

Síntesis química de derivados de aminoácidos. Evaluación de la actividad biológica.

Synthesis and evaluation of biological activity of amino acid derivatives.



Trabajo de fin de Grado

Paula Herrera Hernández

Tutores:

Dr. Ricardo Guillermo Álvarez y Dra. Concepción González Martín

Grado en Biología. Septiembre 2022

Índice

✓ Resumen	1
✓ Abstract	1
✓ Introducción	2
✓ Objetivos	4
✓ Material y métodos	5
✓ Discusión y resultados	9
○ Apartado químico	9
○ Apartado biológico	12
○ Determinación estructural	21
✓ Conclusiones	24
✓ Bibliografía	25

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores Concepción González Martín y Ricardo Guillermo Álvarez, por su inmensa ayuda, apoyo y paciencia durante la realización de este trabajo.

A todo el personal del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, por tener siempre una sonrisa amable. En especial a los/las compañeros/as del Departamento de Síntesis de Productos Naturales, donde realicé el presente trabajo y del que me llevo recuerdos preciosos de risas y mucho café.

Por último, pero no menos importante, a mi madre, que siempre ha tenido palabras de aliento y todo el cariño del mundo para darme. A mis amigos, sin los que los años de carrera se me habrían hecho infinitamente más duros. Y a Dani, por estar siempre ahí, en lo bueno y en lo malo, y ser el motor que me inspira a ser mejor.

Resumen

Las tioureas son moléculas que recientemente han suscitado interés en el campo de los fitosanitarios, debido a los buenos resultados que están obteniendo como antifúngicos contra hongos de importancia agrícola que afectan sobre todo a cultivos de consumo. Conforman una de las líneas de estudio en el desarrollo de nuevos agroquímicos más seguros para el medio ambiente, eficaces y específicos para el control de fitopatógenos. En el presente trabajo se abordó el estudio de la actividad antifúngica de varios productos sintetizados derivados de la L-serina y análogos, contra tres importantes hongos patógenos en plantas: *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, así como el efecto de variaciones estructurales de estas moléculas, con el fin de obtener productos con posible utilidad fitosanitaria. La disponibilidad de los sustratos de partida y la eficiencia de las reacciones hacen que estos compuestos puedan ser considerados como candidatos potenciales.

PALABRAS CLAVE: tioureas, antifúngicos, fitosanitarios, aminoácidos, MIC

Abstract

Thioureas are molecules that have recently raised interest in the field of phytosanitary products, due to the good results they are obtaining as antifungals against fungi of agricultural importance that affect, above all, consumer crops. They are one of the lines of study in the development of new agrochemicals that are safer for the environment, effective and specific for the control of phytopathogens. The present work aims to study the antifungal activity of several synthesized products derived from L-serine and analogues, against three important plant pathogenic fungi: *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*, and the effect of structural variations of these molecules, in order to obtain products with possible phytosanitary utility. The availability of starting substrates and the efficiency of the reactions mean that these compounds can be considered as potential candidates.

KEYWORDS: thioureas, antifungals, phytosanitary, aminoacids, MIC

INTRODUCCION

El control y la erradicación de plagas que afectan a cultivos de consumo lleva siendo uno de los principales problemas a los que el ser humano se ha tenido que enfrentar desde que se desarrolló la agricultura. El aumento en variedad de fitopatógenos y en la incidencia de las enfermedades que desencadenan, la plasticidad genética que presentan a la hora de adaptarse y volverse resistentes a la acción de pesticidas sintéticos (Walters, 2009), sumado al daño que muchos de estos plaguicidas causan indirectamente a la calidad de los cultivos, del suelo agrícola y, en última instancia, al ser humano, hace necesaria la búsqueda de compuestos que sean eficaces contra estos fitopatógenos y además que sean sostenibles y respetuosos con el medio ambiente (Villa-Martínez et al., 2014).

De los hongos patógenos en plantas que causan graves daños en cosecha y postcosecha, podemos destacar a *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.

B. cinerea es un hongo fitopatógeno cosmopolita capaz de infectar a una gran cantidad de especies vegetales. Es el causante de la llamada “podredumbre gris”, enfermedad que afecta a unas 200 especies diferentes de importancia agrícola (Benito et al., 1999) entre las que se incluye el tomate, la vid, la fresa y las ornamentales, y que cursa con la aparición de manchas en hojas, fruto y flor, y culmina con la podredumbre de estos órganos (Gepp et al., 2012). Es un hongo con una gran heterogeneidad genética, por lo que presenta un gran número de variedades resistentes a fungicidas, lo que lo convierte en un agente fitopatógeno muy dañino causante de grandes pérdidas económicas en el sector agrario (Tortora et al., 1994).

A. alternata, también conocido como “moho negro”, es un parásito oportunista muy común y estudiado, responsable del deterioro de diferentes cultivos en cosecha y postcosecha. Afecta a vegetales de importancia agrícola como el tomate o la zanahoria, en los que da lugar a manchas negruzcas sobre todo en hojas, pero también en tallos y frutos (Solfrizzo et al., 2005). Algunas cepas generan micotoxinas altamente tóxicas que no solo afectan a las plantas hospedadoras, sino que, en última instancia, también son perjudiciales para los animales y humanos que las ingieran (Babiceanu et al., 2013). Además, liberan compuestos volátiles al interactuar con la planta, los cuales producen variaciones desagradables en el olor y el sabor de la fruta (Encinas-Basurto et al., 2017).

F. oxysporum es una de las especies de hongos de mayor importancia fitopatológica, de las más extendidas y capaces de habitar en cualquier tipo de suelo. Muchas cepas de este

hongo son saprófitos no patogénicos, pero existen cepas patógenas que infectan tanto a plantas como a animales y humanos, y que causan enormes daños y pérdidas en cultivos de interés económico (Fravel et al., 2003). El hongo penetra en la planta por las raíces, causando su pudrición, y dando lugar a marchitamientos vasculares, manchas en hojas y tallos, y la pudrición de frutos y semillas (Arbeláez et al., 2000). Son capaces de producir toxinas que aumentan su virulencia y afectan severamente a los seres vivos, pudiendo tener en estos desde efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, citotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicos, hasta inmunosupresores y estrogénicos, por lo que representan un riesgo importante para la salud (Villa-Martínez et al., 2014).

Por este motivo, se han estudiado infinidad de compuestos naturales con potencial actividad fitosanitaria y sus derivados, siempre con el objetivo de desarrollar productos que sean más efectivos, selectivos, estables y cuya degradación sea sencilla y no contamine cultivos ni el medio ambiente. Muchos experimentos comparativos se han llevado a cabo, mediante la modificación estructural de moléculas que den lugar a mejoras en su capacidad inhibitoria, insecticida o fungicida.

Las tioureas y sus análogos, las tiohidantoínas, son ejemplos de moléculas altamente estudiadas debido a la extensa variedad de aplicaciones que presentan en el campo de la agroquímica (Huang et al., 2018). Conforman un grupo de pesticidas muy eficiente, con efectos notorios sobre plagas de insectos, incluso sobre las que han desarrollado resistencia frente a otros plaguicidas (Knox et al., 1992). Además, se ha descrito extensamente su actividad fungicida de amplio espectro. Muchos de los compuestos activos que se usan actualmente, presentan en su estructura diferentes tipos de tioureas o tiohidantoínas responsables de su bioactividad frente a fitopatógenos (Min et al., 2019) (Figura 1).

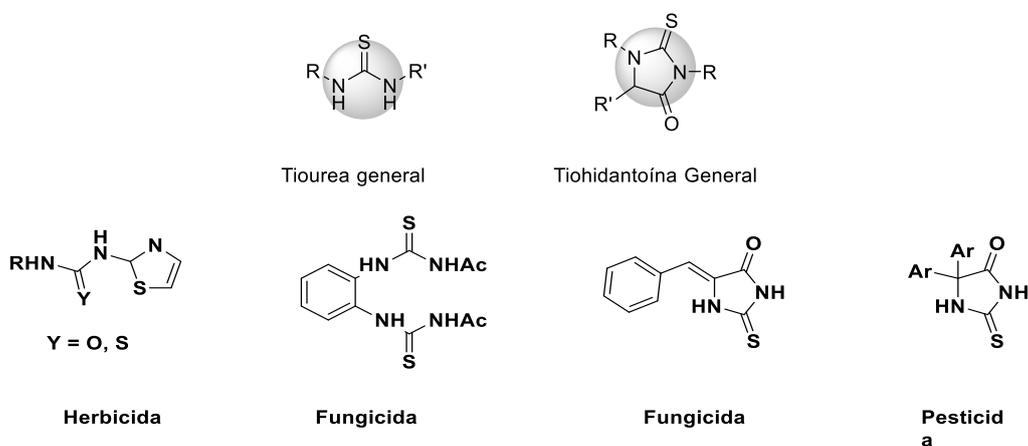
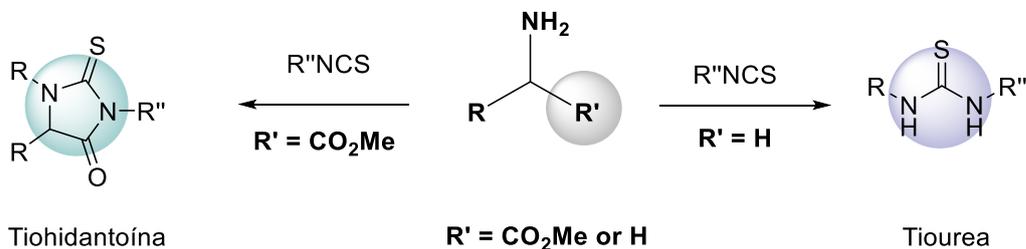


Figura 1: Estructura general de tioureas y tiohidantoínas y algunos ejemplos representativos de compuestos bioactivos.

Las tioureas y tiohidantoínas se pueden sintetizar fácilmente por reacción de diferentes isotiocianatos con aminas o aminoácidos (Esquema 1), y en la bibliografía se pueden encontrar recogidas numerosas referencias respecto a este tema (Jangale et al, 2014).



Esquema 1. Esquema general de síntesis de tioureas y tiohidantoínas.

Por todo ello, en esta memoria se ha llevado a cabo la preparación química de diferentes análogos de tioureas derivadas de aminoácidos y se ha estudiado su posible actividad antifúngica sobre los tres hongos patógenos indicados, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.

OBJETIVOS

Con el fin de estudiar en qué grado afecta la composición estructural de moléculas de diferentes derivados de la L-serina y/o análogos, y encontrar así nuevos compuestos antifúngicos de interés, que presenten el menor impacto posible contra el medio ambiente, y que a la vez sean eficaces contra la aparición de cepas fúngicas cada vez más resistentes, nos hemos propuesto en este estudio los siguientes objetivos:

- La síntesis de diferentes derivados de tioureas de la L-serina utilizando reactivos comerciales.
- Preparación de análogos estructurales con el fin de encontrar elementos que nos permitan hacer una relación estructura-actividad de las moléculas.
- El estudio de su actividad antifúngica, su especificidad y su porcentaje de inhibición llevando a cabo ensayos *in vitro* utilizando hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*).

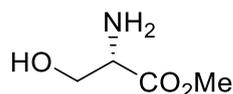
MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los productos utilizados en esta Memoria son productos comerciales (Biosigma-Aldrich). Los disolventes utilizados en las columnas se usaron directamente de las botellas y los disolventes secos se obtuvieron, o bien de un sistema de disolventes secos (diclorometano), o se presecó previamente con hidruro cálcico y se destiló bajo atmósfera de nitrógeno.

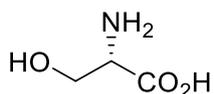
• Síntesis de tioureas y tiohidantoínas

Para la síntesis de los diferentes compuestos se siguió el siguiente procedimiento general: la disolución de aminas o aminoácidos (1.0 mmol) en acetonitrilo seco (5-10 mL) a temperatura ambiente, se le añade el correspondiente arilisotioisocianato (1.2 – 2.7 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez comprobado que la reacción ha terminado mediante un análisis por cromatografía en placa fina, se concentra directamente por tratamiento a vacío y calor. El residuo obtenido se purifica en columna cromatográfica de gel de sílice (hexano/EtOAc 70/30 a 1/1) obteniéndose el producto deseado como un sólido cristalino.

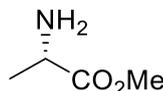
Los aminoácidos/aminas utilizadas son las que se indican a continuación:



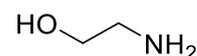
L-Serina metil éster



L-Serina

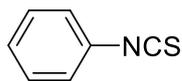


L-Alanina metil éster

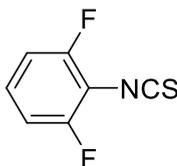


Etanolamina

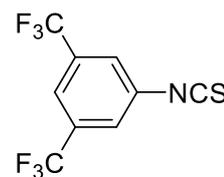
Los diferentes arilisotioisocianatos utilizados fueron:



Fenilisotiocianato



2,6 difluorofenilisotiocianato



3, 5-bistrifluorofenilisotiocianato

- **Técnicas químicas empleadas**

- Técnicas cromatográficas

Cromatografía en capa fina

Técnica eficiente y rápida para determinar el número de compuestos presentes en una mezcla, así como para controlar el progreso de una reacción y cuándo ésta está completada. Se emplearon placas de gel de sílice en las que, con un capilar se aplicó una mínima cantidad de la reacción, del producto de partida y del reactivo, para así comprobar cuánto del producto inicial queda aún sin reaccionar o si se ha agotado por completo, momento en el que se detiene la reacción. Se visualizaron primeramente bajo luz UV y a continuación fueron reveladas con ninhidrina y calor.

- Técnicas de purificación

Purificación en columna (cromatografía líquida)

Esta técnica suele ser utilizada para separar compuestos de baja volatilidad, y en cantidades que pueden variar en un amplio rango, desde miligramos hasta gramos. Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente mezclas de hexano/acetato de etilo de polaridad creciente (desde 70:30 a 50:50, 30:70 y 0:100) pasando a acetato de etilo/metanol (90:10) que se introdujeron en una columna de tamaño dependiente de la cantidad de producto a purificar. Una vez compactado el gel de sílice con la ayuda del eluyente y vacío, se depositó el producto con una pipeta, se abrió la válvula y se dejó fluir el eluyente, depositándolo en diferentes viales que fueron estudiados mediante cromatografía en capa fina.

Cromatotrón

Técnica de cromatografía centrífuga. El principio es el mismo que el de la cromatografía en columna, con una fase estacionaria y un eluyente. En este caso la fase estacionaria es un disco de gel de sílice que gira y va separando los compuestos de diferentes polaridades por acción de la fuerza centrífuga. Tiene diversas ventajas, como el procesado de una mayor cantidad de producto, y la separación en menor tiempo. Al igual que la purificación en columna, el eluyente con el producto se depositó en viales que se analizaron bajo luz UV en placa fina.

- Técnicas espectroscópicas (espectro de masas y resonancia)

Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN):

Los espectros de RMN ^1H se realizaron en un espectrómetro Bruker Advance 400, empleando metanol tetradeuterado (MeOD- d_4) o cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente deuterado, especificado en cada caso.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica no destructiva que proporciona información estructural y estereoquímica de gran interés de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Para la preparación de las muestras se pesaron entre 5 y 10 mg de producto. Las muestras disueltas en el disolvente deuterado oportuno se entregaron en el servicio en un tubo de RMN cerrado y adecuadamente etiquetado.

Espectrometría de masas

Los espectros se realizaron en un espectrofotómetro Waters LCT Premier XE usando la técnica de ionización por electrospray (ESI+-TOF).

La espectrometría de masas es una técnica de análisis instrumental de alta sensibilidad que puede aplicarse tanto al análisis, cualitativo como cuantitativo, de compuestos orgánicos e inorgánicos de bajo y alto peso molecular, y permite la identificación de sustancias, tanto conociendo el valor exacto de su masa (composición elemental), como por la fragmentación de la molécula de interés en iones de menor peso molecular (caracterización estructural). Para la realización de los ensayos, se pesaron en un vial nuevo 0.1 mg de producto y se entregaban en el servicio adecuadamente etiquetado.

- **Diseño experimental: Ensayos biológicos para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento mediante el método de difusión en agar**

Una vez los productos fueron sintetizados y purificados mediante las técnicas anteriormente mencionadas, procedimos al testeo de los mismos con los tres hongos objeto de estudio (*Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*). Para ello se utilizó el método de dilución en agar, con el que se evaluó la actividad antifúngica

de los productos mediante el análisis de la concentración mínima inhibitoria del crecimiento visible de los hongos (MIC) (Balouiri et al., 2016).

Se probaron cinco productos y un control de serina para ver si ésta presentaba actividad antifúngica por si misma. Los productos fueron preparados en tubos Eppendorf y disueltos en etanol o DMSO siguiendo la proporción de 20 mg de sustrato por 500 mL de disolvente. A continuación, en tubos estériles se depositaron las disoluciones de los diferentes sustratos, a diferentes concentraciones (1 mg/mL, 0,5 mg/mL y 0,1 mg/mL) para así determinar la mínima cantidad necesaria para obtener una actividad antifúngica reseñable. En todos los casos se añadió 5 mL de medio de papa dextrosa agar (PDA), medio selectivo recomendado en la bibliografía (Balouiri et al., 2016) para el adecuado crecimiento de hongos, gracias a su contenido en glucosa y su bajo pH. Se emplearon placas de Petri estériles en las que se depositó el producto disuelto en el agar, así como dos controles para cada uno de los hongos.

La inoculación de los hongos se realizó mediante el corte de discos del mismo diámetro obtenidos de hongos subcultivados a partir de cultivos stock en placas de PDA. En cada placa con producto se colocaron 8 discos de los diferentes hongos a la misma distancia unos de otros (Figura 2). En las placas control, por un lado, se adicionó solamente el disolvente utilizado en la dilución de los productos en cada hongo, y por otro la serina inicial, para comprobar si ésta presenta por si sola alguna actividad antimicrobiana frente a alguno de los hongos en estudio.

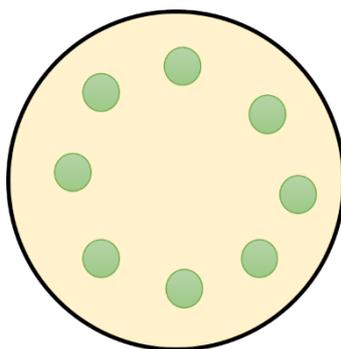


Figura 2: Disposición de los discos en la placa de Petri

- **Análisis de datos**

Al finalizar los ensayos, las placas fueron selladas con Parafilm y puestas a incubar en una estufa a 23 °C y un 70% de humedad durante 48 horas. Pasado este tiempo de incubación, las placas fueron escaneadas y analizadas mediante el programa Image J, con el que se realizaron evaluaciones del diámetro de los discos y el diámetro del crecimiento radial total del hongo en cada uno. Las medidas obtenidas fueron introducidas en el programa Excel, con el que se calculó la media y las desviaciones que presentaban los datos. Para determinar la actividad antifúngica, se utilizó la siguiente fórmula (Salazar et al. 2012).

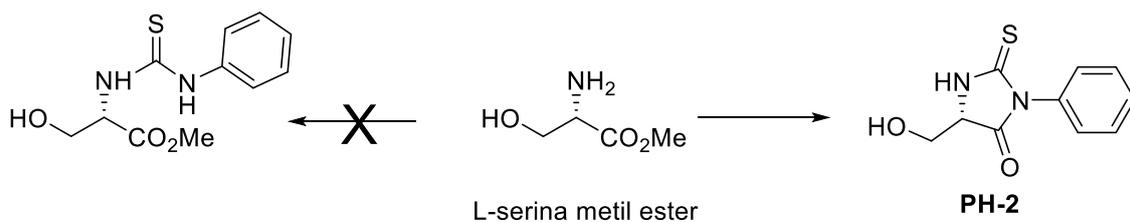
$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{diámetro promedio en PDA sin fungicida} - \text{diámetro promedio en PDA con fungicida})}{\text{diámetro promedio en PDA sin fungicida}} \times 100$$

Se considera que un producto es susceptible de convertirse en un buen antifúngico si supera el 60% de inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **APARTADO QUÍMICO**

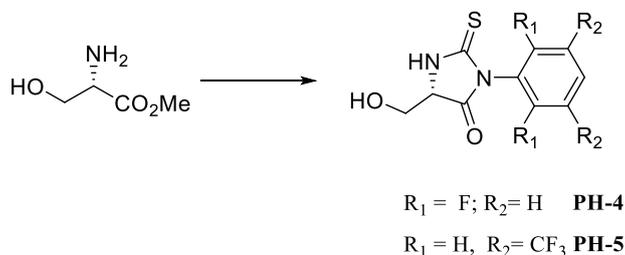
Con la idea de estudiar si diferentes tioureas derivadas de la L-serina podrían tener actividad como antifúngico, comenzamos partiendo de la L-serina metil éster como sustrato de partida y el fenilisotiocianato, siguiendo el protocolo general descrito en la parte de metodología y materiales. Tras una hora de reacción se observó por cromatografía en placa fina que la reacción había acabado y obtenido un compuesto ligeramente menos polar (**PH-2**). Se eliminó el disolvente a vacío y calor, y se obtuvo un sólido cristalino que se purificó por columna de gel de sílice. Sin embargo, su estudio por resonancia reveló la ausencia de la señal correspondiente al metil éster, lo que llevó a replantearse la estructura del producto obtenido. Dicha pérdida también fue confirmada con el espectro de masas, para el que obtuvimos una masa correspondiente a 223 uma, que equivale a la fórmula $C_{10}H_{11}O_2N_2S [M+H]^+$. La única explicación que encontramos es que no se había obtenido la tiourea que esperábamos sino la tiohidantoína correspondiente. Dicha reacción no es inusual, ya que la formación de tiohidantoínas, a partir de aminoácidos, está documentada en la bibliografía (Jangale et al, 2014) (Esquema 2).



Esquema 2: Síntesis de PH-2

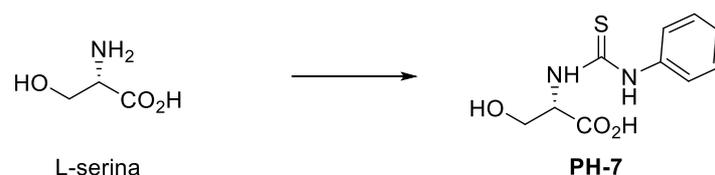
Con la idea de ver si era posible preparar la tiourea correspondiente, se llevó a cabo la reacción a diferentes temperaturas (0 °C y temperatura de reflujo) y con distintos disolventes y bases, pero el resultado fue el mismo, con lo que se decidió mantener las condiciones originales descritas.

A continuación, hicimos la reacción con dos arilisotiocianatos comerciales (Esquema 3). Cuando se utilizó el 2,6-difluorofenilisotiocianato, se obtuvo la correspondiente tiohidantohína **PH-4** como un sólido cristalino y con buen rendimiento (Jangale et al, 2014). Sin embargo, la reacción con 3, 5-bis-(trifluorometil)isotiocianato (**PH-5**) dio muchos problemas. Tiempos de reacción largos, reacciones muy sucias y dificultad en la purificación por lo que se decidió no estudiar este producto.



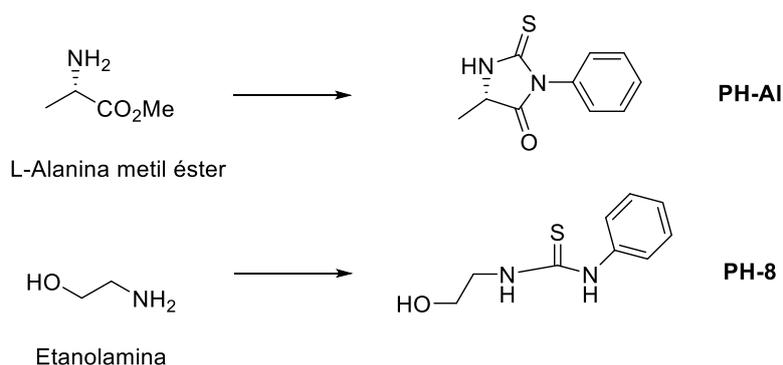
Esquema 3: Síntesis de PH-4 y PH-5

Visto que la presencia del metil éster daba lugar a la tiohidantohína, se decidió hacer la reacción con la L-serina. En esta ocasión, sólo se probó la reacción con el fenilisotiocianato, obteniendo según el espectro de masas la correspondiente tiourea **PH-7**, como un aceite amarillento y con buen rendimiento (Esquema 4).



Esquema 4: Síntesis de PH-7

Finalmente, y para ver algunas variaciones con respecto a la L-serina, se prepararon los derivados correspondientes a la L-alanina metil éster, que se diferencia por la ausencia del grupo hidroxilo en la cadena y la etanolamina, que carece de grupo ácido (Esquema 5). Tal como se esperaba, la alanina metil éster dio lugar a la correspondiente tiohidantoína **PH-AI** (estructura corroborada según espectros de masas y RMN) cuando se hizo reaccionar con el fenilisotiociano (Jangale et al, 2014); mientras que la etanolamina, dio lugar a la correspondiente tiourea **PH-8** (Hirashima et al., 1991).



Esquema 5: Síntesis de PH-AI y PH-8

Se puede observar en la tabla 1 que todos los productos se obtuvieron con buenos rendimientos, especialmente en los casos de la etanolamina (**PH-8**) y de la L- Serina (**PH-7**), superiores al 90%. Hay que indicar también que **PH-7** fue el único producto obtenido como un aceite amarillento, mientras que el resto de los productos fueron sólidos cristalinos blancos.

Todos los productos fueron caracterizados por RMN y espectrometría de masas estando de acuerdo con las estructuras propuestas.

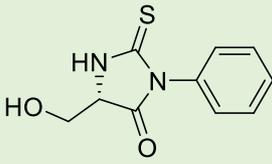
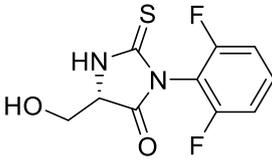
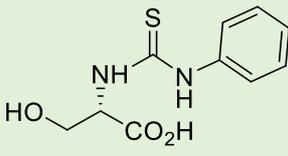
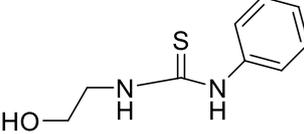
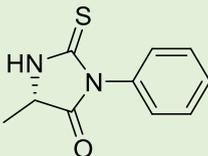
Referencia	Fórmula	Rendimiento	Características
PH-2		77,8%	Sólido cristalino
PH-4		85,3%	Sólido cristalino
PH-7		90,5%	Aceite amarillento
PH-8		92,4%	Sólido cristalino
PH-AI		83,6%	Sólido cristalino

Tabla 1: compuestos sintetizados.

- APARTADO BIOLÓGICO

Los ensayos de actividad biológica se llevaron a cabo mediante el método de dilución de agar, con concentraciones de 1 mg/mL del producto. Si a esta concentración los resultados obtenidos mostraban un porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo superior al 60% (siguiendo la fórmula anteriormente descrita), los compuestos se ensayaron de nuevo disminuyendo la dosis a 0,5 mg/mL y 0,1 mg/mL. Cabe destacar que estos resultados fueron obtenidos con tan solo un ensayo por cada producto, repitiéndose una segunda vez sólo en los casos en los que se obtuvieron valores cuya desviación estándar fue excesivamente alta (como fue el caso de **PH-4** y **PH-8**), por lo que la fiabilidad de las conclusiones obtenidas a partir de ellos pueden no ser las más precisas. Sería interesante, con mayor tiempo del que se dispuso para la realización de este trabajo, reproducir estos experimentos para la obtención de datos estadísticos más robustos.

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los productos sintetizados

- **Control serina**

Inicialmente, se hicieron ensayos utilizando el sustrato de la reacción (L-serina metil éster) como control para comprobar si este tiene algún tipo de actividad antifúngica por sí mismo. Los resultados mostraron que dicho compuesto no inhibe el crecimiento de los hongos estudiados.

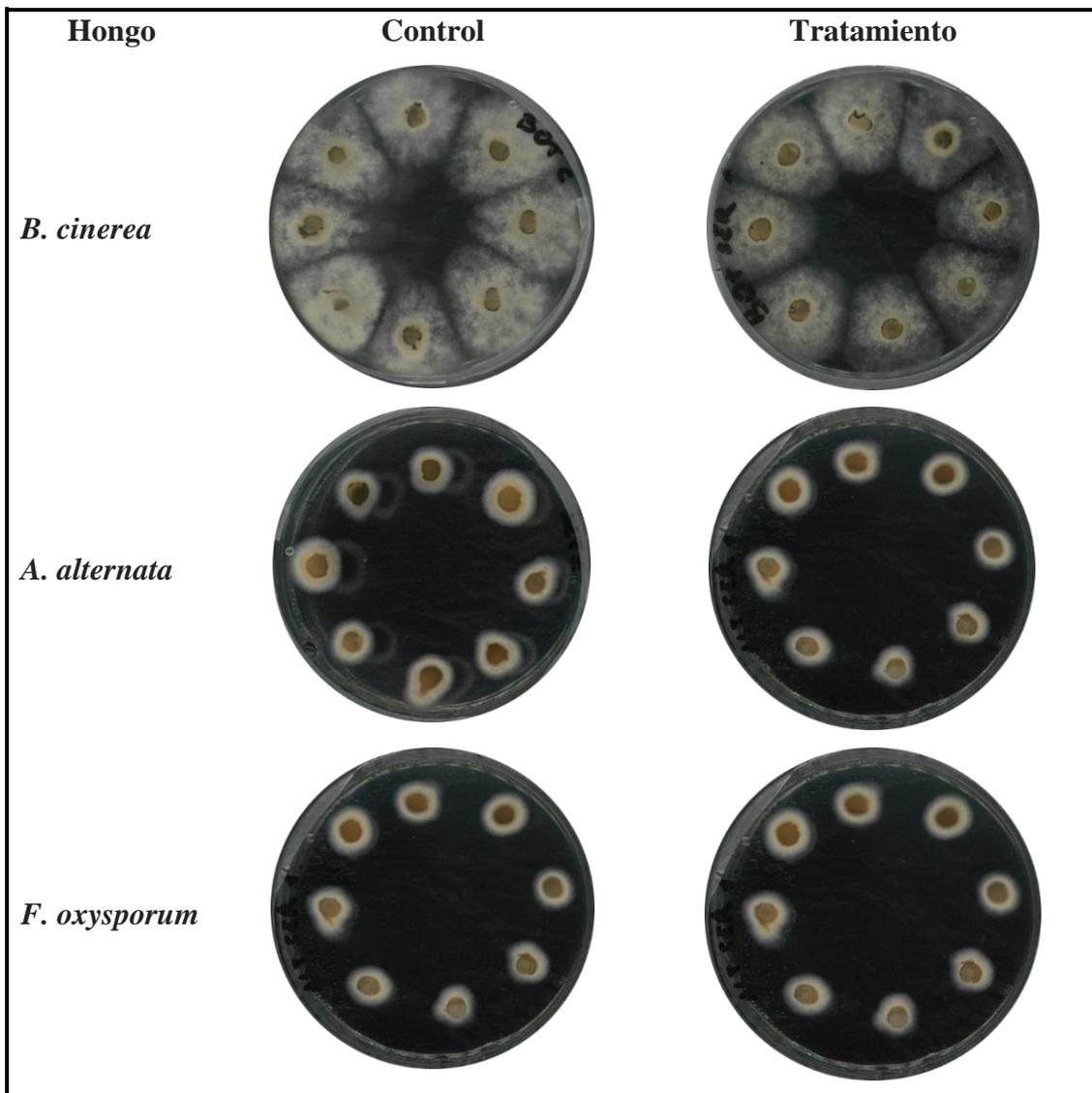
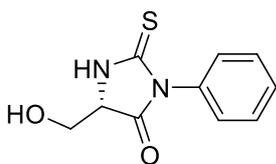


Figura 3: Ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica a 1 mg/mL.

- PH 2

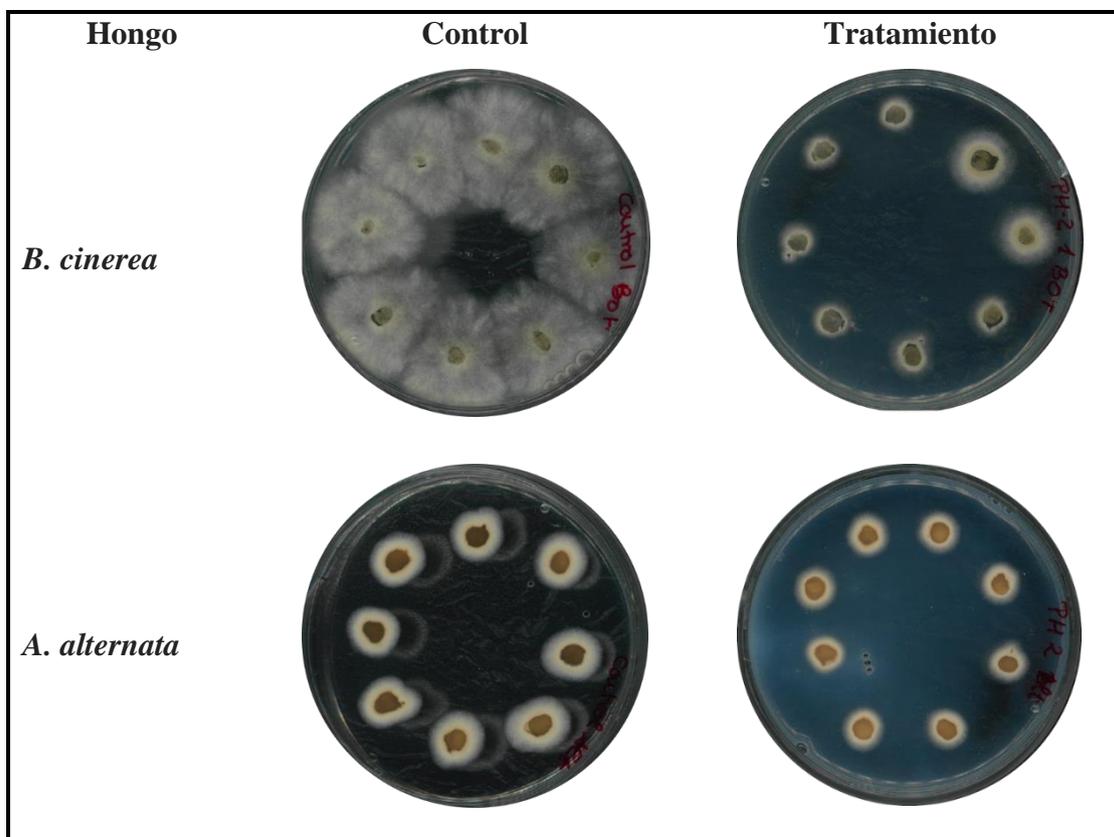


Concentración	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
1 mg/mL	37,40±9,83	74,70±8,75	41,10±10,68
0,5 mg/mL	N.R.	74,25±7,45	N.R.
0,1 mg/mL	N.R.	66,78±12,29	N.R.

Tabla 2: Porcentaje medio de inhibición ± desviación estándar.
N.R. = No realizado

Como se observa en la tabla 2 y figura 4, el compuesto PH-2 (tiohidantoína) presenta una actividad antifúngica destacable contra el hongo *B. cinerea* a una concentración del producto de 1 mg/mL. Al disminuir dicha concentración a 0.5 mg/mL y 0.1 mg/mL, el porcentaje de inhibición sigue superando el 60%, por lo que este producto podría ser un candidato idóneo para el control específico de este hongo.

Sin embargo, los datos obtenidos con los otros dos patógenos fúngicos (*A. alternata* y *F. oxysporum*) reflejan la ineficacia de esta tiohidantoína sintetizada como agente antifúngico.



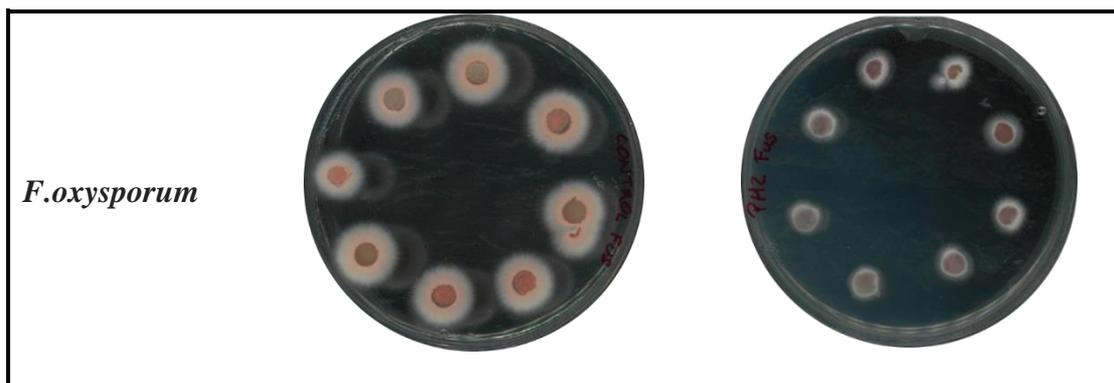
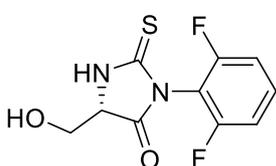


Figura 4: Ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica de PH-2 a 1 mg/mL.

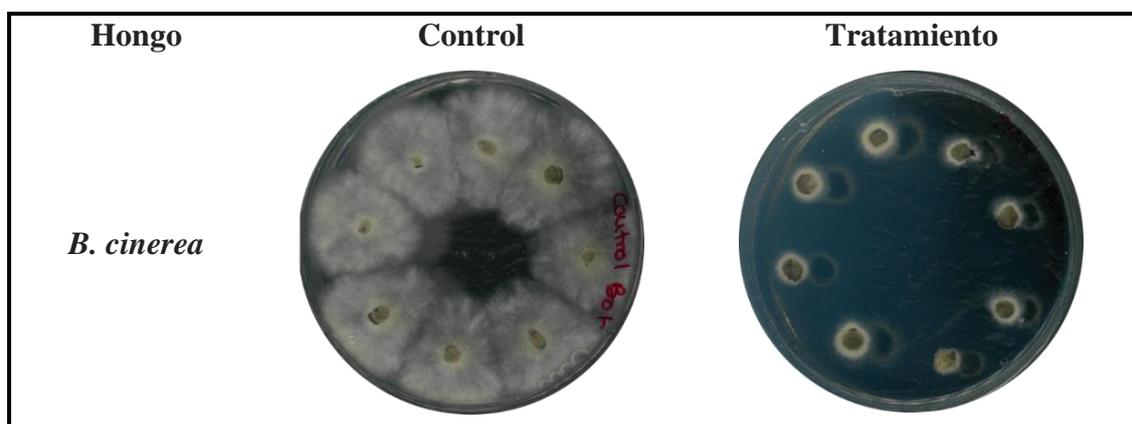
PH4



Concentración	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
1 mg/mL	80,45±6,92	85,77±2,39	42,12±10,16
0,5 mg/mL	65,65±13,60	71,03±7,26	N.R.
0,1 mg/mL	44,81±4,01	31,69±18,06	N.R.

Tabla 3: Porcentaje medio de inhibición ± desviación estándar. N.R. = No realizado.

Con el producto **PH-4**, la 2,6-difluorofeniltiohidantoína, observamos también resultados prometedores contra *B. cinerea* (Tabla 3 y figura 5). El porcentaje medio de inhibición a 1 mg/mL es superior al 85%, y al disminuir la concentración del producto a 0,5 mg/mL y repetir el ensayo, su capacidad inhibitoria media sigue siendo reseñable. Con *A. alternata* vemos que el producto presenta una capacidad antifúngica moderada, superando el 60%, a 0,5 mg/mL, límite para considerar eficaz la acción fungicida. En el caso de *F. oxysporum* observamos una actividad inhibitoria leve, del 40%, por lo que según estos resultados queda descartado para esta especie.



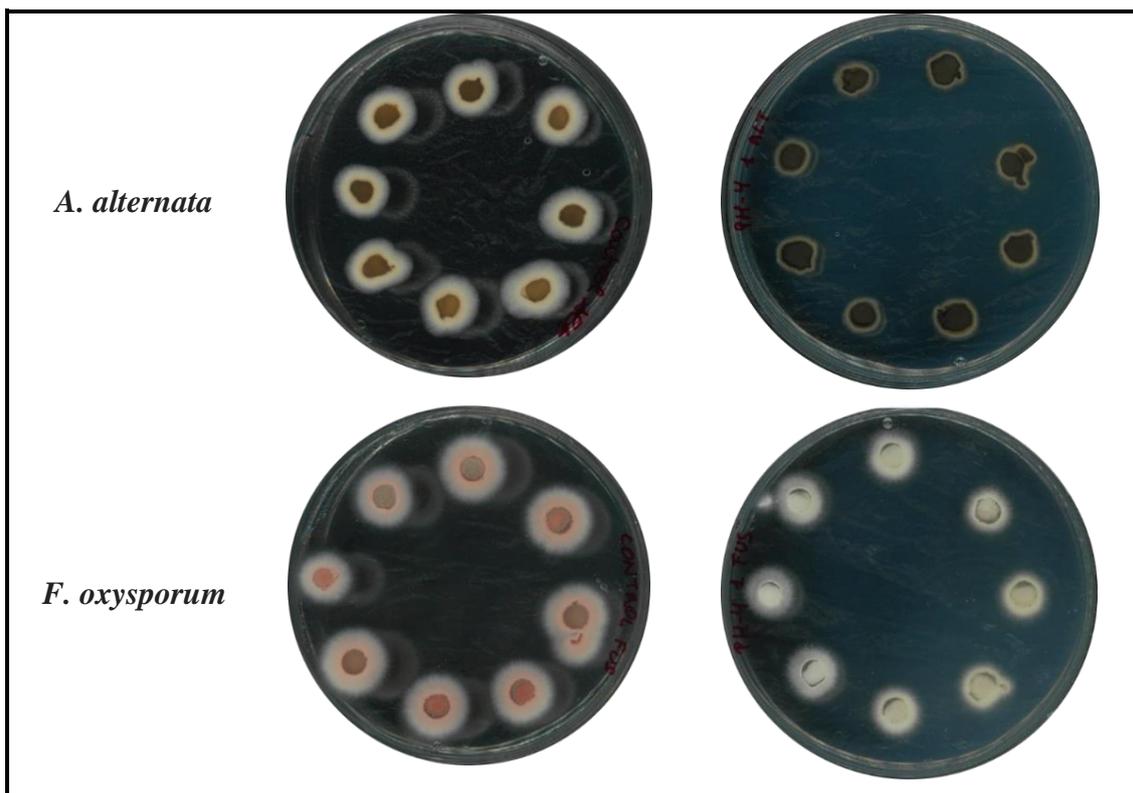
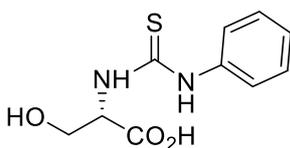


Figura 5: Ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica de PH-4 a 1 mg/mL.

PH7



Concentración	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
1 mg/mL	49,95±10,53	80,97±7,91	50,41±9,65
0,5 mg/mL	N.R.	50,06±5,01	N.R.
0,1 mg/mL	N.R.	27,50±3,59	N.R.

Tabla 4: Porcentaje medio de inhibición ± desviación estándar. N.R. = No realizado.

En el caso de la feniltiourea **PH-7** vemos claramente (Tabla 4 y figura 6) como a 1 mg/mL el producto evidencia su actividad antifúngica contra *B. cinerea*, mientras que para *A. alternata* y *F. oxysporum* la inhibición no es significativa. Sin embargo, al disminuir la concentración del producto para *B. cinerea* a 0,5 mg/mL y a 0,1 mg/mL, la actividad inhibitoria se ve reducida considerablemente (Tabla 4).

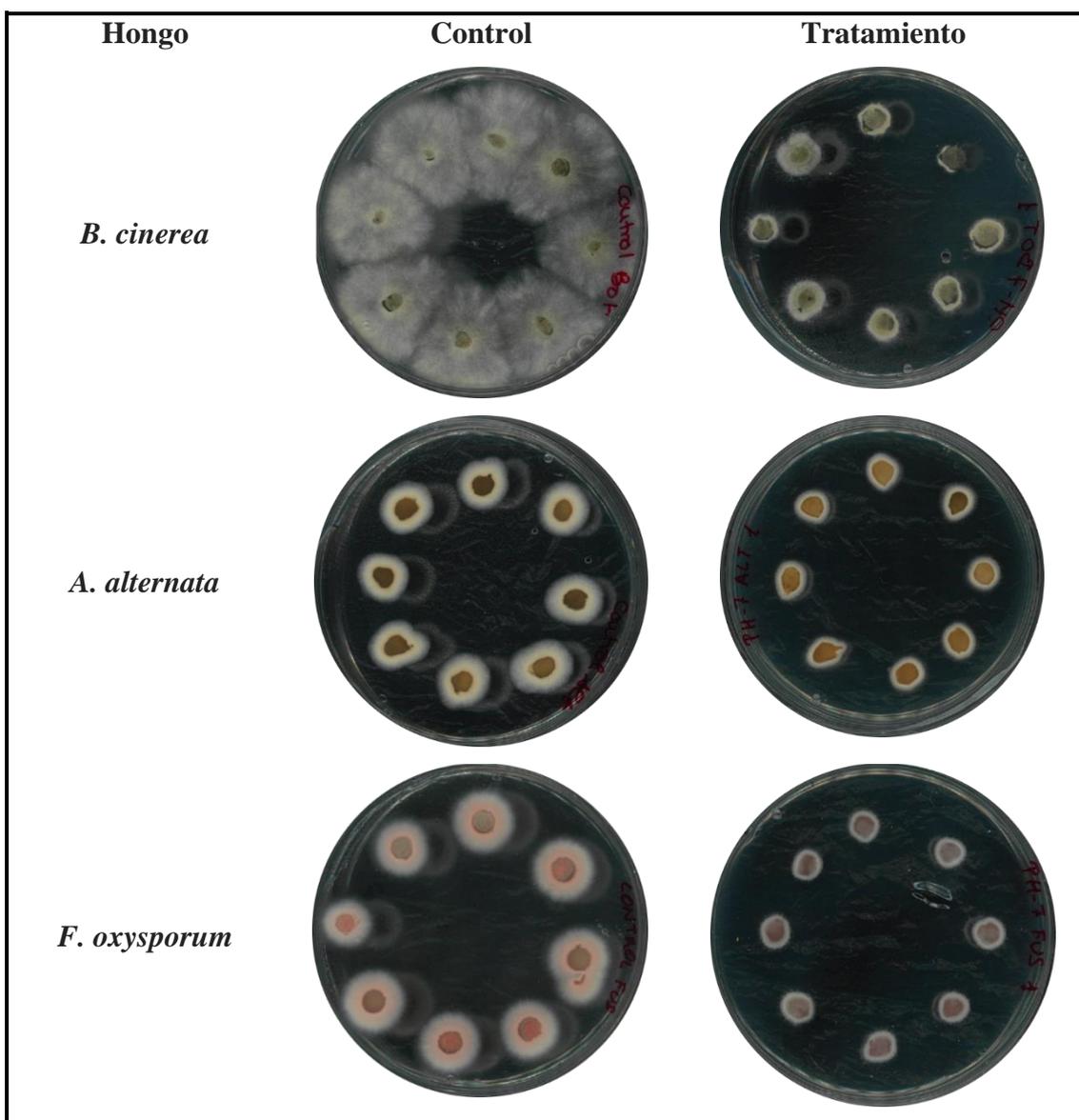
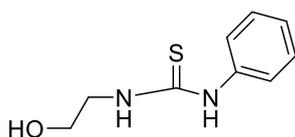


Figura 6: Ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica de PH-7 a 1 mg/mL.

PH8



Concentración	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
1 mg/mL	55,91±7,06	83,11±4,15	10,14±5,45
0,5 mg/mL	44,81±4,01	35,95±23,11	N.R.
0,1 mg/mL	30,67±15,01	37,54±18,90	N.R.

Tabla 5: Porcentaje medio de inhibición ± desviación estándar. N.R. = No realizado

Para la tiourea derivada de la etanolamina (PH-8), se observó una situación parecida a la feniltiourea PH-7. A 1 mg/mL la inhibición en *B. cinerea* es destacable (superior al 80%)

pero al reducir la concentración, el efecto inhibitorio disminuye sobremanera, hasta niveles desdeñables (Tabla 5 y figura 7). Con las otras dos especies de hongos la inhibición fue muy leve.

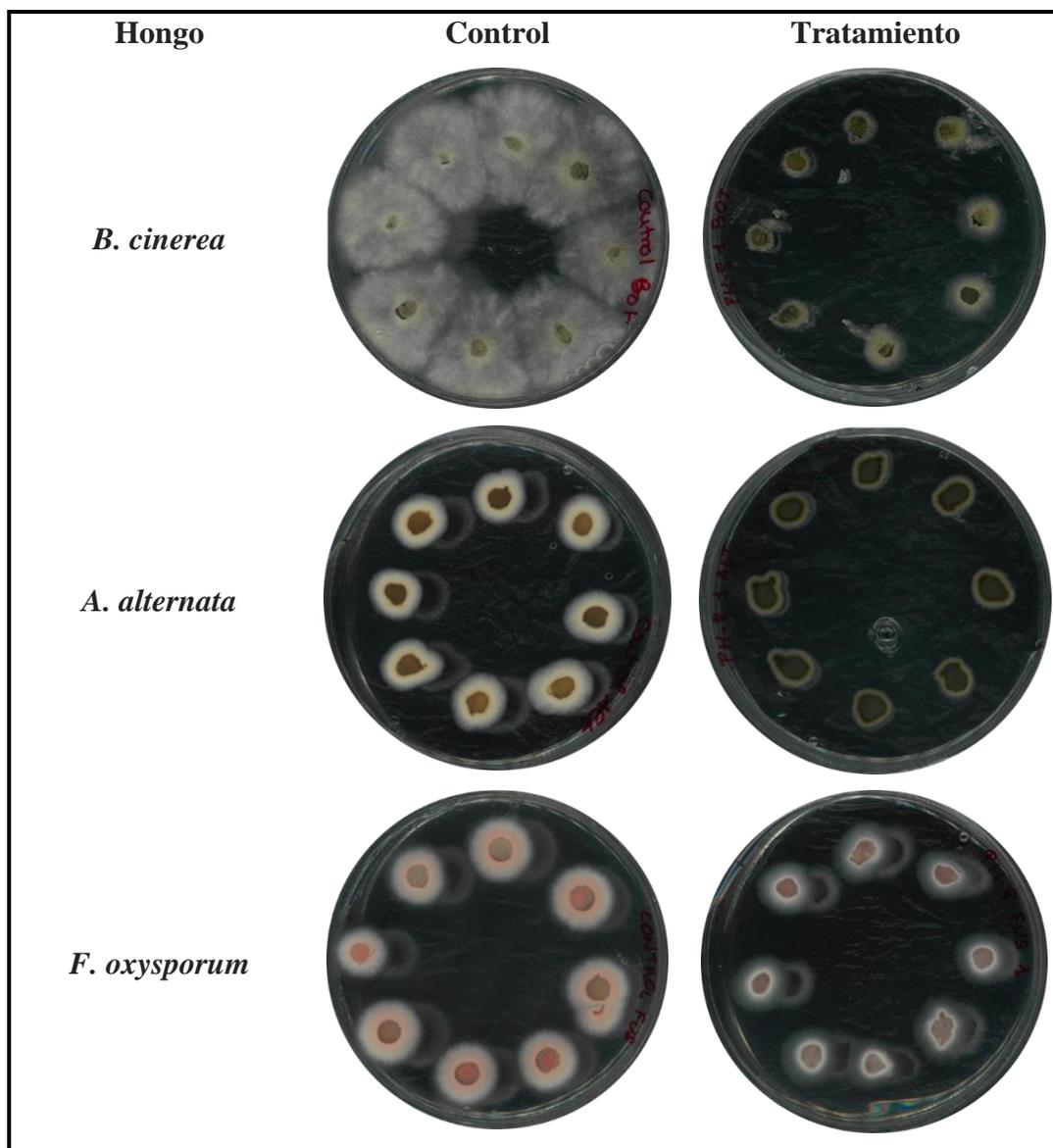
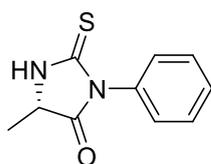


Figura 7: Ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica de PH-8 a 1 mg/mL.

PH-A1



Concentración	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
1 mg/mL	67,29±5,47	85,77±2,39	9,72±5,04
0,5 mg/mL	51,87±6,54	82,11±5,09	N.R.
0,1 mg/mL	13,09±4,65	26,24±12	N.R.

Tabla 6: Porcentaje medio de inhibición ± desviación estándar. N.R. = No realizado.

Con el derivado de la L-alanina (**PH-Al**) a una concentración de 1 mg/mL, se observó inhibición tanto en *B. cinerea* como en *A. alternata* (Tabla 6 y figura 8), siendo, en el primer caso más significativa que en el segundo. Al bajar la concentración, el porcentaje de inhibición disminuye hasta ser poco significativo en *A. alternata*, mientras que en *B. cinerea* se mantiene por encima del 80%. Finalmente, a 0,1 mg/mL el efecto inhibitor del producto sobre el hongo se ve reducido significativamente. En *F. oxysporum* la actividad inhibitoria es casi inexistente.

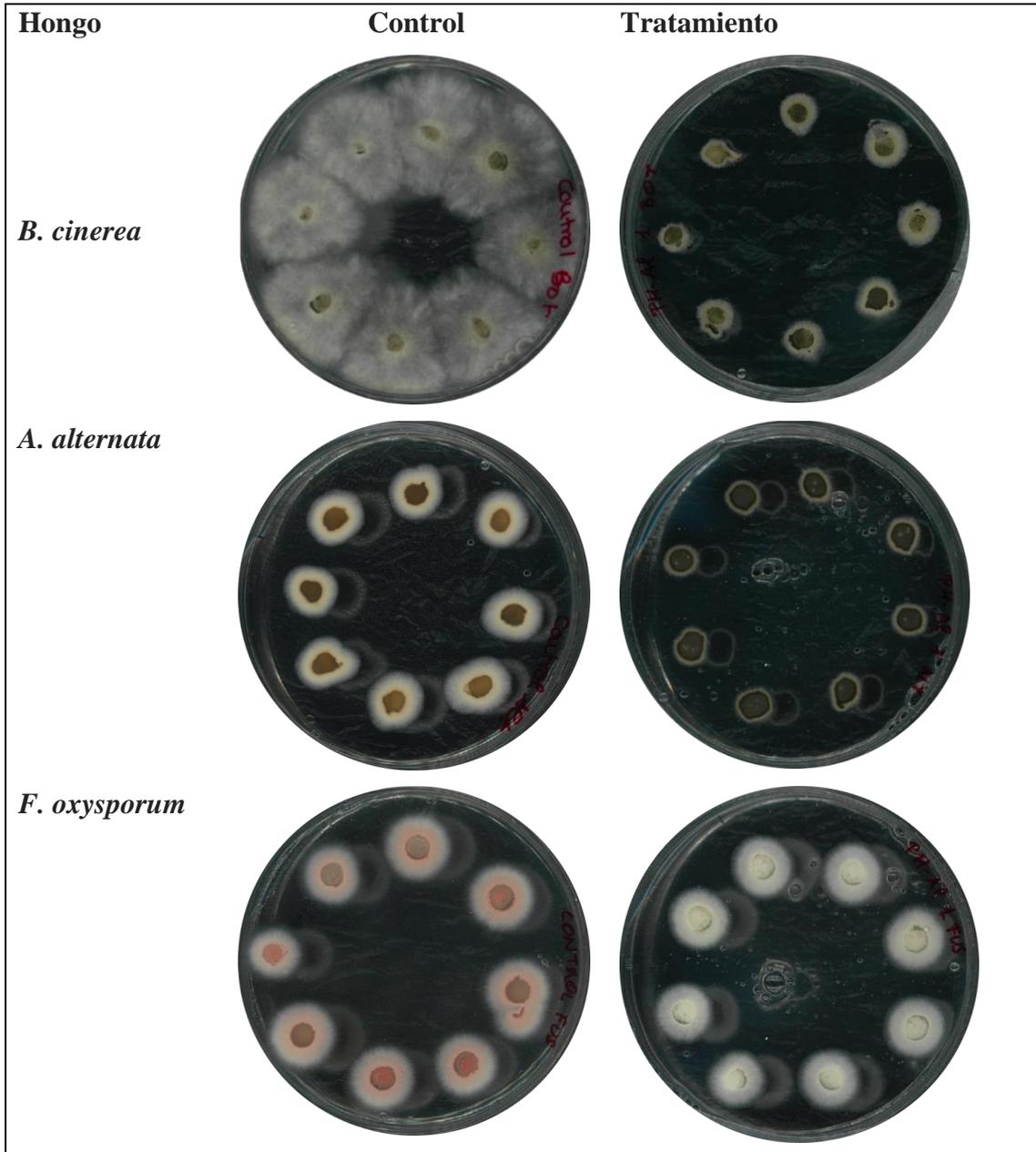


Figura 8: Ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica de PH-Al a 1 mg/mL.

Analizando los resultados en su conjunto, vemos que *F. oxysporum* presenta una alta resistencia a todos los productos sintéticos ensayados, pues ninguno mostró una actividad inhibitoria reseñable a la concentración más alta. En cuanto a *A. alternata* y especialmente *B. cinerea* los resultados son más prometedores. *B. cinerea* es el hongo que mejores resultados presentó, siendo sensible a los productos **PH-2**, **PH-4**, **PH-AI**, **PH-7** y **PH-8**. Los resultados más destacables se obtuvieron con **PH-2** (tiohidantoina), ya que resultó ser activo a la concentración más baja de las ensayadas, lo que demuestra su potencial capacidad antifúngica. En el caso de los productos **PH-AI** y **PH-4**, la concentración mínima inhibitoria (MIC) se encuentra en 0,5 mg/mL del sustrato. Finalmente, en el caso de los productos **PH-7** y **PH-8** vemos que la MIC se sitúa a concentraciones de 1 mg/mL del producto. En *A. alternata*, los datos son más modestos: es sensible para dos de los productos sintetizados a concentraciones de 1 mg/mL, **PH-4** y **PH-AI** (Tabla 8).

Referencia	Concentración	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
PH-2	1 mg/mL	37,40±9,83	74,70±8,75	41,10±10,68
	0,5 mg/mL	N.R.	74,25±7,45	N.R.
	0,1 mg/mL	N.R.	66,78±12,29	N.R.
PH-4	1 mg/mL	80,45±6,92	85,77±2,39	42,12±10,16
	0,5 mg/mL	66,43±9,09	71,03±7,26	N.R.
	0,1 mg/mL	44,81±4,01	31,69±18,06	N.R.
PH-7	1 mg/mL	49,95±10,53	80,97±7,91	50,41±9,65
	0,5 mg/mL	N.R.	50,06±5,01	N.R.
	0,1 mg/mL	N.R.	27,50±3,59	N.R.
PH-8	1 mg/mL	55,91±7,06	83,11±4,15	10,14±5,45
	0,5 mg/mL	44,81±4,01	35,95±23,11	N.R.
	0,1 mg/mL	30,67±15,01	37,54±18,90	N.R.
PH-AI	1 mg/mL	67,29±5,47	85,77±2,39	9,72±5,04
	0,5 mg/mL	51,87±6,54	82,11±5,09	N.R.
	0,1 mg/mL	13,09±4,65	26,24±12	N.R.

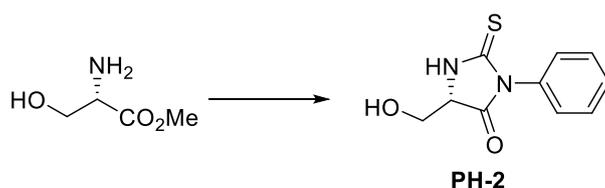
Tabla 8: Resumen del porcentaje de inhibición a concentraciones decrecientes de cada producto utilizado y su desviación estándar. N.R.= No realizado.

Con los datos obtenidos, podemos afirmar que los derivados de la serina, especialmente la feniltiohidantoina **PH-2**, resultan ser selectivos, ya que presentan una inhibición muy destacable del crecimiento de *B. cinerea*, lo cual es ideal ya que lo que se busca principalmente en los nuevos fitosanitarios es que sean más selectivos, además de respetuosos con el medio ambiente. El producto derivado de la etanolamina (**PH-8**) presenta en *B. cinerea* inhibición a una concentración de 1 mg/mL exclusivamente, lo cual nos puede indicar que el grupo carboxilo (-CO₂H) presente en **PH-7**, puede influir en cierto grado en la actividad inhibitoria de los derivados de tioureas. Además, se observa en el caso de *A. alternata* que la ausencia del grupo hidroximetileno aumenta la actividad inhibitoria de la molécula, ya que el derivado de L-alanina (**PH-AI**) presenta mejores resultados en el hongo que el obtenido de la L-serina, la tiohidantoína **PH-2**.

- **Obtención y determinación estructural de los compuestos sintetizados para este estudio**

En este apartado se detallan los datos experimentales y descripción espectroscópica (RMN de protón y espectrometría de masas) de los compuestos sintetizados para este estudio.

PH-2

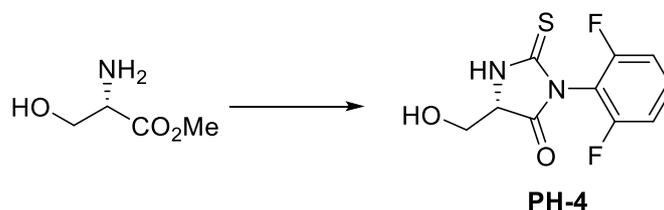


Seguendo el procedimiento general, L-serina metil éster (155.5 mg, 1 mmol) se trató con fenilisotiocianato (0,14 mL, 1.2 mmol) obteniendo después de 1 hora, el compuesto denominado **PH-2** (172.8 mg, 0.78 mmol, 77.8 %) como un sólido cristalino.

Masas (ESI⁺) calculado para C₁₀H₁₁O₂N₂S [M+H]⁺ 223.0541, encontrado 223.0544.

RMN ¹H (400 MHz, MeOD-d₄) δ_H 7.49-7.40 (3H, m, Ar), 7.30-7.28 (2H, m, Ar), 4.37 (1H, dd, *J* = 3.1, 3.1 Hz), 3.99 (1H, dd, *J* = 3.4, 11.8 Hz), 3.92 (1H, dd, *J* = 2.8, 11.8 Hz).

PH-4

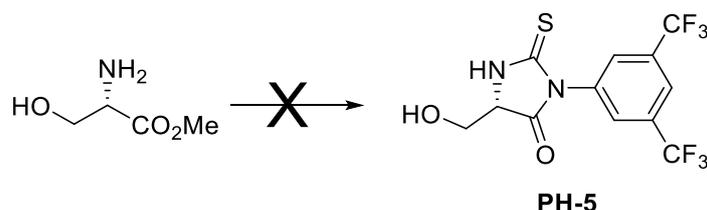


Siguiendo el procedimiento general, L-serina metil éster (155.5 mg, 1 mmol) se trató con 2,6 difluorofenilisotiocianato (0.14 mL, 1.2 mmol) obteniendo después de 1 hora, el compuesto denominado **PH-4** (220.1 mg, 0.85 mmol, 85.3%) como un sólido cristalino.

Masas (ESI⁺) calculado para C₁₀H₉O₂N₂SF₂ [M+H]⁺ 259.0353, encontrado 259.0356.

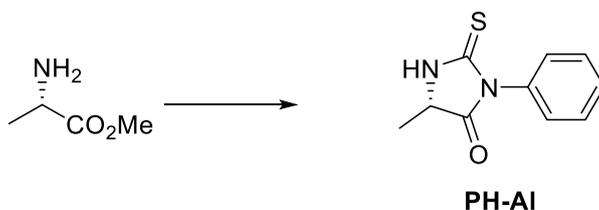
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.37-7.30 (1H, m, Ar), 7.08-7.04 (2H, m, Ar), 5.24 (1H, sa), 4.22 (1H, dd, *J* = 3.2, 11.3 Hz), 4.06 (1H, dd, *J* = 3.1, 11.3 Hz).

PH-5



Siguiendo el procedimiento general, L-serina metil éster (155.5 mg, 1 mmol) se trató con 3,5-bis-(trifluorometilfenil)isotiocianato (0.23 mL). Sin embargo, la reacción mostró por cromatografía en placa fina después de 6 horas, una mezcla compleja de productos que finalmente no fueron analizados. Después de varios intentos se desestimó este producto.

PH-AI

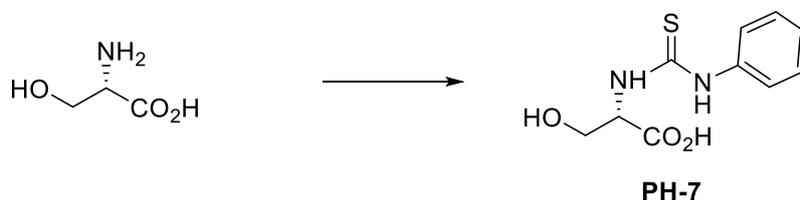


Siguiendo el procedimiento general, L-alanina metil éster (139.5 mg, 1 mmol) se trató con fenilisotiocianato (0.14 mL, 1.2 mmol) obteniendo después de 1 hora, el compuesto denominado **PH-AI** (172.2 mg, 0.83 mmol, 83.6 %) como un sólido cristalino blanco.

Masas (ESI⁺) calculado para C₁₀H₁₁N₂OS [M+H]⁺ 207.0592. Obtenido 207.0591.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.54-7.44 (3H, m, Ar), 7.34-7.32 (2H, m, Ar), 4.36 (1H, q, *J* = 7.1 Hz), 1.61 (3H, d, *J* = 7.1 Hz).

PH-7

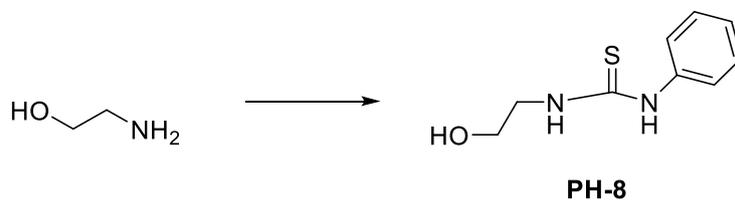


Siguiendo el procedimiento general, L-serina (105 mg, 1 mmol) se trató con fenilisotiocianato (0.14 ml, 1.2 mmol) obteniendo después de 1 hora, el compuesto denominado **PH-7** (95 mg, 0.90 mmol, 90.5 %) como un aceite amarillo.

Masas (ESI⁺) calculado para C₁₀H₁₃O₃N₂S [M+H]⁺ 241.0647, encontrado 241.0652.

RMN ¹H (400 MHz, MeOD-d₄) δ_H 7.44-7.36 (4H, m, Ar), 7.22-7.19 (1 H, m, Ar), 5.15 (1H, sa), 4.01 (1H, dd, *J* = 3.2, 11.1 Hz), 3.98 (1H, dd, *J* = 3.4, 11.1 Hz)

PH-8



Siguiendo el procedimiento general, etanolamina (139 mg, 2.27 mmol) se trató con fenilisotiocianato (0.32 ml) obteniendo después de 1 hora, el compuesto denominado **PH-8** (411 mg, 2.1 mmol, 92.4 %) como un sólido cristalino.

Masas (ESI⁺) calculado para C₉H₁₃N₂SO [M+H]⁺ 197.0749. Obtenido 197.0748.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.70 (1H, sa), 7.47-7.43 (2H, m, Ar), 7.36-7.32 (1H, m, Ar), 7.27-7.24 (2H, m, Ar), 6.47 (1H, sa), 3.87-3.85 (4H, m), 1.99 (1H, sa).

CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la preparación de dos tioureas y tres tiohidantoínas derivadas de L-serina y análogos, por reacción de los correspondientes aminoácidos o aminas con diferentes arilisotiocianatos, con tiempos relativamente cortos y en buen rendimiento.
- Se realizó un cribado *in vitro* de los productos sintetizados, para estudiar la posible actividad antifúngica que presentan sobre los hongos *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Se identificaron productos con potencial para ser considerados de interés para el control de los fitopatógenos mencionados, ya que presentaron un porcentaje de inhibición superior al 60%.
- En *B. cinerea* las tioureas y las tiohidantoínas mostraron un resultado muy prometedor, especialmente estas últimas, cuyas concentraciones mínimas de inhibición se encuentran en 0,5 mg/mL y, en el caso de PH-2, hasta en 0,1 mg/mL sigue siendo efectiva. En *A. alternata* también son las tiohidantoínas las que mejores resultados obtuvieron, pero en este caso con datos mucho más moderados. En el resto de los productos no se observó inhibición destacable para este hongo. Finalmente, para *F. oxysporum*, ningún producto sintetizado presentó potencial inhibitorio reseñable.
- Sería necesario continuar con estos ensayos para poder obtener datos más sólidos.

CONCLUSIONS

- The preparation of two thioureas and three thiohydantoins derived from L-serine and analogues, by reaction of the corresponding amino acids or amines with different arylisothiocyanates, was carried out with relatively short times and in good yield.
- *In vitro* screening of these products was carried out to study their possible antifungal activity on the fungi *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. Products with potential to be considered of interest for the control of the mentioned phytopathogens were identified, since they present a percentage of inhibition higher than 60%.
- In *B. cinerea* thioureas and thiohydantoins showed very promising results, especially the latter, whose minimum inhibition concentrations are found at 0,5 mg/mL and, in the case of PH-2, up to 0,1 mg/mL they are still effective. In *A.*

alternata, thiohydantoin were also the ones that obtained the best results, but in this case, with much more moderate data. In the rest of the products, no notable inhibition was observed for this fungus. Finally, for the *F. oxysporum*, no synthesized product presented notable inhibitory potential.

- It would be necessary to continue with these tests in order to obtain more relevant data.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Arbeláez Torres, G. (2000). *Algunos aspectos de los hongos del genero fusarium y de la especie fusarium oxysporum*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Centro Editorial.
- 2) Babiceanu, M. C., Howard, B. A., Rumore, A. C., Kita, H., & Lawrence, C. B. (2013). Analysis of global gene expression changes in human bronchial epithelial cells exposed to spores of the allergenic fungus, *Alternaria alternata*. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00196>
- 3) Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016b, abril). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- 4) Benito, E. P., Arranz, M., & Eslava, A. P. (1999). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S43-S46.
- 5) Encinas-Basurto, D., Valenzuela-Quintanar, M. I., Sánchez-Estrada, A., Tiznado-Hernández, M. E., Rodríguez-Félix, A., & Troncoso-Rojas, R. (2017, septiembre). Alterations in volatile metabolites profile of fresh tomatoes in response to *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 1912 infection. *Chilean journal of agricultural research*, 77(3), 194-201. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392017000300194>
- 6) Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2003, marzo). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157(3), 493-502. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x>
- 7) Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M. E., Romero, G., Silvera, E., González, P., Rebellato, J., Ferreira, Y., & Bentancur, O. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia (Uruguay)*, 16, 97-107.

http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482012000100012&lng=es&tlng=es.

- 8) Hirashima, A., Yoshii, Y., & Eto, M. (1991, octubre). Synthesis and Biological Activity of 2-Aminothiazolines and 2-Mercaptothiazolines as Octopaminergic Agonists. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(10), 2537-2545. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10871030>
- 9) Huang, Y., Guo, Z., Song, H., Liu, I., Wang, L., Wang, Q. (2018) Design, Synthesis, and Biological Activity of β -Carboline Analogues Containing Hydantoin, Thiohydantoin, and Urea Moieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(31), 8253-8261. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03087>
- 10) Jangale, A. D., Kumavat, P. P., Wagh, Y. B., Tayade, Y. A., Mahulikar, P. P., & Dalal, D. S. (2014, 13 diciembre). Green Process Development for the Synthesis of Aliphatic Symmetrical *N,N'*-Disubstituted Thiourea Derivatives in Aqueous Medium. *Synthetic Communications*, 45(3), 376-385. <https://doi.org/10.1080/00397911.2014.963876>
- 11) Knox, J. R., Toia, R. F., & Casida, J. E. (1992, mayo). Insecticidal thioureas: preparation of [phenoxy-4-3H] diafenthiuron, the corresponding carbodiimide, and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5), 909-913. <https://doi.org/10.1021/jf00017a043>
- 12) Min, L. J., Zhai, Z. W., Shi, Y. X., Han, L., Tan, C. X., Weng, J. Q., Li, B. J., Zhang, Y. G., & Liu, X. H. (2019, 1 julio). Synthesis and biological activity of acyl thiourea containing difluoromethyl pyrazole motif. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 195(1), 22-28. <https://doi.org/10.1080/10426507.2019.1633530>
- 13) Salazar, E., R. Hernández, A. Tapia, y L. Gómez-Alpizar. 2012. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agron. Costarricense* 36(1):53-68. doi:10.15517/rac.v36i1.9964
- 14) Solfrizzo, M., Girolamo, A. D., Vitti, C., Tylkowska, K., Grabarkiewicz-Szczęśna, J., Szopińska, D., & Dorna, H. (2005, abril). Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 302-308. <https://doi.org/10.1080/02652030500058379>

- 15) Tortora, A., Ciampi, L., & González, S. (1994). Características culturales y biológicas en cepas de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., aisladas en la novena y décima regiones. *Agricultura técnica*, 54 (3), 243-251.
- 16) Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014, 19 noviembre). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.
<https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- 17) Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014b, noviembre 19). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.
<https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- 18) Walters, D. (2009, 13 abril). *Disease Control in Crops: Biological and Environmentally-friendly Approaches* (1.^a ed.). Wiley-Blackwell.