al-said et al. 1990a)

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9,51 (1H, d, $J = 4,2$ Hz, H-11); 9,49 (1H, s, H-12); 7,1 (1H, m, H-7); 4,91 (1H, dd, $J = 1,5$ y 1,5 Hz, H-13a); 4,72 (1H, dd, $J = 1,5$ y 1,5 Hz, H-13b); 3,0 (1H, m, H-9); 2,44 (2H, m, H-6); 2,1 (1H, m, H-5); 2,0 (1H, m, H-3); 1,90-1,62 (2H, m, H-1); 1,70-1,15 (2H, m, H-2); 1,07 (3H, d, $J = 6,3$ Hz, CH_3 -14); CH_3 -15);

Con esta información se determinó que la estructura correspondía al compuesto **65**. En investigaciones anteriores, este compuesto, ha sido encontrado en la especie *Canella winterana* perteneciente a la familia de las *Winteraceas* (Ying et al. 1995a; Al-said et al. 1990b).

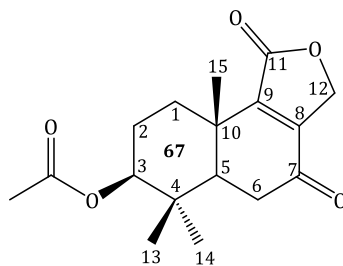
• Fracción F10'-C1

Dímero



$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9,73 (2H, d, $J = 3,7$ Hz, H-11); 9,33 (2H, s, H-12); 7,54 (2H, d, $J = 15,9$ Hz, H-3'); 7,45 (4H, d, $J = 8,56$ Hz, H-6' Y H-8'); 7,04 (2H, t, $J = 2,68$ Hz, H-7); 6,79 (4H, d, $J = 8,64$ Hz, H-5' Y H-9'); 6,23 (2H, d, $J = 15,9$ Hz, H-2'); 5,28 (2H, dd, $J = 4,7$; 11,54 Hz, H-1); 3,71 (2H, s, H-9); 2,89 (2H, dt, $J = 2,8$; 20,5 Hz, H-6); 2,47 (2H, ddd, $J = 1,6$; 5,4; 20,5 Hz, H-6); 2,00 (3H, m, H-2); 1,77 (5H, m, H-3); 1,26 (5H, m, H-2 Y H-3); 1,24 (6H, s, CH_3 -C15); 1,20 (6H, s, CH_3 -C14); 1,04 (6H, s, CH_3 -C13); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 204,4 (CH, C-11); 194,6 (CH, C-12); 168,9 (C, C-1'); 161,4 (C, C-7'); 152,5 (CH, C-7); 146,8 (CH, C-3'); 141,4 (C, C-8); 131,3 (CH, C-5' Y C-9'); 127,1 (C, C-4'); 116,8 (CH, C-6' Y C-8'); 116,5 (CH, C-2'); 78,9 (C, C-5); 78,4 (CH, C-1); 56,9 (CH, C-9); 54,5 (C, C-10); 39,3 (C, C-4); 35,6 (CH_2 , C-2); 32,9 (CH_2 , C-6); 27,8 (CH_3 , C-13); 25,7 (CH_3 , C-14); 25,5 (CH_2 , C-3); 13,8 (CH_3 , C-15);

Lactona



¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 4,86 (2H, s, H-12); 4,57 (1H, dd, $J = 4,4 - 11,5$ Hz, H-3); 2,70 (1H, ddd, $J = 3,4 - 3,3 - 15,5$ Hz, H-1); 2,63 (1H, d, $J = 3,4$ Hz, H-6); 2,56 (1H, dd, $J = 13,7 - 13,2$ Hz, H-6); **2,07 (3H, s, CH₃-CO)**; 1,93 (1H, d, $J = 3,24$ Hz, H-5); 1,89 (1H, c, $J = 4,4$ Hz, H-2); 1,71 - 1,81 (1H, m, H-2); 1,31 (3H, s, CH₃-C15); 1,01 (3H, s, CH₃-C13); 0,93 (3H, s, CH₃-C14). **¹³C RMN** (CDCl₃, 100 MHz): δ 195,4 (C, C-7); 170,6 (C, C-11); **170,5 (C, CO)**; 151,6 (C, C-9); 149,1 (C, C-8); 78,9 (CH, C-3); 67,4 (CH₂, C-12); 50,9 (CH, C-5); 37,7 (C, C-4); 36,1 (C, C-10); 35,6 (CH₂, C-6); 31,36 (CH₂, C-1); 27,6 (CH₃, C-14); 23,2 (CH₂, C-2); **21,1 (CH₃, C CH₃-CO)**; 18,1 (CH₃, C-15); 16,2 (CH₃, C-13). **IR $\nu_{\text{máx}}$** (KBr) 2963; 1767; 1730; 1720; 1686 cm⁻¹.

La mayoría de las señales observadas en el espectro de ¹H RMN y el ¹³C RMN concuerdan con un esqueleto del tipo sesquiterpeno drimano. No obstante, estas características no coinciden con los espectros de moléculas ya reportadas para *D. winteri*.

De los diversos espectros obtenidos se puede deducir que la molécula presenta tres grupos carbonilos, estos fueron observados en el espectro de IR como tres picks intensos entre 1720 y 1770 cm⁻¹ señales características de este grupo carbonilo. Estos pick concuerdan con lo observado en el espectro de ¹³C RMN, ya que presenta una señal a $\delta = 195,4$ ppm (C₇) característica de una cetona y dos señales características de ésteres, $\delta = 170,6$ (C₁₁) ppm y $\delta = 170,5$ ppm respectivamente. Adicionalmente, con ayuda del espectro de ¹H RMN se determinó que un metilo se encuentra unido a uno de los carbonilos ($\delta = 2,07$ ppm, 3H), ya que presenta un desplazamiento químico característico, es decir uno de los ésteres corresponde a un grupo acetilo. Para determinar cuál de los carbonilos pertenece al grupo acetilo se utilizó el espectro bidimensional de correlación heteronuclear del tipo ¹H-¹³C HMBC (ver Figura 16), con el cual es posible establecer que los protones del grupo acetilo se correlacionan a ³J_{H-C} con el carbonilo con señal en $\delta = 170,5$ ppm.

Adicionalmente, la banda de IR con pick en 1686 cm^{-1} en conjunto con dos señales de ^{13}C RMN con $\delta = 151,6\text{ ppm}$ (C_9) y $\delta = 149,1\text{ ppm}$ (C_8) respectivamente, son indicios de que la molécula presenta un insaturación del tipo doble enlace. Con el espectro de HMBC es posible determinar que C_9 se correlaciona a $^3J_{\text{H-C}}$ con H_{15} ($\delta = 1,31\text{ ppm}$, CH_3) y C_8 se correlaciona a $^3J_{\text{H-C}}$ con H_{12} ($\delta = 4,86\text{ ppm}$, $-\text{O}-\text{CH}_2$).

Otras correlaciones ($^3J_{\text{H-C}}$) observadas son las de H_{13} y H_{14} con C_3 ($\delta = 78,9\text{ ppm}$, $\text{O}-\text{CH}$), carbono en que se ubica el hidrógeno H_3 ($\delta = 4,57\text{ ppm}$, $\text{O}-\text{CH}$) y las de H_6 con C_{10} ($\delta = 36,1\text{ ppm}$, C) y C_5 ($\delta = 50,9\text{ ppm}$, CH).

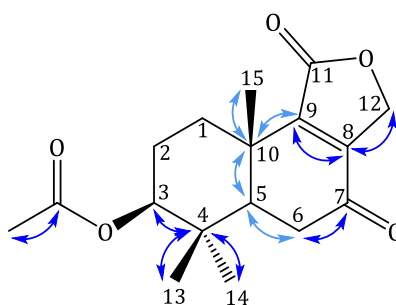


Figura 18, Interacciones HMBC más importantes

Ademas, se determinó la orientación espacial de los hidrógenos de la molécula, utilizando el experimento de excitación selectiva de ^1H ^2D NOESY (ver Figura 17). Para ello se consideró que los sesquiterpeno drimanos reportados para la especie poseen fusión de anillo *trans* con el metilo del C_{10} en posición axial hacia arriba. Esto se quedo demostrado al no existir interacción entre H_{15} y H_5 , es decir, H_{15} se posición axial hacia arriba (*beta*) y H_5 posición axial hacia abajo (*alfa*). A partir de ello se puede determinar que H_{13} se encuentran en la misma orientación (*beta*) que H_{15} y H_3 encuentran en orientación *alfa* al igual que H_5 .

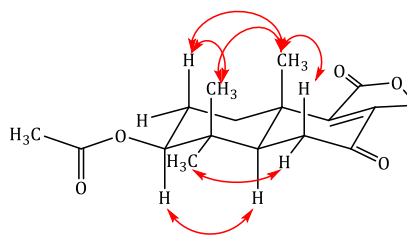


Figura 19, Interacciones NOESY

El compuesto **66** no ha sido reportado como producto natural. No obstante, en una investigación asociada a la obtención mediante síntesis de sesquiterpeno drimano se reportó el compuesto sin acetilar **67** (Swarts et al. 1994).

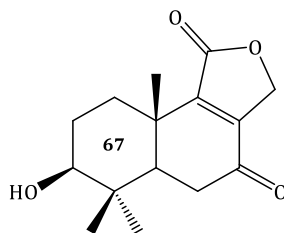
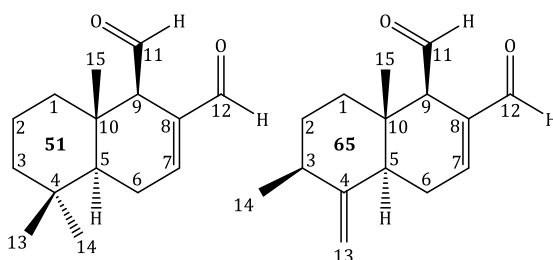


Figura 20, Estructura reportada como producto de síntesis.
Fuente: (Swarts et al. 1994)

- **Fracción B4**
- **Mezcla de dialdehídos**

Anteriormente se había obtenido una mezcla similar, pero con una mayor concentración de poligodial. No obstante, igual se contaba con los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN de la mezcla, por lo que fue sencillo comparar con el **vial 34** de **C10**. En todos los casos se contaba con una superposición de algunas de las señales. No obstante, era posible determinar algunas partes de la molécula.

Fue posible determinar que la molécula presentaba un dialdehído estructuralmente similar a poligodial (sesquiterpeno drimano). Adicionalmente, fue posible observar una insaturación adicional a la presentada en poligodial. Por lo que era complicado determinar la estructura de la nueva molécula, debido a ello, se decidió realizar experimentos 1D TOCSY con variación del tiempo de mezcla (d9). Confirmando la estructura del compuesto (**65**).



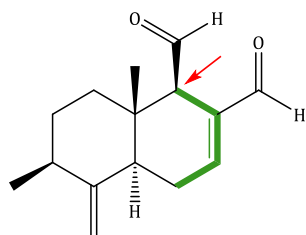


Figura 21, TOCSY H - 9, con $D_9 = 0,08$ [s]

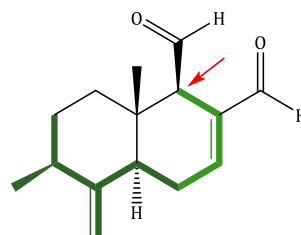


Figura 22, TOCSY H - 9, con $D_9 = 0,24$ [s]

Los experimentos se realizaron tomando en consideración sólo las señales que no pertenecían a poligodial, es decir las del compuesto 66, en primer lugar, se irradió selectivamente 9H con un tiempo de mezcla de 0,08 segundos, observando que la magnetización era transmitida hasta 6H, confirmando que estos formaban parte de un subsistema similar al de poligodial, con una insaturación con las mismas características entre los C_7 y C_8 . Al aumentar d_9 la magnetización fue transmitida hasta 2H, lo cual entrego un espectro casi completo de la molécula, confirmando la estructura de esta.

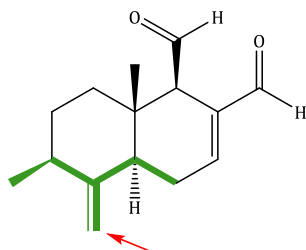


Figura 23, TOCSY H - 13, con $D_9 = 0,08$ [s]

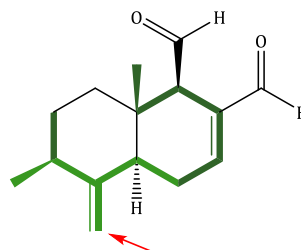


Figura 24, TOCSY H - 13, con $D_9 = 0,24$ [s]

Posteriormente, se irradió uno de los 13H, con este fue posible confirmar la presencia de un grupo metilo en el C_3 . Al aumentar d_9 hasta 0,24 segundos la magnetización fue transmitida hasta los 15H, confirmando la presencia del metilo del C_{10} .

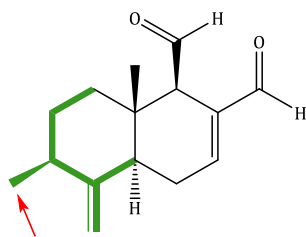


Figura 25, TOCSY H - 14, con D9 = 0,08 [s]

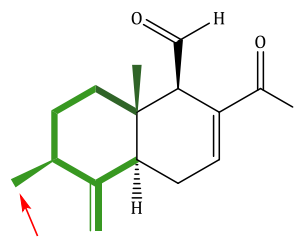
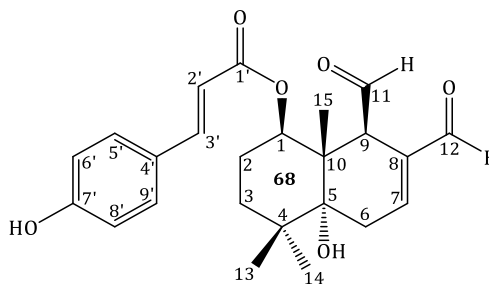


Figura 26, TOCSY H - 14, con D9 = 0,24 [s]

Finalmente, se irradió el metilo del C₃ con d9 0,08 y 0,24 segundos, el resultado fue la unión de los dos espectros obtenidos anteriormente. Con esta información se confirmó que la molécula correspondía a un dialdehído con estructura de sesquiterpeno drimano (**65**).

▪ **Vial 94.**



¹H RMN (CD₃COCD₃, 400 MHz): δ 9,77 (1H, d, *J* = 3,28 Hz, H-11); 9,34 (1H, s, H-12); 9,00 (1H, s, OH); 7,56 (1H, d, *J* = 16,0 Hz, H-3'); 7,54 (2H, d, *J* = 8,56 Hz, H-5', H-9'); 7,00 - 7,03 (1H, m, H-7); 6,88 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-6', H-8'); 6,26 (1H, d, *J* = 16,0 Hz, H-2'); 5,33 (1H, dd, *J* = 4,7 - 11,6 Hz, H-1); 3,78 (1H, s, OH); 3,72 (1H, s, H-9); 2,91 (1H, dt, *J* = 2,8 - 20,3 Hz, H-6); 2,51 (1H, ddd, *J* = 1,8 - 5,3 - 20,5 Hz, H-6); 2,08 (1H, s, H-2); 1,77 - 1,85 (1H, m, H-3); 1,67 - 1,74 (1H, m, H-3); 1,24 - 1,27 (2H, m, H-2); 1,21 (3H, s, H-14); 1,15 (3H, s, H-15); 1,04 (3H, s, H-13). **¹³C RMN** (CD₃COCD₃, 100 MHz): δ 201,3 (CH, C-11); 193,2 (CH, C-12); 166,5 (C, C-1'); 160,6 (C, C-7'); 150,6 (CH, C-5); 145,5 (CH, C-6'); 141,3 (C, C-8); 130,9 (CH, C-5', C-9'); 126,9 (C, C-4'); 116,6 (CH, C-6', C-8'); 115,8 (CH, C-2'); 78,1 (C, C-5); 77,5 (CH, C-1); 56,3 (CH, C-9); 47,4 (C, C-10); 38,8 (C, C-4); 35,0 (CH₂, C-2); 32,6 (CH₂, C-6); 27,71 (CH₃, C-13); 25,5 (CH₃, C-14); 25,0 (CH₂, C-3); 13,7 (CH₃, C-15). **IR** $\nu_{m\acute{a}x}$ (Lamina) 3489; 3446; 3343; 2984; 2887; 2863; 2799; 2735; 1756; 1743; 1713; 1683; 1601 cm⁻¹.

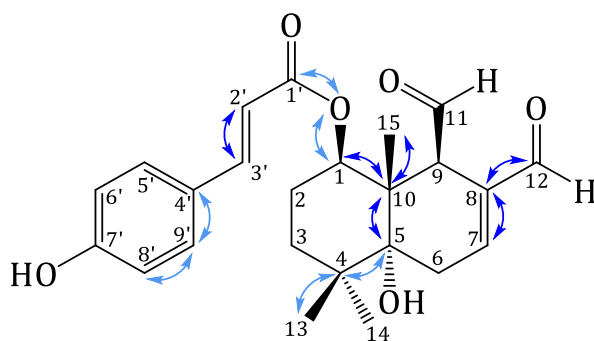


Figura 27, Interacciones HMBC más importantes.

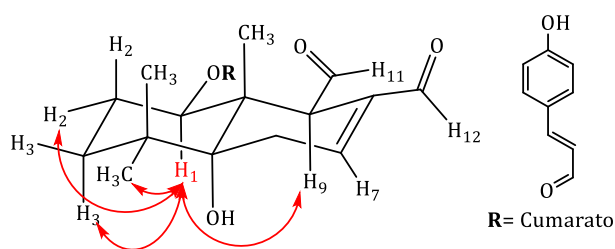


Figura 28, Interacciones NOESY.

El compuesto ha sido reportado como drimanol, el compuesto encontrado no se encuentra metoxilado. (Della Monica et al. 2007)

4.2.4. Pruebas Biológicas de Metabolitos.

4.2.4.1. Pruebas en *P. cinnamomi*

En la Figura 27, se presentan los resultados obtenidos para los metabolitos drimenol y poligodial. En ella, es posible apreciar que existen diferencias significativas en el efecto ocasionado por poligodial versus la actividad presentada por drimenol. Drimenol presentó un porcentaje de inhibición del 38,04% \pm 4,27% a una concentración de 160 ppm. Por otra parte, poligodial alcanzó un 85,97% \pm 1,29% de inhibición del fitopatógeno a una concentración de 160 ppm.

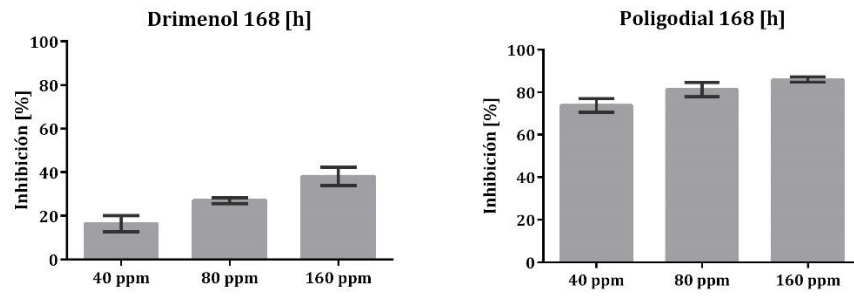


Figura 29, Resultados de actividad de Drimenol y Poligodial

Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones.

Desde los resultados obtenidos:

1. Se puede afirmar que los extractos de *D. winteri* si presentan actividad inhibidora del crecimiento micelial y que este efecto varía según la procedencia del material vegetal. Este resultado puede ser generado por las diferencias existentes en concentración y variedad de metabolitos en cada extracto.
2. El extracto de acetato de etilo de Chiloé presentó los mejores resultados de inhibición frente al fitopatógeno *B. cinerea*.
3. Por otra parte, tanto el extracto etanólico como el de acetato de etilo, proveniente de Chiloé, presentaron buenos resultados en la inhibición de crecimiento micelial de *P. cinnamomi*. Al comparar el efecto de los extractos, no se encontraron diferencias significativas.
4. Poligodial presenta buenos resultados en la inhibición del crecimiento micelial de *P. cinnamomi*.
5. El efecto de los extractos puede estar relacionado con la presencia de poligodial. No obstante, existe la posibilidad que metabolitos con grupos funcionales similares (dialdehído) provoquen un aumento en la inhibición del crecimiento de los patógenos.

A partir de la serie de pruebas que se realizaron se recomienda:

1. Realizar el fraccionamiento liquido-liquido del extracto, con el fin de minimiza el tiempo separación y purificación.
2. Evaluar la actividad biológica de las fracciones con el fin de separar y purificar la que presente la mayor actividad.
3. Realizar Pruebas con mezcla de dialdehídos y comparar con resultados de poligodial, para determinar si hay un aumento o disminución de la actividad.

Capítulo 6. Bibliografía.

- Adikaram, N., A. Brown, and T. Swinburne, 1988: Phytoalexin Induction as a Factor in the Protection of *Capsicum annuum* L. Fruits Against Infection by *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathology*, **273**, 267–274.
- Agrios, G., 1995: *Fitopatología*. Segunda. LIMUSA, Ed. Universidad de Massachusetts, México, 836 pp.
- Al-said, M. S., S. M. El-khawaja, F. S. El-feraly, and C. D. Hufford, 1990a: 9-Deoxy Drimane Sesquiterpenes from *Canella winterana*. *Phytochemistry*, **29**, 975–977.
- Aleix Amurrio, R., 2015: Un caso de diagnostico: encinas con síntomas de decaimineto procedente de las localidades de Alcoi, Alcublas y Pina de Montalgro. Universitat Politècnica de València, .
- Aleu, J., R. Hernandez-Galán, J. R. Hanson, P. B. Hitchcock, and I. G. Collado, 1999: Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid ginsenol by *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Soc. - Perkin Trans. 1*, **6**, 727–730.
- Aleu, J., R. Hanson, R. Hernandez-Galán, and I. Collado, 2001: Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid patchoulol, ginsenol cedrol and globulol by *Botrytis cinerea*. *J. Mol. Catal.*, **11**, 329–334.
- Allardyce, J. A., J. E. Rookes, H. I. Hussain, and D. M. Cahill, 2013: Transcriptional profiling of *Zea mays* roots reveals roles for jasmonic acid and terpenoids in resistance against *Phytophthora cinnamomi*. *Funct. Integr. Genomics*, **13**, 217–228, doi:10.1007/s10142-013-0314-7.
- Alvarez, M., 1991: Resistencia cruzada negativa entre los fungicidas benomilo y dietofencarb en aislamientos de *Botrytis cinerea* de vides. *Agric. Tec.*, **51**, 171–176.
- Antonov, A., A. Stewart, and M. Walter, 1997: Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products. *Proc. / New Zeal. plant Prot. Conf.*, **50**, 159–164.
- Appel, B. H. H., C. J. W. Brooks, and K. H. Overton, 1959: The Constitution and Stereochemistry of Drimenol, a Novel Bicyclic Sesquiterpenoid. 3322–3332.
- Appel, H., R. Bond, and K. Overton, 1963: The constitution and stereochemistry of valdiciolide, fuegin, winterin and futronolide. *Tetrahedron*, **19**, 635–641.

- Audesirk, T., G. Audesirk, and B. Byers, 2003: *Biología la vida en la tierra*. 6ta Edició. L. Gaona, Ed. México, 892 pp.
- Ávalos, A., and E. Pérez, 2009: Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*. *Ser. Fisiol. Veg.*, **2**, 119–145.
- Avenido, R., 2009: Somatic Embryogenesis and embryo culture coupled with gamma irradiation for generating avocado (*Persea americana* Miller) mutants in the Philippines. *International Atomic Energy Agency*, 47–69.
- Badgley, C., and I. Perfecto, 2007: Can Organic Agriculture Feed the World? *Renew. Agric. Food Syst.*, **22**, 80–85.
- Badgley, C., J. Moghtader, E. Quintero, E. Zakem, M. J. Chappell, K. Aviles-Vazquez, A. Samulon, and I. Perfecto, 2007: Organic agriculture and the global food supply. *Renew. Agric. Food Syst.*, **22**, 86–108.
- Bailey, J. A., G. G. Vincent, and R. S. Burden, 1974: Diterpenes from *Nicotiana glutinosa* and their effect on fungal growth. *J. Gen. Microbiol.*, **85**, 57–64.
- Ballare, C. L., 2011: Jasmonate-induced defenses : a tale of intelligence , collaborators and rascals. *Trends Plant Sci.*, **16**, 249–257.
- Barbosa Mendes De Vasconcelos, M. D. C., R. N. Bennett, E. A. S. Rosa, and J. V. Ferreira-Cardoso, 2009: Industrial processing effects on chestnut fruits (*Castanea sativa* Mill.). 1. Starch, fat, energy and fibre. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **44**, 2606–2612.
- Barnes, C. S., and J. W. Loder, 1962: The structure of polygodial: a new sesquiterpene dialdehyde from *Polygonum hydropiper* L. *Aust. J. Chem.*, **15**, 322–327.
- Barrera-Necha, L., C. Garduno-Pizana, and L. Garcia-Barrera, 2009: In vitro antifungal activity of essential oils and the compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathol. J.*, **8**, 17–21.
- Barrett, S. R., B. L. Sheare, and G. E. S. Hardy, 2004: Phytotoxicity in relation to in planta concentration of the fungicide phosphite in nine Western Australian native species. *Australas. Plant Pathol.*, **33**, 521–528.

- Bautista-Baños, S., E. García-Domínguez, L. L. Barrera-Necha, R. Reyes-Chilpa, and C. L. Wilson, 2003: Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): Action against *Botrytris cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, **29**, 81–92.
- Becerra, J., and V. J. Hernandez, 2010: Actividad de aceites esenciales de Canelo , Queule , Bailahuén y Culén frente a hongos fitopatógenos. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas*, **9**, 212–215.
- Beever, R. E., and H. M. R. Brien, 1983: A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. *New Zeal. J. Agric. Res.*, **26**, 391–400.
- Biasoli, M., 2013: *Micología*. Rosario, Argentina, 32 pp.
- Blanco Torres, M. A., 2009: Inhibición del crecimiento in vitro de fitopatógenos del suelo mediante el empleo de corteza de canelo (*Drimys winteri* J.R et G. Forster). Universidad de Concepción, .
- Boiteux, J. J., M. V. Hapon, and M. D. L. Á. Fernández, 2015: Efecto del extracto acuoso de chañar (*Geoffroea decorticans* Burkart) sobre *Botrytis cinerea* , como posible alternativa para su control durante poscosecha de uva de mesa. **47**.
- Bollen, G. J., and G. Scholten, 1971: Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Neth. J. Pl. Path.*, **77**, 83–90.
- Boote, K. J., J. W. Jones, J. W. Mishoe, and R. D. Berger, 1983: Coupling pests to growth simulators to predict yield reductions. *Am. Phytopathol. Soc.*, **73**, 1581–1587.
- Boyras, N., and M. Özcan, 2006: Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *Int. J. Food Microbiol.*, **107**, 238–242.
- Brown, G. D., 1995: A new sesquiterpene from *Drimys winteri*. *J. Essent. oil Res.*, **7**, 705–707.
- Butin, H., and H. L. Peredo, 1986: *Hongos parásitos en coníferas de América del Sur, con especial referencia a Chile*. J. Cramer, Berlin, 51 pp.
- Calle, J., M. T. Guerrero, and A. Rivera, 1985: Aislamiento de Poligodial de la Corteza de *Drymis*

- granadensis*, var. *grandiflora*. *Rev. Colomb. química*, **14**, 27–30.
- Camarena-gutierrez, G., and R. De la Torre-Almaráz, 2007: Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Rev. Chapingo Ser. ciencias For. y del Ambient.*, **13**, 157–162.
- Cárcamo, G., M. Silva, J. Becerra, H. Urrutia, K. Sossa, and C. Paz, 2014: Inhibition of quorum sensing by drimane lactones from chilean Flora. *J. Chil. Chem. Soc.*, **59**, 2622–2624.
- Carreño, I., and M. Alvarez, 1990: Determinación de razas resistentes de *Botrytis cinerea* de vides a fungicidas dicarboximidas. *Agric. Tec.*, **50**, 298–303.
- Carta, C., M. D. L. Moretti, and T. Peana, 1996: Activity of the oil of *salvia officinalis* L. against *Botrytis cinerea*. *J. Essent. oil Res.*, **8**, 399–404.
- Cechinel Filho, V., V. Schlemper, A. R. S. Santos, T. R. Pinheiro, R. A. Yunes, G. L. Mendes, J. B. Calixto, and F. Delle Monache, 1998: Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. *J. Ethnopharmacol.*, **62**, 223–227.
- Chee, K., and F. J. Newhook, 1965: Improved methods for use in studies on *Phytophthora cinnamomi* Rands and other *Phytophthora* species. *New Zeal. J. Agric. Res.*, **8**, 88–95.
- Coffey, M. D., L. J. Klure, and L. a Bower, 1984: Variability in Sensitivity to Metalaxyl of Isolates of *Phytophthora Cinnamomi* and *Phytophthora Citricola*. *Phytopathology*, **74**, 417–422.
- Cotoras, M., C. Folch, and L. Mendoza, 2004: Characterization of the Antifungal Activity on *Botrytis cinerea* of the Natural Diterpenoids Kaurenoic Acid and 3 β -Hydroxy-kaurenoic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2821–2826.
- Cruz, M., 2004: EL caldo Bordelés, preparación y usos. <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR32057.pdf>.
- Daoubi, M., R. Hernández-Galán, A. Benharref, and I. Collado, 2005: Screening Study of Lead Compounds for Natural Product-Based Fungicides: Antifungal Activity and Biotransformation of 6r,7r-Dihydroxy-r-himachalene by *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6673–6677.
- Darvas, J. M., and J. C. Toerien, 1979: Chemical Control of *Phytophthora* Root Rot on Fully grown Avocado Trees. *South African Avocado Grow. Assoc.*, **3**, 23–24.
- Departamento Económico y Social, F., 2002: Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030.

<http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s11.htm> (Accessed June 16, 2017).

- Derita, M., I. Montenegro, F. Garibotto, R. D. Enriz, M. C. Fritis, and S. A. Zacchino, 2013: Structural requirements for the antifungal activities of natural drimane sesquiterpenes and analogues, supported by conformational and electronic studies. *Molecules*, **18**, 2029–2051.
- Díaz, J., A. Have, and J. Van Kan, 2002: The Role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *plant Physiol*, **129**, 1341–1351.
- Dinis, L. T., F. Peixoto, C. Zhang, L. Martins, R. Costa, and J. Gomes-Laranjo, 2011: Physiological and biochemical changes in resistant and sensitive chestnut (*Castanea*) plantlets after inoculation with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **75**, 146–156.
- Doss, R. P., S. W. Potier, G. A. Chastagner, and J. K. Christian, 1993: Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrat. **59**, 1786–1791.
- Durrant, W. E., and X. Dong, 2004: Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*, **42**, 185–209.
- Elad, Y., 1997: Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biol. Rev.*, **72**, 381–422.
- Elad, Y., and D. Shtienberg, 1995: *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integr. Pest Manag. Rev.*, **1**, 15–29.
- Escobar, B., and O. Wittke, 1988: Isodrimenin, (5 α ,9 α β)-4,5,5a,6,7,8,9,9a-octahydro-6,6,9a-trimethylnaphtho[1,2-c]furan-1(3H)-one. *Acta Cryst*, 154–156.
- FAO, 2015: El panorama de la agricultura. *Dep. Económico y Soc.*,
- FAO, 2016: ¿Qué es la agricultura orgánica?
- Fernández Arias, M., 2003: *La agricultura costarricense ante la globalización : las nuevas reglas del comercio internacional y su impacto en el agro*. Editorial Universidad de Costa Rica, Ed. Costa Rica,
- Figuroa, E., and E. Calfucura, 2008: Principales actividades productivas y su relación con la biodiversidad. *Biodiversidad de Chile, Patrimonio y Desafíos*, Ocho Libros editores LTDA, Ed., Santiago de Chile, 434–461.

- Fillinger, S., and Y. Elad, 2016: *Botrytis- the fungus the pathogen and its managemen in Agricultural systems*. S. Fillinger and Y. Elad, Eds. Springer, 190 pp.
- Fraga, B. M., 1998: Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, **15**, 73–92.
- García M. R., and Pérez L. R., 2003: Fitoalexinas: Mecanismo De Defensa De Las Plantas. *Rev. Chapingo. Ser. ciencias For. y del Ambient.*, **9**, 5–10.
- García, V., 2005: *Introducción a la microbiología*. 2da Edició. Universidad Estatal a Distancia, Puerto Rico,.
- Gepp, V., and P. Mondino, 1990: *Apuned sobre fungicidas*. 7 pp. http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/Apuntes_Fungicidas.pdf.
- Giamperi, L., D. Fraternali, and D. Ricci, 2002: The *in vitro* Action of Essential Oils on Different Organisms. *J. Essent. oil Res.*, **14**, 312–318.
- Gullino, L., and L. Kuijpers, 1994: Social and Political Implication of Managing Plant Diseases With Restricted Fungicides in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol*, **32**, 559–579.
- Hardy, G. E. S. J., S. Barrett, and B. L. Shearer, 2001: The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australas. Plant Pathol.*, **30**, 133–139.
- Hartill, W. F. T., G. R. Tompkins, and P. J. Kleinsman, 1983: Development in New Zealand of resistance to dicarboximide fungicide in *Botrytis cinerea*, acylalanines in *Phytophthora infestans*, and to guazatine in *Penicillium italicum*. *N. Z. J. Agric. Res.*, **26**, 261–269.
- Hernandez, A., S. Bautista-baños, and M. Vasquez, 2007: Prospective of plant extracts for controlling postharvest diseases of horticultural products. *Fitotec. Mex.*, **30**, 119–123.
- Hernandez, M., C. Donoso, and M. Romero, 1996: Variación genecológica de dos poblaciones contiguas de *Drimys winteri* (Forst .). *Bosque*, **17**, 65–75.
- Hernando Fernandez, V., 1976: *Jornadas Internacionales sobre: La investigación científica y el problema agrario*. V. Hernando Fernandez, Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 401 pp.
- Hill, R. J., B. A. Wilson, J. E. Rookes, and D. M. Cahill, 2009: Use of high resolution digital multi-spectral

- imagery to assess the distribution of disease caused by *Phytophthora cinnamomi* on heathland at Anglesea, Victoria. *Australas. Plant Pathol.*, **38**, 110–119.
- Hu, J. H., C. X. Hong, E. L. Stromberg, and G. W. Moorman, 2010: Mefenoxam Sensitivity in *Phytophthora cinnamomi* Isolates. *Plant Dis.*, **94**, 39–44.
- IFOAM, 2016: La agricultura orgánica y la igualdad de género. *Of. Estud. y Políticas Agrar.*, **2**.
- INIA, Sanidad Vegetal.
- Ishii, H., 2006: Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agric. Res. Q.*, **40**, 205–211.
- Jara-Arancio, P., M. R. Carmona, C. Correa, F. A. Squeo, and G. Arancio, 2012: Leaf morphological and genetic divergence in populations of *Drimys* (Winteraceae) in Chile. *Genet. Mol. Res.*, **11**, 229–243, doi:10.4238/2012.February.3.3.
- Katan, T., 1982: Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide ('dicarboximide') fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. *Plant Pathol.*, **31**, 133–141.
- King, M., W. Reeve, M. B. Van Der Hoek, N. Williams, J. McComb, P. A. O'Brien, and G. E. S. J. Hardy, 2010: Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Genet. Genomics*, **284**, 425–435.
- Kubo, I., and I. Ganjian, 1981: Insect antifeedant terpenes, hot tasting to humans. *Experientia*, **37**, 1063–1064.
- Kubo, I., and M. Taniguchi, 1988: Polygodial, an antifungal potentiator. *J. Nat. Prod.*, **51**, 22–29.
- Kubo, I., Y. Lee, M. Pettei, F. Pilkiewicz, and K. Nakanishi, 1976: Potent Army worm antifeedants from the east African Warburgia Plants. *J. C. S. Chem. Comm.*, 1013–1014.
- Kuchkova, K. I., A. N. Aricu, I. P. Dragalin, and P. F. Vlad, 2004: Convenient synthesis of drimenol and its oxidation with selenium dioxide. **53**, 2862–2865.
- Lamour, K., 2013: *Phytophthora a global perspective*. K. Lamour, Ed. Cabi, Knoxville, 233 pp.
- Latorre, B., F. De Andraca, and X. Besoain, 1989: Tristeza del palto.
- Latorre, B. A., 2007: Pudrición gris (*Botrytis cinerea*), un factor limitante de la producción de uva

- de mesa en Chile. *Fitopatología*, **42**, 09-20.
- Leroux, P., 2007: Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. *Botrytis Biol. Pathol. Control*, 208-222.
- Leroux, P., R. Fritz, and M. Gredt, 1977: Etudes en Laboratoire de Souches de *Botrytis cinerea* Pers., Resistantes a la Dichlozoline, au Dicloran, au Quintozene, a la Vinchlozoline et au 26019 RP (ou Glycophene). *Phytopathology*, **89**, 347-359.
- Leroux, P., R. Fritz, D. Debieu, C. Albertini, C. Lanen, J. Bach, M. Gredt, and F. Chapeland, 2002: Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.*, **58**, 876-888.
- Lugo, M., E. Crespo, E. Menoyo, and T. Pedernera, 2015: MANUAL DE "BIOLOGÍA DE PROTISTAS Y HONGOS." 1-155.
- Lunde, C. S., and I. Kubo, 2000: Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 1943-1953.
- Maestro-Durán, R., R. León, and V. Ruiz-Gutiérrez, 1993: Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. *Grasas y Aceites*, **44**, 365-369.
- Malheiros, A., V. C. Filho, C. B. Schmitt, A. R. S. Santos, C. Scheidt, J. B. Calixto, F. D. Monache, and R. A. Yunes, 2001: A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. *Phytochemistry*, **57**, 103-107.
- Manzur, M., 2008: Diversidad genética. *Biodiversidad de Chile, Patrimonio y Desafíos*, Ocho Libros editores LTDA, Ed., Santiago de Chile, 396-403.
- Marais, P. G., and M. J. Hattingh, 1986: Reduction of root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* in grapevines by chemical treatments.pdf. *Am. Phytopathol. Soc.*, **70(2)**, 109-111.
- Márquez, D., E. Galeano, and A. Martínez, 2004: Productos Naturales con Actividad Antimicrobiaca. Parte II. *Vitae, Rev. la Fac. Química Farm.*, **11**, 35-41.
- Mazoyer, M., and L. Roudart, 2006: *A history of world agriculture, from the neolithic age to the current crisis*. Earthscan, London, 525 pp.
<https://books.google.cl/books?id=5GpFT9NQS1gC&printsec=frontcover&dq=history+of+the>

+agriculture&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiQoLGC5pvLAhVDIZAKHVT7DRAQ6AEIGjAA#v=onepage&q=history of the agriculture&f=false.

- McCallion, R. F., A. L. J. Cole, J. R. L. Walker, J. W. Blunt, and M. H. G. Munro, 1982: Antibiotic Substances from New Zealand Plants. *Planta Med*, **44**, 134–138.
- Mendes, G., A. Santos, M. Campos, K. Tratsk, R. Yunes, V. C. Filho, and J. Calixto, 1998: Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main Sesquiterpene Polygodial Isolated from the Barks of *Drimys winteri* (Winteraceae). *Life Sci.*, **63**, 369–381.
- Mendoza, L., P. Espinoza, A. Urzua, M. Vivanco, and M. Cotoras, 2009: In vitro antifungal activity of the diterpenoid 7 α -hydroxy-8(17)- labden-15-oic acid and its derivatives against *Botrytis cinerea*. *Molecules*, **14**, 1966–1979.
- Mendoza, L., C. Sepúlveda, R. Melo, and M. Cotoras, 2015: Characterization of the antifungal activity against *Botrytis cinerea* of sclareol and 13-epi-sclareol, two labdane-type diterpenoids. *J. Chil. Chem. Soc.*, **60**, 3024–3028.
- Mesejo, G., 2015: Efecto de las heridas sobre la resistencia de frutos de pimiento a *Botrytis cinerea*.
- Della Monica, C., L. De Petrocellis, V. Di Marzo, R. Landi, I. Izzo, and A. Spinella, 2007: Enantioselective synthesis and vanilloid activity evaluation of 1- β -(p-methoxycinnamoyl)polygodial, an antinociceptive compound from *Drimys winteri* barks. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **17**, 6444–6447, doi:10.1016/j.bmcl.2007.10.001.
- Monsálvez, M., N. Zapata, M. Vargas, M. Berti, M. Bittner, and V. Hernandez, 2010: Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of *Drimys winteri* bark against Take-All disease. *Ind. Crops Prod.*, **31**, 239–244, doi:10.1016/j.indcrop.2009.10.013.
- Muckenschnabel, I., C. S. Gronover, N. Deighton, B. A. Goodman, G. D. Lyon, D. Stewart, and B. Williamson, 2003: Oxidative effects in uninfected tissue in leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris*) containing soft rots caused by *Botrytis cinerea*. *J. Sci. Food Agric.*, **83**, 507–514.
- Muñoz-Concha, D., H. Vogel, R. Yunes, I. Razmilic, L. Bresciani, and A. Malheiros, 2007: Presence of polygodial and drimenol in *Drimys* populations from Chile. *Biochem. Syst. Ecol.*, **35**, 434–438.
- Muñoz, O., and M. Gutierrez, 2015: Antifungal and Insecticidal properties of the Phytoconstituents of *Drimys winteri* (Winteraceae) growing in Chiloe Island (Chile). *Nat. Prod. Chem. Res.*, **03**.

<http://www.esciencecentral.org/journals/antifungal-and-insecticidal-properties-of-the-phytoconstituents-of-drimys-winteri-winteraceae-growing-in-chiloe-island-chile-2329-6836-1000182.php?aid=57625>.

Muñoz, O., M. Montes, and T. Wilkomirsky, 2001: *Plantas Medicinales de uso en Chile, química y farmacología*. Editorial Universitaria,.

Musiet Soto, D. N., 2015: Eficacia de diferentes formulaciones de *Clonostachys rosea* en el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en condiciones operacionales de plantas de *Eucalyptus* spp. Universidad de Concepción, 60 pp.

Newhook, F. J., 1958: The association of *Phytophthora* spp. with mortality of *Pinus radiata* and other conifers: I. Symptoms and epidemiology in shelterbelts. *New Zeal. J. Agric. Res.* **2.4**, 8233, 808–843.

ODEPA, 2015: *Panorama de la Agricultura*. Santiago de Chile,.

ODEPA, 2016: *Informe con datos macroeconómicos y del sector silvoagropecuario*.

Oerke, E.-C., 2006: Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.*, **144**, 31.

OMS, 2016: Residuos de plaguicidas en los alimentos. 1. <http://www.who.int/features/qa/87/es/> (Accessed June 16, 2017).

Palacios, N., D. Burtin, and M. Leech, 2004: Biología molecular , una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, **6**, 67–77.

Pappas, A. C., 1997: Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Prot.*, **16**, 257–263.

Paz Robles, C., D. Mercado, S. Suarez, and R. Baggio, 2014: Two drimane lactones, valdiviolide and 11-epivaldiviolide, in the form of a 1:1 cocrystal obtained from *Drimys winteri* extracts. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.*, **70**, 1112–1115.

Pomilio, A. B., 2012: Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina : Vinculación con la Bioquímica. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, **46**, 73–82.

Quiroz Bravo, K. A., 2003: Determinación del efecto fungicida de extractos de canelo (*Drimys*

winteri), matico (*Buddleja globosa*), peumo (*Cryptocarya alba*), boldo (*Peumus Boldus*) y bailahuén (*Haplopappus taeda* y *H. multifolius*) sobre hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporium*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium* spp). Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agraria, Escuela de Agronomía, .

- Raimann, X., L. Rodríguez, P. Chavez, and C. Torrejón, 2014: Mercurio en pescados y su importancia en la salud. *Rev med Chile*, **142**, 1174–1180.
- Ramírez, M., and A. Rodríguez, 2012: Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica : una revisión. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, **14**, 271–284.
- Ramón, R., A. Juan, Z. Andrea, Q. Andrés, A. Marysol, and A. Alfonso, 2012: The effects of the essential oil and hydrolate of canelo (*Drimys winteri*) on adults of *Aegorhinus superciliosus* in the laboratory. *Cienc. Inv. Agr.*, **39**, 481–488. /scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lang=pt.
- Reino, J. L., R. F. Guerrero, R. Hernández-Galán, and I. G. Collado, 2008: Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem. Rev.*, **7**, 89–123.
- Del Río, J. A., A. G. Báidez, J. M. Botía, and A. Ortuño, 2003: Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chem.*, **83**, 75–78.
- Rodríguez, B., N. Zapata, P. Medina, and E. Viñuela, 2005: A complete ¹H and ¹³C NMR data assignment for four drimane sesquiterpenoids isolated from *Drimys winteri*. *Magn. Reson. Chem.*, **43**, 82–84.
- Rosslénbroich, H. J., and D. Stuebler, 2000: *Botrytis cinerea* - History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Prot.*, **19**, 557–561.
- Russell, P. E., 2005: A century of fungicide evolution. *J. Agric. Sci.*, **143**, 11–25.
- SAG, S. A. Y. G., 2013: *Agricultura Orgánica Nacional Bases Técnicas y Situación Actual*. 156 pp. http://www.sag.cl/sites/default/files/agricultura_org_nacional_bases_tecnicas_y_situacion_actual_2013.pdf.
- Saito, S., and S. Suzuki, 2009: Fungicide Resistant Profiles of *Botrytis cinerea* in a Vineyard. *J. ASEV*, **20**, 8–14.

- Sánchez-Pérez, J. D. L., M. G. Jaimes-Lara, R. Salgado-Garciglia, and J. E. López-Meza, 2009: Root extracts from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) inhibit the mycelial growth of the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. *Eur. J. Plant Pathol.*, **124**, 595–601.
- El Sayah, M., V. Cechinel Filho, R. A. Yunes, and J. B. Calixto, 1997: Action of the extract of *Drymis winteri* on contraction induced by inflammatory mediators, compound 48/80 and ovalbumin of the guinea-pig trachea in vitro. *Gen. Pharmacol.*, **28**, 699–704.
- Sepúlveda, P., P. Rebufel, G. Sepúlveda, and C. Bilbao, 2010: “tristeza del palto”, una enfermedad importante. Arica y Parinacota, Chile, 1-4 pp. http://platina.inia.cl/ururi/docs/Informativo_INIA-URURI_31.pdf.
- Serrano, M. S., P. de Vita, P. Fernández-Rebollo, and M. E. Sánchez Hernández, 2012: Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Quercus ilex*. *Eur. J. Plant Pathol.*, **132**, 271–279.
- Soto, M., and M. Rosales, 2016: Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extraacción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza. *Maderas, Cienc. y Tecnol.*, **18**, 701–714.
- Soylu, E. M., Ş. Kurt, and S. Soyly, 2010: International Journal of Food Microbiology *in vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int. J. Food Microbiol.*, **143**, 183–189.
- Swarts, H. J., A. A. Verstegen-haaksma, B. Jansen, and A. De Groot, 1994: Total synthesis of drimane sesquiterpenes from S-(+)-Carvone (Part 5). *Tetrahedron*, **50**, 10083–10094.
- Taiz, L., and E. Zeiger, 2006: *Fisiología Vegetal*. tercera. Sinauer Associates Inc., Ed. 581 pp.
- Taniguchi, M., A. Chapya, I. Kubo, and K. Nakanishi, 1978: Screening of East African plants for antimicrobial activity. I. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **26**, 2910–2913. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110003623395/>.
- Taniguchi, M., T. Adachi, and S. Oi, 1984: Structure–activity relationship of the Warburgia sesquiterpene dialdehydes. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 73–78. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00021369.1984.10866095>.
- Taniguchi, M., Y. Yano, E. Tada, K. Ikenishi, S. Oi, H. Haraguchi, K. Hashimoto, and I. Kubo, 1988:

- Mode of action of polygodial. An antifungal sesquiterpene dialdehyde. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1409–1414.
- Thacker, J., 2002: *An Introduction to Arthropod Pest Control*. Cambridge, United Kingdom, 623-626 pp.
- Tratsk, K. S., M. M. Campos, Z. R. Vaz, V. Filho, V. Schlemper, R. A. Yunes, and J. B. Calixto, 1997: Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymis winteri*. *Inflamm. Res.*, **46**, 509–514.
- Vega, F. E., and Coauthors, 2009: Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.*, **2**, 149–159.
- Vengurlekar, S., R. Sharma, and P. Trivedi, 2012: Efficacy of some natural compounds as antifungal agents. *Pharmacogn. Rev.*, **6**, 91–99.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3459460&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Verdeguer, M., D. García-rellán, H. Boira, and E. Pérez, 2011: Herbicidal Activity of *Peumus boldus* and *Drimys winteri* Essential Oils from Chile. *Molecules*, **16**, 403–411.
- Villagran, C., and L. F. Hinojosa, 2005: Esquema Biogeográfico de Chile. *Regionalización Biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines*, J. Llorente and J. Morrone, Eds., Santiago de Chile, 551–577.
- Weste, G., and G. C. Marks, 1987: The Biology of *Phytophthora cinnamomi* in Australian Forest. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **25**, 207–229.
- Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, and J. Van Kan, 2007: *Botrytis cinerea* : the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.*, **8**, 561–580.
- Wilson, C. L., J. M. Solar, A. El Ghaouth, and V. Scientist, 1997: Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against *Botrytis cinerea*. **81**, 204–210.
- Xu, W., K. Huang, F. Guo, W. Qu, J. Yang, Z. Liang, and Y. Luo, 2007: Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biol. Technol.*, **46**, 86–94.

- Ying, B.-P., G. Peiser, Y.-Y. Ji, K. Mathias, D. Tutko, and Y.-S. Hwang, 1995a: Phytotoxic Sesquiterpenoids from *Canella winterana*. *Phytochemistry*, **38**, 909–915.
- Ying, B. P., G. D. Peiser, Y. Y. Ji, K. M. Mathias, F. Karasina, and Y. S. Hwang, 1995b: Structure-Activity Relationships of Phytotoxic Sesquiterpenoids from *Canella winterana*. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 826–829.
- Zaki, A. I., G. A. Zentmyer, J. Pettus, J. J. Sims, N. T. Keen, and V. Sing, 1980: Borbonol from *Persea* spp . -chemical properties and antifungal activity against *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Plant Pathol.*, **16**, 205–212.
- Zaldúa, S., and E. Sanfuentes, 2010: Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globulus* mini-cuttings using *Clonostachys* and *Trichoderma* strains. *Chil. J. Agric. Res.*, **70**, 576–582.
- Zapata, N., G. Lognay, and G. Smagghe, 2010: Bioactivity of essential oils from leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Acyrtosiphon pisum*. *Pest Manag. Sci.*, **66**, 1324–1331, doi:10.1002/ps.2018.
- Zapata, N., M. Vargas, and R. Ceballos, 2011a: CRUDE EXTRACTS OF *Drimys winteri* BARK TO INHIBIT GROWTH OF *Gaeumannomyces graminis* VAR . tritici. *J. Agric. Res.*, **71**, 45–51.
- Zapata, N., M. Vargas, and M. Medina, 2011b: Actividad fitotóxica de un extracto N-hexano obtenido de la corteza de *Drimys Winteri* sobre cuatro especies de maleza. *Planta Dininha*, **29**, 323–331.
- Zentmyer, G., 1959: Avocado diseases in Latin America. *Plant Dis. Report.*, **43**, 1299

Anexos

1. Abreviaturas y Glosario.

- μL : Microlitro.
- ABA: Ácido Abscísico.
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico.
- CCF: Cromatografía en Capa Fina.
- Cambium: meristemo lateral, paralelo al eje longitudinal de las raíces y tallos, que da origen al crecimiento secundario de tallos y raíces de plantas leñosas (Audesirk et al. 2003).
- Clamidospora: Estructuras que pueden ser formadas por muchos hongos y se caracterizan por poseer pared celular gruesa. Son las esporas más resistentes de los hongos (García 2005).
- Conidios: Mitospora asexuales, externos que se forman a partir de una célula conidiógena o hifa fértil (Biasoli 2013).
- Cromóforo: En química un cromóforo es cualquier molécula o parte de una molécula responsable por el color del material. Cuando la luz alcanza un cromóforo, la excitación de un electrón hace con que sean emitidos fotones de un color específico.
- *epi*: Epimero.
- Epimero: Diastereoisómeros que difieren en la configuración de un solo carbono quiral.
- Esporagio: Estructura donde se producen esporas (Audesirk et al. 2003).
- Esporas: Célula reproductora haploide que puede desarrollarse para convertirse en un adulto sin fusionarse con otra célula (Audesirk et al. 2003).
- ET: Etileno.
- FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).
- Floema: tejido conductor de las plantas vasculares que transporta verticalmente una solución concentrada de azúcares en la planta (Audesirk et al. 2003).
- Germinación: es un tipo de reproducción vegetativa en el que el nuevo individuo surge en forma de excrecencia o yema sobre un animal adulto adquiriendo más tarde

la forma y tamaño de éste. Los nuevos individuos se desprenden para hacer vida libre o bien quedan unidos al progenitor para formar una colonia, como ocurre en esponjas, conidarios, briozoos y tunicados. A veces este tipo de reproducción no es sino una forma de resistencia ante condiciones desfavorables.

- Haploide: Dícese de las células que tienen un solo miembro de cada par de cromosomas homólogos (Audesirk et al. 2003).
- Hifa: Estructura parecida a un hilo que se compone de células alargadas, por lo general con muchos núcleos haploides; muchas hifas constituyen el cuerpo fúngico (Audesirk et al. 2003).
- Hojas perennes: cuando las hojas de un árbol permanecen por más de dos años
- IFOAM: International Federation of Organic Agriculture Movements
- INIA: Institutos de Investigaciones Agropecuarias.
- JA: Ácido Jasmónico.
- Meristemo lateral: tejido meristemático que forma cilindros paralelos al eje longitudinal situado entre el xilema primario y el floema primario y justo afuera del floema, también llamado **Cambium** (Audesirk et al. 2003).
- Micelio: El cuerpo de un hongo, que consiste en una masa de hifas (Audesirk et al. 2003).
- mL: Mililitro.
- ODEPA: Oficina de Estudios y Políticas Agrarias.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- Oomiceto: o moho acuático, forman una pequeña división de protistas filamentosos que incluyen tanto especies inofensivas que viven en agua y en suelo, como especies patógenas de gran importancia económica (Audesirk et al. 2003).
- Pecíolo: Raballo que conecta una hoja con el tallo (Audesirk et al. 2003).
- ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.
- RSA: Resistencia Sistémica Adquirida.
- SA: Ácido Salicílico.
- Saponinas: Son, generalmente, sustancias terciarias, de elevado peso molecular, neutras o ligeramente ácidas. Además, tienen con frecuencia acción hemolítica.
- *spp*: Especies.
- Winteranáceas: del género *winterana*=*Canella*.

- Zoospora: célula reproductora no sexual que nada con flagelo; la forman miembros de la división Oomycota de los protista (Audesirk et al. 2003).

2. Mercurio Orgánico

El mercurio orgánico incluye compuestos con metilmercurio, etilmercurio y fenilmercurio, todos los cuales fueron producidos como biocidas y pesticidas. El más conocido es el metilmercurio, ya que es el compuesto que se encuentra en el ambiente, se deposita en el agua y se acumula en organismos, especialmente en el medio acuático (Raimann et al. 2014).

3. Preparación de Sílica con Nitrato de Plata.

Se pesan 10 gramos de nitrato de plata (AgNO_3) y se pulveriza en un mortero, los que luego son trasvasiados a un balón de 500 [mL], al cual se adicionan 250 [mL] de etanol. La mezcla se calienta a baño maría hasta disolver el AgNO_3 . Una vez disuelto, se agregan 100 [g] de Sílica gel y se mezcla hasta que quede homogénea. Posteriormente, se debe concentrar la mezcla a presión reducida (rotavapor), de manera de retirar el etanol. Finalmente, la mezcla se trasvasija a un cristizador y se deja secar en la estufa a 110°C , hasta que quede exento de etanol.

4. Diagrama de Extracción y Separación Completo

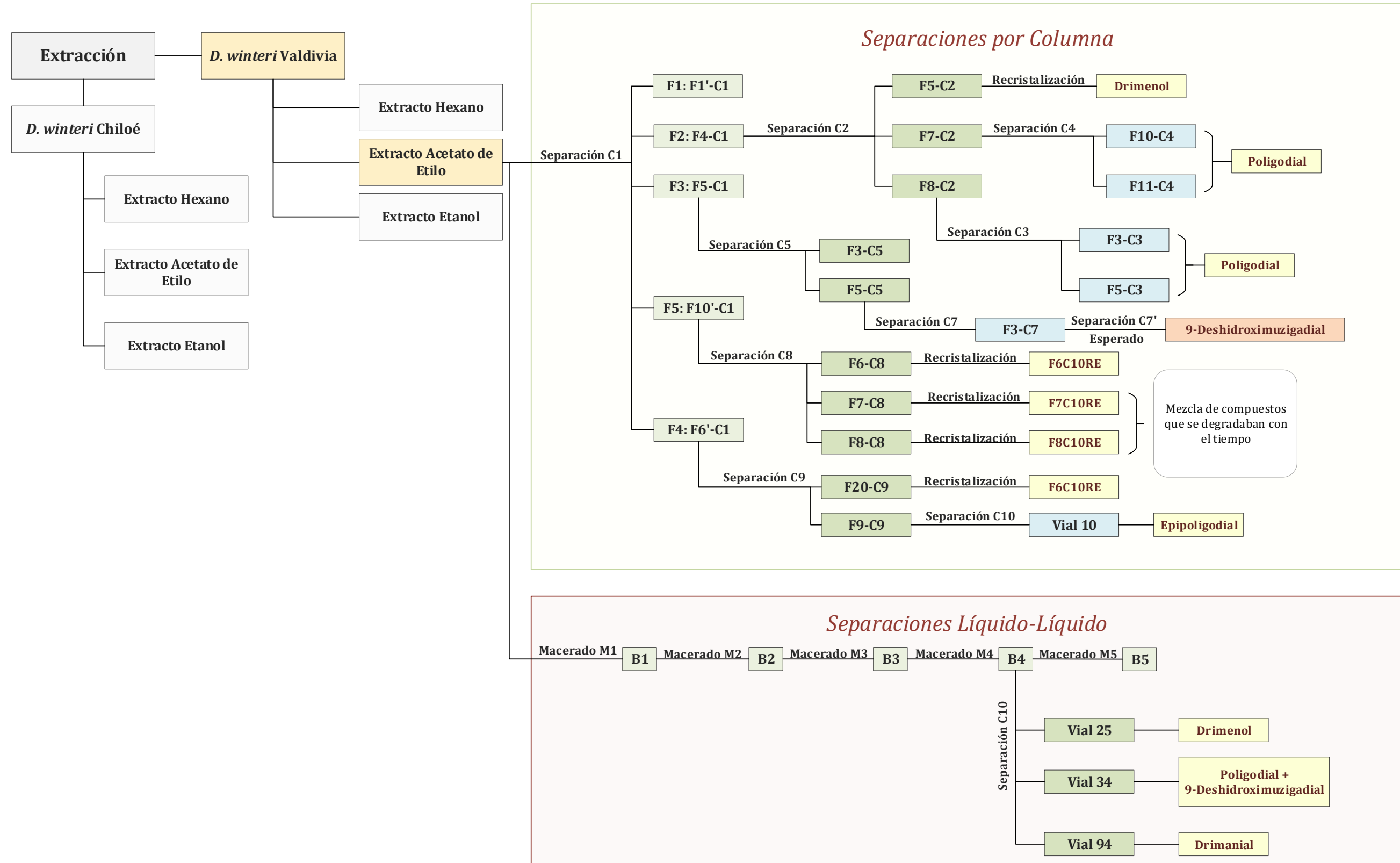


Diagrama 11, Diagrama de Extracción y Separación.

Fuente: Elaboración Propia.

5. Tablas Pruebas Biológicas

Tabla 8, Resultados de actividad biológica de extractos de *d. winteri* Valdivia

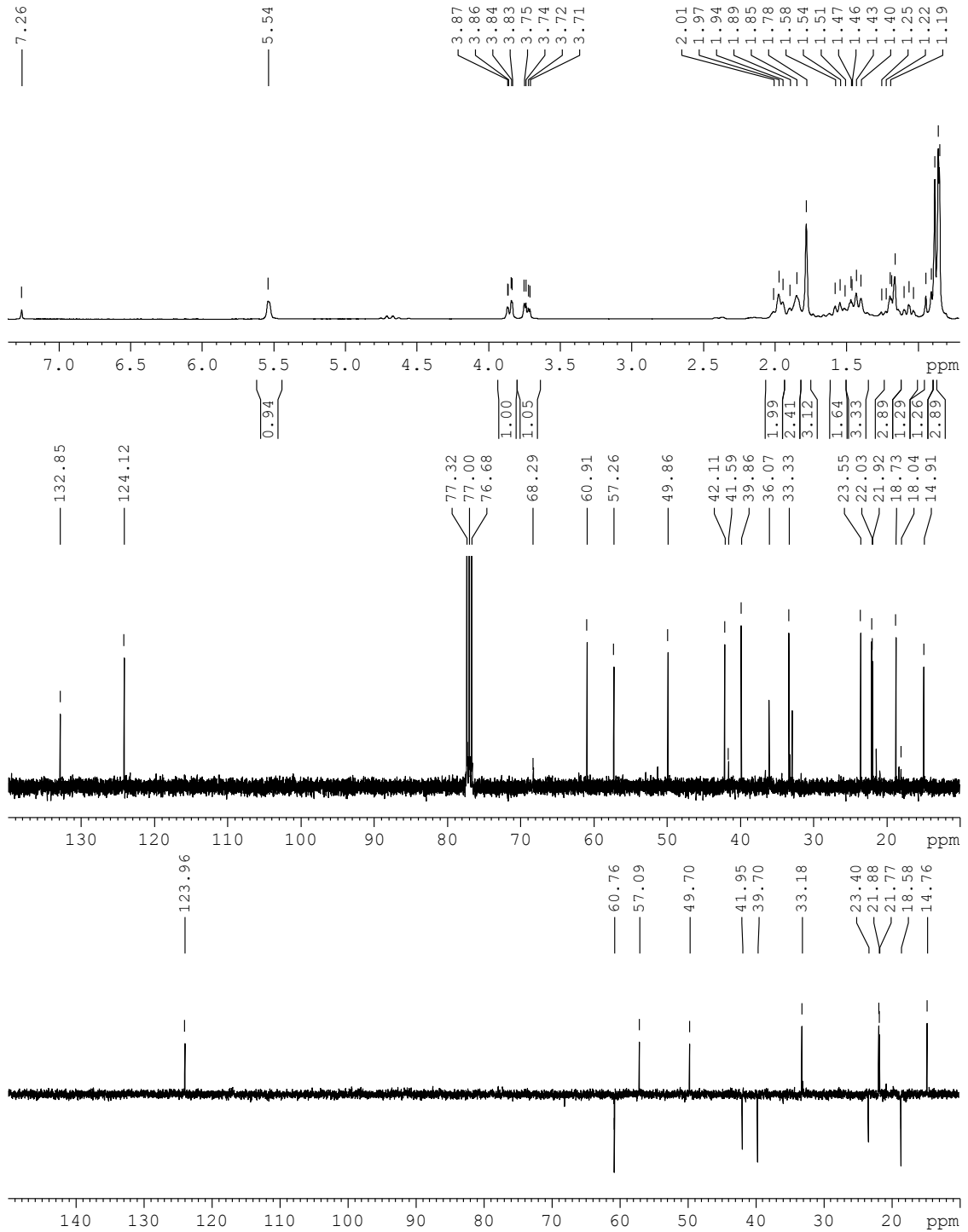
<i>Botrytis</i>	Hexano		Acetato		Etanol	
Concentración	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
20 ppm	<u>15,83</u>	1,32	14,57	6,47	7,50	1,00
40 ppm	25,83	0,41	<u>31,75</u>	10,32	11,83	2,78
80 ppm	44,00	3,46	<u>46,5</u>	6,37	20,67	3,50
160 ppm	<u>55,33</u>	3,32	55,11	9,54	29,67	3,14

Tabla 9, Resultados de actividad biológica de extractos de *d. winteri* Chiloé

<i>Botrytis</i>	Hexano		Acetato		Etanol	
Concentración	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
20 ppm	10,00	1,41	<u>12,43</u>	2,76	3,50	1,00
40 ppm	12,25	1,50	<u>31,14</u>	5,39	9,75	1,26
80 ppm	22,25	2,06	<u>48,44</u>	3,75	18,00	3,56
160 ppm	26,50	1,00	<u>69,56</u>	5,34	24,50	1,29

6. Espectros

5.1. Drimenol



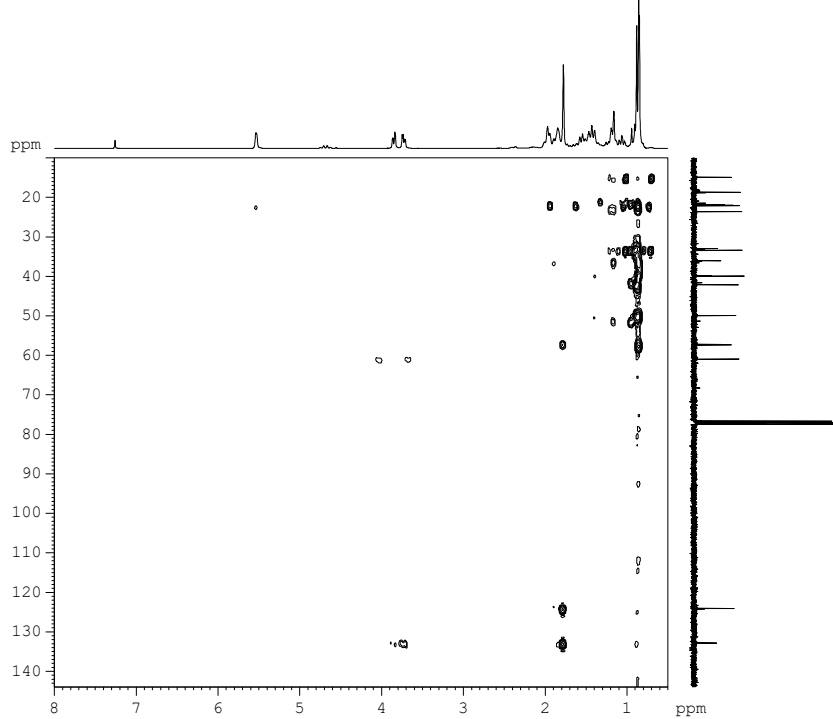
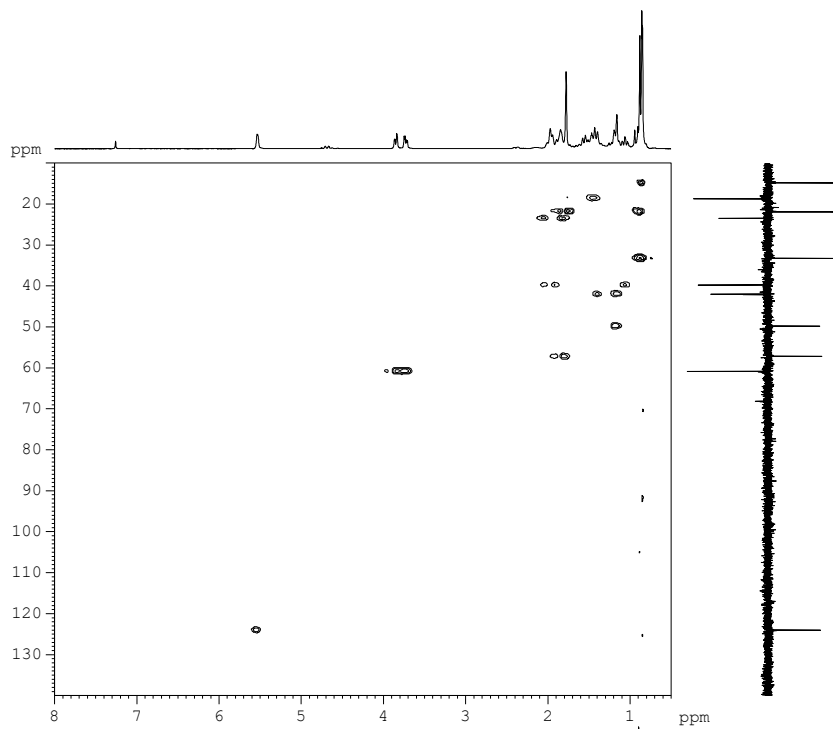
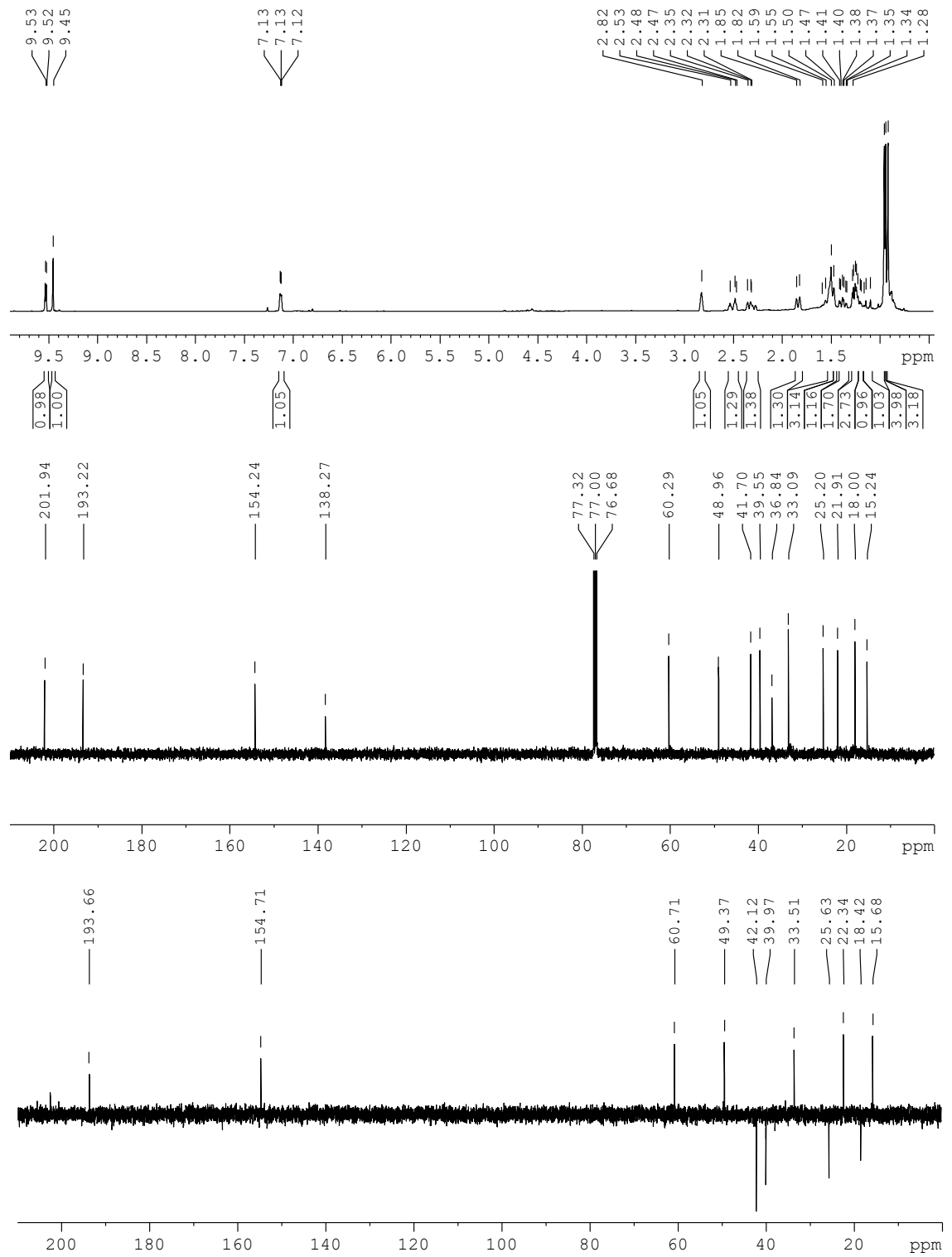


Figura 30, HSQC y HMBC Drimenol

5.2. Poligodial



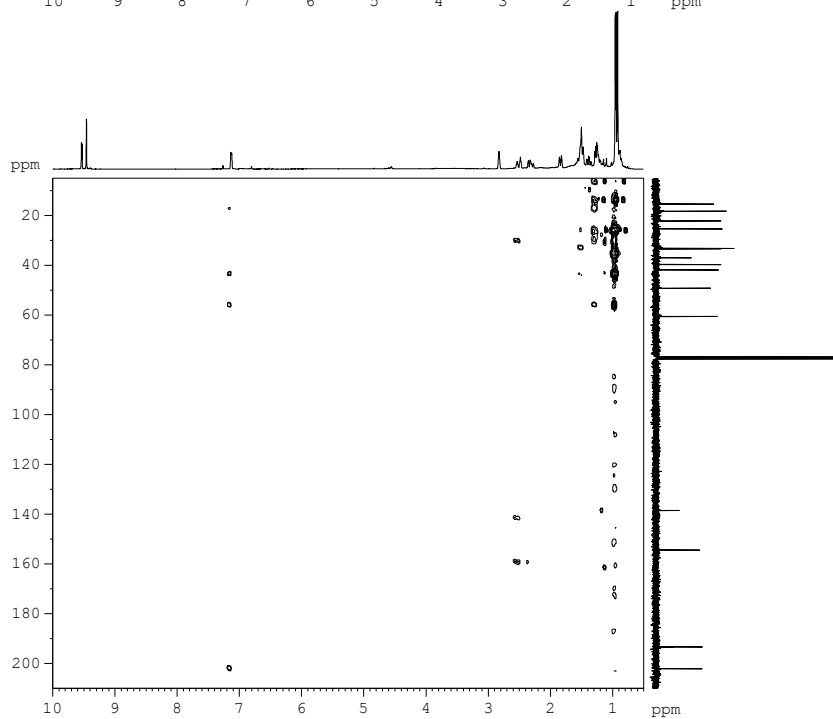
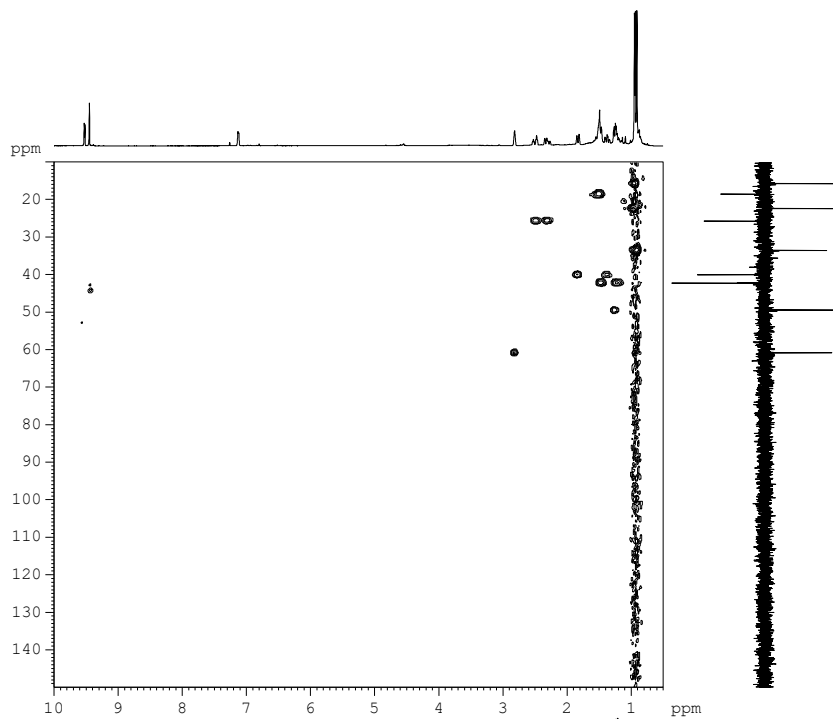
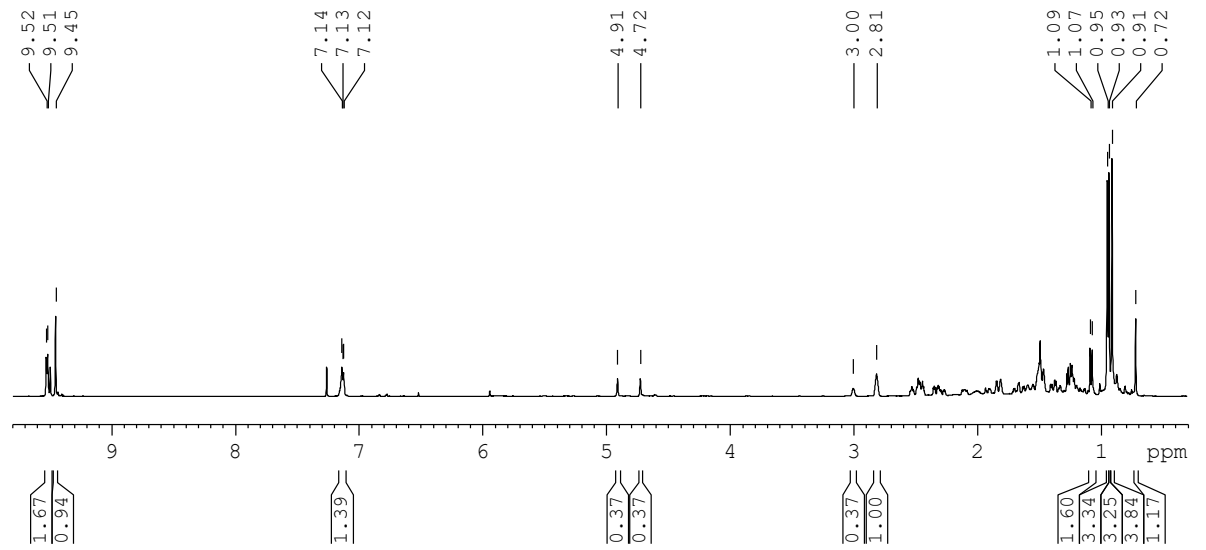
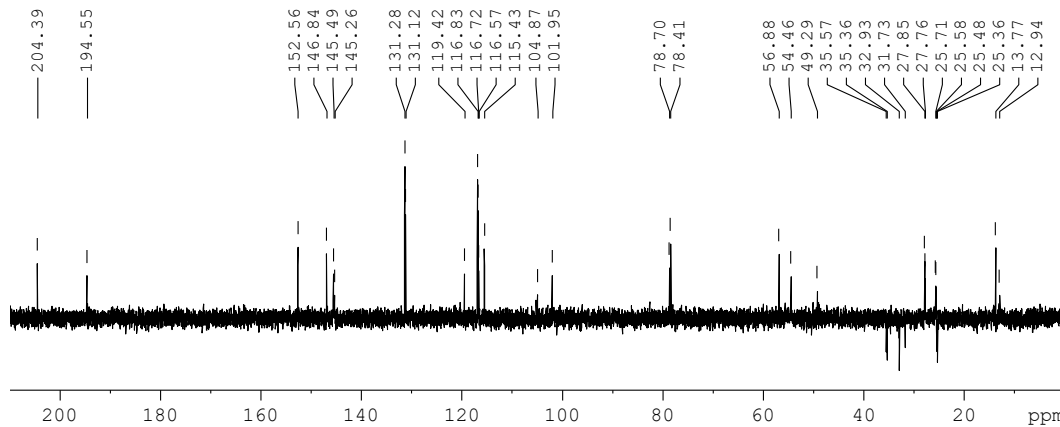
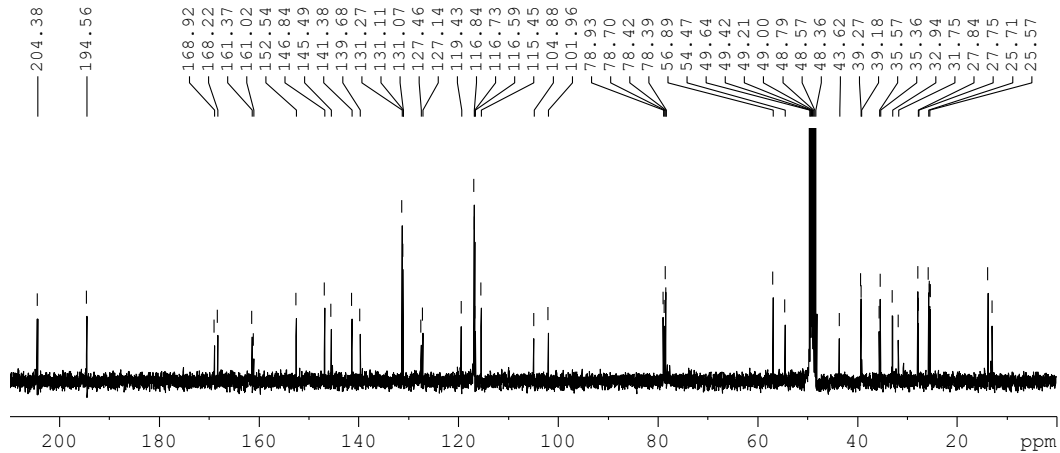
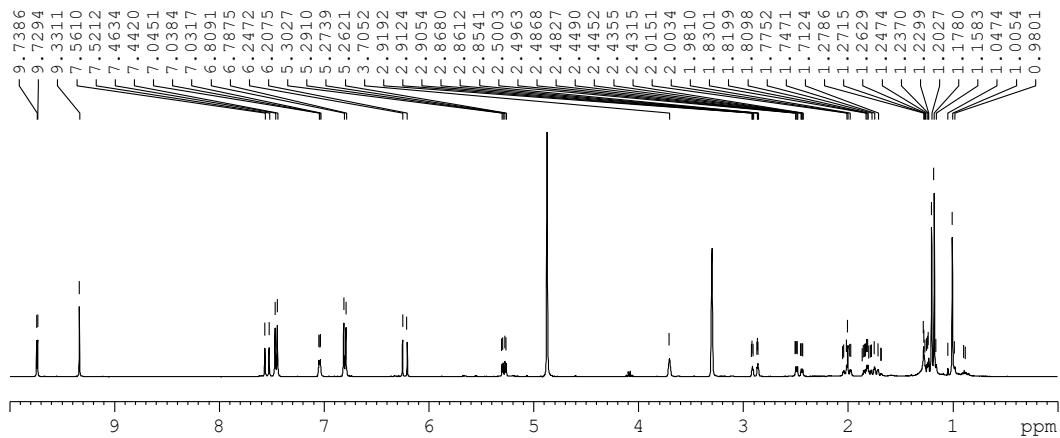


Figura 31, HSQC y HMBC Poligodial

5.3. Mezcla Poligodial y 9desoximuzigadial



5.4. Dímero



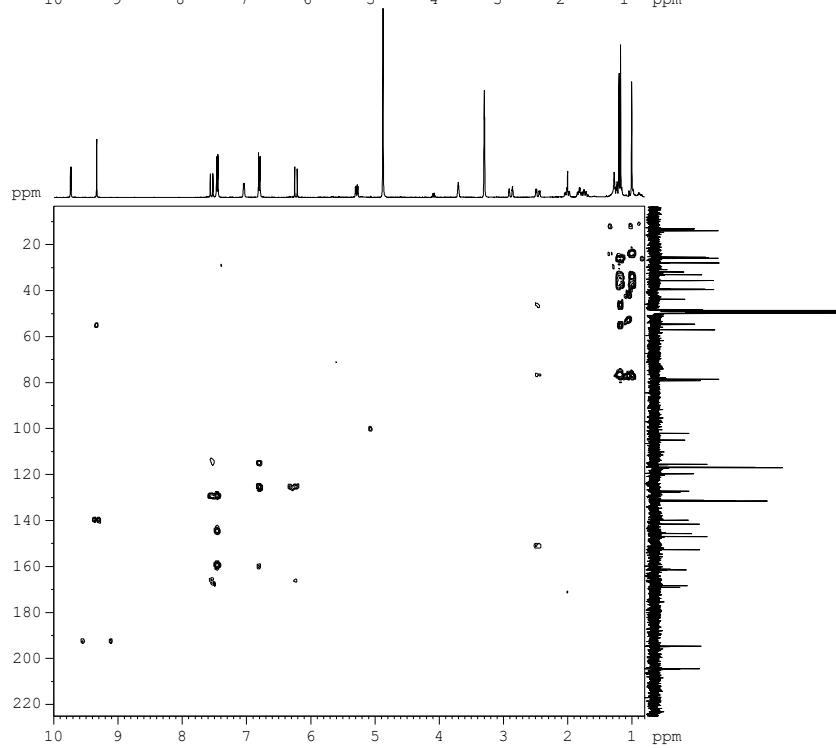
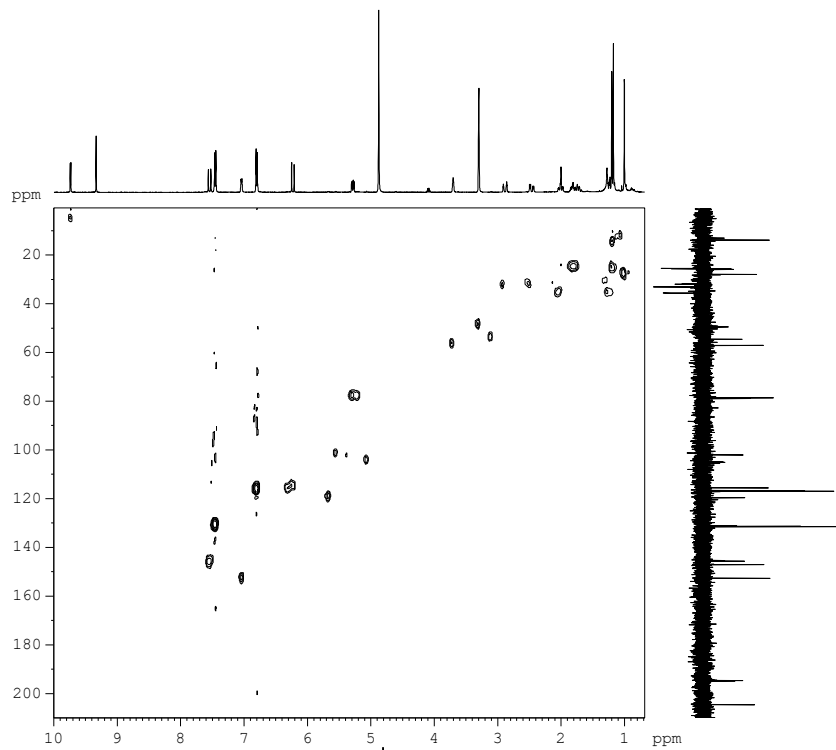
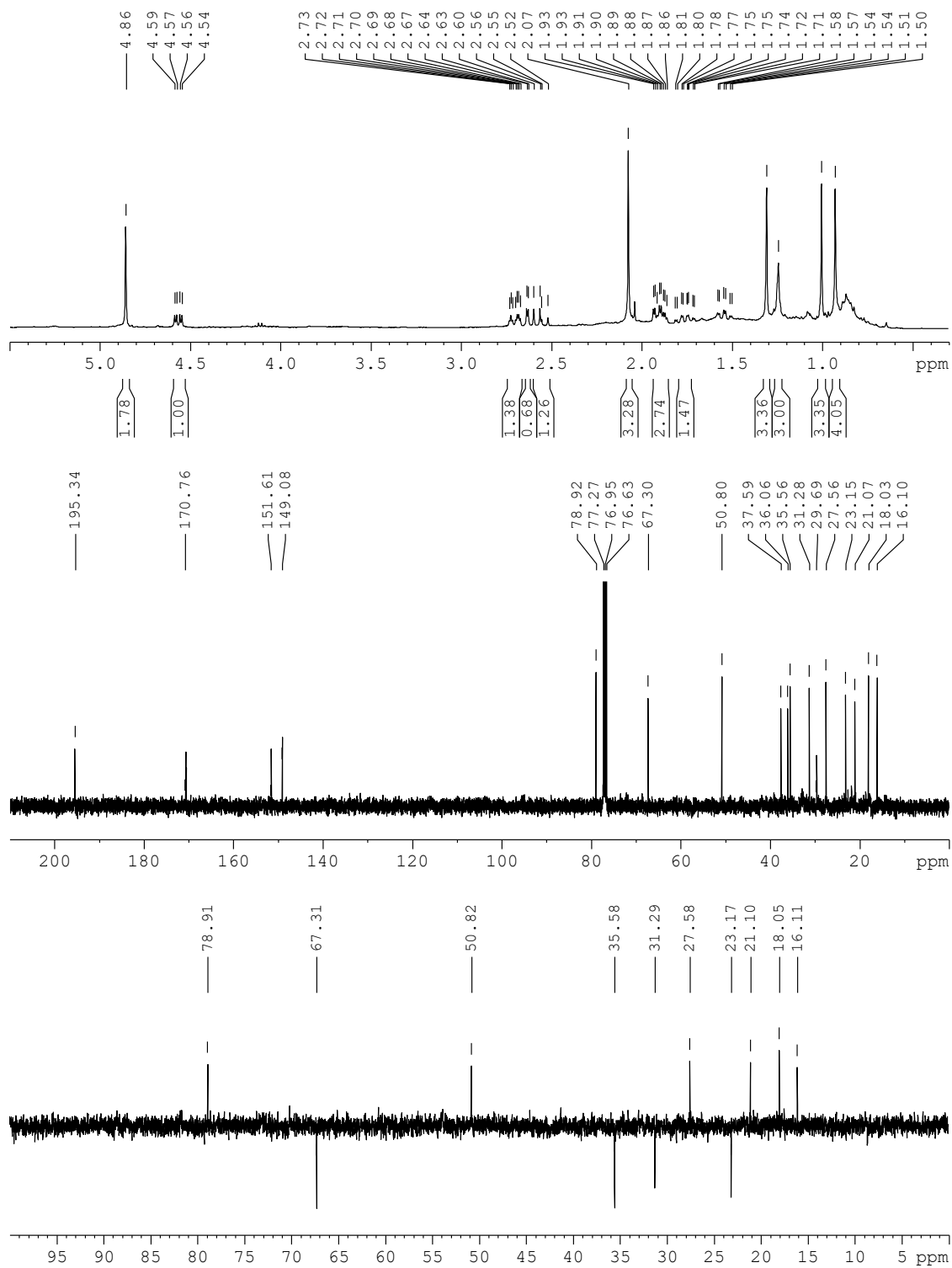


Figura 32, HSQC y HMBC Dímero

5.5. Lactona



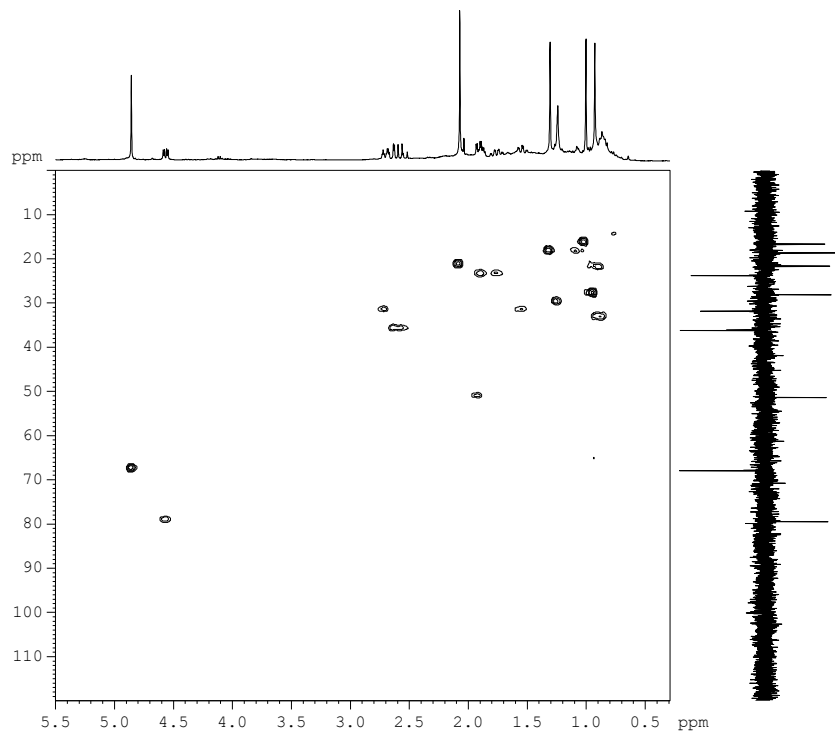
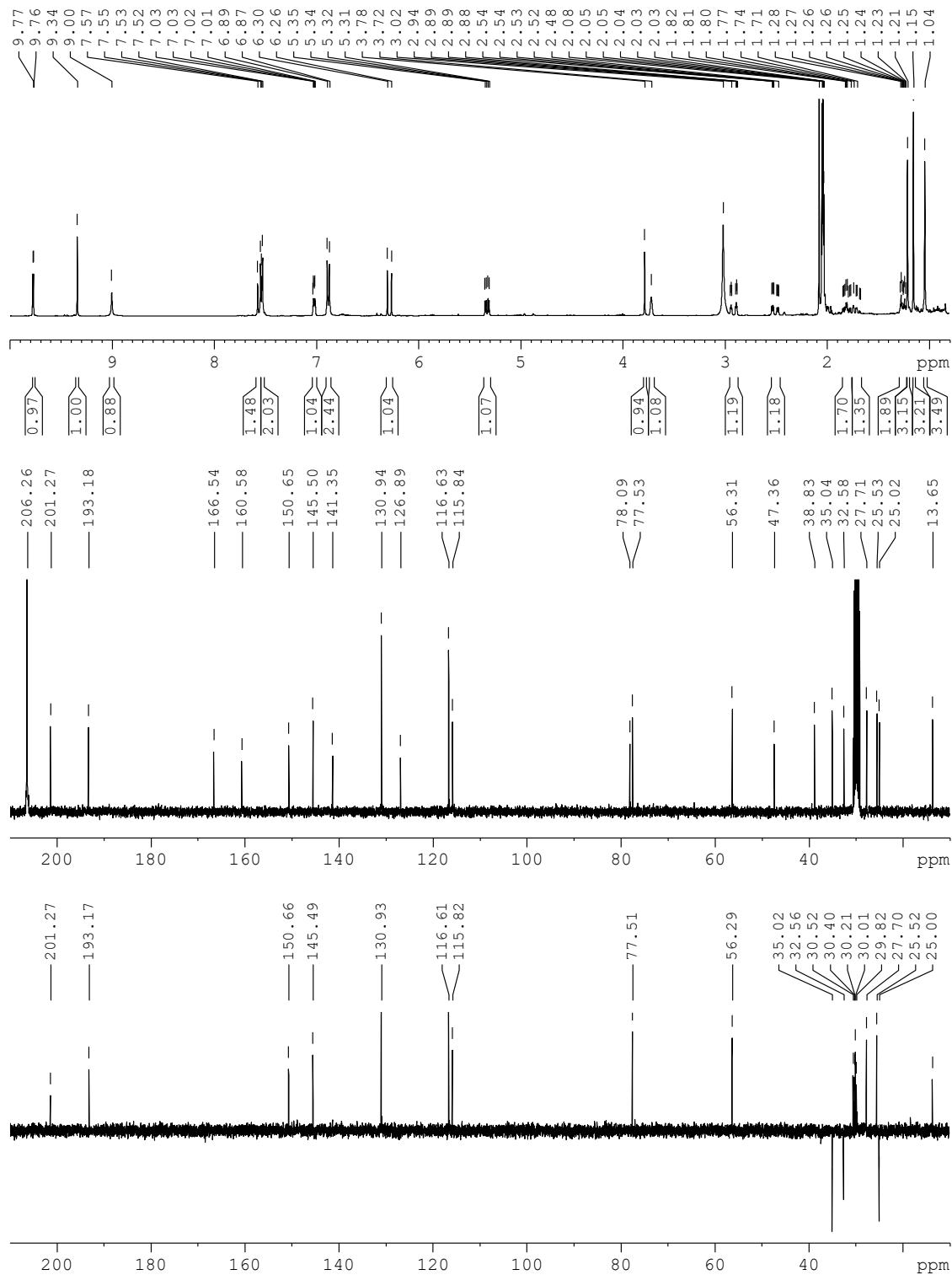
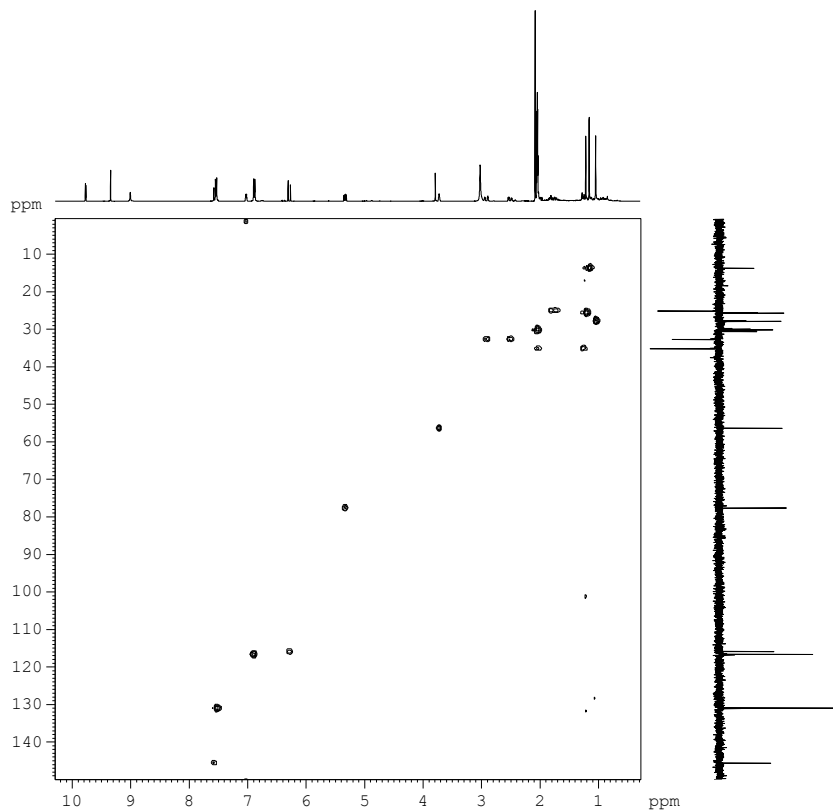


Figura 33, HSQC Lactona

5.6. Drimanal





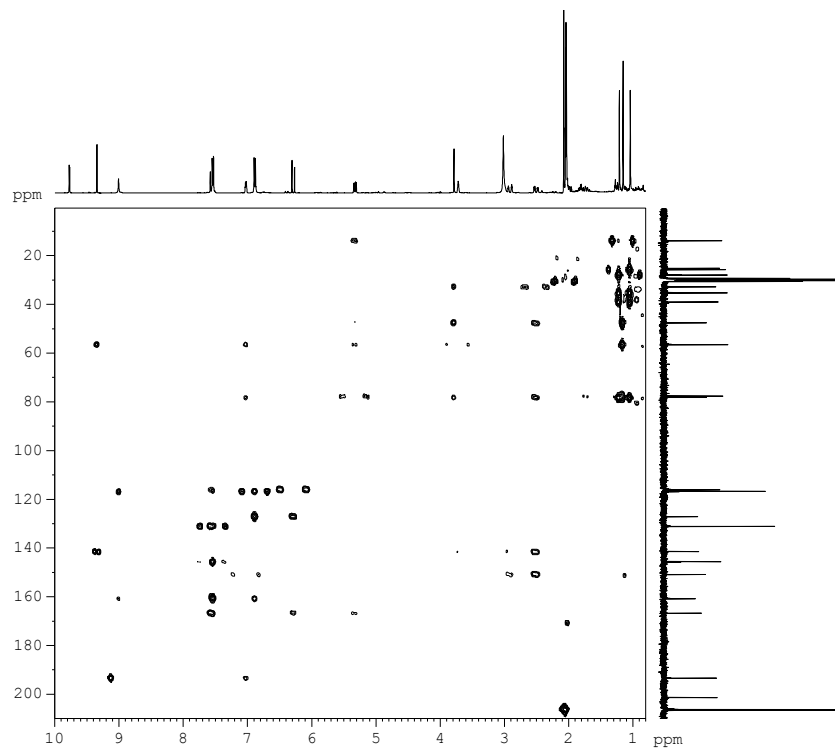


Figura 34, HSQC y HMBC Drimanil

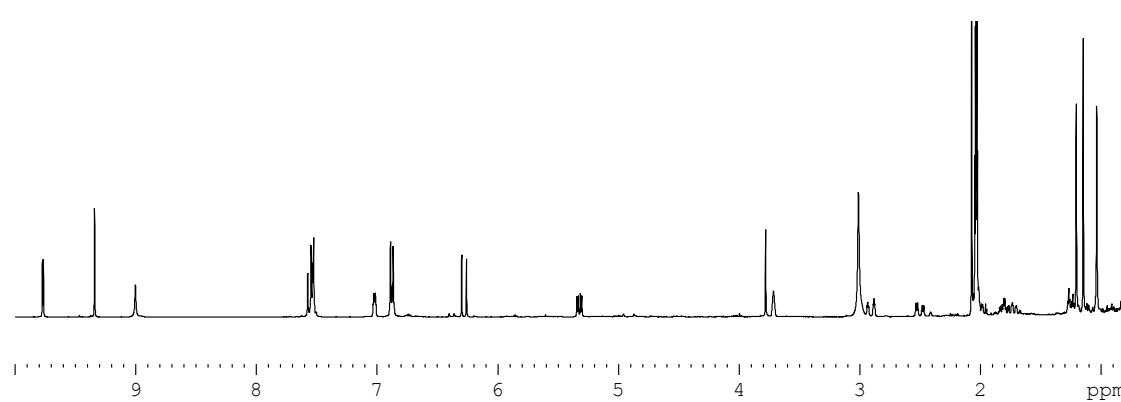
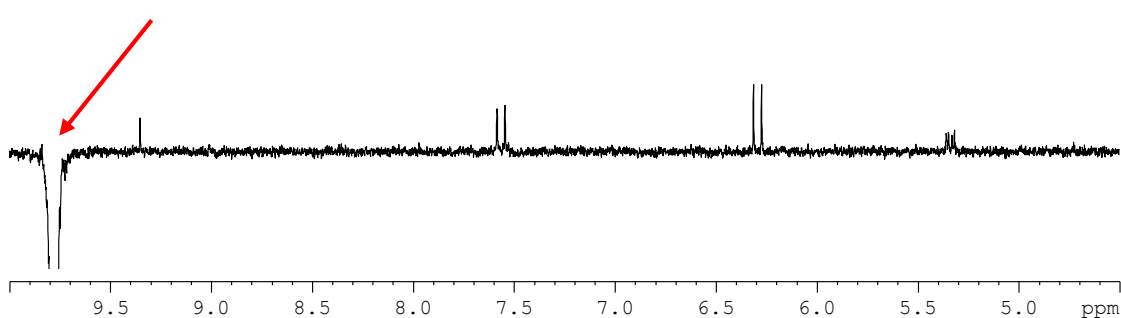
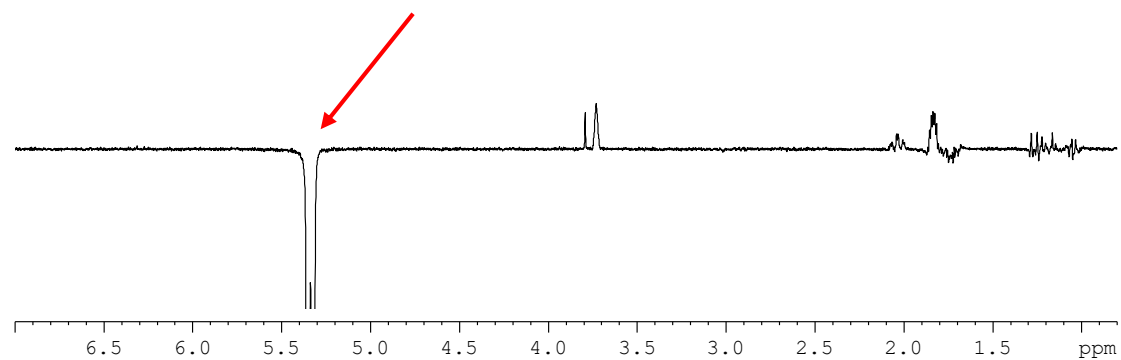
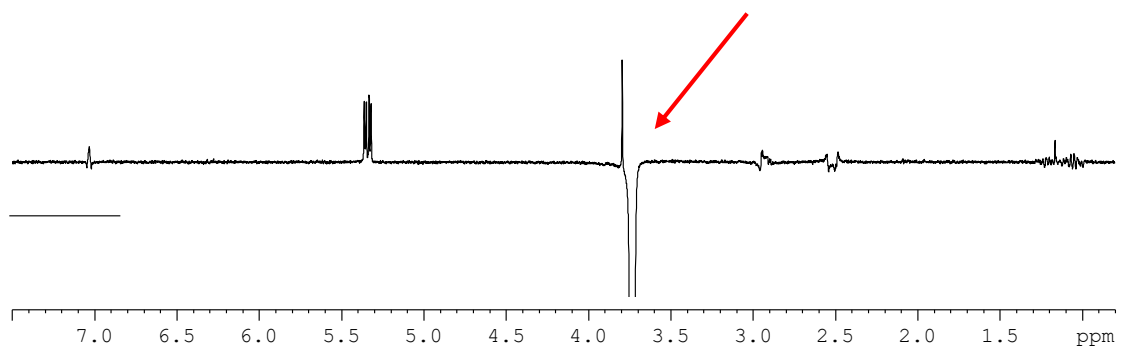


Figura 35, Experimento NOESY Drimanal

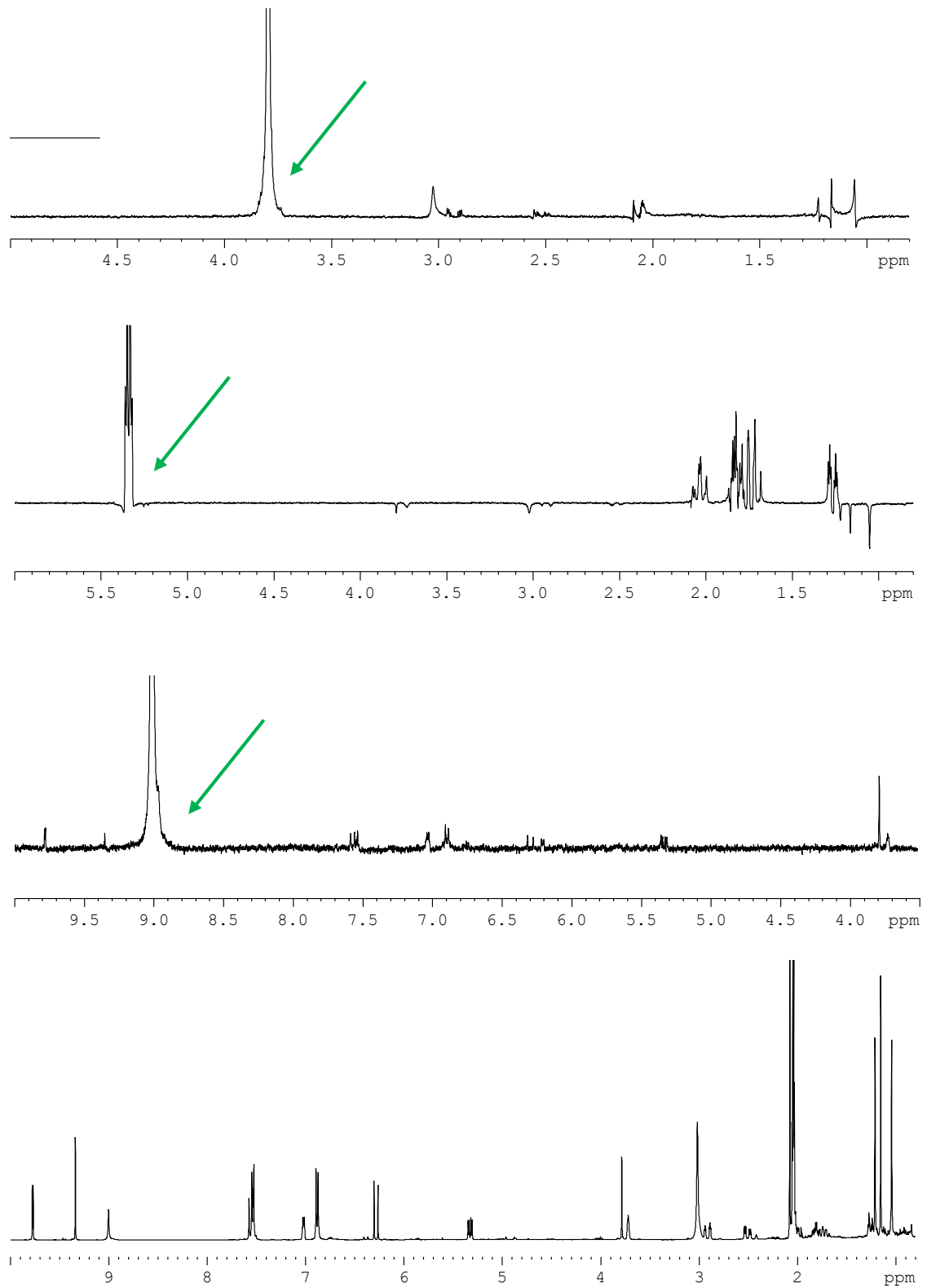


Figura 36, Experimento TOCSY Drimanal