

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del catálogo en línea, página web y Repositorio Institucional del CRAI-USTA, así como en las redes sociales y demás sitios web de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor, nunca para usos comerciales.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

**Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación, CRAI-USTA
Universidad Santo Tomás, Bucaramanga**

Síntesis de Compuestos de Cu (II) y Zn (II) con ligandos Salen, caracterización estructural y evaluación de la actividad fungistática contra *Botrytis cinérea* DMS 5144; y *Fusarium sp*

Cristian Camilo Rosas Rueda

Tesis de grado para optar el título de Magíster en Ciencias y Tecnologías Ambientales

Director

Hernando Alberto Camargo García. *Qco., Ph.D*

Codirectores

José Antonio Henao Martínez. *Qco. M.Sc. Ph.D*

Inés Hernández Celi. *Bact. M.Sc*

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de Ingenierías y Arquitectura

Facultad de Química Ambiental

Maestría en Ciencias y Tecnologías Ambientales

2019

Tabla de contenido

	pág.
Introducción	12
1. Síntesis de Compuestos de Cu (II) y Zn (II) con ligandos Salen, caracterización estructural y evaluación de la actividad fungistática contra <i>Botrytis cinérea</i> DMS 5144; y <i>Fusarium sp</i>	14
1.1 Objetivos	14
1.1.1 Objetivo General	14
1.1.2 Objetivo Específicos	14
2. Marco Referencial.....	15
2.1 Marco Teórico.....	15
2.1.1 Bases de Schiff.....	15
2.1.2 Compuestos de Coordinación de Cobre (II) y Zinc (II).....	17
2.1.3. Hongo <i>Fusarium sp</i>	17
2.1.4 Hongo <i>Botrytis cinérea</i>	19
2.1.5 Técnicas Analíticas Instrumentales.....	20
2.2. Marco de Antecedentes.....	23
3. Diseño Metodológico.....	31
3.1. Aspectos Generales.....	31
3.1.1 Reactivos.....	31
3.1.2 Materiales.....	32
3.2. Síntesis de ligandos tipos bases de Schiff.....	33

3.2.1. Síntesis Orgánica Convencional.	33
3.2.2. Mecanosíntesis.	34
3.3. Síntesis de compuestos de coordinación de Zn (II) y Cu (II).	34
3.4. Caracterización de los compuestos obtenidos.	35
3.4.1. Espectrometría Infrarrojo (FT-IR).	36
3.4.2. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).	36
3.4.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	36
3.4.4 Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-vis).	36
3.4.5 Caracterización cristalográfica de los compuestos obtenidos (bases de Schiff y compuestos de coordinación).	37
3.5 Determinación de la actividad fungistática de los compuestos obtenidos.	39
4. Resultados y Discusión.	41
4.1 Obtención de ligandos tipo base de Schiff por procesos convencionales.	41
4.1.1 Obtención de N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina (3a).	41
4.1.2 Obtención de N1,N2-di(5-bromo)di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3b).	41
4.2 Obtención de ligandos tipo base de Schiff por mecano-síntesis.	41
4.2.1 Obtención de N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a).	41
4.2.2 Obtención de N1, N2-di(5-bromo)di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3b).	42
4.3 Caracterización cristalográfica de los ligandos tipo base de Schiff.	42
4.3.1 Caracterización cristalográfica de N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a).	

4.3.2 Caracterización cristalográfica de N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a) obtenido por mecanosíntesis	43
4.3.3 Caracterización estructural por Difracción de rayos-X de Monocristal de N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a).....	44
4.3.4 Caracterización cristalográfica de N1,N2-di(5-bromo)di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3b).	48
4.4 Obtención de los compuestos de coordinación de Zn (II) y Cu (II)	49
4.4.1 Obtención del compuesto de coordinación de Zn (II)	49
4.4.2 Obtención del compuesto de coordinación de Cu (II)	50
4.5 Caracterización cristalográfica de los compuestos de coordinación de Zn(II) y Cu(II).	53
4.5.1 Caracterización cristalográfica del compuesto 5 ^a	53
4.5.2 Caracterización cristalográfica del compuesto 5b.	54
4.6 Evaluación de las propiedades fungistáticas de los compuestos obtenidos.....	55
4.6.1 Evaluación de propiedades fungistáticas contra Fusarium sp.....	55
4.6.1 Evaluación de propiedades del compuesto N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a).....	56
4.6.2 Evaluación de propiedades fungistáticas contra Botrytis cinerea DMS 5144.	60
5. Conclusiones.....	69
6. Recomendaciones	71
Referencias Bibliográficas	72
Apéndices.....	81

Lista de tablas

	pág.
Tabla 1. <i>Listado de reactivos usados en el proyecto.</i>	32
Tabla 2. <i>Indicadores del refinamiento del compuesto N^1, N^2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina (3a)</i>	47
Tabla 3. <i>Porcentajes de inhibición de las bases de Schiff y compuestos de coordinación sintetizados frente a <i>Fusarium sp</i></i>	56
Tabla 4. <i>Imágenes <i>Fusarium sp</i>, control y <i>Fusarium sp</i> efecto del compuesto 3a concentración 0,125 mg/mL, a 8 días.</i>	58
Tabla 5. <i>Porcentajes de inhibición de las bases de Schiff y compuestos de coordinación sintetizados. frente a <i>Botrytis cinerea</i></i>	61
Tabla 6. <i>Fotografía <i>Botrytis cinerea</i>, control y efecto de los compuestos 3a y 3b mg/mL.</i>	68

Lista de figuras

	pág.
<i>Figura 1.</i> Grupo Azometino (Rodríguez Ramírez, 2009).....	15
<i>Figura 2.</i> Esquemización del Mecanismo de formación de las iminas	16
<i>Figura 3.</i> Esquema de la ley de Bragg.....	21
<i>Figura 4.</i> Estructura molecular Quitosano.....	23
<i>Figura 5.</i> Reacción general para la formación de diiminas derivadas de N1,N2-dibencilidenbenceno-1,2-di-imina.	34
<i>Figura 6.</i> Reacción general para la formación de compuestos de coordinación de Zn (II) y Cu (II).	35
<i>Figura 7.</i> Ecuación porcentaje de inhibición de crecimiento.	40
<i>Figura 8.</i> Perfil de Difracción de Rayos-X del compuesto 3a.....	43
<i>Figura 9.</i> Perfil de Difracción de Rayos-X del compuesto 3a obtenido por mecosíntesis.	44
<i>Figura 10.</i> Unidad asimétrica del compuesto N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina (3a).	45
<i>Figura 11.</i> Representación de la celda unidad del compuesto N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina (3a).	46
<i>Figura 12.</i> Superposición de los perfiles obtenidos del compuesto 3a.....	47
<i>Figura 13.</i> Perfil de Difracción de Rayos-X del compuesto 3b.	48
<i>Figura 14.</i> Estructura propuesta del compuesto 4a.	49
<i>Figura 15.</i> Estructura propuesta del compuesto 4b.	50

<i>Figura 16.</i> Estructura propuesta del compuesto 5a.	51
<i>Figura 17.</i> Estructura propuesta del compuesto 5a1.	52
<i>Figura 18.</i> Estructura propuesta del compuesto 5b.	53
<i>Figura 19.</i> Perfil de Difracción del compuesto 5a.....	54
<i>Figura 20.</i> Perfil de Difracción del compuesto 5b.	55
<i>Figura 21.</i> Cinética de crecimiento <i>Fusarium</i> sp, frente a compuesto 3a.....	57
<i>Figura 22.</i> Concentración mínima inhibitoria del compuesto 3a.	60
<i>Figura 23.</i> Cinética de crecimiento <i>Botrytis</i> sp, frente a compuesto 3a.	62
<i>Figura 24.</i> Curva % de inhibición Vs Concentración a 8 días de crecimiento, para el compuesto 3a y su efecto sobre <i>Botrytis cinerea</i> DMS 5144.....	63
<i>Figura 25.</i> Concentración mínima inhibitoria del compuesto 3a.	64
<i>Figura 26.</i> Cinética de crecimiento <i>Botrytis cinerea</i> , frente a compuesto 3b.....	65
<i>Figura 27.</i> Curva % de inhibición Vs Concentración, para el compuesto 3b y su efecto sobre <i>Botrytis</i> sp.	66
<i>Figura 28.</i> Concentración mínima inhibitoria del compuesto 3b.	67

Lista de Apéndices

Apendice 1. Cinética de crecimiento <i>Fusarium</i> sp, frente al compuesto 3b.	81
Apendice 2. Cinética de crecimiento <i>Fusarium</i> sp, frente al compuesto 4a.	82
Apendice 3. Cinética de crecimiento <i>Fusarium</i> sp, frente al compuesto 4b.	83
Apendice 4. Cinética de crecimiento <i>Fusarium</i> sp, frente al compuesto 5a.	84
Apendice 5. Cinética de crecimiento <i>Fusarium</i> sp, frente al compuesto 5a1.	85
Apendice 6. Cinética de crecimiento <i>Fusarium</i> sp, frente al compuesto 5b.	86
Apendice 7. Cinética de crecimiento <i>Botrytis cinerea</i> , frente al compuesto 4a.	87
Apendice 8. Cinética de crecimiento <i>Botrytis cinerea</i> , frente al compuesto 4b.	88
Apendice 9. Cinética de crecimiento <i>Botrytis cinerea</i> , frente al compuesto 5a.	89
Apendice 10. Cinética de crecimiento <i>Botrytis cinerea</i> , frente al compuesto 5a1.	90
Apendice 11. Cinética de crecimiento <i>Botrytis cinerea</i> , frente al compuesto 5b.	91

Resumen

La síntesis de nuevos materiales con propiedades antifúngicas y/o fungistáticas, es de amplio interés a nivel agroindustrial y farmacéutico debido a la múltiple resistencia que vienen presentando los hongos al control químico que se ofrece actualmente en el mercado. Como estrategia de apoyo a esta situación problemática, se propuso la síntesis de diversos compuestos tipo bases de Schiff para ser empleados como ligandos en compuestos de coordinación con sales metálicas de cobre (II) y zinc (II). El éxito de los procesos de síntesis se comprobó por caracterización molecular empleando diversas técnicas analíticas instrumentales como: Espectroscopía Infrarroja (IR), Espectrometría de masas (EM), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Ultravioleta Visible (UV-Vis), caracterización cristalográfica por Difracción de Rayos-X de polvo y caracterización estructural mediante estudio por DRX de monocristales. Finalmente se evaluaron los compuestos obtenidos como posibles agentes fungistáticos sobre cepas de interés fitopatológico en la región y el país como lo son: *Botrytis cinérea* DMS 5144; principal agente causal del moho gris en frutas y *Fusarium sp*; agente causal de la antracnosis y pudrición de verduras y frutas.

Palabras Clave: Bases de Schiff, Química de Coordinación, Caracterización estructural, Actividad antifúngica.

Abstract

The synthesis of new materials with antifungal properties, of wide interest at agroindustrial and pharmaceutical areas due to the multiple resistances that the fungi present to the chemical control currently offered in the market. As a support strategy for this problematic situation, it is proposed to carry out various organic tests of Schiff base compounds, as ligands in coordination compounds with sales of copper (II) and zinc (II). The success of the synthesis processes can be verified by molecular characteristics using several instrumental analytical techniques such as: Infrared Spectroscopy (IR), Mass Spectrometry (MS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Visible Ultraviolet (UV-Vis), crystallographic characterization by Diffraction of X-ray powder, structural characterization by study of monocrystals. Finally, the following were evaluated as possible fungistic agents on the strains of phytopathogenic interest in the region and the country as: *Botrytis cinerea* DMS 5144; main causative agent of gray mold in fruits and *Fusarium* sp; causal agent of anthracnose and rotting of vegetables and fruits.

Keywords: Schiff bases, Coordination Compounds, Structural Characterization, antifungal.

Introducción

Los compuestos químicos de origen sintético o natural empleados para el tratamiento de diversas patologías de origen fúngico, cada vez son menos eficientes debido a la resistencia que este tipo de organismos exhiben frente a los tratamientos convencionales (Espinel-Ingroff, 2008). La búsqueda de alternativas que permitan disminuir el impacto económico que causan éstos patógenos en la agroindustria, enfoca el interés de recientes investigaciones a desarrollar nuevos materiales bioactivos con mayor efectividad sobre cepas fúngicas (Abdel-Rahman, El-Khatib, Nassr, Abu-Dief, & Lashin, 2013). Las bases de Schiff, o iminas, son un tipo de compuesto orgánico que ha presentado actividad biológica antifúngica, antibacterial, antiviral y antimicrobiana, entre otras, por lo que son ampliamente utilizadas para este propósito (Salehi et al., 2015). De igual manera, se ha comprobado que la inclusión de las iminas como ligandos en compuestos de coordinación promueve una mayor actividad biocida contra diferentes microorganismos (Kursunlu, Guler, Sevgi, & Ozkalp, 2013).

En esta investigación se planteó la síntesis de compuestos orgánicos a partir de 1,2-fenilendiamina y diferentes derivados del 2-hidroxibenzaldehído, para ser incluidos como ligandos en compuestos de coordinación de cobre (II) y zinc (II), se realizó la caracterización molecular, por técnicas instrumentales como: Espectroscopía Infrarroja (IR), Espectrometría de masas (EM), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Ultravioleta Visible (UV-Vis), para posteriormente, determinar las características cristalográficas (sistema cristalino, grupo espacial y constantes de celda unidad) mediante difracción de rayos-X de muestras policristalinas (DRXP) y, en los procesos de cristalización efectivos (evaporación de solvente y enfriamiento de la solución), se determinó la estructura cristalina de los ligandos y los compuestos

organometálicos mediante difracción de rayos-X de monocristales. Finalmente, se evaluó la actividad biológica como agentes fungistáticos de *Botrytis cinerea* DMS 5144 y *Fusarium sp* tanto de los ligandos orgánicos como de los compuestos de coordinación sintetizados (Mounika, Pragathi, & Gyanakumari, 2010; Thakor, Patel, & Patel, 2011).

La hipótesis en la cual se fundamenta este trabajo se basa en que numerosos compuestos tipo base de Schiff poseen actividad biológica característica, la cual se ve incrementada al coordinar este tipo de compuestos con metales de transición. Esta actividad biológica, tanto de las iminas como de los compuestos de coordinación, está documentada en publicaciones como las hechas por K. Mounika y colaboradores quienes en 2010 reportaron la síntesis de diversas iminas y sus respectivos compuestos de coordinación obteniendo como resultado que los compuestos orgánicos presentaron una fuerte actividad biológica como agente antagonista de las cepas fúngicas *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* igualmente evidenciando que esta actividad fue incrementada al coordinar los compuestos orgánicos con metales de transición como cobre (II) y zinc (II) (Mounika et al., 2010).

Adicionalmente se realizó la síntesis mediante procesos convencionales y haciendo uso de principios de química verde con énfasis en aquellos que implican la reducción de sustancias auxiliares, compuestos derivados o residuos y la eficiencia energética y atómica de los procesos (Nudelman, 2004).

Los resultados derivados con esta investigación pretenden ser un aporte importante frente a la problemática actual generada para la agroindustria en general, debido a la resistencia que desarrollan los organismos patógenos frente a los tratamientos actuales y contemporáneos (Cervera, 2012; Espinel-Ingroff, 2008; Pontón & Quindós, 2006) al igual que se promueve la obtención de materiales químicos con alto valor agregado mediante principios de química verde.

1. Síntesis de Compuestos de Cu (II) y Zn (II) con ligandos Salen, caracterización estructural y evaluación de la actividad fungistática contra *Botrytis cinérea* DMS 5144; y *Fusarium sp*

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General. Evaluar la actividad fungistática de compuestos orgánicos tipo iminas y compuestos de coordinación de Cu (II) y Zn (II) contra cepas fitopatógenas *Botrytis cinérea* DMS 5144 y *Fusarium sp*.

1.1.2 Objetivo Específicos

- Sintetizar bases de Schiff a partir de la 1,2-fenilendiamina y derivados del benzaldehído mediante métodos convencionales y empleando principios de química verde.
- Sintetizar compuestos de coordinación de Cu (II) y Zn (II) utilizando bases de Schiff como ligandos.
- Caracterizar estructuralmente mediante técnicas de difracción de rayos-X las bases de Schiff y los complejos de coordinación obtenidos.
- Determinar la actividad fungistática de los nuevos compuestos obtenidos sobre cepas de *Botrytis cinérea* DMS 5144 y *Fusarium sp*.

2. Marco Referencial

2.1 Marco Teórico

2.1.1 Bases de Schiff. Las bases de Schiff son también denominadas como iminas o azometinas (Figura 1), y son el producto de la condensación de una amina y una especie carbonilo (aldehído o cetona) (Revenga Parra, 2009).

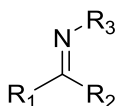


Figura 1. Grupo Azometino (Rodríguez Ramírez, 2009).

Este tipo de compuestos presentan gran relevancia puesto que son relativamente fácil de preparar y a su vez, se ha demostrado que presentan actividad biológica como agentes terapéuticos anticancerígenos y antimicrobianos (Guo et al., 2007; Rodríguez Ramírez, 2009). El mecanismo de reacción general para la formación de las bases de Schiff se esquematiza a continuación (ver figura 2) del cual podemos observar que la reacción se ve favorecida en medio ácido.

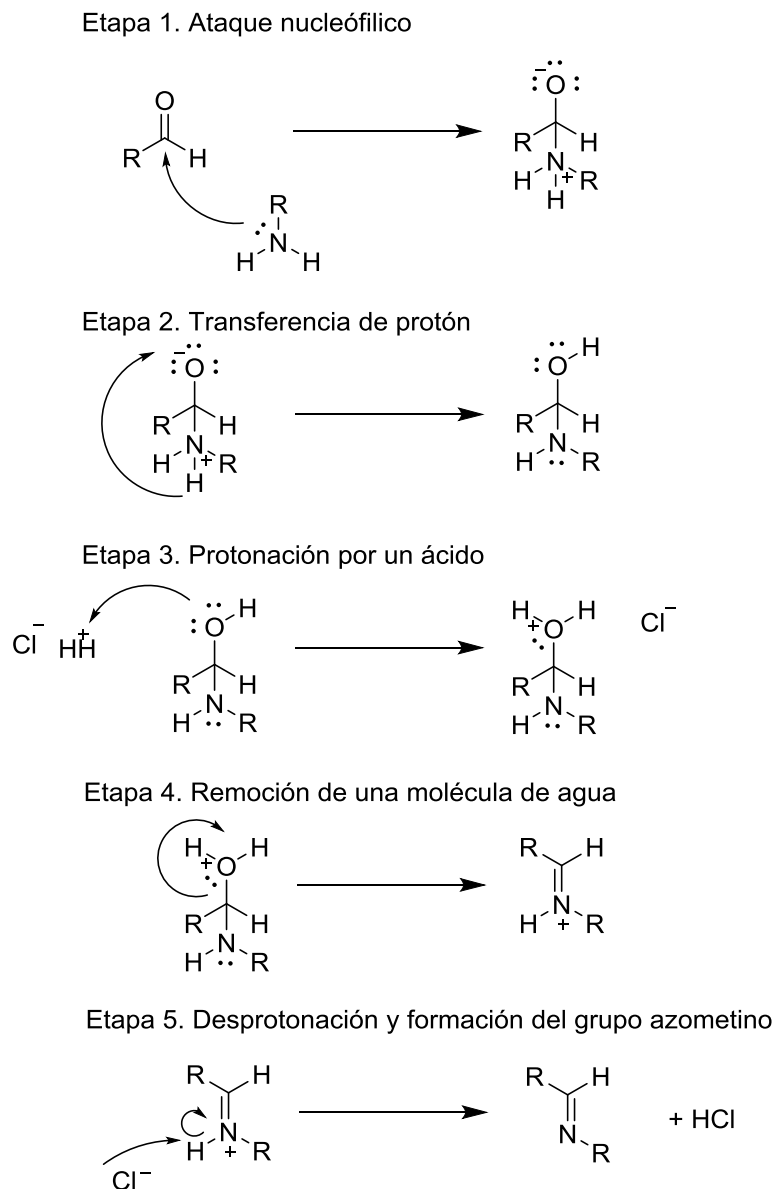


Figura 2. Esquemmatización del Mecanismo de formación de las iminas

Fuente: elaboración propia.

Sin embargo, los procesos convencionales para la obtención de materiales bioactivos acarrear consigo el consumo de materias primas que, en la mayoría de los casos, se pueden traducir en la reducción en la disponibilidad de los recursos, así como la generación de residuos. Por esta razón, la inclusión principios de química verde en la obtención de los materiales cobra

importancia puesto que se puede destacar que vela por la reducción de la implementación de sustancias auxiliares, la reducción de compuestos derivados o residuos y la eficiencia energética y atómica de los procesos (Nudelman, 2004).

2.1.2 Compuestos de Coordinación de Cobre (II) y Zinc (II). La generación de compuestos de coordinación es el proceso mediante el cual los ligandos de interés reaccionan con diferentes sales metálicas con el propósito de mejorar las propiedades de los compuestos precursores.

En este campo de estudio, se reporta que la actividad antibacteriana de las bases de Schiff así como de sus compuestos de coordinación de cobre (II) y Zinc (II) presentan actividad biológica frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, siendo su actividad diferenciada en función de las respectivas estructuras y composiciones de los diferentes compuestos (Amiri Rudbari et al., 2016).

K. Mounika, en 2010 reportó la síntesis y evaluación de actividad antibacteriana y fungistática tanto de un ligando tipo base de Schiff como de sus respectivos compuestos de coordinación con metales de transición como Níquel (II), Cobalto (II), Cobre (II), y Zinc (II), obteniendo como resultado que todos los compuestos evaluados presentaron actividad biológica frente a las cepas bacterianas; *E.coli*, *S. aureaus* y las cepas fúngicas; *A.niger*, *F.oxysporum* (Mounika et al., 2010).

2.1.3. Hongo *Fusarium sp.* El género *Fusarium sp*, es considerado un hongo persistente pues sobrevive periodos largos de tiempo bajo condiciones climáticas desfavorables incluso en ausencia de un hospedante. A su vez se cataloga como hongo imperfecto, pues carece de un

estado sexual, su reproducción se da por medio de esporas tipo conidias de las cuales posee tres clases (Estupiñan & Ossa, 2007):

Microconidias que son esporas unicelulares, hialinas de forma variable, con tamaño 5-12*2,5-3,5 micras.

Macroconidias que se caracterizan por ser de pared delgada, fusiformes, largas y con una ligera curvatura en forma de haz, con un tamaño 27-60*3-5 micras.

Clamidosporas las cuales son globosas de doble pared gruesa, normalmente se encuentran solas o en parejas. Su formación se debe a la condensación del contenido de las hifas y las conidias, se caracterizan por su persistencia en el ambiente y su capacidad de sobrevivir aun en condiciones ambientales desfavorables y en ausencia de una planta hospedante. Su tamaño ronda 5-15 micras de diámetro (Estupiñan & Ossa, 2007).

Los hongos de esta especie afectan particularmente a las hortalizas principalmente brócoli, colibrol, lechuga, calabacín, apio, cebolla, cilantro, y tomate entre otras (Instituto Colombiano Agropecuario, 2012) y en frutas como mora, uchuva, fresa y banano (Arevalo Peñaranda, Díaz Jiménez, Galindo Álvarez, & Rivero Cruz, 2011; Estupiñan & Ossa, 2007; Instituto Colombiano Agropecuario, 2012; Vásquez-Ramírez & Castaño-Zapata, 2017).

Los síntomas de la presencia del hongo son la destrucción de los tejidos, el amarillamiento de hojas, el doblamiento del tallo y finalmente la muerte (Arevalo Peñaranda et al., 2011; Instituto Colombiano Agropecuario, 2012) .

Sin embargo, el banano es particularmente susceptible a una especie denominada raza 4 tropical (R4T) de la cual no se conoce un manejo o tratamiento efectivo una vez infectada la planta. Por tanto solo se conocen manejos y políticas públicas preventivas (Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, 2017a), de esta especie se manifiesta síntomas como:

marchitamiento, hojas necróticas, decoloración o tinción de tejidos vasculares a colores que van desde el amarillo claro hasta el café rojizo (Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, 2017b).

2.1.4 Hongo *Botrytis cinérea*. El hongo *Botrytis cinérea*, también denominado moho gris, es un parasito facultativo que afecta principalmente a hortalizas como el brócoli, coliflor, lechuga, ají, apio, repollo, calabacín, cebolla, arveja, pimentón, alcachofa, tomate de mesa entre otras, a su vez dicho parasito también afecta un sin número de especie frutales tales como mora, fresa, uva, frambuesa, entre otras (Arevalo Peñaranda et al., 2011; Instituto Colombiano Agropecuario, 2012).

Este hongo se caracteriza por que afecta generalmente las flores y frutos de las plantas (Capelo & Roche, 2016); su principal fuente de inóculo primario son las conidias provenientes de la germinación de los esclerocios depositados en el terreno o en material vegetal de desecho, se ve favorecido en condiciones de humedad relativa altas, temperaturas bajas, poca luz solar y agua libre sobre los tejidos (Arevalo Peñaranda et al., 2011)

Los principales síntomas de la presencia del moho gris son: coloración parda en flores; tallos florales necrotizados, lo que ocasiona que el fruto no cuaje; manchas amarillentas y acuosas en la superficie de los frutos; pudrición del tallo, raíces y bulbo; ahogamiento de la plántula; manchas foliares (Arevalo Peñaranda et al., 2011; Capelo & Roche, 2016; Instituto Colombiano Agropecuario, 2012)

La gran importancia en el control de la propagación de esta plaga denominada “moho gris” radica en que la misma puede invernar en forma de micelio y esclerocios en el suelo en los residuos de cosecha e incluso en las semillas, lo que dificulta su erradicación en terrenos

cultivables ya infestados (Instituto Colombiano Agropecuario, 2012), a su vez debido a que su propagación se disminuye sustancialmente la calidad y cantidad de las cosechas de fruto, afectando en gran medida la economía agrícola de las regiones. Los daños ocasionados a las plantas, sus estructuras de reproducción y sus frutos varían en función de factores como la susceptibilidad del huésped, la virulencia de aislado de *B. cinérea*, y de condiciones meteorológicas como humedad, temperatura y luminosidad (Calvo-Garrido, 2014).

Finalmente es de mencionar que el organismo *Botrytis cinérea*, ha logrado desarrollar resistencia a la mayoría de los fungicidas sintéticos comúnmente usados, dando lugar incluso a fenotipos multirresistentes (Grove, 2015).

2.1.5 Técnicas Analíticas Instrumentales

2.1.5.1 Difracción de Rayos-X (DRX). La difracción de rayos-X es una técnica analítica ampliamente empleada para obtener información sobre la estructura cristalina de la muestra. El fenómeno de difracción de rayos-X se presenta cuando un haz de rayos-X que se desplaza incide sobre una muestra, de tal manera que se obtienen diferentes posiciones o ángulos de incidencia en las que hay un máximo, de acuerdo con la ley de Bragg (Ver figura 3). Así, si la radiación difractada es recolectada en un registro, y a la vez se desplaza correctamente, el haz de rayos-X y el detector, se obtiene un perfil de difracción característico de la composición cristalina de la muestra (Bermúdez Polonio, 1981).

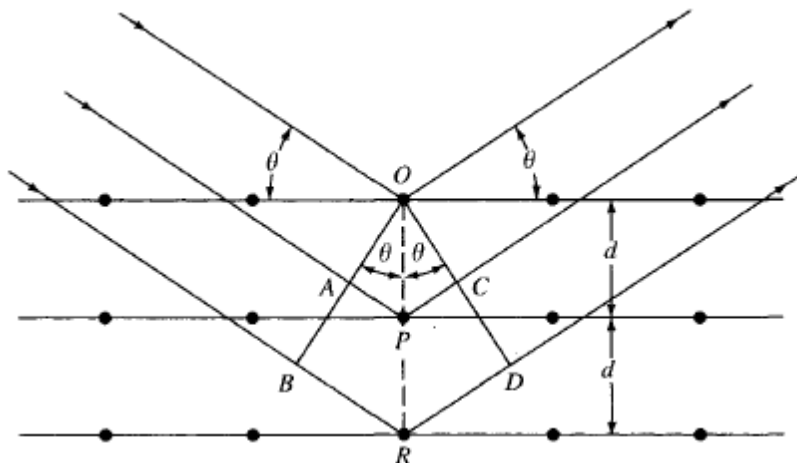


Figura 3. Esquema de la ley de Bragg.

Difracción de Rayos-X de Monocristal

La difracción de rayos-X de monocristal es altamente precisa y proporciona la mayor cantidad de información, pues permite realizar una caracterización estructural, dando a conocer posiciones atómicas, longitudes de enlace, ángulos de enlace, torsiones, interacciones inter e intramoleculares, composición de la celda unidad, permitiendo además la verificación de las constantes de celda, sistema cristalino y su distribución, datos que se determinan mediante DRX de muestras policristalinas. Para la aplicación de esta técnica se necesita poseer un cristal único, de tamaño específico y sin maclas, por lo cual el proceso de recristalización debe ser altamente controlado.

2.1.5.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica analítica basada en la absorción de energía de radiofrecuencia por parte de ciertos núcleos cuando son colocados en un campo magnético intenso y es utilizada principalmente

como herramienta para la determinación estructuras a partir de espectros y datos obtenidos a partir de éste como desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento y mediciones de área bajo la señal (integración). Además, es usado para en la identificación de grupos funcionales, propiedades físicas y químicas en sustancias puras o mezclas muy complejas.

Esta técnica presenta considerables ventajas frente a otras técnicas debido a que no requiere derivatización, no requiere curvas de calibración para efectuar análisis, además no requiere de un compuesto puro, pues basta con identificar las señales de una porción específica de la molécula (Rubinson & Rubinson, 2001).

2.1.5.3 Espectroscopia Infrarroja (IR). La espectroscopia infrarroja se fundamenta en la absorción de radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula determinada absorberá energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé lugar a una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de determinada manera como efecto de la energía suministrada por el haz de luz infrarroja. La espectroscopía infrarroja tiene su aplicación inmediata en el análisis cualitativo mediante la detección de grupos funcionales presentes en el material objeto de análisis (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

2.1.5.4 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis). La espectrofotometría ultravioleta-visible es una técnica analítica que permite elucidar la presencia o ausencia grupos funcionales y la coordinación de estructuras orgánicas con un metal de un compuesto en una solución. Se basa en que las moléculas y sus fracciones de interés absorben las radiaciones electromagnéticas, a su

vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración (Skoog et al., 2001).

2.2. Marco de Antecedentes

Los compuestos biológicamente activos y su búsqueda son sin lugar a duda una necesidad latente, esto con el propósito de obtener nuevos y más eficientes tratamientos contra diferentes patógenos. Las iminas o también denominadas “bases de Schiff”, fueron descubiertas por Hugo Schiff, y desde su descubrimiento han sido objeto de estudio para el desarrollo de nuevos materiales biológicamente activos para el tratamiento de patologías de origen bacteriano y fúngico (Abdel-Rahman et al., 2013; Gungor, Celen, Azaz, & Kara, 2012; Suresh et al., 2013).

En 2007, Zhanyoung Guo y colaboradores de la academia de ciencias de China, sintetizaron y caracterizaron diferentes bases de Schiff derivadas de quitosano y sus isómero (ver figura 4) y con las iminas obtenidas y sus precursores, realizaron ensayos de actividad antifúngica, obteniendo que en la mayoría de los casos las iminas presentaban una mayor actividad antifúngica (Guo et al., 2007).

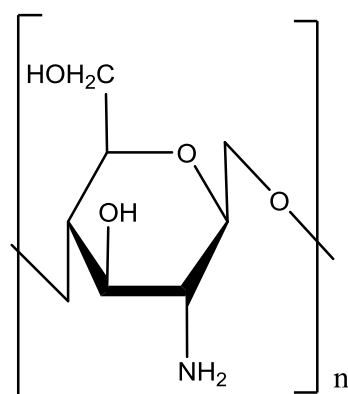


Figura 4. Estructura molecular Quitosano.

Fuente: elaboración propia.

Hassan Keypour y colaboradores, miembros de la universidad de Bu-Ali Sina, en 2008 publicaron su estudio titulado “Synthesis and characterization of copper (II) and cobalt (II) complexes with new potentially hexadentate Schiff base ligands. X ray crystal structure determination of one copper complex” en el que exponen la metodología implementada para la síntesis y caracterización de iminas hexadentadas y sus compuestos metálicos Co(II) y Cu(II), obteniendo como resultado que el rendimiento de las reacciones de formación de los compuestos de coordinación en parte depende de la rigidez de los ligando que han de conformar y su impedimento estérico. Finalmente obtuvieron un incremento evidente en las propiedades biológicas de los ligandos al ser coordinados con los metales de transición (Keypour et al., 2008).

En el año 2008, R.A Vázquez y colaboradores en el marco del V encuentro de participación de la mujer en la ciencia, presentaron su estudio titulado “ Mecanosíntesis: síntesis en estado sólido de compuestos nitrogenados tipo imina”, estudio que evidenció las metodologías implementadas por los autores para la producción de diferentes bases de Schiff por un proceso alternativo al convencional, esta nueva metodología despertó interés de la academia y la industria por cuanto requiere menor volumen de reactivos y sustancias auxiliares lo que directamente reduce los tiempo de reacción (Vázquez et al., 2008).

En 2009, investigadores de la Universidad de Oriente, prepararon una serie de compuestos metálicos de hierro (II), cobre (II) y níquel (II) utilizando como ligandos diversas bases de Schiff. Adicionalmente se realizaron estudios de actividad antibacteriana de los productos obtenidos, los resultados de las síntesis arrojaron que los rendimientos fueron superiores en los compuestos metálicos respecto de las síntesis de sus precursores (bases de Schiff) atribuyendo esta diferencia a factores fisicoquímicos como el pH y a errores de procedimiento y

manipulación durante las etapas de aislamiento y purificación. A su vez se encontró que la actividad biológica fue mayor en los compuestos orgánicos que en los compuestos de coordinación, siendo nula para los compuestos de coordinación de Cu (II) y Ni(II) (área de inhibición 0) y de 20mm a 50mm de área de inhibición para las respectivas bases de Schiff con las que fueron preparados, demostrando que no siempre la actividad biológica de este tipo de compuestos se ve incrementada al estar coordinados con metales de transición al menos no la actividad biológica que fue evaluada en este estudio (Rodríguez Ramírez, 2009).

Vittorio Saggiomo y Ulrich Lüning, en 2009 publicaron su trabajo en el cual contraponen algunas hipótesis planteadas en torno a la síntesis de iminas en presencia de agua difiriendo en cuanto a productividad o improductividad asociada a la presencia de agua. Los autores realizaron las síntesis de diferentes bases de Schiff tanto en presencia como en ausencia de agua, determinando así que el agua no es determinante en los procesos de formación de este tipo de compuestos, pero si resulta ser determinante la solubilidad de tanto reactivos como productos pues esta asegura una mayor interacción entre los reactivos, lo cual se ve reflejado en un rendimiento de reacción mayor (Saggiomo & Lüning, 2009).

Posteriormente en 2010, K. Mounika y colaboradores de la Universidad de Osmania reportaron algunos métodos de síntesis para la producción de bases de Schiff y diferentes compuestos metálicos a partir de 3-etoxisalicilaldehído y el ácido 2-aminobenzoico y sales metálicas de zinc (II), cobalto (II), cobre (II), y níquel (II). Seguido a esto los autores estudiaron su actividad como agentes antimicrobianos, obteniendo que tanto bases de Schiff como sus compuestos de coordinación, presentaron actividad biológica y que esta era significativamente superior en los compuestos metálicos que contenían cobre(II) y Zinc(II) (Mounika et al., 2010).

En 2011, Yogendrasinh J. Thakor y colaboradores, miembros de la Universidad de N V Patel de Ciencias Puras y Aplicadas, reportaron su estudio sobre los métodos de síntesis, caracterización molecular y estructural y la evaluación de actividad antibacterial de diversas bases de Schiff y sus compuestos de coordinación de zinc(II), cobalto(II), cobre(II), manganeso(II), hierro(II) y níquel(II), obteniendo como resultado que todos los productos presentaron fuerte actividad antibacteriana y que esta actividad era superior en los compuestos metálicos con relación a sus bases de Schiff precursoras (Thakor et al., 2011).

Elif Gungor y colaboradores en 2012, trabajaron en la síntesis de diversas iminas y su inclusión como ligandos en la formación de compuestos metálicos de cobalto (III), su respectiva caracterización y la evaluación de las propiedades antibacterianas y antifúngicas mostró que la totalidad de los compuestos sintetizados presentaron actividad antifúngica y antibacteriana diferenciada, viéndose estas propiedades incrementadas en los compuestos metálicos de cobalto (III) pues los compuesto orgánicos presentaron entre 7 y 8 mm de área de inhibición promedio frente a unos microorganismos específicos y los compuestos de coordinación, un área de inhibición entre 9 y 10 mm, frente al mismo organismo (*Eterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) (Gungor et al., 2012).

Laila H. Abdel-Rahman y colaboradores, de la Universidad de Sohag, en 2013 prepararon una serie de bases de Schiff y sus respectivos compuestos metálicos. Posteriormente los autores evaluaron los potenciales usos terapéuticos de los diferentes compuestos preparados, encontrando que los compuestos presentaban actividad antibacterial y antifúngica sin embargo presentaban cierto grado de teratogenicidad. Todos los compuestos preparados presentaron bioactividad y dichas actividades se vieron notablemente incrementadas en los compuestos metálicos con relación a las bases de Schiff que los conformaron. En promedio, la actividad

antibacteriana contra las especies *P.aeruginosa*, *E.coli* y *B. cereus* se vio incrementada en un 433%, dicha actividad fue evaluada mediante el método de área de inhibición de crecimiento bacteriano. (Abdel-Rahman et al., 2013).

En 2014, K. Babu y P. Amutha, elaboraron una serie de compuestos tipo imina y sus respectivos compuestos metálicos de Ni(II) y Cu(II), los reactivos para su preparación fueron: 1,2-fenilendiamina, 2-naftaldehido, isatina, y sales de acetato de los respectivos metales. Los compuestos se caracterizaron y su actividad biológica como agentes antibacterianos fue evaluada. Los resultados de la investigación arrojaron que los compuestos fueron efectivos como agentes antibacterianos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo que la actividad de los compuestos metálicos incrementaron su actividad en un 50% respecto del compuesto orgánico precursor (Babu & Amutha, 2014).

Teng-Jin Khoo y asociados en 2014, dieron a conocer su estudio sobre la síntesis, caracterización molecular, estructural y la evaluación de propiedades biológicas de diversas bases de Schiff y su compuestos de coordinación con sales metálicas de níquel (II), cobre (II), cadmio (II), zinc (II), obteniendo que todos los compuestos presentaron actividad biológica variada siendo estos los resultados más representativos; el ácido 4-formilbenzoico [1] precursor de las bases de Schiff presentó diámetro de inhibición de 14 mm; que los compuestos orgánicos tipo base de Schiff ácido -4 - ((2-((piridin-4-ilmetiltio) carbonotioil) hidrazono) metil) benzoico [3] y piridin-4-ilmetil -2- (piridin-2-ilmetileno) hidrazina-1-carboditioato [4] no mostraron inhibición o actividad biológica; el compuesto de coordinación de cobre (II) [10] derivado de compuesto [3] mostró un diámetro de inhibición de 32 mm frente a *Aspergillus ochraceous*, y los compuestos de coordinación de Cu (II) derivados de la base de Schiff [4] denominados [6] y [7] mostraron diámetro de inhibición de 15 mm y 17 mm respectivamente frente a *Candida*

albicans, la cual podría depender de la estructura del ligando, la presencia o ausencia de un grupo de tipo ácido benzoico o un anillo de piridina y el metal con el cual se formó. Sin embargo, los autores concluyeron que los análisis realizados no bastan para aprobar o descartar las permutaciones realizadas como óptimas o pésimas por su actividad biológica (Khoo et al., 2014).

En 2015, G.T Tigineh y colaboradores publicaron su estudio titulado “Solvent-free mechanochemical conversion of 3-ethoxysalicylaldehyde and primary aromatic amines to corresponding Schiff-bases” en el cual realizaron la síntesis de diversas bases de Schiff derivadas del 3-etoxisalilaldehído y diferentes aminas aromáticas primarias. Entre las condiciones de síntesis se destacan la ausencia de solventes o sustancias auxiliares y la molienda de los compuestos en relación estequiometría 1:1. Los resultados de esta metodología de síntesis arrojaron rendimientos iguales o superiores al 99% (Tigineh, Wen, & Liu, 2015).

Mehdi Salehi miembro de la Universidad Semnan en Irán y colaboradores, en 2015, dieron a conocer su estudio sobre la síntesis, caracterización molecular y estructural y evaluación de actividad antibacteriana de las dos iminas derivadas de isoftaldehído. Los autores obtuvieron que los compuestos se sintetizaron con rendimientos superiores al 70%, a su vez fue notable la actividad biológica, siendo más representativa tanto contra bacterias Gram-negativas como Gram-positivas en el compuesto preparada a partir de isoftaldehído y 4-bromoanilina respecto del otro compuesto preparado con isoftaldehído y 4-metoxianilina (Salehi et al., 2015).

En 2016, X. Zhang, publicó su artículo titulado “Copper(II) Complexes With Bis-Schiff Bases: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activities” en el cual preparó diferentes bases de Schiff derivadas de 5-metoxisalicylaldehído, 5-clorosalicilaldehído, 1,2-diaminoetano y 1,3-diaminopropano y sal de percloruro de cobre (II), las síntesis de los compuestos orgánicos se

presentaron un rendimiento superior al 90%, sin embargo, la síntesis de los compuestos de coordinación arrojaron rendimientos entre 40% y 55%. Finalmente se determinó que la actividad antibacteriana frente a las especies *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, obteniendo que la base de Schiff *N,N'*bis(5-metoxisaliciliden)-1,2-etilendiimina denominada por los autores L¹ presentó concentraciones efectivas (ppm) de 12,5-12,5-25 y >100 respectivamente, mientras que para su compuesto de coordinación con cobre [1] presentó concentraciones efectivas de 0,78-3,12-6,25 y 25 respectivamente. A su vez para la base de Schiff *N,N'*bis(clorosaliciliden)-1,3-propilendiimina denominada L² se evaluó la actividad biológica frente a las mismas cepas obteniendo como resultado la concentración efectiva de 3,12-6,25-25-50 y para su compuesto de coordinación con cobre [2] los valores fueron 0,10-1,56-6,25-25, valores que demuestran que los compuesto tipo base de Schiff presentaron actividad antibacteriana y que dicha actividad se vio notablemente incrementada al coordinar las bases de Schiff con Cobre (II) (Zhang, 2016).

En 2016, Hadi Amiri Rudbari y colaboradores publicaron su estudio titulado “Synthesis, characterization, X-ray crystal structures and antibacterial activities of Schiff base ligands derived from allylamine and their vanadium(IV), cobalt(III), nickel(II), copper(II), zinc(II) and palladium(II) complexes” estudio que trata sobre la síntesis de bases de Schiff derivadas de alilamina y la formación de sus compuestos de coordinación con diferentes metales de transición, los compuestos se obtuvieron en estado sólido y la evaluación de sus propiedades antibacterianas arrojó que todos los compuestos presentaron actividad biológica significativa siendo esta diferenciada en función de la estructura del compuesto y del centro metálico (Amiri Rudbari et al., 2016).

I Ansari y asociados, en 2017 publicaron su estudio sobre la síntesis de diversas bases de Schiff, a su vez, con ellos llevaron a cabo la preparación de diversos compuestos de coordinación con metales de transición, para posteriormente evaluar su uso potencial como agentes antibacterianos y antifúngicos, obteniendo como resultado que todos los compuestos presentaron fuerte actividad biológica y que esta actividad se incrementó en los compuestos de coordinación preparados (Ansari et al., 2017).

En octubre de 2018, Ashish K. Sarangi y colaboradores publicaron un artículo titulado “synthesis, structural investigations, DFT, molecular docking and antifungal studies of transition metal complexes with benzothiazole based Schiff base ligands”, del cual se resaltan los resultados obtenidos en cuanto a la síntesis de cuatro diferentes bases de Schiff y sus respectivos compuestos de coordinación, los cuales fueron sintetizadas y sus estructuras correspondieron con las planteadas por los autores, a su vez realizaron la evaluación de las propiedades antifúngicas de los diferentes compuestos, obteniendo que las diferentes todas las bases de Schiff presentaron actividad antifúngica contra *A. niger* y *A. flavus*, sin embargo si bien las bases de Schiff presentaron actividad antifúngica, dicho propiedad fue de mayor magnitud para los compuestos de coordinación de Cobre (II) y Zinc (II) siendo que dicha propiedad incremento cerca de un 30% en promedio respecto de la actividad obtenida en la base de Schiff libre, a su vez los autores destaca que dicha respuesta antifúngica se expresa de manera proporcional a la concentración del compuesto a la cual se exponen los organismos es decir a mayor concentración mayor efecto antifúngico, finalmente se menciona que dicha propiedad biológica se debe al mejoramiento de la propiedad lipófila de los compuestos de coordinación (Mohapatra et al., 2019).

En 2018, Zareen Akhter y colaboradores, dieron a conocer su estudio titulado “ Synthesis, characterization and biological assay of salicylaldehyde Schiff base Cu (II) complexes and their

precursors” en el cual se describen la síntesis de tres diferentes bases de Schiff y sus correspondientes compuestos de coordinación de Cu (II), así como la evaluación de las propiedades antifúngicas de los diferentes compuestos contra cinco sepas diferentes de origen fúngico (*M. species*, *A. niger*, *A. fumigates*, *A. flavus* y *F. solani*), obteniendo como principales resultados que los compuestos presentaron estructuras conformes a las planteadas por los autores, a su vez de las pruebas antifúngicas determinaron que los diferentes compuestos preparados presentaron baja actividad antifúngica siendo esta inferior en los compuestos de coordinación respecto de sus precursores orgánicos (bases de Schiff)(Iftikhar et al., 2018).

3. Diseño Metodológico

3.1. Aspectos Generales

Para la realización de este proyecto de investigación se emplearon los siguientes equipos de laboratorio: balanza analítica (Melter Toledo AL 204); manta de calentamiento (E&Q Equipos, electrónica y químicos M-250); bomba de vacío (Thomas 927CAI8), lámpara de luz Ultra-Violeta (spectroline model ENF-240C;115 voltios, 60 Hz, 0,20 Amps); cabina para microbiología (Azbil Telstar Technologies S. L. U, modelo BIO II Advance 3); bacto incinerador (bacti-cinerador Sterilizer, modelo HY-800); autoclave (TUTTNAUER, modelo 3840EL-D); incubadora (memmert).

3.1.1 Reactivos. Para la realización del presente proyecto de investigación se emplearon los reactivos relacionados en la Tabla 1.

Tabla 1. *Listado de reactivos usados en el proyecto.*

Compuesto	Casa comercial	Pureza (%)
1,2-fenilendiamina	Merck	99
2-hidroxibenzaldehido	Merck	99
Etanol	Merck	99
Metanol	J.T. Baker	99
Acetona	Merck	98
Acetato de etilo	Merck	98
Éter de petróleo	Merck	
Nitrato de Zinc (II) tetrahidratado	Merck	99
Acetato de Cobre (II) monohidratado	Merck	99
Cloroformo deuterado	Merck	99
Dimetilsulfóxido deuterado	Merck	99
Medio de cultivo Agar papa dextrosa	Merck	N/A

Fuente: elaboración propia

3.1.2 Materiales. Pipetas graduadas y aforadas; condensadores de bolas esmerilado 24/40; balones fondo redondo de una boca esmerilado 24/40; vasos de precipitado; probetas; pinzas; nueces; mangueras de hule; micropipetas; placa de gel de sílice (ácido silícico $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) en soporte de aluminio; espátulas; microespátulas; vidrio reloj; mortero con pistilo; recrystalizadores; cajas Petri descartables (5cm x 5 cm); asa redonda; parafilm; vinipel.

3.2. Síntesis de ligandos tipos bases de Schiff

La obtención de las iminas se realizó por dos metodologías; la síntesis orgánica convencional empleando solventes orgánicos y por medio de mecano-síntesis, basándose en los principios de la química verde (ausencia de solventes) (Nudelman, 2004; Tigineh et al., 2015).

La síntesis convencional se desarrolló con el propósito de generar los compuestos de interés por metodologías ya establecidas y realizar la caracterización molecular y cristalográfica que sirvió de soporte para controlar la obtención de los compuestos de interés por mecano-síntesis.

3.2.1. Síntesis Orgánica Convencional. Las correspondientes diiminas [**3(a-b)**], se obtuvieron haciendo reaccionar cantidades estequiométricas en relación 1:2 de los derivados de la 1,2-fenilendiamina [**1**] y los benzaldehídos sustituidos [**2(a-b)**] utilizando etanol anhidro como solvente y manteniendo reflujo y agitación constante. El control de la reacción se realizó por medio de cromatografía de capa fina (CCF). En la Figura 5 se observa en forma representativa el esquema de la reacción. La purificación de los compuestos se realizó mediante el proceso de recristalización, posterior a ello se determinó el rendimiento de reacción (Pan, Zhao, Xue, & Yang, 2016).

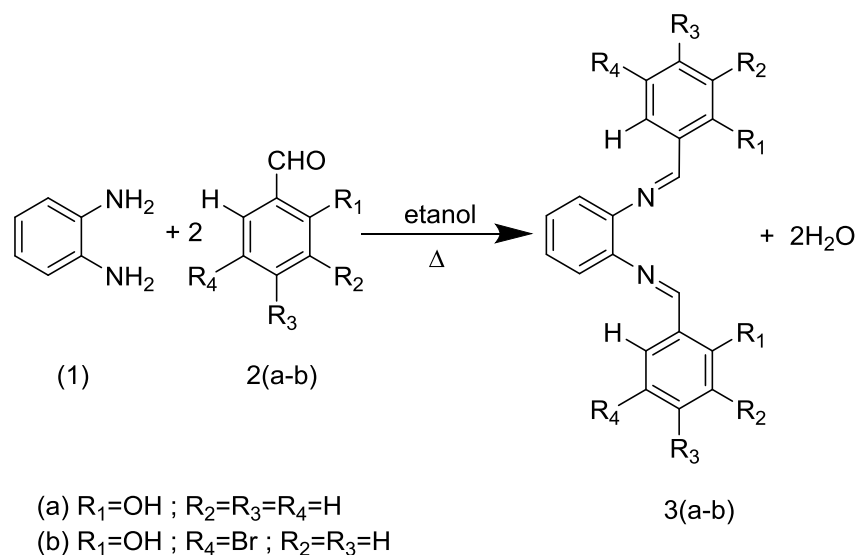


Figura 5. Reacción general para la formación de diiminas derivadas de N1,N2-dibencilidenbenceno-1,2-di-imina.

Fuente: elaboración propia.

3.2.2. Mecanosíntesis. En un mortero de ágata se adicionaron cantidades estequiométricas en relación 1:2 de la amina y el correspondiente aldehído (siguiendo el Esquema de la Figura 5, sin tener en cuenta el solvente). Se realizó el proceso de mecano-síntesis o maceración esperando la formación del producto de interés, la generación de los nuevos materiales se controló por CCF y la purificación realizó por medio de recristalización (Kaitner & Zbačnik, 2012).

3.3. Síntesis de compuestos de coordinación de Zn (II) y Cu (II)

Se preparó una solución compuesta por 25 mL de etanol y 1,0 mmol de la respectiva sal metálica (nitrato de zinc tetrahidratado o acetato de cobre hidratado), la cual se adicionó lentamente y con agitación a una solución compuesta por 1 mmol de la respectiva base de Schiff (**3(a-b)**) y 25 mL de etanol. La solución resultante se mantuvo bajo agitación y reflujo constante

por 6 horas, se dejó enfriar la solución resultante, se filtró al vacío y el sólido formado se lavó con etanol frío (ver figura 6). (Qin et al., 2016); (Zhang, 2016).

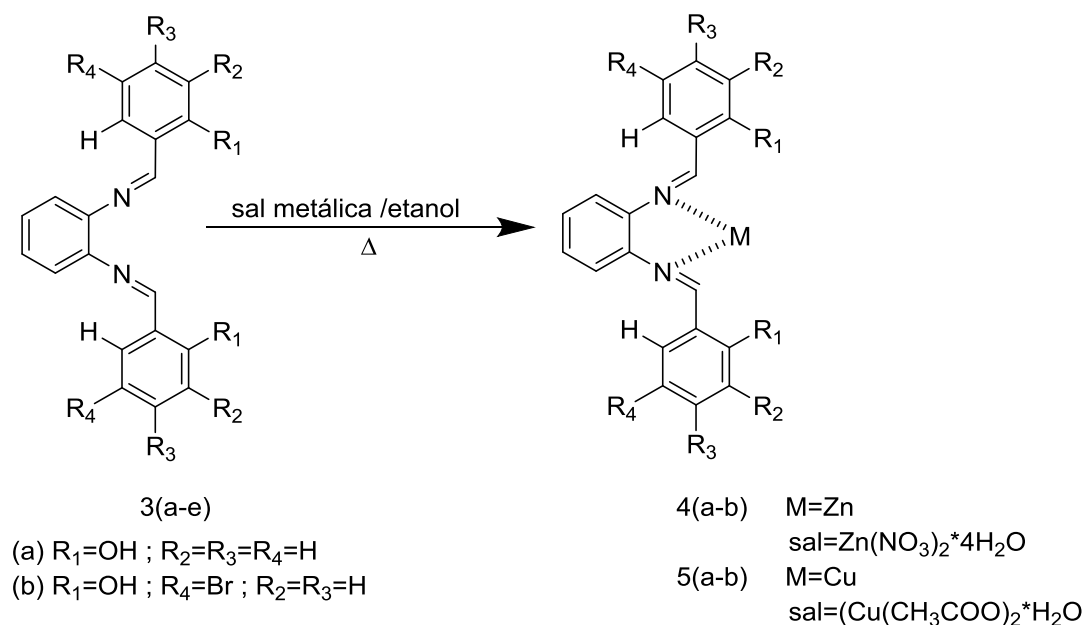


Figura 6. Reacción general para la formación de compuestos de coordinación de Zn (II) y Cu (II).

Fuente: elaboración propia.

3.4. Caracterización de los compuestos obtenidos

Al final de cada etapa de síntesis mencionadas en los numerales 5.3 y 5.4 (Formación de diiminas y compuestos de coordinación), se realizó la caracterización molecular de los productos obtenidos a través de las siguientes técnicas instrumentales; siendo utilizadas espectroscopia FTIR, y RMN para la caracterización de las diiminas y CG-EM para los compuestos de coordinación. Adicionalmente se determinaron sus puntos de fusión (fusiómetro) y densidades (Método de Flotación).

3.4.1. Espectrometría Infrarrojo (FT-IR). La identificación de los principales grupos funcionales mediante espectroscopia infrarroja (IR) se realizó con el espectrómetro FT-IR Bruker Tensor 27 ubicado en el laboratorio 304 del edificio de investigaciones de la Universidad Industrial de Santander en la sede Guatiguará.

3.4.2. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). La determinación de las masas moleculares de las diiminas obtenidas se realizó mediante ionización por electrospray (ESI-IT) en el espectrómetro de masas Bruker, ubicado en el laboratorio de espectroscopía del Parque Tecnológico Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander.

3.4.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los análisis de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz de frecuencia y capaz de generar un campo magnético de 9.4 T, utilizando como solvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) implementado como referencia interna para calibración tetrametilsilano (TMS). El equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de RMN de la Universidad Industrial de Santander sede Guatiguará.

3.4.4 Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-vis). Los registros se llevaron a cabo en un espectro espectrofotómetro marca Agilent, y está ubicado en el laboratorio de investigaciones ambientales de la Facultad de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás Bucaramanga, campus Floridablanca.

3.4.5 Caracterización cristalográfica de los compuestos obtenidos (bases de Schiff y compuestos de coordinación).

3.4.5.1. Difracción de rayos-X de muestras policristalinas. La metodología desarrollada se describe a continuación:

El material de ensayo (aprox. 100 mg), se pulverizó en un mortero de ágata y se montó en un portamuestra zero background (ZBH). El proceso de toma de datos se llevó a cabo utilizando un difractómetro de polvo BRUKER D8 Advance equipado con un detector lineal LynexEye, filtro de níquel (Ni) en un rango de medición de 2 a 70° en ángulos de 2 theta (2θ) y con una razón de muestreo de 1 s/paso. El difractómetro utilizado para la toma de datos se encuentra ubicado en el Laboratorio de Rayos-X de la Universidad Industrial de Santander (UIS) – sede Guatiguará.

Posterior a la toma de datos de difracción de polvo, se realizó la caracterización cristalográfica de cada uno de los compuestos obtenidos siguiendo los pasos descritos a continuación:

- Tratamiento de datos: la información obtenida para cada compuesto mediante DRX se sometió a una serie de corrección de datos que involucran el alisamiento del perfil utilizando el método de Savitzky-Golay; eliminación del ruido de fondo (background) mediante el método de Sonneveld y Visser; eliminación de la radiación $K\alpha_2$ del material del que está hecho el ánodo del equipo utilizando el método de Ranchinger y localización de los picos calculando el ancho máximo de la altura media (FWHM) para cada uno (Löuer & Boultif, 2004). Este proceso se realizó utilizando el programa especializado de dominio público POWDERX (Dong, 1998).
- Determinación de las características cristalográficas: se determinó el sistema cristalino y el cálculo de las constantes de celda mediante la asignación de índices a las reflexiones

observadas (indexado) utilizando el método de dicotomía de volumen, DICVOL14 (Löuer & Boultif, 2004).

- El grupo espacial se estableció mediante el estudio de las ausencias sistemáticas con la ayuda del programa especializado CHEKCELL.(Jean & Bochu, 1992).
- Con la información del grupo espacial se realizó el cálculo de los mejores valores de las constantes de la celda unidad o refinamiento de las constantes de la celda. Para llevar a cabo esta actividad, se utilizó la totalidad de las reflexiones observadas mediante el uso del programa especializado NBS*AIDS83 (Miguell, Hubbard, & Stalick, 1991).

3.4.5.2 Difracción de rayos-X de Monocristal. La DRX de monocristales es la técnica mayormente empleada en determinar la estructura de materiales cristalinos. En primera instancia, para llevar a cabo la resolución estructural es necesario realizar el proceso de escogencia de cristales con forma y tamaño adecuados. Este proceso se realizó con ayuda de un estereoscopio de luz polarizada Advanced optical ubicado en el laboratorio de rayos-X de la UIS.

La resolución de la estructura consiste en determinar las constantes de celda unidad, el sistema cristalino, grupo espacial, posiciones atómicas, longitudes de enlace, ángulos de enlace e interacciones intra e intermoleculares. Para determinar la estructura es necesario realizar una serie de etapas mencionadas a continuación:

Toma de datos: este proceso se llevó a cabo en un difractómetro de monocristal marca Rigaku, modelo XtaLab P200, equipado con dos fuentes de radiación (Cu y Mo) y un detector Pilatus, Dectris 200K. El difractómetro se encuentra ubicado en el laboratorio de Rayos-X de la UIS.

Análisis cristalográfico: se realizó la identificación de las constantes de celda unidad y sistema cristalino del material en estudio. Esto se desarrolló con ayuda del Software CrystalClear versión 2.1.

Caracterización estructural: el estudio de las características estructurales (posiciones atómicas, longitudes de enlace, ángulos de enlace e interacciones intra e intermoleculares) se realizó empleando el software CrystalClear 2.1 para el refinamiento de las constantes de celda unidad y asignación del grupo espacial y con el programa OLE-X 2.0 para la solución y refinamiento de la estructura.

3.5 Determinación de la actividad fungistática de los compuestos obtenidos

Las bases de Schiff sintetizadas y los compuestos de coordinación obtenidos, fueron evaluados como agentes fungistáticos de dos cepas fitopatógenas *Botrytis cinerea* DMS 5144 y *Fusarium sp* las cuales se cultivaron sobre agar papa dextrosa (PDA durante 7 días a 28°C. La técnica que se empleó fue dilución en agar a concentraciones de 0,125, 0,15, 0,175, 0,20, 0,225, y 0,25 mg/mL, para preparar las soluciones se empleó como solvente dimetilsulfóxido (DMSO) con una concentración máxima de 0,60%. Las concentraciones se seleccionaron a partir de la dosis efectiva reportada para el antifúngico de referencia Carbendazim® frente a este tipo de hongos fitopatógenos. Los ensayos se realizaron con inóculos en disco de los hongos fitopatógenos de 0,5 mm de diámetro. Los ensayos tuvieron como control: crecimiento de las cepas fúngicas en PDA. Todos los ensayos fueron incubados a 28 °C con mediciones periódicas cada dos días del diámetro de la colonia. Los experimentos se realizaron por triplicado y se realizó réplica en los compuestos que presentaron actividad fungistática representativa tratando

los datos con la prueba de Tukey para evaluar reproducibilidad en los resultados de los ensayos (Fratemale, Giamperi, & Ricci, 2003). Las mediciones obtenidas de las concentraciones de los tratamientos y el control fueron usadas para el cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento, de acuerdo con la figura 7 (ver figura 7).

$$\%de\ inhibición = \left(\frac{\text{diámetro colonia control} - \text{diámetro colonia tratada}}{\text{diámetro colonia control}} \right) \times 100$$

Figura 7. Ecuación porcentaje de inhibición de crecimiento.

Fuente: elaboración propia

Al igual que los compuestos que presentaron actividad fungistática, fueron evaluados para determinar su actividad fungicida. Los ensayos fueron realizados en placas de 96 pozos de fondo plano, por la metodología de microdilución en caldo papa dextrosa, adaptando la metodología M38-A, para ensayos de sensibilidad a los antifúngicos no solubles para hongos filamentosos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)(Cantón, Martín, & Espinel, 2007), inoculando propágulos de las cepas *Botrytis cinerea* DMS 5144 y *Fusarium sp* a una concentración de 1×10^8 /mL. Se evaluaron cuatro diluciones de las concentraciones obtenidas (0,005, 0,045, 0,085, 0,125 mg/mL contra *Fusarium sp*) y (0,25, 0,35, 0,50, 0,65 mg/mL contra *Botrytis cinerea* DMS 5144), control de crecimiento. La lectura de los datos de hizo por espectroscopía a 450 nm.

4. Resultados y Discusión

4.1 Obtención de ligandos tipo base de Schiff por procesos convencionales

4.1.1 Obtención de N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina (3a). Se obtuvieron 1,995 g (6,30 mmol, 90,7%) de un sólido brillante color naranja con morfología acicular. P.F: 163-168°C; densidad 1,234g/cm³; IR-ATR en KBr ($\nu_{\max, \text{cm}^{-1}}$): 758, 1103, 1149, 1190, 1230, 1274, 1402, 1479, 1560, 1610, 2555, 3053; ¹H RMN (400Hz, CDCl₃) δ 13.0-2 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.44 – 7.32 (m, 3H), 7.26 – 7.21 (m, 1H), 7.05 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.92 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H).

4.1.2 Obtención de N1,N2-di(5-bromo)di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3b). Se obtuvieron 2,2353 g (4,714 mmol, 87,7%) de un polvo anaranjado opaco. P.F: 205°C; IR-ATR en KBr ($\nu_{\max, \text{cm}^{-1}}$): 754, 1172, 1186, 1230, 1271, 1346, 1469, 1562, 1610, 2950, 3058; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.01 (s, 1H), 8.55 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.56 – 7.30 (m, 3H), 7.24 (dd, J = 5.9, 3.4 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 10.0, 7.0 Hz, 1H).

4.2 Obtención de ligandos tipo base de Schiff por mecosíntesis

4.2.1 Obtención de N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a). Se obtuvieron 2,06 g (6,51 mmol, 94%) de un de un polvo fino anaranjado. P.F: 167°C; densidad 1,234g/cm³; IR-ATR en KBr ($\nu_{\max, \text{cm}^{-1}}$): 756, 1101, 1149, 1190, 1230, 1276, 1396, 1481,

1560, 1608, 2553, 3057; ^1H RMN (400Hz, CDCl_3) δ 13.02 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.44 – 7.32 (m, 3H), 7.26 – 7.21 (m, 1H), 7.05 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.92 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H).

Los resultados anteriores mencionados prueban que se pudo obtener por medio de los dos procesos sintéticos el compuesto de interés, siendo la mecano-síntesis un proceso más eficiente pues presenta un rendimiento mayor a la síntesis convencional.

4.2.2 Obtención de N1, N2-di(5-bromo)di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3b).

Se implementó la metodología para la síntesis del compuesto 3b por mecano-síntesis según lo establecido en el numeral 5.3.2. de la metodología. Sin embargo, no se logró obtener un producto de reacción estable, esto basándose en los resultados obtenidos por CCF, los cuales arrojaron siempre la presencia de ambos sustratos.

4.3 Caracterización cristalográfica de los ligandos tipo base de Schiff

4.3.1 Caracterización cristalográfica de N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a). Para la caracterización cristalográfica del compuesto 3a se realizó la toma de datos de Difracción de Rayos-X de polvo, obteniendo el difractograma mostrado en la Figura 8.

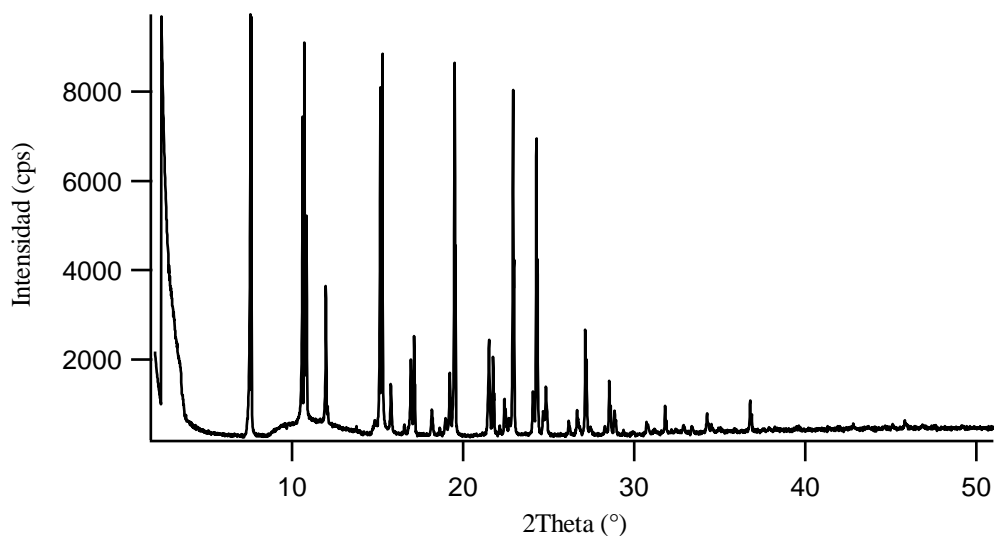


Figura 8. Perfil de Difracción de Rayos-X del compuesto 3a.

Fuente: elaboración propia.

Producto de la caracterización cristalográfica se determinó que la base de Schiff N^1, N^2 -di-(2hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina (3a), cristaliza en el sistema monoclinico con grupo espacial $P2_1/c$ (No. 14); constantes de celda $a=16.348$ (1) Å, $b=16.563$ (1) Å, $c=5.960$ (1) Å, $\beta=91.42$ (1) °, $V=1615.62$ (2) Å³, $Z=4$; con figuras de mérito asociadas a los resultados de $M_{20}=19.2$ y $F_{30}=48.5$ (0.0111, 56).

4.3.2 Caracterización cristalográfica de N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a) obtenido por mecosíntesis. El compuesto N^1, N^2 -di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina (3a) se preparó por mecosíntesis, al cual se le realizó su correspondiente caracterización cristalográfica, logrando así determinar que el compuesto cristaliza en el sistema monoclinico con grupo espacial $P2_1/c$ (No. 14); constantes de celda $a=16.382$ (1) Å, $b=16.584$ (1) Å, $c=5.987$ (1) Å, $\beta=91.39$ (1) °, $V=1626.24$ (2) Å³, $Z=4$; con figuras de mérito de $M_{20}=$

17.4 y $F_{30} = 23.6$ (0.0107, 119). En la Figura 9 se observa el perfil de difracción de rayos-X de polvo del compuesto 3a obtenido por mecano-síntesis.

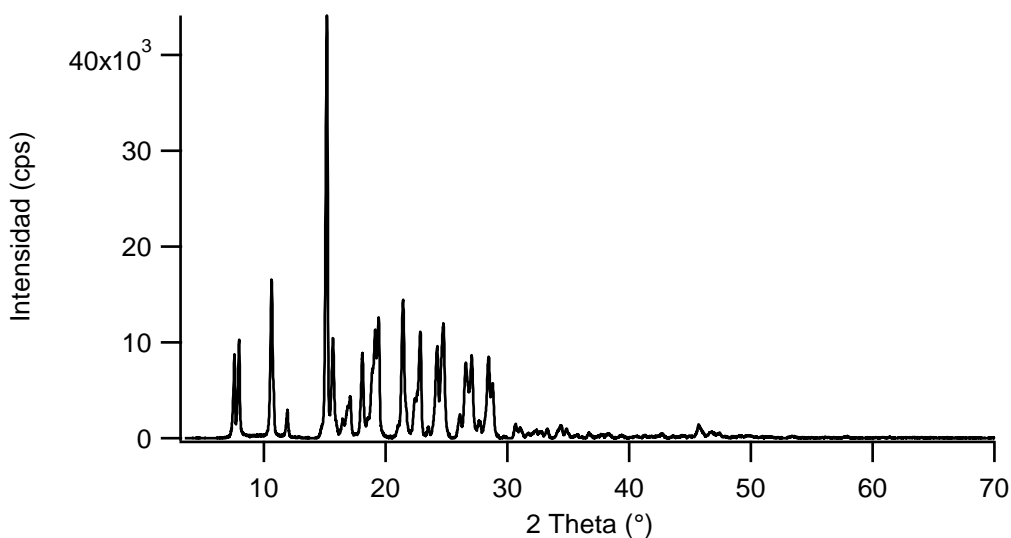


Figura 9. Perfil de Difracción de Rayos-X del compuesto 3a obtenido por mecano-síntesis.

Fuente: elaboración propia.

4.3.3 Caracterización estructural por Difracción de rayos-X de Monocristal de N¹,N²-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a). Se logró obtener cristales de calidad adecuados para el proceso de caracterización estructural del compuesto *N*¹,*N*²-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina (3a) para el cual se determinó que cristaliza en el sistema monoclinico, con grupo espacial $P2_1/c$ (No. 14) y constantes de celda unidad de $a=5.976$ (2) (3) Å, $b= 16.584$ (5) Å, $c=16.372$ (5) Å, $\beta=91.443$ (7)°, $V=1622.2$ (9) Å³ y un valor de $Z=4$, confirmando así los resultados obtenidos por DRX de polvo. En la Figura 10 se observa la unidad asimétrica que conforma la estructura cristalina del compuesto 3a.

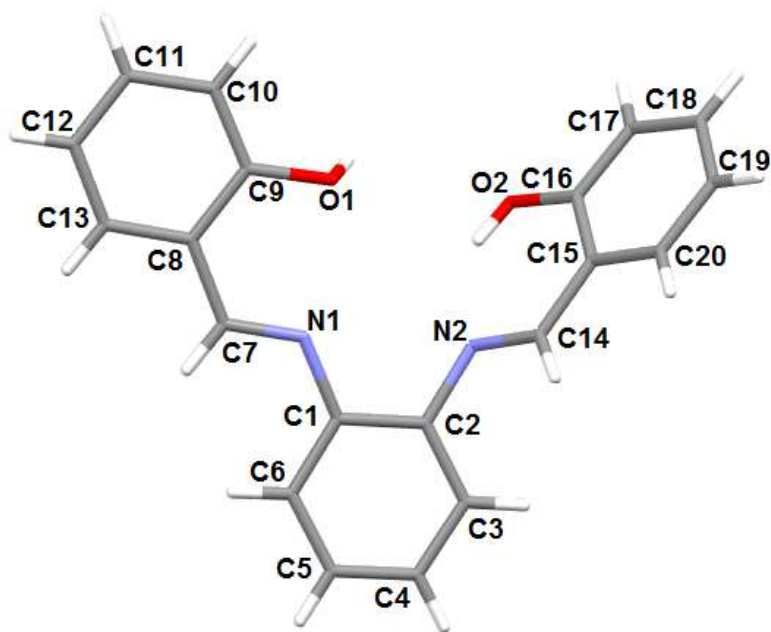


Figura 10. Unidad asimétrica del compuesto N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina (3a).

Fuente: elaboración propia.

La representación básica de este empaquetamiento se representa en la Figura 11 mediante la visualización de la celda unidad. A su vez, se presentan las interacciones intramoleculares presentes dentro de la misma.

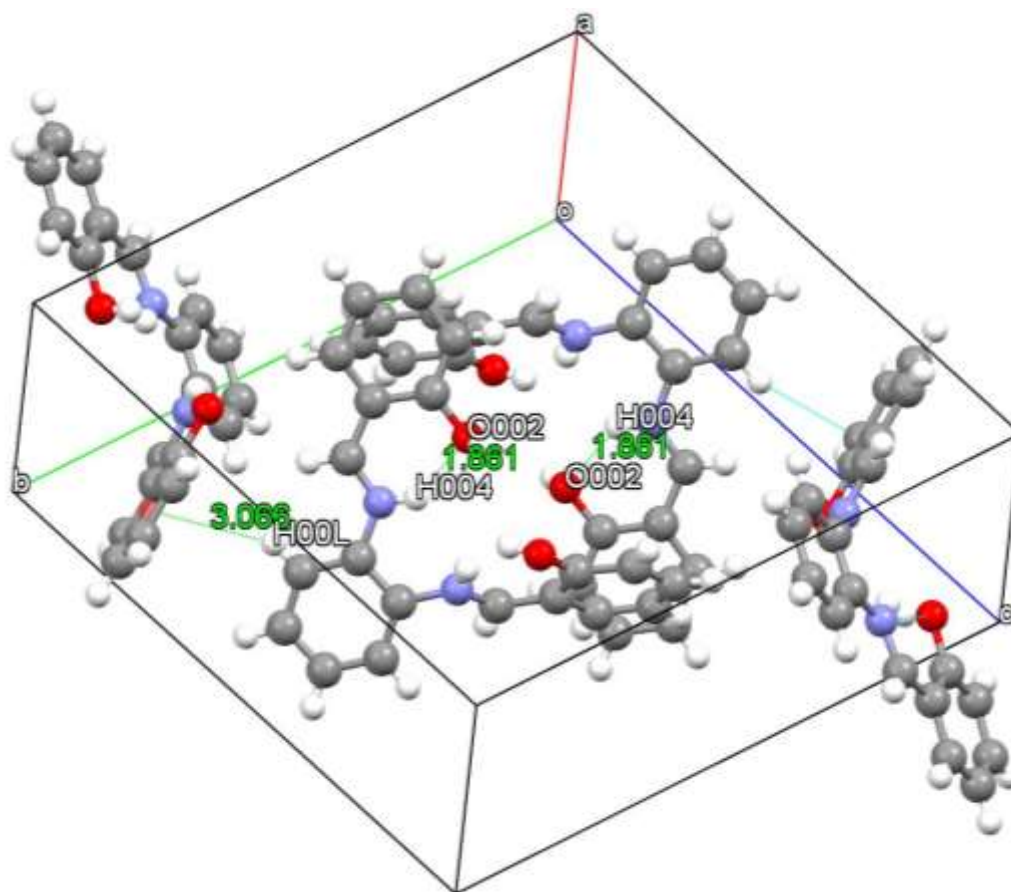


Figura 11. Representación de la celda unidad del compuesto N¹,N²-di(2-hidroxi)benzilidenbenceno-1,2-diimina (3a).

Fuente: elaboración propia

Por medio de la técnica de Difracción de Rayos-X de monocristales se determinó que la distancia de la interacción puente de hidrógeno intramolecular (N-H...O) es de 1.861 Å. Por otra parte, se aprecia una interacción intermolecular de 3.066 Å entre la nube de un anillo aromático y el Hidrógeno del grupo hidroxilo de otra molécula adyacente. Adicionalmente se aprecia que cada celda unidad se conforma por cuatro (4) moléculas de N¹,N²-di(2-hidroxi)benzilidenbenceno-1,2-diimina (3a). En la Tabla 2 se pueden observar los indicadores del refinamiento de la estructura cristalina.

Tabla 2. *Indicadores del refinamiento del compuesto N^1, N^2 -di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina (3a)*

N^1, N^2 -di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina

R1	16.76	Completeness	88.47
wR2	24.39	Rint	14.77
Goof	1.069	Reflexiones totales	11710

Fuente: Elaboración propia.

A continuación, en la figura 12 se presenta la superposición de los perfiles de difracción del compuesto 3a, obtenido por los diferentes métodos de interés, así como el perfil simulado a partir de la información recolectada de los datos de monocristal por difracción de rayos-X de monocristal, lo cual se realiza con el propósito de correlacionar los compuestos, con la estructura resuelta a partir de difracción de rayos-X de monocristal.

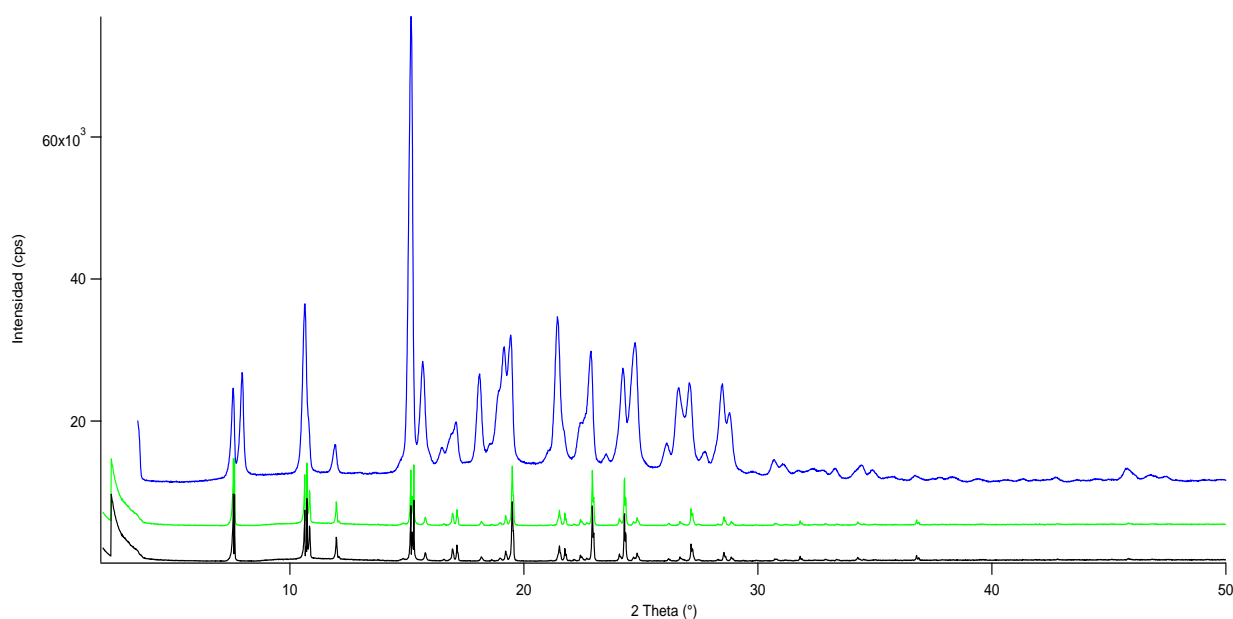


Figura 12. Superposición de los perfiles obtenidos del compuesto 3a.

Fuente: elaboración propia.

En la gráfica podemos observar en negro el perfil simulado, en verde el preparado por disolución, y en azul el obtenido por mecano-síntesis, de la gráfica se puede deducir que los compuestos preparados corresponden en estructura cristalina, debido a que la mayoría de los picos se presentan en todos los perfiles.

4.3.4 Caracterización cristalográfica de N1,N2-di(5-bromo)di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3b). El registro de datos de difracción de rayos-X de muestras policristalinas para compuesto 3b generó el difractograma mostrado en la Figura 13.

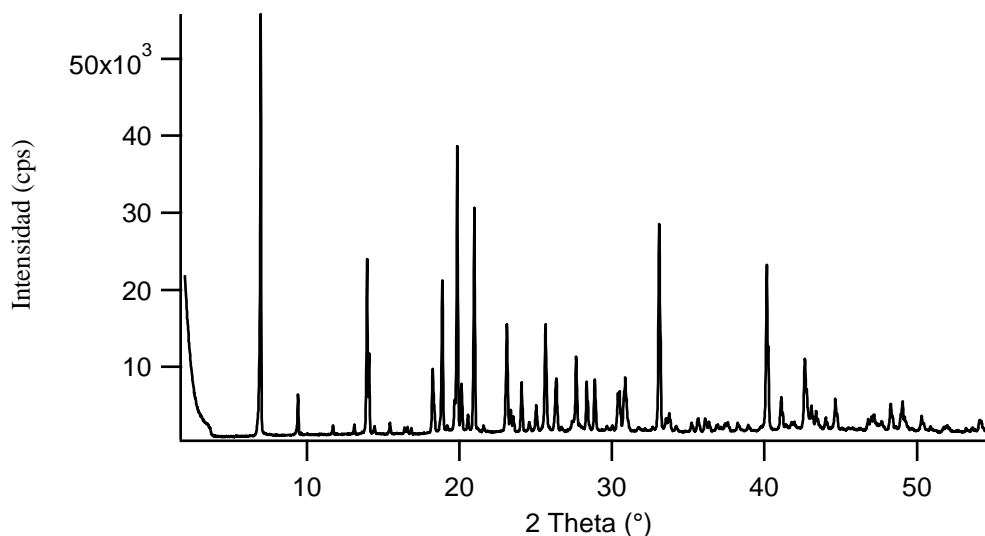


Figura 13. Perfil de Difracción de Rayos-X del compuesto 3b.

Fuente: elaboración propia.

El indexado del del perfil de difracción y la caracterización cristalográfica del compuesto N^1,N^2 -di(5-bromo)di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-diimina (3b), se obtuvo que el compuesto cristaliza en el sistema monoclinico; grupo espacial P2/m (No. 10); con constantes de celda $a=15.112$ (1) Å, $b=12.7165$ (1) Å, $c=6.0862$ (1) Å, $\beta=90.886$ (1) °, $V=1169.45$ (1) Å³, $Z=2$; con figuras de mérito de $M_{20}= 13.9$ y $F_{30}= 18.4$ (0.0138, 118).

4.4 Obtención de los compuestos de coordinación de Zn (II) y Cu (II)

4.4.1 Obtención del compuesto de coordinación de Zn (II)

4.4.1.1 Obtención del compuesto de coordinación 4^a. Se obtuvieron 4,5845 g (12,009 mmol, 85,85%) de un sólido amarillo opaco. La caracterización por espectrometría de masas muestra el ion molecular (m/z 381,0), indicando la formación del compuesto de coordinación $[C_{20}H_{16}N_2O_2Zn]^{2+}$ confirmando la unión del centro metálico a la base de Schiff por medio de 4 enlaces covalentes coordinados (Figura 14). Conociendo que la configuración electrónica del Zn^{+2} es $[Ar] 3d^{10}$, se deduce que el compuesto formado tiene hibridación sp^3 , adoptando una geometría tetraédrica.

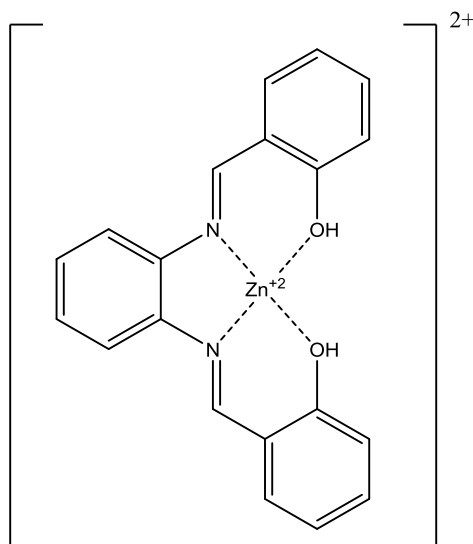


Figura 14. Estructura propuesta del compuesto 4a.

Fuente: elaboración propia.

4.4.1.2 Obtención del compuesto de coordinación 4b. Se obtuvieron 6,001 g (9,976 mmol, 92,80%) de un sólido color amarillo, el espectro de masas muestra una señal en $m/z = 600,1$

correspondiente al peso molecular del compuesto formado, con fórmula $[C_{20}H_{14}Br_2N_2O_2Zn]^+NO_3^-$. En este caso, se aprecia la presencia de un contraión nitrato, lo que hace prever que la esfera de coordinación tiene carga +1. Del mismo modo que en la formación del compuesto 4a, la hibridación y geometría se mantienen, adoptando una geometría tetraédrica. En la Figura 15 se muestra la estructura propuesta para este compuesto.

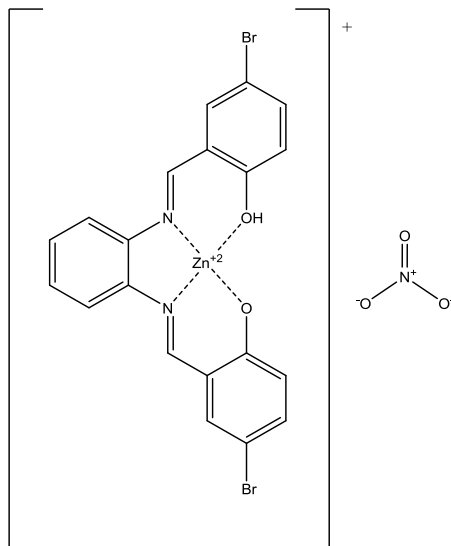


Figura 15. Estructura propuesta del compuesto 4b.

Fuente: elaboración propia.

4.4.2 Obtención del compuesto de coordinación de Cu (II)

4.4.2.1 Obtención del compuesto de coordinación 5^a. En el proceso de síntesis de este compuesto se obtuvieron dos resultados, los cuales se denominaron 5a y 5a1. Aunque el proceso de síntesis fue similar, el aspecto físico de los materiales obtenidos es diferente.

Para el compuesto 5a se obtuvieron 4,86 g (9,169 mmol, 85,32%) de un polvo color marrón brillante, el análisis por espectrometría de masas mostró la señal correspondiente a $m/z = 515$, lo cual indica que la fórmula molecular del compuesto es $[C_{20}H_{16}CuN_2O_2] \cdot (CH_3COO) \cdot H_2O$. En la

Figura 15 se aprecia la estructura propuesta para este compuesto. Debido a que la hibridación del Cu^{+2} es $[\text{Ar}] 3d^9$, se deduce que el compuesto formado tiene hibridación sp^3 , concluyendo que tiene una disposición espacial con geometría tetraédrica (Figura 16).

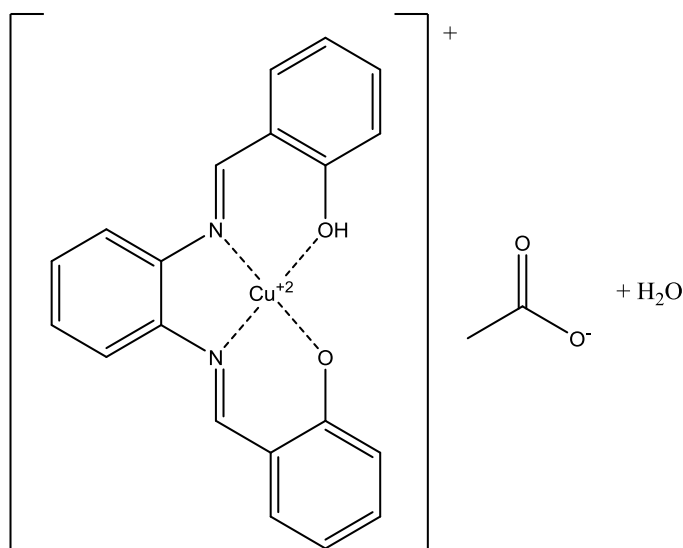


Figura 16. Estructura propuesta del compuesto 5a.

Fuente: elaboración propia.

4.4.2.2 Obtención del compuesto de coordinación 5a1. Se obtuvieron 5,12 g (13,476 mmol, 96,236%) de un polvo color negro brillante, con peso molecular de 378 g/mol, obtenido según la relación masa/carga m/z 377,7 obtenida por espectrometría de masas. Mediante el análisis realizado se propone que el compuesto 5a1 tiene como fórmula molecular $[\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{CuN}_2\text{O}_2]$ (Figura 17). Se aprecia que, la diferencia con la estructura 5a, se basa en la ausencia tanto del contraión acetato como de la molécula de agua. Este cambio puede estar relacionado con la hidratación del solvente empleado y/o las condiciones de cristalización. La esfera de coordinación no se ve afectada, por lo que sigue adoptando una geometría tetraédrica.

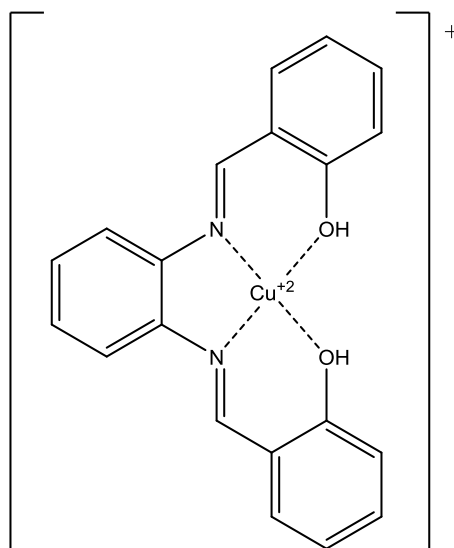


Figura 17. Estructura propuesta del compuesto 5a1.

Fuente: elaboración propia.

4.4.2.3 Obtención del compuesto de coordinación 5b. Se obtuvieron 6,08 g (9,669 mmol, 89,887%) de un polvo marrón opaco con relación masa/carga m/z 677 según el análisis de espectrometría de masas. Mediante este estudio se propone que la fórmula molecular del compuesto 5b es $[C_{20}H_{14}Br_2CuN_2O_2] \cdot (CH_3COO) \cdot H_2O$ con la estructura mostrada en la Figura 18. En este caso, el contraión de la esfera de coordinación es el ion acetato y adicionalmente se determinó que la molécula se encuentra hidratada. De igual manera que en el compuesto 5a, la hibridación y geometría del compuesto formado es sp^2d y cuadrada plana respectivamente.

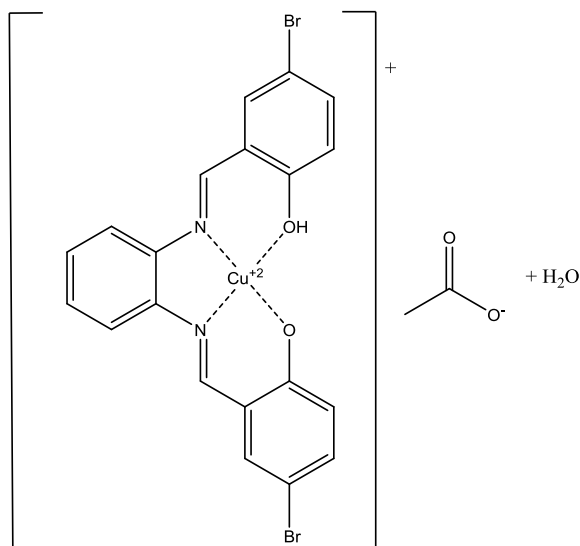


Figura 18. Estructura propuesta del compuesto 5b.

Fuente: elaboración propia.

4.5 Caracterización cristalográfica de los compuestos de coordinación de Zn(II) y Cu(II)

El estudio por DRX de muestras policristalinas de los compuestos de coordinación obtenidos, se realizó a los materiales con centro metálico cobre (5a, 5a1 y 5b) debido a que en los compuestos 4a y 4b no se obtuvieron sólidos cristalinos aptos para este estudio.

4.5.1 Caracterización cristalográfica del compuesto 5^a. El perfil de difracción obtenido para este compuesto se aprecia en la Figura 19. El estudio cristalográfico mostró que el sólido cristaliza en el sistema cristalino monoclinico con grupo espacial $P2_1/c$ (No. 14); con constantes de celda $a=18.053$ (1) Å, $b=19.042$ (1) Å, $c=9.161$ (1) Å, $\beta=90.16$ (1) °, $V=3149.30$ (1) Å³, $Z=4$; con figuras de mérito de $M_{20}= 18.9$ y $F_{30}= 42.5$ (0.0077, 92).

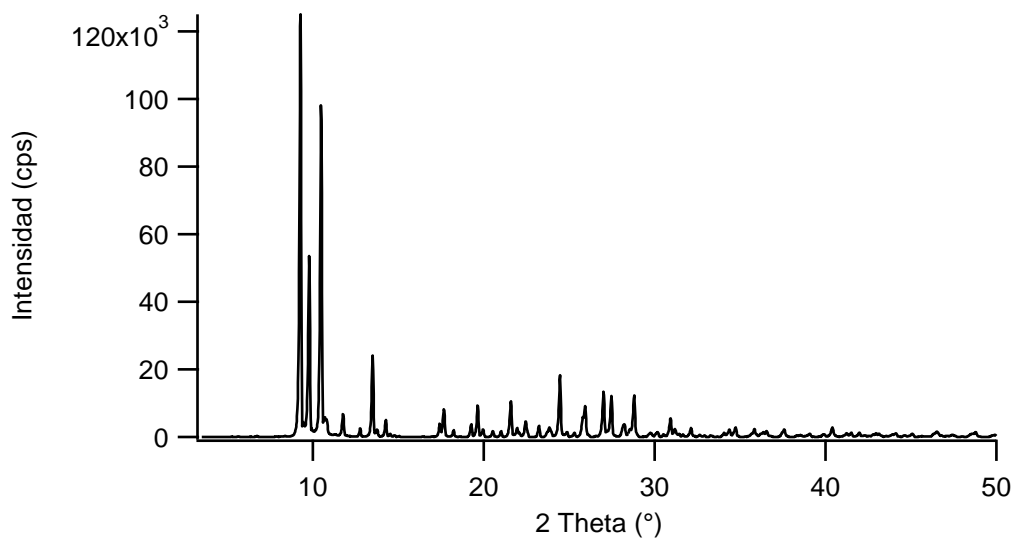


Figura 19. Perfil de Difracción del compuesto 5a.

Fuente: elaboración propia

4.5.2 Caracterización cristalográfica del compuesto 5b. El difractograma del compuesto $[\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{CuN}_2\text{O}_2]^+(\text{CH}_3\text{COO}^-)\cdot\text{H}_2\text{O}$ se aprecia en la Figura 20. Mediante la caracterización cristalográfica se determinó que el compuesto cristaliza en el sistema monoclinico con grupo espacial P2/m (No. 10); con constantes de celda $a=17.299(1)\text{ \AA}$, $b=12.462(1)\text{ \AA}$, $c=8.921(1)\text{ \AA}$, $\beta=92.46(1)^\circ$, $V=1921.29(1)\text{ \AA}^3$, $Z=4$; con figuras de mérito asociadas a los resultados de $M_{20}=15.1$ y $F_{27}=27.9(0.0125, 86)$.

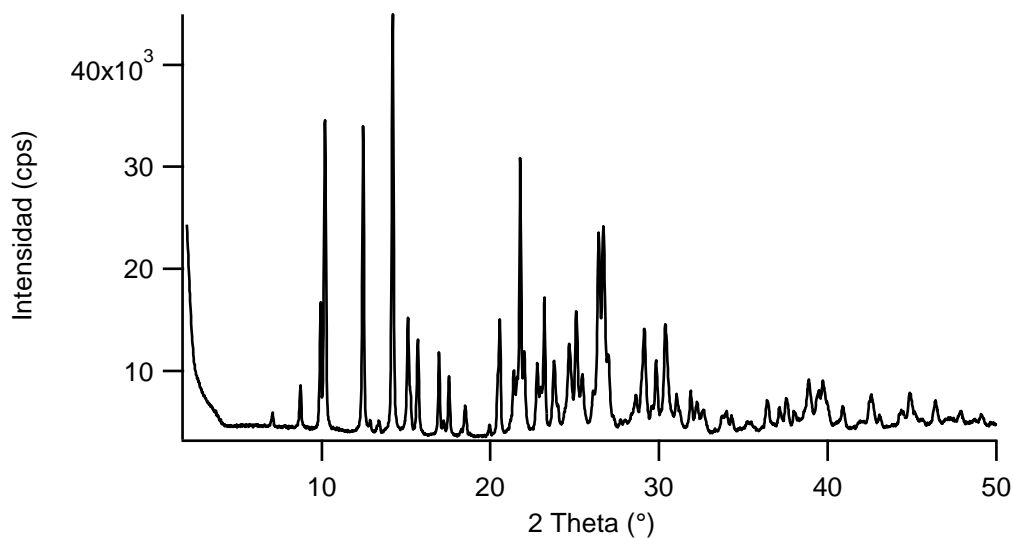


Figura 20. Perfil de Difracción del compuesto 5b.

Fuente: elaboración propia

4.6 Evaluación de las propiedades fungistáticas de los compuestos obtenidos

4.6.1 Evaluación de propiedades fungistáticas contra *Fusarium* sp. A continuación, se relacionan los resultados obtenidos de las pruebas de actividad fungistática sobre las cepas fúngicas empleando las diferentes bases de Schiff, así como de sus correspondientes compuestos de coordinación de Zn (II) y Cu (II) (ver tabla 3)

Tabla 3. *Porcentajes de inhibición de las bases de Schiff y compuestos de coordinación sintetizados frente a Fusarium sp*

Compuesto	% de Inhibición a 144 horas de incubación
3a	100%
3b	21,39%
4a	16,38%
4b	32,24%
5a	31,76%
5a1	36,73%
5b	17,81%

Fuente: elaboración propia.

El compuesto que presento actividad fungicida; 3a se procedió a realizar replicas para determinar la concentración mínima fungistática. Para el caso de los compuestos cuya actividad fungistática no fue relevante; 3b, 4a, 4b, 5a, 5a1 y 5b según lo reportado por H. Sachdeva y colaboradores quienes establecen valores de diámetros de inhibición superiores a 8 mm para ser catalogado un compuesto como moderadamente fungistático (Sachdeva, Saroj, Khaturia, Dwivedi, & Prakash Chauhan, 2014), igualmente en los anexos se presentan las gráficas correspondientes a cinética de crecimiento del hongo frente a las diferentes concentraciones de los compuestos 3b, 4a, 4b, 5a, 5a1 y 5b (ver anexo1-6).

4.6.1 Evaluación de propiedades del compuesto N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a). A continuación, se presenta la gráfica de cinética de crecimiento del hongo *Fusarium sp*, en las diferentes concentraciones del compuesto 3a a las que fue sometido, así como la cinética de crecimiento del hongo en control de crecimiento (solo agar PDA) (ver figura 21).

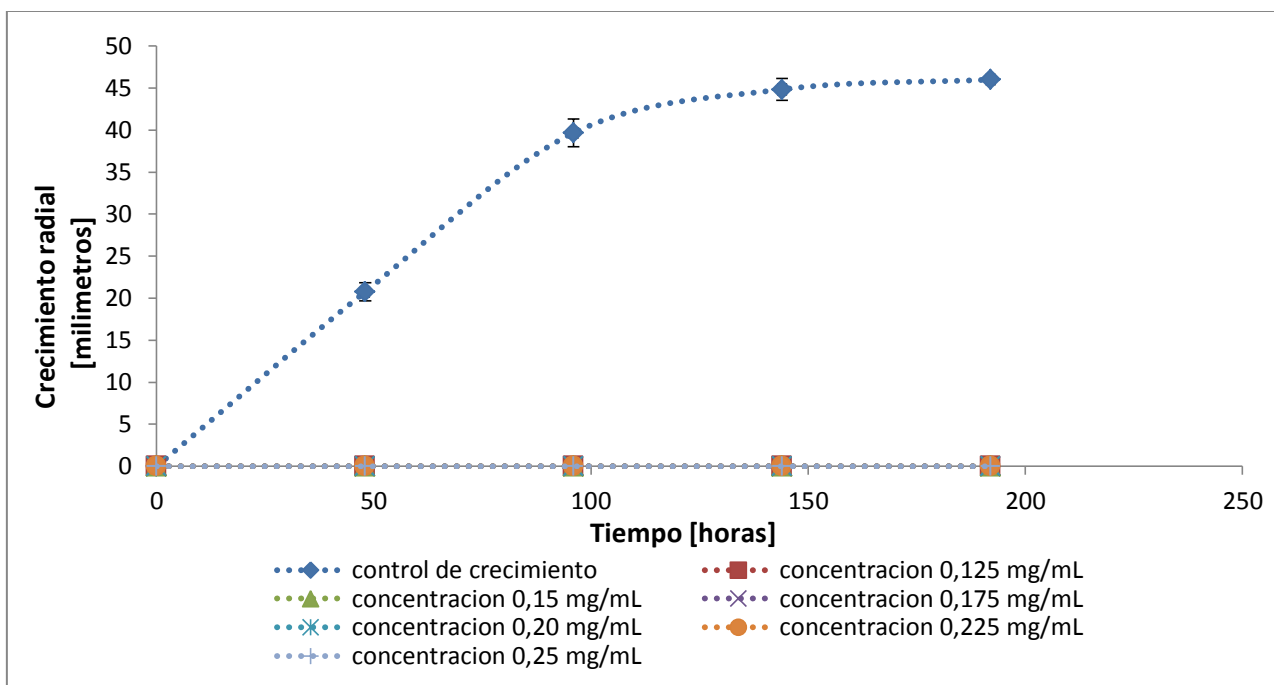
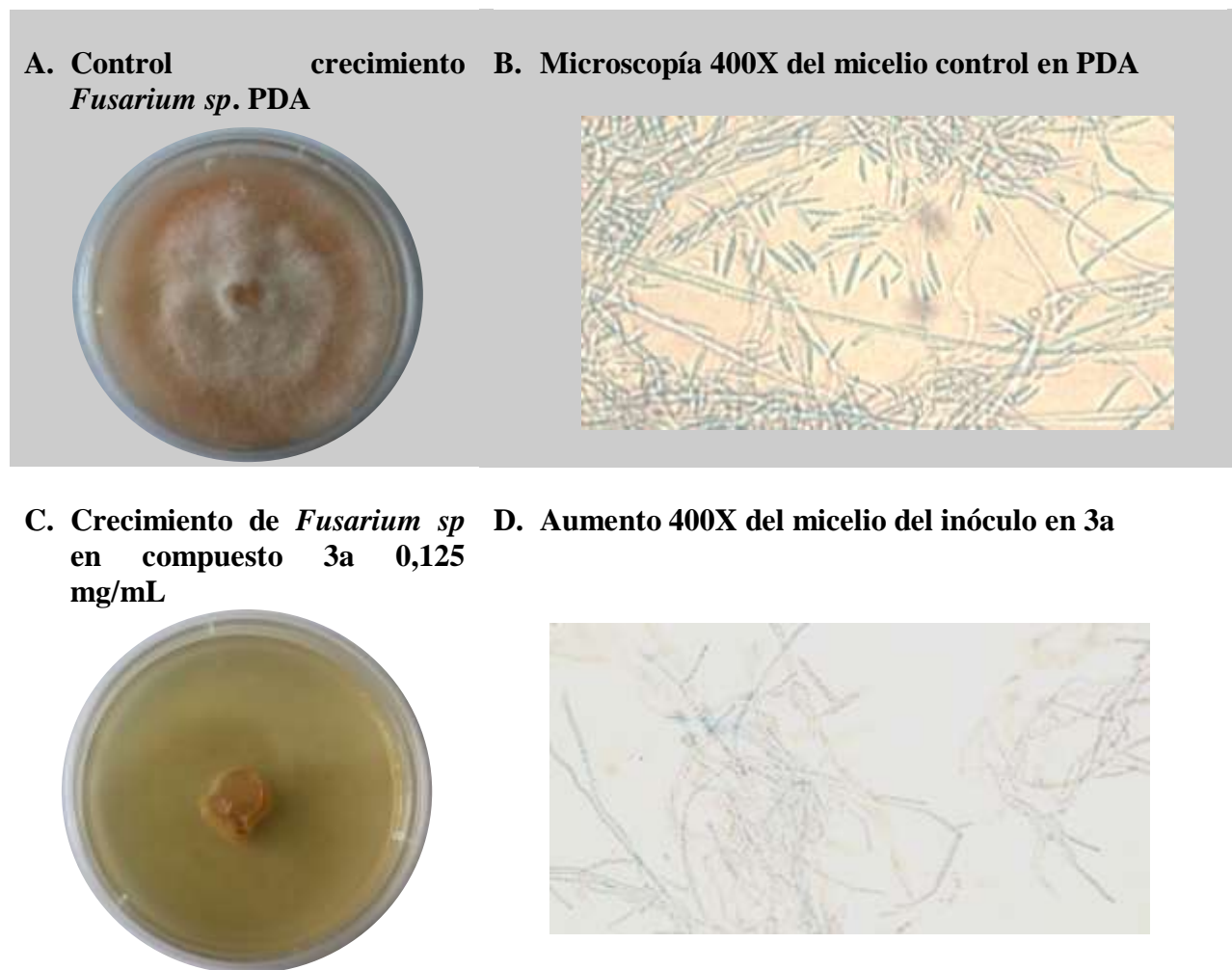


Figura 21. Cinética de crecimiento *Fusarium sp.* frente a compuesto 3a.

En la tabla 4 podemos observar que el crecimiento radial del hongo se ve inhibido por las diferentes concentraciones del compuesto 3a a las cuales fue sometido, al igual se puede evidenciar el registro fotográfico de lo observado en la cinética por el compuesto 3a y el control, así como los efectos del compuesto sobre el hongo a nivel microscópico (ver tabla 4).

Tabla 4. Imágenes *Fusarium sp*, control y *Fusarium sp* efecto del compuesto 3a concentración 0,125 mg/mL, a 8 días.



Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 4 parte A se evidencia el crecimiento radial extensivo del hongo *Fusarium sp* en PDA con textura algodonosa, formación de micelio aéreo y en la parte B el micelio hialino, septado, alargado con la presencia de microconidias fusiformes. Sin embargo, en la parte C se observa ausencia total de micelio aéreo y en la parte D se observa extravasación celular en las hifas y daño a nivel de pared y membrana fúngica producto del tratamiento realizado con el

compuesto 3a (Arias tauta & Jerez Ramirez, 2008; Retana, Adolfo Ramírez-Coché, Castro, & Blanco-Meneses, 2018). Se puede concluir que el mecanismo de acción del compuesto se da mediante la formación de enlace tipo puente de hidrogeno, entre el grupo azometino y los centros activos de diversos constituyentes celulares del hongo, interfiriendo así en los procesos celulares del organismo, como la constitución de la membrana plasmática ocasionando el aumento en su permeabilidad y la consiguiente fuga de proteína y aminoácidos, esenciales para el sostenimiento y proliferación del organismo (Al-Hetar, Zainal Abidin, & Wong, 2007; Mounika et al., 2010).

A partir de estos resultados se realizó una réplica la cual permitió a partir de un análisis estadístico mediante la prueba Tukey, inferir que el tratamiento 3a in vitro puede emplearse en análisis posteriores como agente fungicida sobre *Fusarium sp*, basándose en el valor de la diferencia de los promedios 12,205 y su relación con la diferencia honestamente significativa con margen de error del 5,00%; (DHS)18,622, siendo que la diferencia de promedios es menor a la DHS, postulando que los ensayos son reproducibles entre ellos (Carreño et al., 2018; Manssouri, Znini, El Harrak, & Majidi, 2016).

Al igual que se realizó prueba para identificar la concentración mínima inhibitoria del compuesto 3a sobre *Fusarium sp*. Se lograron obtener los resultados presentados en la Figura 22.

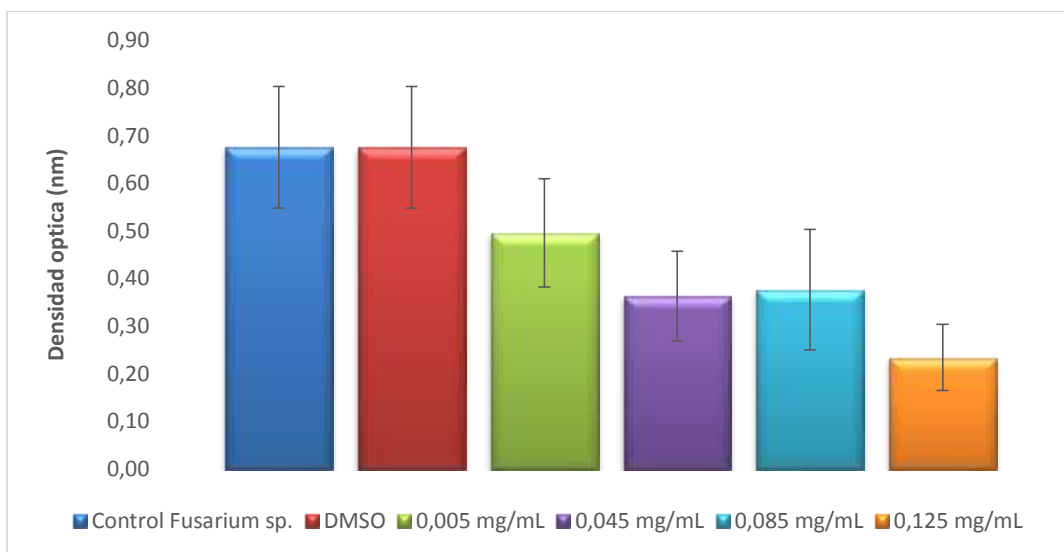


Figura 22. Concentración mínima inhibitoria del compuesto 3a.

Fuente: elaboración propia.

A partir de la figura 22. Se puede observar que la concentración mínima inhibitoria (MIC 50%) para el compuesto 3a es desde 0,045 mg/mL, en base a dicho valor se puede catalogar el compuesto 3a como efectivo contra *Fusarium sp.*, tomando en consideración que en la bibliografía consultada se encontró que el compuesto benomyl fue catalogado como efectivo a una concentración de 0,6 mg/mL (Sandoval-chávez, Martínez-peniche, Hernández-iturriaga, & Fernández-escartín, 2011).

4.6.2 Evaluación de propiedades fungistáticas contra *Botrytis cinerea* DMS 5144. A continuación, se describen los resultados obtenidos de las pruebas de actividad fungistática de las diferentes bases de Schiff, así como de sus correspondientes compuestos de coordinación de Zn (II) y Cu (II) (ver tabla 5)

Tabla 5. *Porcentajes de inhibición de las bases de Schiff y compuestos de coordinación sintetizados. frente a Botrytis cinerea*

Compuesto	% de inhibición máximo tras 192 horas de incubación
3a	86,10%
3b	67,40%
4a	58,51%
4b	57,77%
5a	65,55%
5a1	56,66%
5b	50,00%

Fuente: elaboración propia.

Los resultados de los compuestos catalogados como no efectivos fueron aquellos que presentaron un % de inhibición de crecimiento inferior al 60%, así como aquellos que presentaron un comportamiento anómalo o no lineal en la relación entre las variables % de inhibición Vs concentración, dicho comportamiento se denomina hormesis, y consiste en un comportamiento no correlacionado entre las variables en cuestión, es decir se presentan datos atípicos donde los máximos de inhibición están a concentraciones inferiores y a su vez no es lineal este comportamiento para las demás concentraciones evaluadas (Agathokleous, Kitao, & Calabrese, 2018; Calabrese & Blain, 2011).

Finalmente, con los compuestos que presentaron actividad fungistática de relevancia se realizaron pruebas complementarias a fin de lograr una mejor caracterización de su propiedad, los resultados y graficas de aquellos compuestos que fueron descartados como posibles fungistáticos se pueden observar en el apartado de anexos (Ver anexos 7-11).

4.6.2.1 Evaluación de propiedades del compuesto *N1,N2-di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3a)*. Se realizaron pruebas fungistáticas contra la especie *Botrytis cinerea* DMS 5144, producto de las cuales se obtuvo que el compuesto 3a, posee propiedades fungistáticas de relevancia contra la especie en mención, a continuación, se presenta la gráfica de cinética de crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* DMS 5144 frente al compuesto 3a a diferentes concentraciones (ver figura 23).

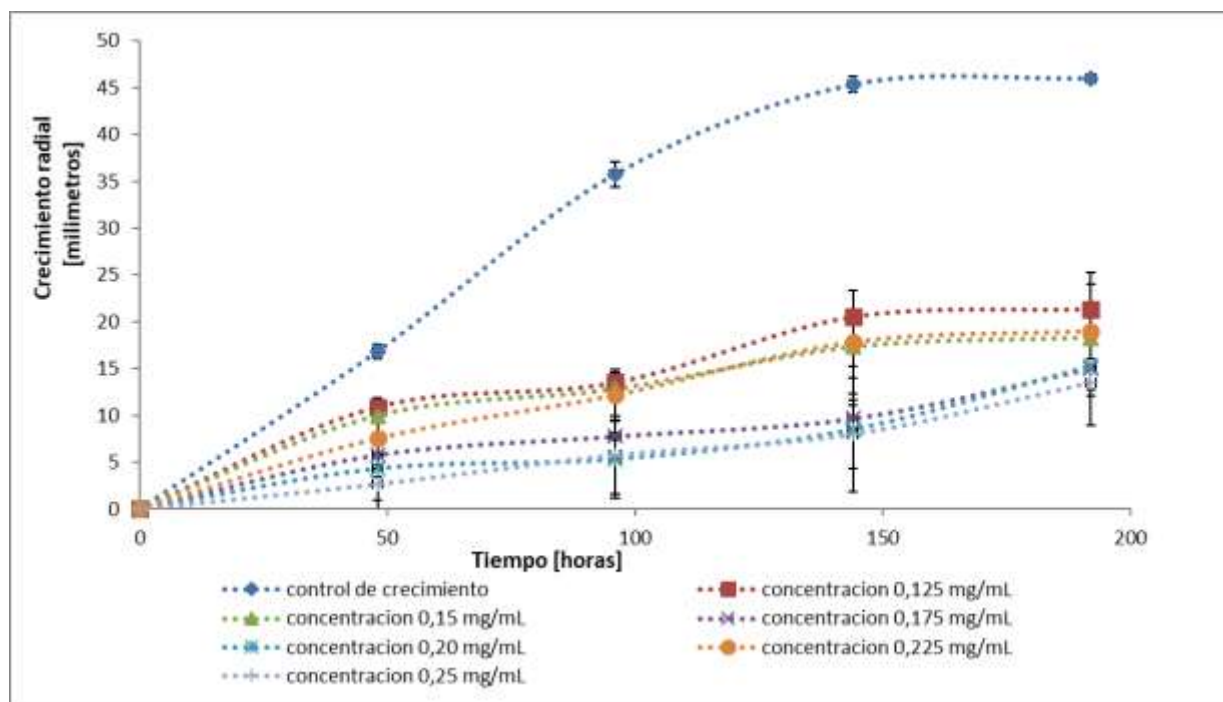


Figura 23. Cinética de crecimiento *Botrytis* sp, frente a compuesto 3a.

Fuente: elaboración propia

Con algunos de los datos obtenidos se realizó una curva donde se graficó % de inhibición vs concentración, a 192 horas u 8 días (ver figura 24).

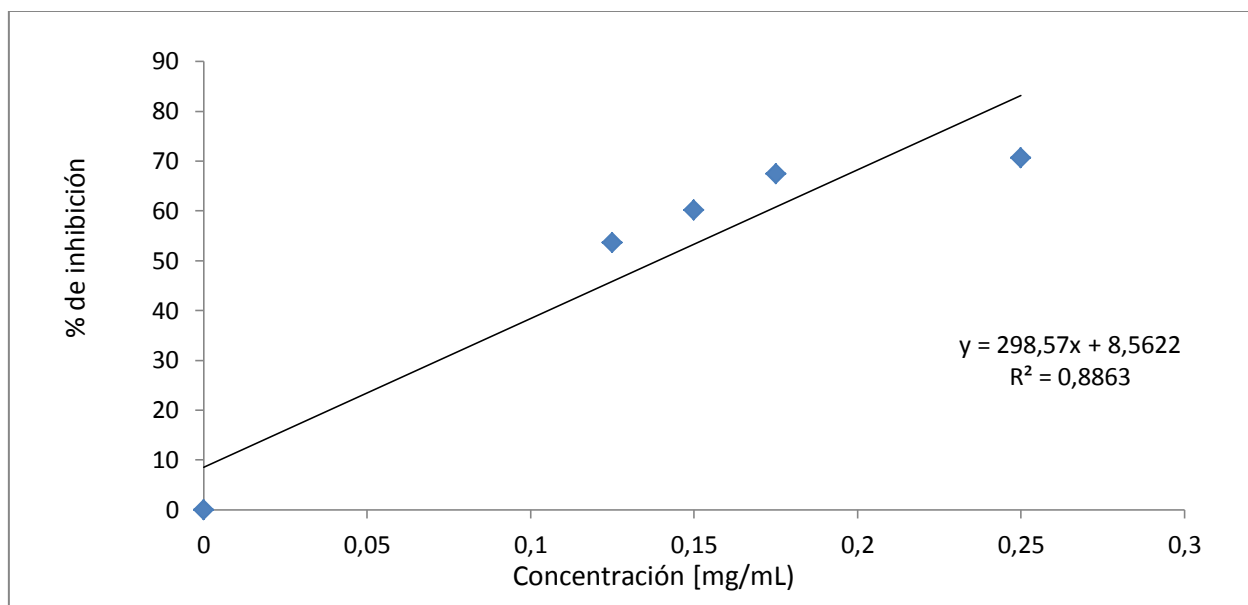


Figura 24. Curva % de inhibición Vs Concentración a 8 días de crecimiento, para el compuesto 3a y su efecto sobre *Botrytis cinerea* DMS 5144.

Fuente: elaboración propia.

Con la Curva anteriormente presentada (ver figura 24) se realizó una regresión lineal, con la cual se calculó la concentración efectiva 50%, es decir el valor de concentración capaz de lograr un efecto inhibitorio del 50% del crecimiento del hongo, dicho valor se calculó en 0,138 mg/mL. A su vez se realizaron montajes para realizar la correspondiente observación y análisis de diferentes efectos del compuesto sobre el hongo. A continuación, se presenta las fotografías de la caja Petri y de lo observado en el microscopio (ver tabla 6).

A partir de estos resultados se realizó una réplica con la cual se realizó el análisis estadístico mediante la prueba Tukey que permitió inferir que el tratamiento 3a in vitro puede emplearse en análisis posteriores como agente fungistático sobre *Botrytis cinérea*, esto basándose en que se obtuvo una diferencia de los promedios de los ensayos de 7,172, valor que está por debajo del valor de la diferencia honestamente significativa (DHS) cuyo valor fue de 14,865 con un

porcentaje de error de 5%, lo que implica reproducibilidad entre los ensayos (Carreño et al., 2018; Manssouri et al., 2016).

A partir de la figura 25. Se puede realizar la correspondiente regresión lineal obteniendo que la concentración máxima inhibitoria para el compuesto 3a es desde 0,306 mg/mL, valor que puede catalogar el compuesto como agente efectivo para el tratamiento contra *Botrytis cinérea*, esto dado que el compuesto de referencia iprodiona presentó un valor de 0,5 mg/mL, el cual fue reportado en el año 1996(Díaz, Barrera, & Garcés de granada, 1996), es de mencionar que el valor anteriormente mencionado pueden ser superior en la actualidad, esto dada la gran capacidad de adaptación que presentan los organismos frente a la exposición continua a compuestos o condiciones determinadas(Grove, 2015).

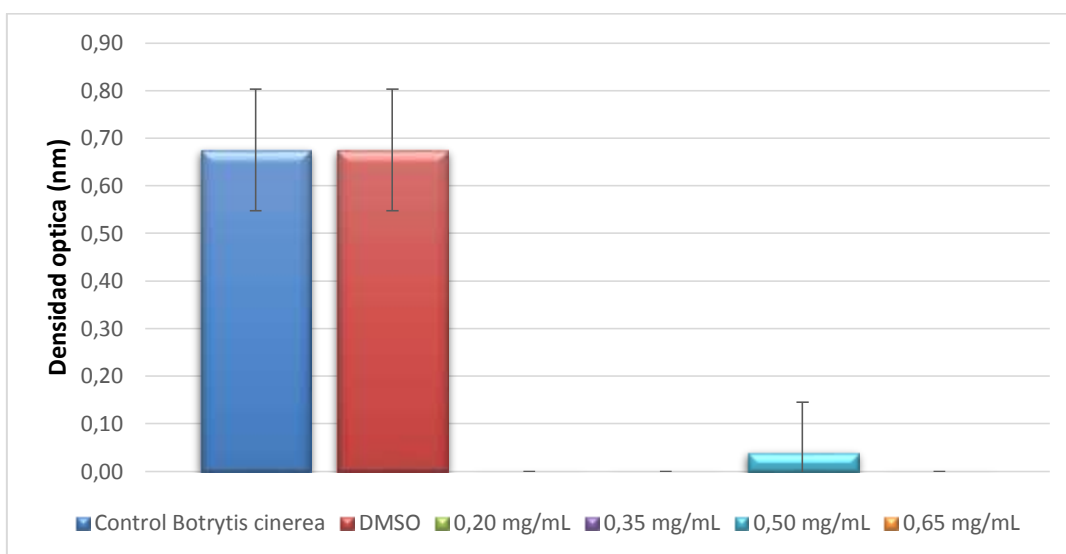


Figura 25. Concentración mínima inhibitoria del compuesto 3a.

Fuente. Elaboración propia.

4.6.2.2 Evaluación de propiedades del compuesto *N1,N2-di(5-bromo)di(2-hidroxi)bencilidenbenceno-1,2-di-imina(3b)*. Se realizaron las correspondientes pruebas fungistáticas contra la especie *Botrytis cinerea* de acuerdo con lo contemplado en el numeral 5.6

de la metodología, de las cuales se recolectaron los datos e información necesarios para la generación de la gráfica de cinética de crecimiento (ver figura 26), de la cual podemos determinar que el compuesto presenta una actividad fungistática de relevancia frente a la especie en mención.

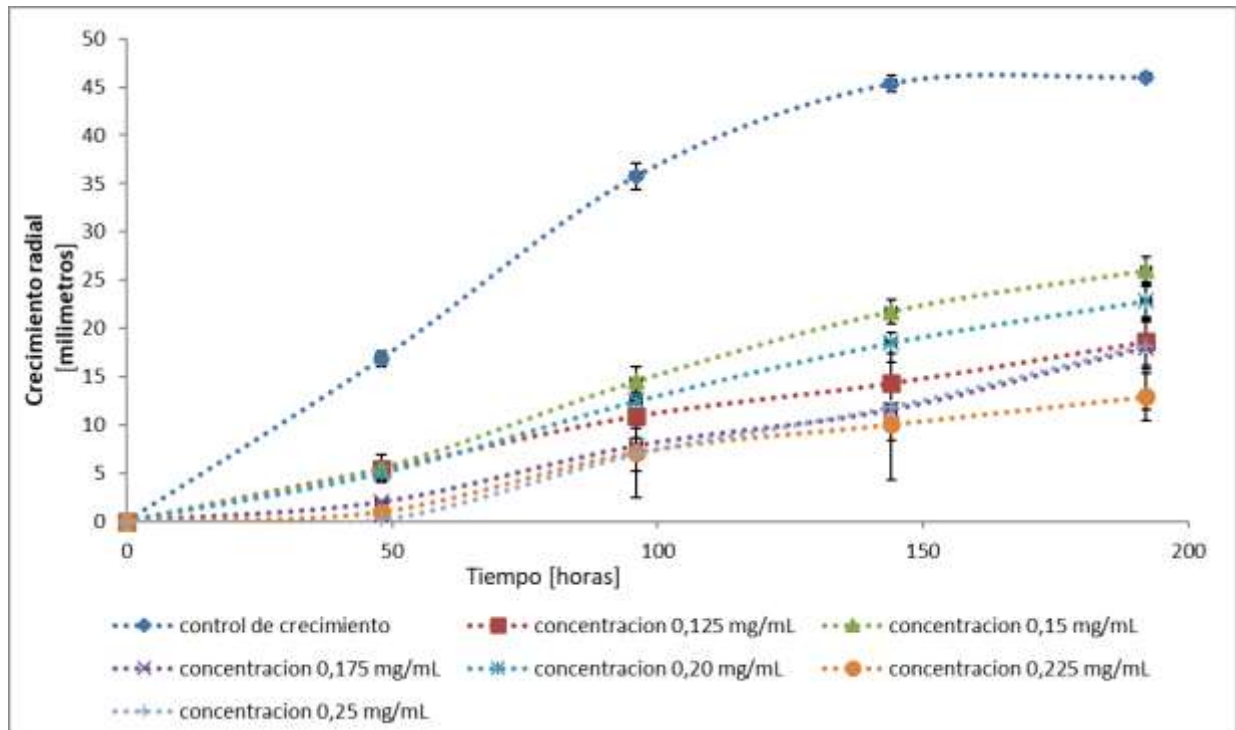


Figura 26. Cinética de crecimiento Botrytis cinerea, frente a compuesto 3b.

Fuente: elaboración propia.

A su vez con algunos de los datos recolectados de las pruebas fungistáticas se realizó una curva donde se graficó % de inhibición Vs concentraciones, al tiempo final de duración del ensayo, 192 horas (ver figura 27).

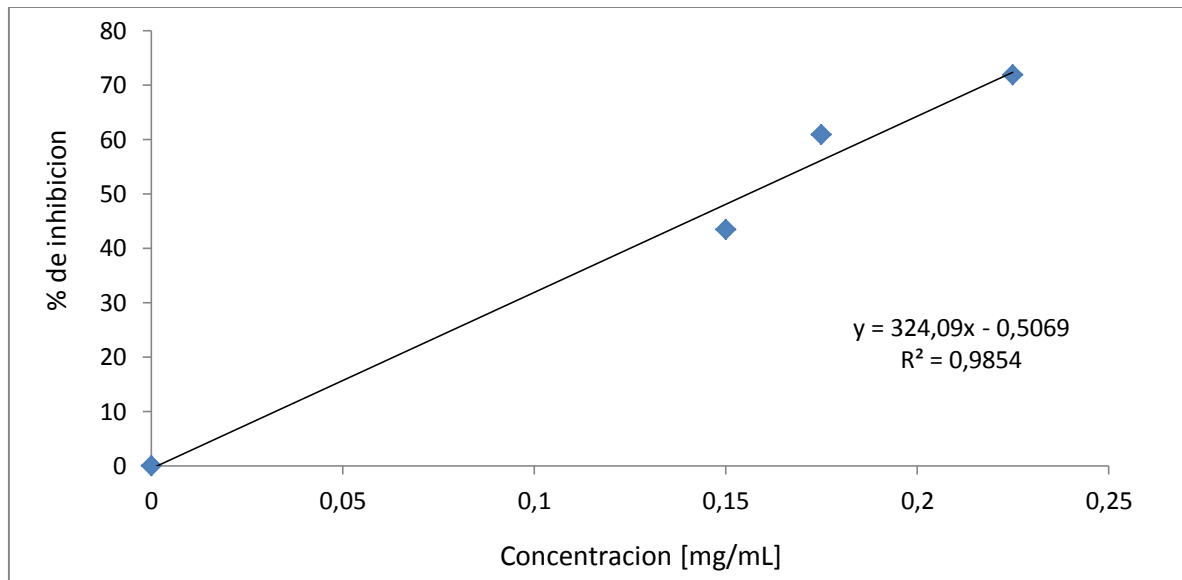


Figura 27. Curva % de inhibición Vs Concentración, para el compuesto 3b y su efecto sobre *Botrytis* sp.

Fuente: elaboración propia.

Con la curva obtenida se realizó la correspondiente regresión lineal, con la cual se logró realizar el cálculo para el valor de concentración efectiva 50%, es decir el valor de concentración con un efecto inhibitorio del 50% del crecimiento del hongo, dicho valor se calculó en 0,1558 mg/mL.

A partir de estos resultados se realizó una réplica, con los datos obtenidos en ambas replicas se realizó un análisis estadístico mediante la prueba Tukey producto del cual se postula que el tratamiento 3b in vitro puede emplearse en análisis posteriores como agente fungistático sobre *Botrytis cinerea*, dado que se obtuvo una diferencia honestamente significativa (DHS) de 12,290 y una diferencia de promedio de 0,557 valor que es muy inferior al DHS, lo que indica que los ensayos son reproducibles entre sí (Carreño et al., 2018; Manssoury et al., 2016).

En la figura 28. Se puede observar que la concentración máxima inhibitoria para el compuesto 3b es desde 0,35 mg/mL, valor con el cual se cataloga como de baja efectividad, esto si se compara su efectividad con la reportada por el compuesto pirimetanil cuyo CE50 fue de 0,039 mg/mL según el estudio publicado por G. Zárate, quien estudio la susceptibilidad del patógeno silvestre a diferentes compuestos comerciales, y a su vez afirma que la resistencia o susceptibilidad de los hongos a determinada sustancia presenta cierto margen de error, por cuanto las condiciones de exposición previa a una sustancia y las condiciones ambientales son variables tanto que pueden generar mayor susceptibilidad o resistencia de los organismos a una sustancia determinada (Zárate Chinchilla, 2012). Sin embargo, si se compara con el compuesto de referencia iprodiona cuyo valor es 0,5 mg/mL según N. Diaz (Díaz et al., 1996) podríamos catalogar el compuesto como efectivo, es por esto que se considera que los resultados obtenidos por G. Zárate fueron realizados en organismos con mayor susceptibilidad, y se toma la determinación de catalogar el compuesto 3b como efectivo.

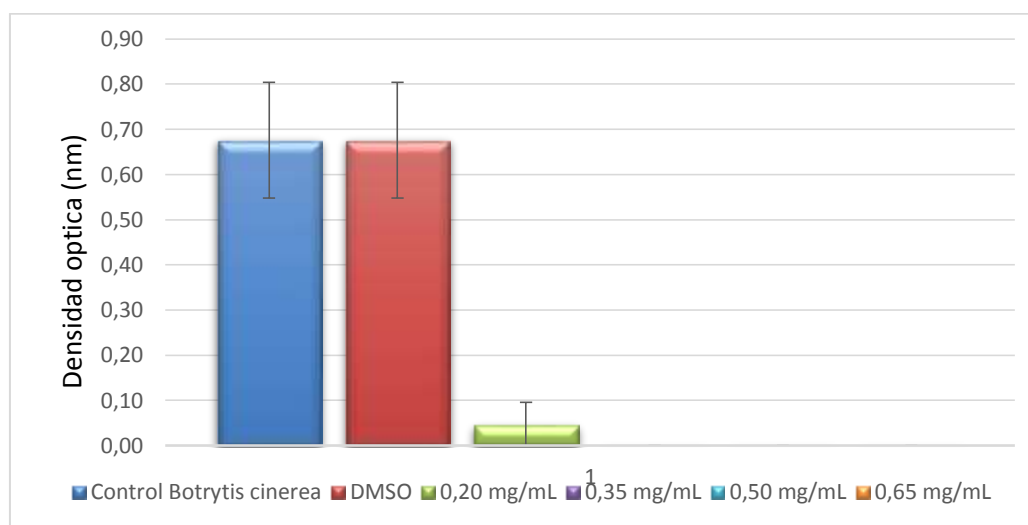
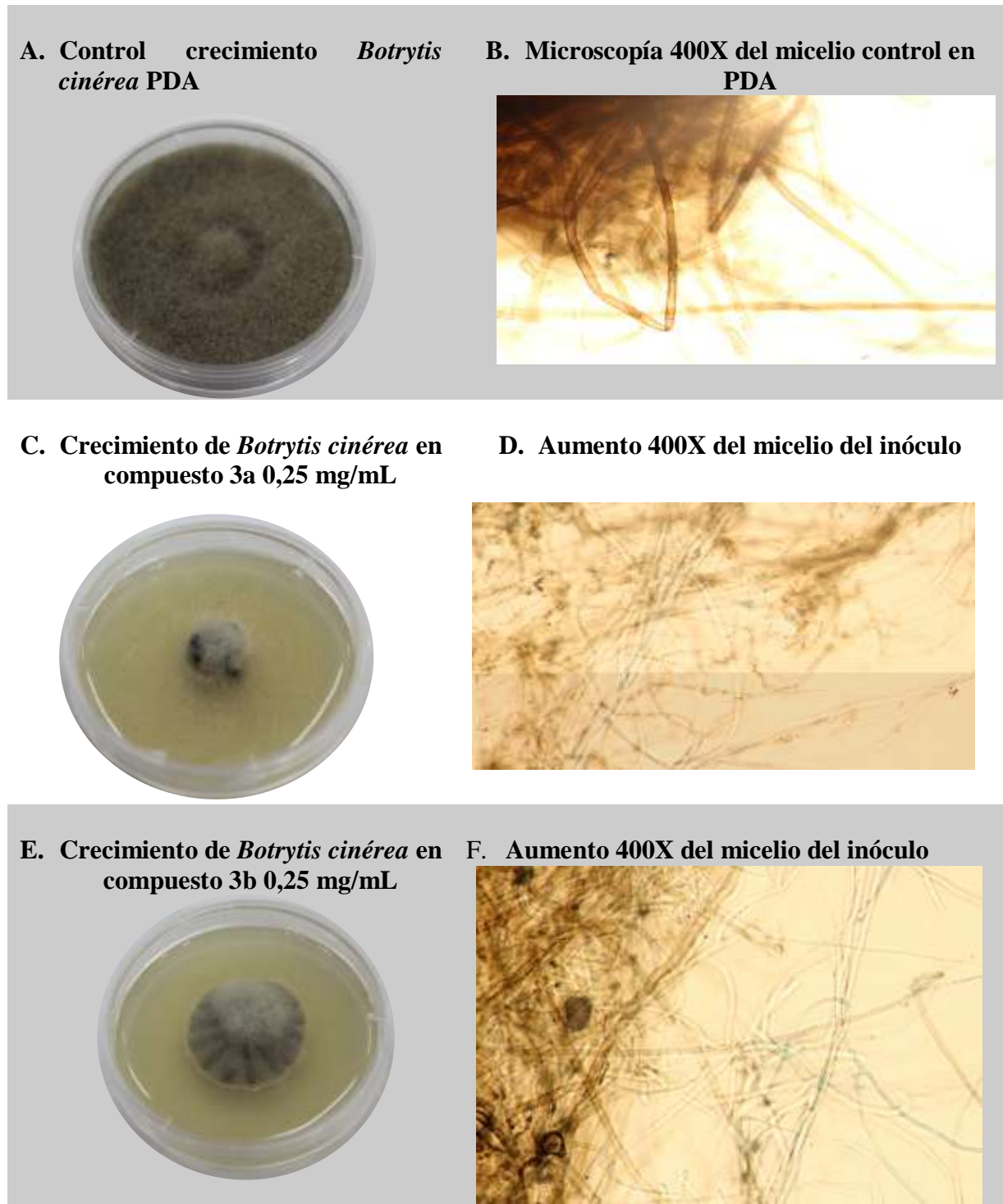


Figura 28. Concentración mínima inhibitoria del compuesto 3b.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 6. Fotografía *Botrytis cinerea*, control y efecto de los compuestos 3a y 3b mg/mL.



Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 6, parte A se evidencia el crecimiento radial del hongo *Botrytis cinerea* en PDA con textura algodonosa, formación de micelio aéreo y en la parte B el micelio dematiaceo, septado. Sin embargo, en los tratamientos: en la parte C se observa ausencia total de micelio aéreo y en la parte D se observa extravasación celular en las hifas e hifas cenocíticas producto del tratamiento realizado con el compuesto 3a. Respecto al aparte E se observa una disminución en el crecimiento radial respecto al control, formación de micelio aéreo y en el aparte F. no se observaron mayores cambios morfológicos y estructurales en las hifas como parte del tratamiento realizado por el compuesto 3b(Arias tauta & Jerez Ramirez, 2008; Gómez Rodriguez, 2013; Villalobos Alvarez, 2006). Se puede inferir que el mecanismo de acción mediante el cual actúan los compuestos sobre el hongo se desarrolla a través de la formación de enlaces tipo puente de hidrogeno, entre el grupo azometino y los centros activos de diversos constituyentes celulares del hongo, afectando la constitución membrana plasmática, generando anomalías a de tipo granular al interior del citoplasma que en conjunto pueden generar la fuga o formación de vesículas con proteínas y aminoácidos de relevancia para el crecimiento y proliferación del organismo(Al-Hetar et al., 2007; Mounika et al., 2010; Rahman, Hjeljord, Aam, Sørliie, & Tronsmo, 2014).

5. Conclusiones

Se comprobó que la mecanoquímica es una técnica eficiente para preparar este tipo de compuestos favoreciendo el rendimiento de reacción. En caso particular, para el compuesto 3a, obtenido convencionalmente se tuvo un rendimiento de 90% y por mecanoquímica del 94% rendimiento pasando de 90% en síntesis convencional a 94% obtenido por mecanoquímica.

Empleando la técnica de DRX de muestras policristalinas se determinó que el compuesto 3a cristalizó en el sistema monoclinico; grupo espacial P21/c (No. 14); constantes de celda $a=16.348$ (3) Å, $b=16.563$ (1) Å, $c=5.969$ (1) Å, $\beta=91.42$ (2) °, $V=1615.62$ (1) Å³ y $Z=4$ y el compuesto 3b cristalizó el sistema monoclinico; grupo espacial P2/m (No. 10); con constantes de celda $a=15.112$ (1) Å, $b=12.7165$ (1) Å, $c=6.0862$ (1) Å, $\beta=90.886$ (1) °, $V=1169.45$ (1) Å³ y $Z=2$.

Empleando la técnica de espectrometría de masas se estimó la geometría y conectividad de los ligandos y centros metálicos en la esfera de coordinación y la presencia o no de contraiones o moléculas de solvente en los compuestos de coordinación. Para los compuestos sintetizados se identificó la relación 1:1 metal - ligando, en la esfera de coordinación.

Se identificó en el compuesto de coordinación 4b la presencia de una molécula de nitrato como contraión.

Se estableció la formación de dos productos para la síntesis del compuesto 5a, dando lugar a un compuesto denominado 5a y otro denominado 5a1. El compuesto 5a presenta un contraión acetato y una molécula de agua dentro de su estructura, mientras que el compuesto de coordinación 5a1 no tiene contraión ni solvente en su estructura.

Para el compuesto de coordinación 5b, se determinó que la estructura de esfera de coordinación está confirmada por un contraión acetato y una molécula de agua como solvente.

Se determinó que el compuesto 3a, presenta efectividad como tratamiento contra el hongo *Fusarium sp*, dado que el efecto deseado se presenta a una concentración de 0,045 mg/mL y a que los resultados son estadísticamente representativos.

Se identificó que el compuesto 3a, presentó efectividad de relevancia como agente para el tratamiento contra *Botrytis cinérea*, puesto que su CE50 se estimó en 0,138 mg/mL, y su dosis máxima efectiva presenta un valor de 0,306, lo cual limita el rango de uso del compuesto.

Se determinó que el compuesto 3b, presenta efectividad frente al hongo *Botrytis cinérea*, dado que su CE50 se calculó en 0,1558 mg/mL, a su vez se determinó su concentración máxima efectiva cuyo valor es de 0,35 mg/mL, dicho margen entre la CE50 y la máxima efectiva limita el rango de uso para el compuesto.

Se estableció que la biblioteca de compuestos de coordinación de Zn (II) y Cu (II) preparados a partir de los compuestos 3a y 3b, no son efectivos para el tratamiento de los patógenos de estudio: *Fusarium sp* y *Botrytis cinérea*.

6. Recomendaciones

Buscar las condiciones idóneas mediante las cuales se logre la síntesis de las diferentes bases de Schiff por métodos alternativos, que resulten en optimización de procesos en pro del medio ambiente.

Evaluar nuevas condiciones de cristalización con el fin de obtener cristales aptos para el estudio estructural por DRX de monocristal.

Evaluar las propiedades farmacológicas de los diferentes compuestos obtenidos frente a organismos objetivos diferentes a los evaluados.

Referencias Bibliográficas

- Abdel-Rahman, L. H., El-Khatib, R. M., Nassr, L. a E., Abu-Dief, A. M., & Lashin, F. E.-D. (2013). Design, characterization, teratogenicity testing, antibacterial, antifungal and DNA interaction of few high spin Fe(II) Schiff base amino acid complexes. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *111*, 266–276. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2013.03.061>
- Agathokleous, E., Kitao, M., & Calabrese, E. J. (2018). Environmental hormesis and its fundamental biological basis: Rewriting the history of toxicology. *Environmental Research*, *165*(April), 274–278. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2018.04.034>
- Al-Hetar, M. Y., Zainal Abidin, M. A., & Wong, M. Y. (2007). Antifungal Activity of Chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Polymers and Polymer Composites*, *21*(7), 449–456. <http://doi.org/10.1002/app>
- Amiri Rudbari, H., Iravani, M. R., Moazam, V., Askari, B., Khorshidifard, M., Habibi, N., & Bruno, G. (2016). Synthesis, characterization, X-ray crystal structures and antibacterial activities of Schiff base ligands derived from allylamine and their vanadium(IV), cobalt(III), nickel(II), copper(II), zinc(II) and palladium(II) complexes. *Journal of Molecular Structure*, *1125*(Iv), 113–120. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.06.055>
- Ansari, I. a, Sama, F., Raizada, M., Shahid, M., Kant, R., & Siddiqi, Z. a. (2017). Synthesis and spectral characterization of 2- ((2-hydroxybenzylidene) amino) -2-methylpropane-1 , 3-diol derived complexes : Molecular docking and antimicrobial studies. *Journal of Molecular Structure*, *1127*. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.07.079>
- Arevalo Peñaranda, E., Díaz Jiménez, A. L., Galindo Álvarez, J. R., & Rivero Cruz, R. M.

- (2011). Manejo fitosanitario del cultivo del mora (*Rubus glaucus* Benth) Medidas para la temporada invernal. *Ica*, 32.
- Arias tauta, J. K., & Jerez Ramirez, A. del P. (2008). *Elaboración de un atlas para la descripción macroscópicas y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá*.
- Babu, K., & Amutha, P. (2014). The new Cu (II) and Ni (II) complexes of schiff bases : Synthesis , characterization and antibacterial studies. *Der Pharma Chemica*, 6(1), 432–435.
- Bermúdez Polonio, J. (1981). *Métodos de Difracción de Rayos-X. Principios y aplicaciones*. Madrid: Ediciones Pirámide, S.A.
- Calabrese, E. J., & Blain, R. B. (2011). The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 61(1), 73–81. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.06.003>
- Calvo-Garrido, C. (2014). *Control de la podredumbre por Botrytis cinerea mediante la aplicación de Candida sake CPA-1 y otras estrategias alternativas a los fungicidas químicos en uva de vinificación Carlos Calvo Garrido*. Universidad de Lleida.
- Cantón, E., Martín, E., & Espinel, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, (15a–1), 24. Retrieved from <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
- Capelo, A. G., & Roche, J. V. (2016). Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela de Ingeniería Agronómica. *Tesis, I*, 1–186.
- Carreño, A., Zúñiga, C., Páez-Hernández, D., Gacitúa, M., Polanco, R., Otero, C., ... Fuentes, J. A. (2018). Study of the structure-bioactivity relationship of three new pyridine Schiff bases: Synthesis, spectral characterization, DFT calculations and biological assays. *New Journal of*

Chemistry, 42(11), 8851–8863. <http://doi.org/10.1039/c8nj00390d>

Cervera, C. (2012). [Candidemia and invasive candidiasis in the adult: clinical forms and treatment]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(8), 483–91. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.02.003>

Díaz, N. C., Barrera, M. J., & Garcés de granada, E. (1996). Contribución al control de *Botrytis cinerea* pers. en *statice* (*limonium sinuatum* mill) variedad midnight blue. *Acta Biológica Colombiana*, 3(2), 7–18.

Dong, C. (1998). No Title. *Journal Applied Crystallography*, 32.

Espinel-Ingroff, A. (2008). Mecanismos de resistencia a los antifúngicos: levaduras y hongos filamentosos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 101–106. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70027-5](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70027-5)

Estupiñan, H., & Ossa, J. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo, 89.

Fratemale, D., Giamperi, L., & Ricci, D. (2003). Chemical Composition and antifungal activity of essential oil obtained from in vitro plants of *thymus mastichina* L. *Journal of Essential Oil Research*, 15(4), 278–281. <http://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712142>

Gómez Rodríguez, T. (2013). Caracterización de aislamientos de *Botrytis cinerea* de rosa en la Sabana de Bogotá, 88. <http://doi.org/10.1007/s00299-010-0845-5>

Grove, G. (2015). Podredumbre por *Botrytis* en la uva para producción comercial en Washington :, 1–5.

Gungor, E., Celen, S., Azaz, D., & Kara, H. (2012). Two tridentate Schiff base ligands and their mononuclear cobalt (III) complexes: Synthesis, characterization, antibacterial and

- antifungal activities. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *94*, 216–21. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2012.03.034>
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., & Li, P. (2007). Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Carbohydrate Research*, *342*(10), 1329–1332. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2007.04.006>
- Iftikhar, B., Javed, K., Khan, M. S. U., Akhter, Z., Mirza, B., & Mckee, V. (2018). Synthesis, characterization and biological assay of Salicylaldehyde Schiff base Cu(II) complexes and their precursors. *Journal of Molecular Structure*, *1155*, 337–348. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.11.022>
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo de hortalizas.
- Jean, L., & Bochu, B. (1992). CHEKCELL: LMGP-Suite Suite of Programs for the interpretation of X-ray. Experiments, ENSP/Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique, BP 46. 38042 Saint Martin d'Hères.
- Kaitner, B., & Zbačnik, M. (2012). Solvent-free Mechanochemistry of Two Thermochromic Schiff Bases. *Acta Chim. Slov*, *59*, 670–679.
- Keypour, H., Shayesteh, M., Sharifi-Rad, A., Salehzadeh, S., Khavasi, H., & Valencia, L. (2008). Synthesis and characterization of copper(II) and cobalt(II) complexes with two new potentially hexadentate Schiff base ligands. X-ray crystal structure determination of one copper(II) complex. *Journal of Organometallic Chemistry*, *693*(19), 3179–3187. <http://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2008.07.012>
- Khoo, T.-J., Break, M. K. Bin, Crouse, K. a., Tahir, M. I. M., Ali, A. M., Cowley, A. R., ... Tarafder, M. T. H. (2014). Synthesis, characterization and biological activity of two Schiff base ligands and their nickel(II), copper(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes derived

- from S-4-picolylidithiocarbamate and X-ray crystal structure of cadmium(II) complex derived from pyr. *Inorganica Chimica Acta*, *413*, 68–76. <http://doi.org/10.1016/j.ica.2014.01.001>
- Kursunlu, A. N., Guler, E., Sevgi, F., & Ozkalp, B. (2013). Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with Schiff bases derived from 5-bromo-salicylaldehyde. *Journal of Molecular Structure*, *1048*, 476–481. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.06.017>
- Löuer, D., & Boultif, A. (2004). No Title. *Journal Applied Crystallography*, *24*, 987 – 993.
- Manssouri, M., Znini, M., El Harrak, A., & Majidi, L. (2016). Antifungal activity of essential oil from the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., in liquid and vapour phase against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *6*(5), 131–136. <http://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60520>
- Miguell, A. D., Hubbard, C. R., & Stalick, J. K. (1991). *NBS*AIDS83: A Fortran program for crystallographic data evaluation* (No. 1141).
- Ministerio de Agricultura y Ganaderia de Costa Rica. (2017a). Proyecto de resolucion N° 004-2017-NR-SFE, 1–10. Retrieved from <http://www.albayan.ae>
- Ministerio de Agricultura y Ganaderia de Costa Rica. (2017b). Servicio Fitosanitario del Estado. Boletin N°83 Noviembre-Diciembre 2017. *Actualidad Fitosanitaria*, (83).
- Mohapatra, R. K., Sarangi, A. K., Azam, M., El-ajaily, M. M., Kudrat-E-Zahan, M., Patjoshi, S. B., & Dash, D. C. (2019). Synthesis, structural investigations, DFT, molecular docking and antifungal studies of transition metal complexes with benzothiazole based Schiff base ligands. *Journal of Molecular Structure*, *1179*, 65–75. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.10.070>

- Mounika, K., Pragathi, a., & Gyanakumari, C. (2010). Synthesis, Characterization and Biological Activity of a Schiff Base Derived from 3-Ethoxy Salicylaldehyde and 2-Amino Benzoic acid and its Transition Metal Complexes. *Journal of Scientific Research*, 2, 513. <http://doi.org/10.3329/jsr.v2i3.4899>
- Nudelman, N. (2004). Química Verde o Sustentable. In *Química Verde o Sustentable* (p. 8). Santa fé, Argentina.
- Pan, Z.-H., Zhao, G.-Q., Xue, L.-W., & Yang, W.-C. (2016). Synthesis, Crystal Structure, and Antimicrobial Activity of Manganese(III) and Iron(III) Complexes Derived from Similar bis-Schiff Bases. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 46(June), 1759–1764. <http://doi.org/10.1080/15533174.2015.1137068>
- Pontón, J., & Quindós, G. (2006). Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Medicina Clínica*, 126, 56–60. <http://doi.org/10.1157/13097528>
- Qin, J., Xia, Z., Zhang, Y., Niu, F., You, Z., & Zhu, H. (2016). Syntheses , Characterization , and Crystal Structures of Schiff Base Zinc (II) Complexes with Tetrahedral Coordination. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 3174(June). <http://doi.org/10.1080/15533174.2015.1137065>
- Rahman, M. H., Hjeljord, L. G., Aam, B. B., Sørli, M., & Tronsmo, A. (2014). Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1), 147–158. <http://doi.org/10.1007/s10658-014-0533-3>
- Retana, K., Adolfo Ramírez-Coché, J., Castro, O., & Blanco-Meneses, M. (2018). CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Fusarium oxysporum* F. SP. Añi ASOCIADO A LA MARCHITEZ DEL APIO EN COSTA RICA. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 115–126. Retrieved from

www.mag.go.cr/revagr/index.htmlwww.cia.ucr.ac.cr

Reventa Parra, M. (2009). *Síntesis y caracterización de ligandos hidroxilados de base de schiff. aplicación al desarrollo de sensores y biosensores*. Universidad Autónoma de Madrid.

Rodríguez Ramírez, L. B. (2009). *SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPLEJOS METÁLICOS CON BASES DE SCHIFF QUE CONTIENEN CEFRADINA*. UNIVERSIDAD DE ORIENTE NÚCLEO DE SUCRE.

Rubinson, K., & Rubinson, J. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Prentice Hall.

Sachdeva, H., Saroj, R., Khaturia, S., Dwivedi, D., & Prakash Chauhan, O. (2014). Green route for efficient synthesis of novel amino acid schiff bases as potent antibacterial and antifungal agents and evaluation of cytotoxic effects. *Journal of Chemistry*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/848543>

Saggiomo, V., & Lüning, U. (2009). On the formation of imines in water—a comparison. *Tetrahedron Letters*, 50(32), 4663–4665. <http://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.05.117>

Salehi, M., Amoozadeh, A., Salamatmanesh, A., Kubicki, M., Dutkiewicz, G., Samiee, S., & Khaleghian, A. (2015). Synthesis, characterization, crystal structures, computational studies, and antibacterial activities of two new Schiff bases derived from isophthalaldehyde. *Journal of Molecular Structure*, 1091, 81–87. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.02.060>

Sandoval-chávez, R. A., Martínez-peniche, R. Á., Hernández-iturriaga, M., & Fernández-escartín, E. (2011). Control Biológico y Químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha. *Chapingo Serie Horticultura*, 17(2), 161–172.

Skoog, D. a., Holler, F. J., & Nieman, T. a. (2001). *Análisis Instrumental. Journal of Chemical Information and Modeling*.

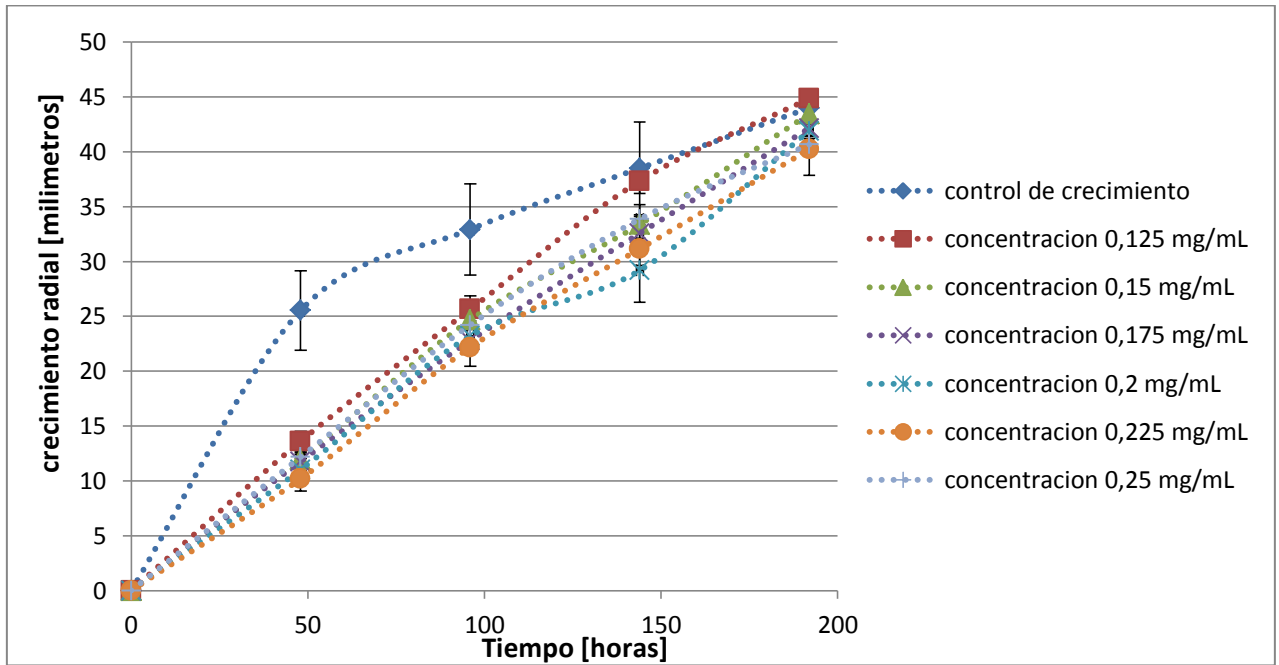
- Suresh, R., Kamalakkannan, D., Ranganathan, K., Arulkumaran, R., Sundararajan, R., Sakthinathan, S. P., ... Thirunarayanan, G. (2013). Solvent-free synthesis, spectral correlations and antimicrobial activities of some aryl imines. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 101, 239–248. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.039>
- Thakor, Y. J., Patel, S. G., & Patel, K. N. (2011). Synthesis, characterization and biocidal studies of Ni(II), Cu(II), Co(II), Fe(II), Mn(II) and Zn(II) complexes Containing tetra dentate and neutral bi dentate schiff base. *Der Chemica Sinica*, 2(1), 43–51.
- Tigineh, G. T., Wen, Y. S., & Liu, L. K. (2015). Solvent-free mechanochemical conversion of 3-ethoxysalicylaldehyde and primary aromatic amines to corresponding Schiff-bases. *Tetrahedron*, 71(1), 170–175. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2014.10.074>
- Vásquez-Ramírez, L. M., & Castaño-Zapata, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363–374. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v20n2/v20n2a14.pdf>
- Vázquez, R. A., Coreño, O., Veloz, M. A., Reyes, V. E., Martínez, M., Zamora, F., ... Reyes, M. I. (2008). MECANOSÍNTESIS: SÍNTESIS EN ESTADO SÓLIDO DE COMPUESTOS ORGÁNICOS NITROGENADOS DE TIPO IMINA. *Memorias Del V Encuentro de Participación de La Mujer En Las Ciencias*, 1, 8–11. Retrieved from http://200.34.44.252/investigacion/icbi/LI_RecCorr/maria_veloz/S2-BYQ.pdf
- Villalobos Alvarez, C. A. (2006). Características morfológicas y patogénicas de aislamientos de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries desde arándano (*Vaccinium corymbosum* L. y *Vaccinium virgatum* Ait.) resistentes a benomilo, 90. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0735->

1097(17)34146-3

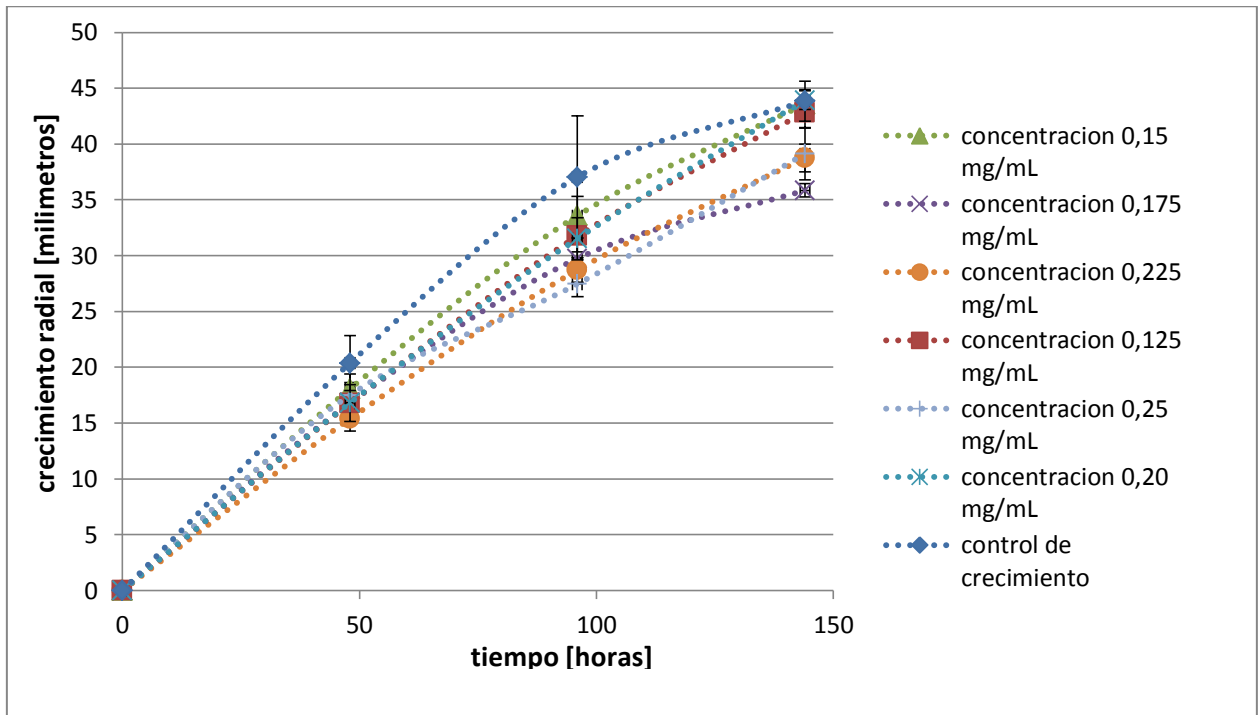
Zárate Chinchilla, G. (2012). Análisis de sensibilidad de fungicidas utilizados en el combate de *Botrytis cinerea* in vitro e in vivo utilizando plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*), 69.

Zhang, X.-L. (2016). Copper(II) Complexes With Bis-Schiff Bases: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activities. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 46(May), 1848–1853.
<http://doi.org/10.1080/15533174.2015.1137069>

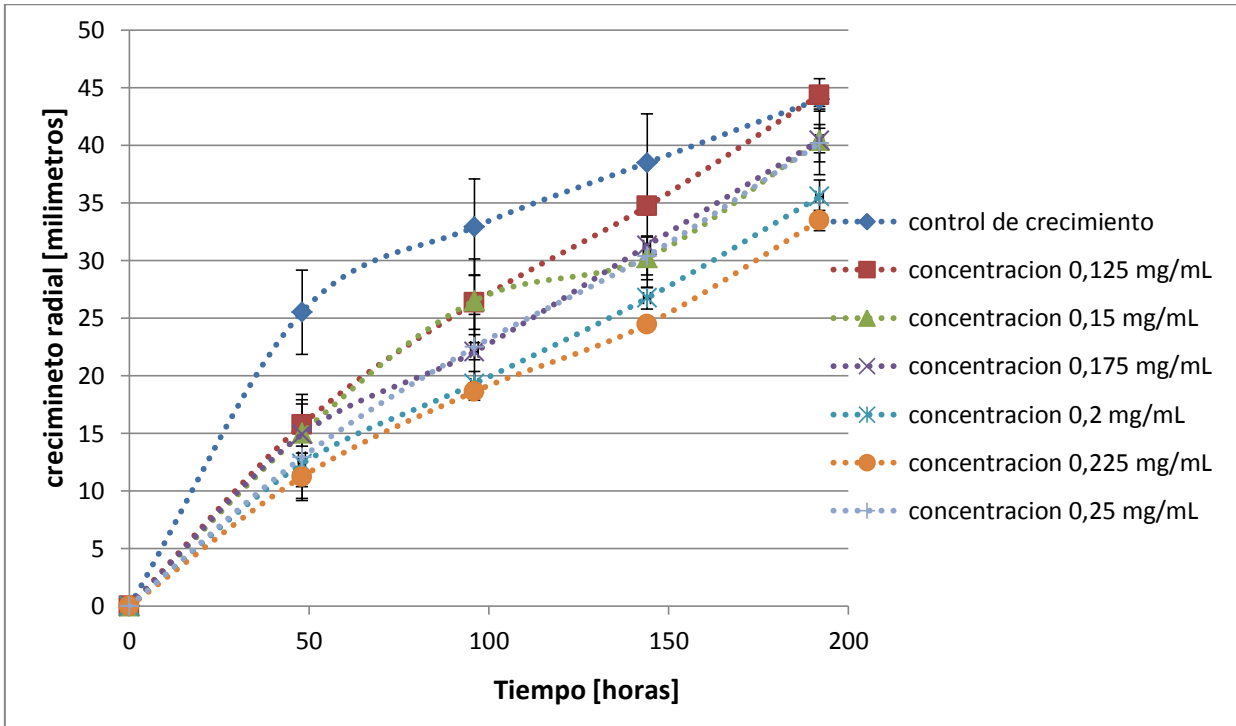
Apéndices

Apendice 1. Cinética de crecimiento *Fusarium* sp, frente al compuesto 3b.

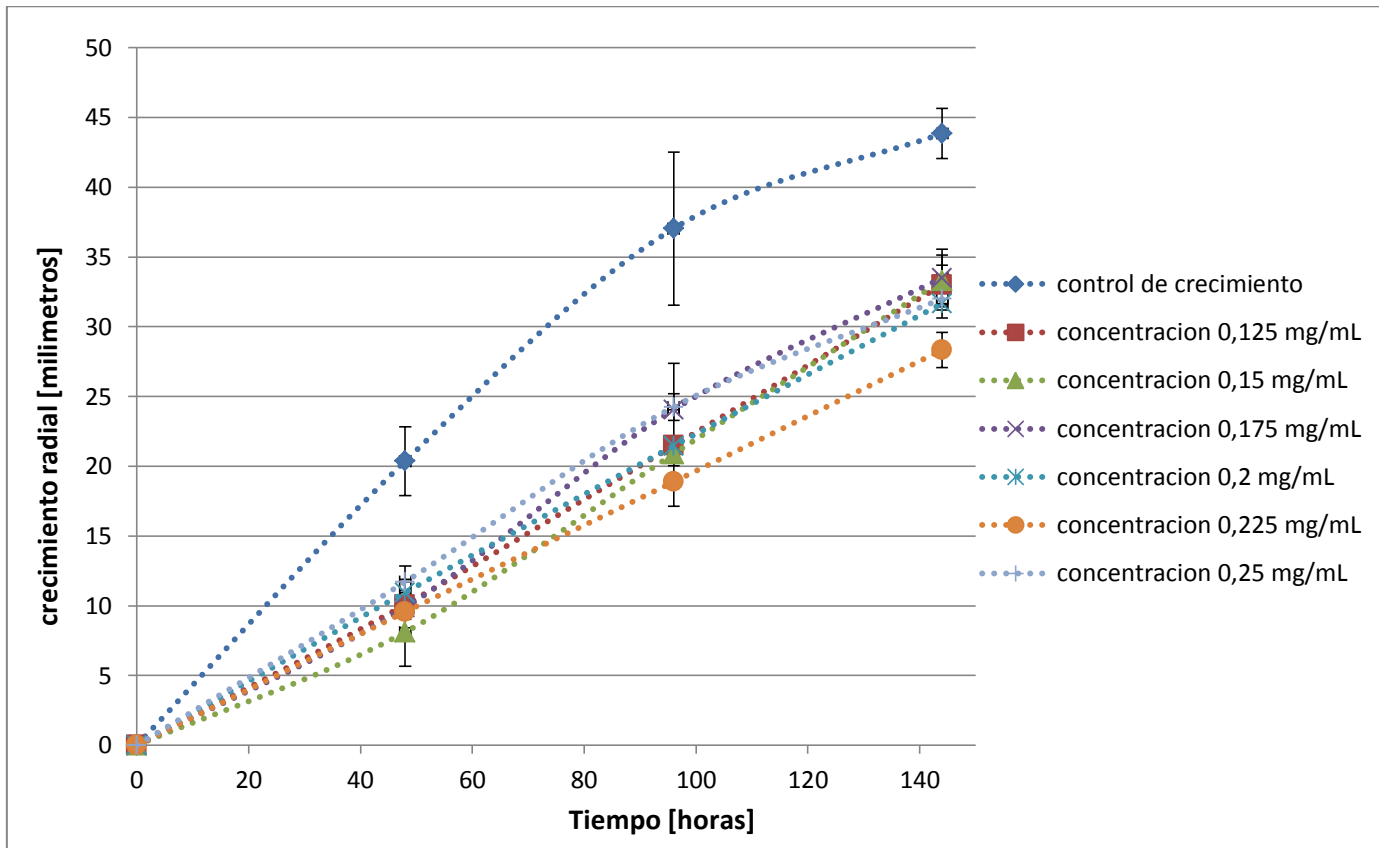
Apéndice 2. Cinética de crecimiento *Fusarium* sp, frente al compuesto 4a.



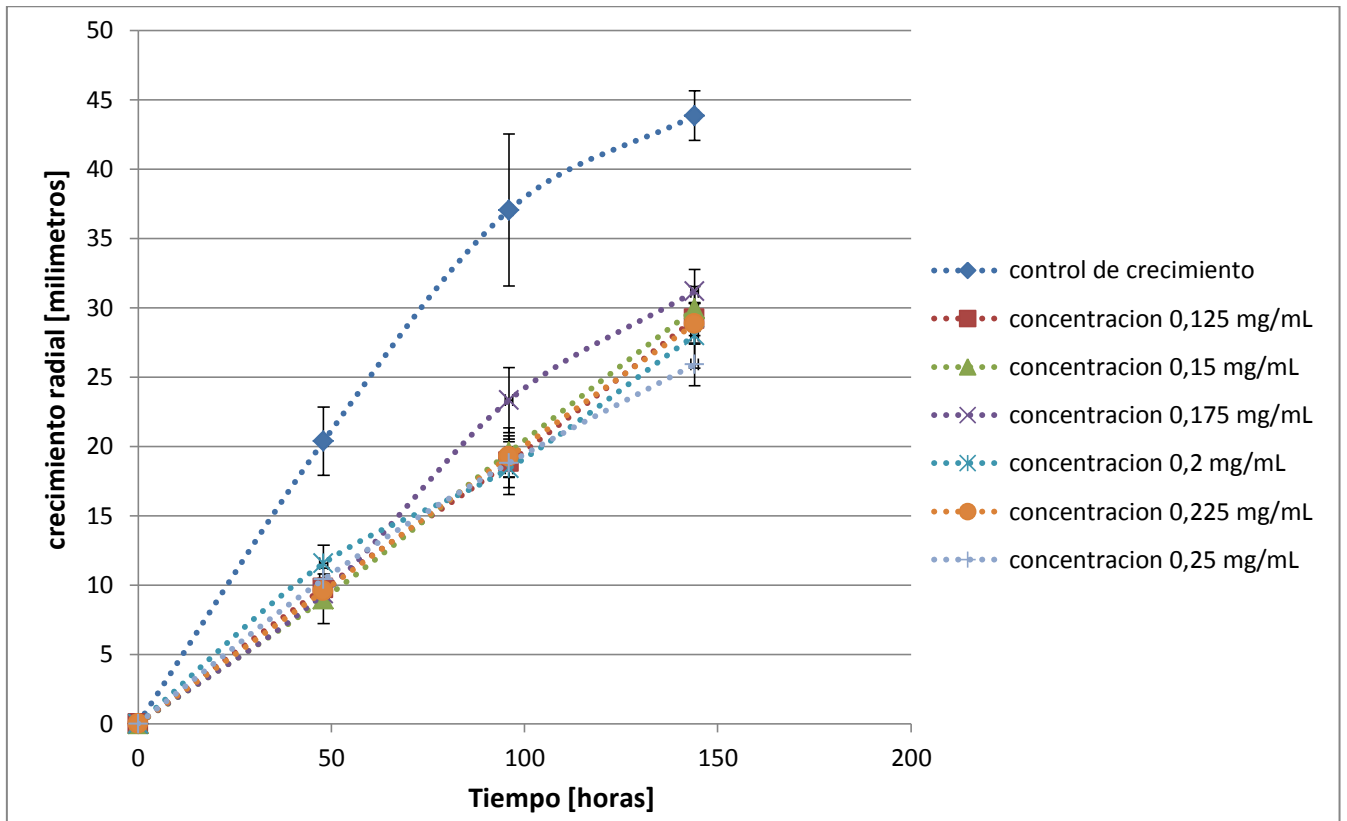
Apéndice 3. Cinética de crecimiento *Fusarium sp.* frente al compuesto 4b.



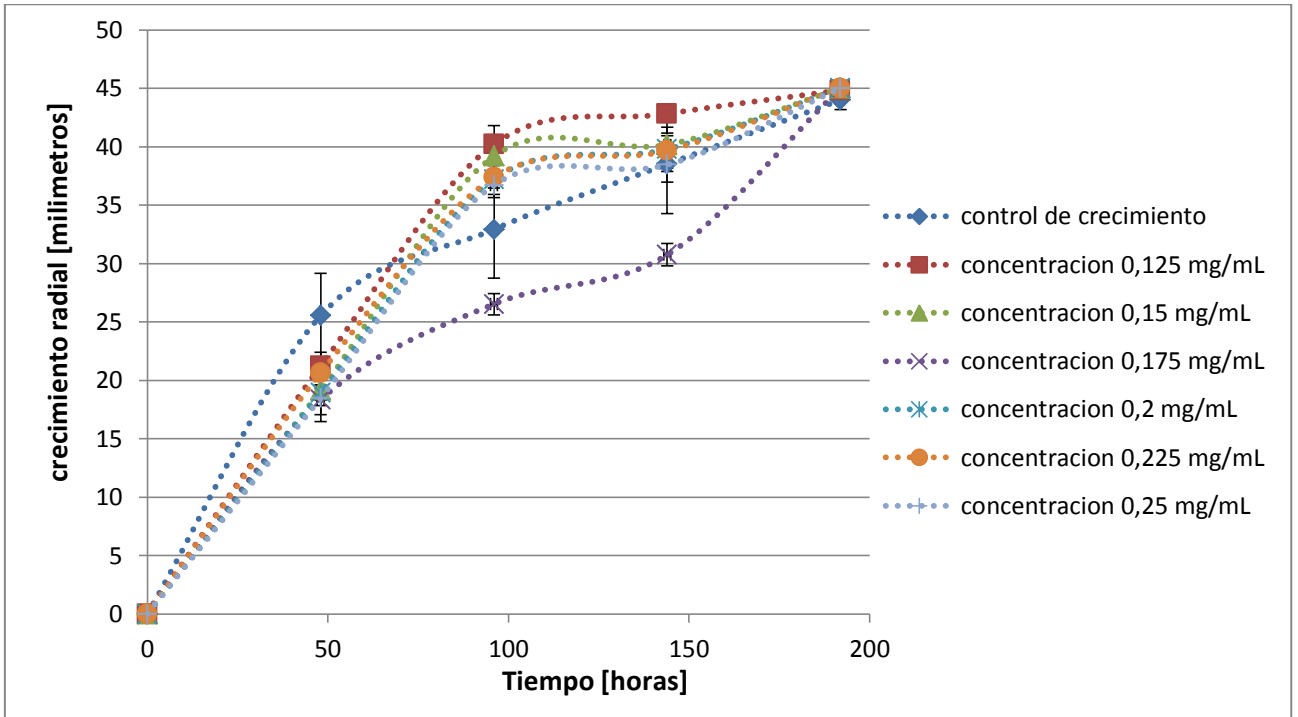
Apéndice 4. Cinética de crecimiento *Fusarium sp.* frente al compuesto 5a.



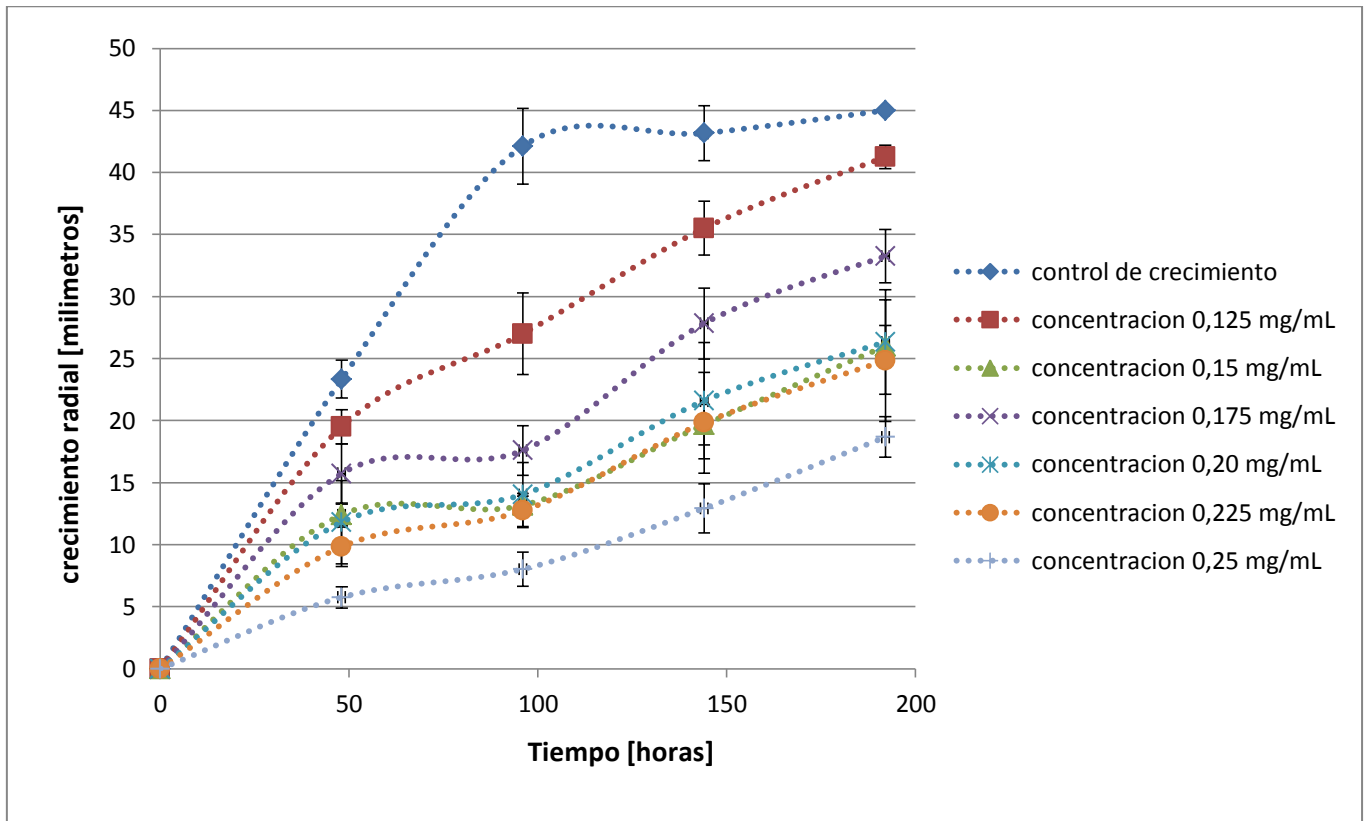
Apéndice 5. Cinética de crecimiento *Fusarium sp.* frente al compuesto 5a1.



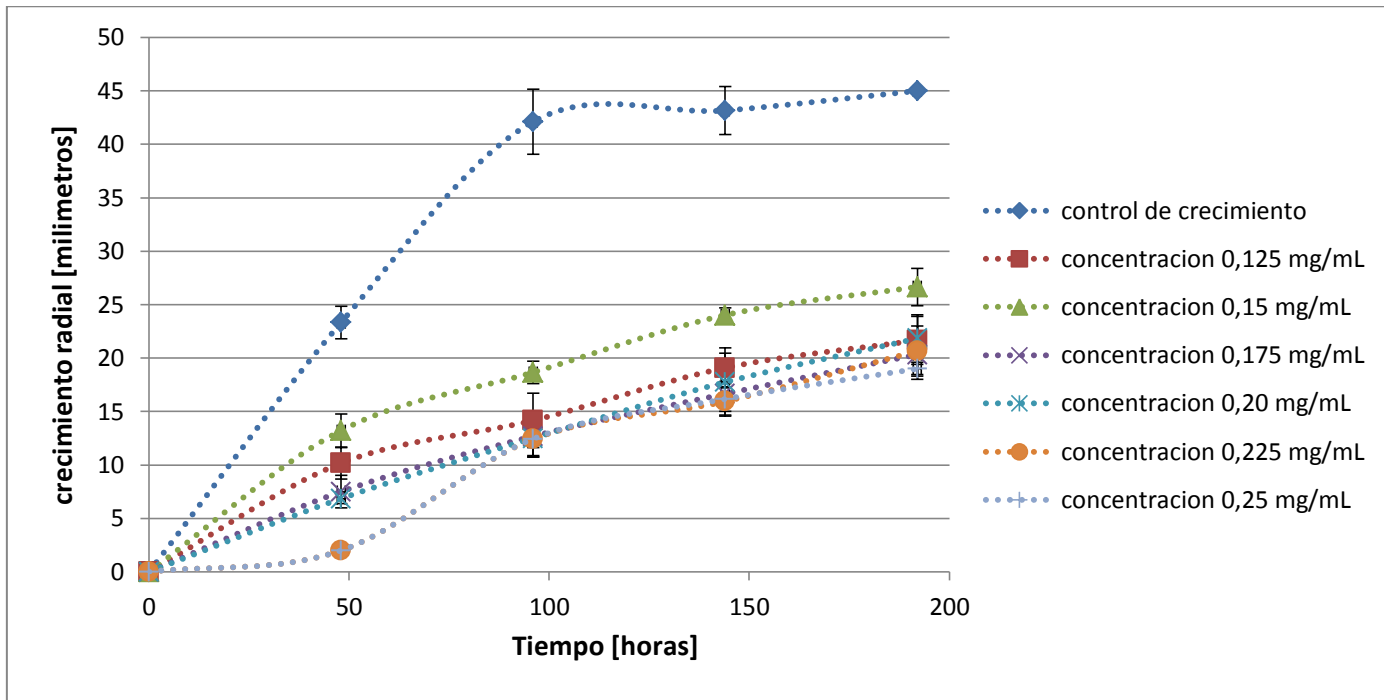
Apéndice 6. Cinética de crecimiento *Fusarium sp.* frente al compuesto 5b.



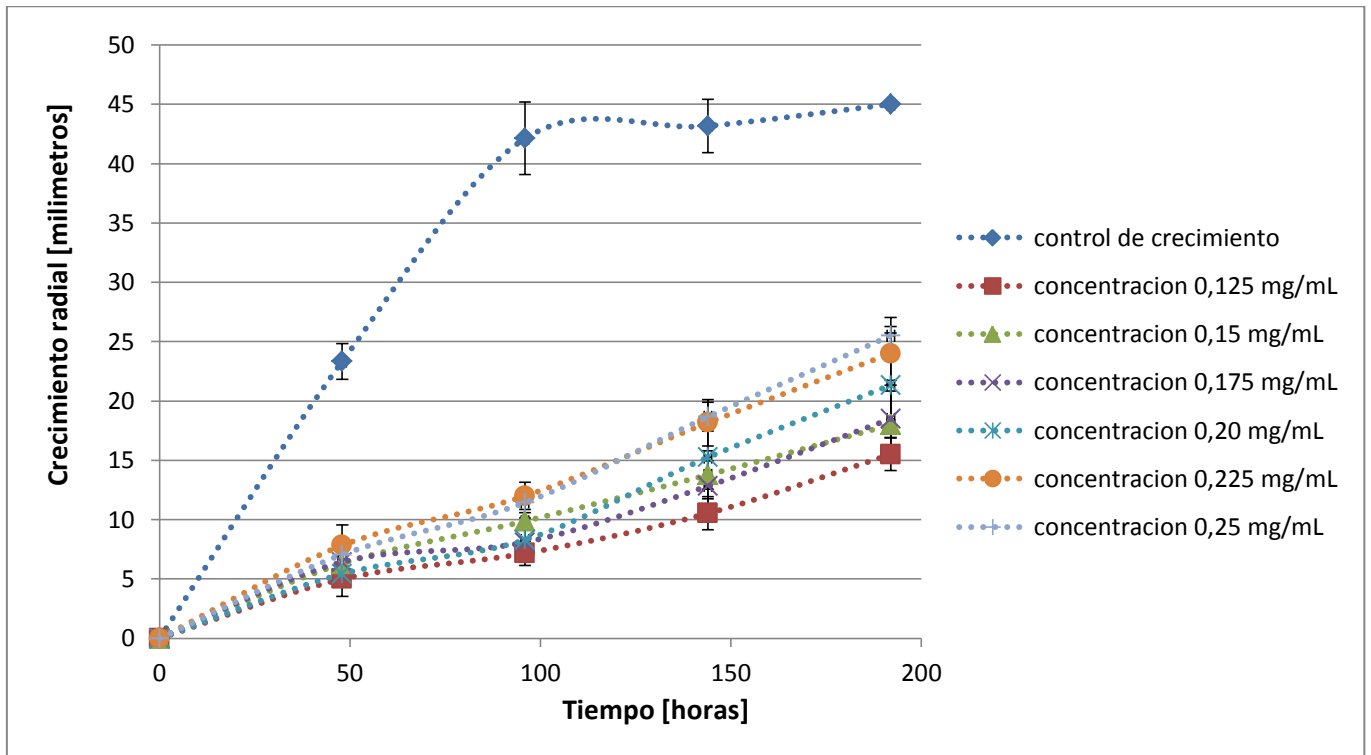
Apéndice 7. Cinética de crecimiento *Botrytis cinerea*, frente al compuesto 4a.



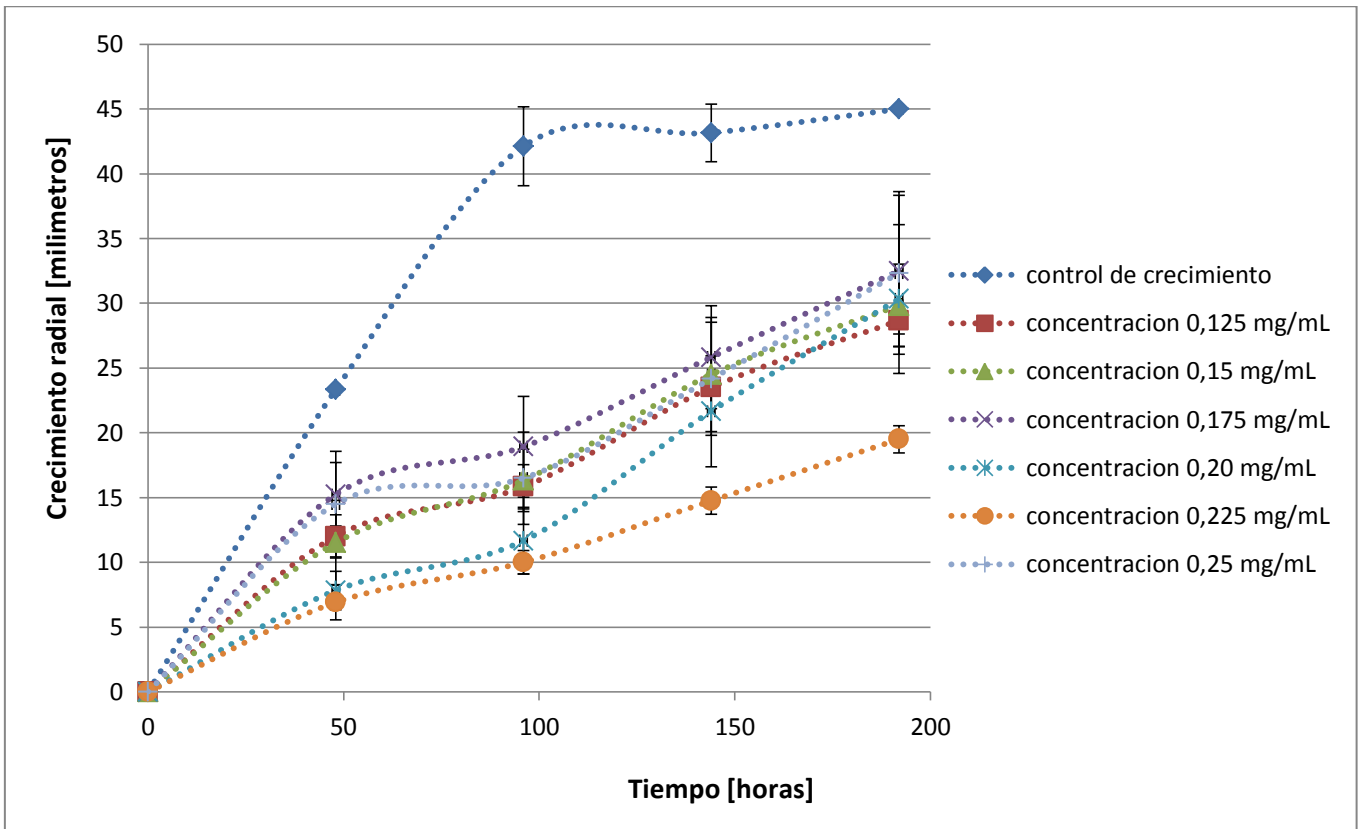
Apéndice 8. Cinética de crecimiento *Botrytis cinerea*, frente al compuesto 4b.



Apéndice 9. Cinética de crecimiento *Botrytis cinerea*, frente al compuesto 5a.



Apéndice 10. Cinética de crecimiento *Botrytis cinerea*, frente al compuesto 5a1.



Apéndice 11. Cinética de crecimiento *Botrytis cinerea*, frente al compuesto 5b.

