

00002



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

POTENCIAL HERBICIDA DE METABOLITOS AISLADOS DE ESPECIES
SELECTAS DE ACTINOMICETOS. ACTINOMICETO MIV2B(31) COMO
UNA FUENTE NOVEDOSA DEL ANTIBIOTICO MADURAMICINA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA)

PRESENTA:

Q.F.B. MARIA TERESA GUTIERREZ LUGO

MEXICO, D. F.

2000

287255



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Alfredo Ortega Hernández
Primer vocal	Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Segundo vocal	Dr. Blas Lotina Henssen
Tercer vocal	Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Secretario	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Primer suplente	Dr. Eduardo Bárzana García
Segundo suplente	Dr. Javier Plascencia de la Parra.


Tutor: **Dra. Rachel Mata Essayag.**


Cotutor: **Dra. Amelia Farrés González Saravia.**


Sustentante: **María Teresa Gutiérrez Lugo.**

El presente trabajo de tesis se desarrollo en las siguientes Instituciones y Dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia.

División de Bioquímica y Farmacia.

Facultad de Química.

Laboratorio 115, Departamento de Bioquímica.

División de Bioquímica y Farmacia

Facultad de Química.

Laboratorio 225, Departamento Biotecnología.

División de Bioquímica y Farmacia

Facultad de Química.

Laboratorio de Microbiología Industrial.

Departamento de Biotecnología

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Planta Piloto

Departamento de Biotecnología

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Unidad de Ribotipificación

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes Instituciones y Dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM): a la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Coordinación General de Estudios de Posgrado por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo a través de los proyectos 27978N, IN207300 y PADEP 005327 y 207340, respectivamente. A la DGAPA y al CONACyT por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de Posgrado.

También agradezco a los siguientes académicos por el apoyo brindado a lo largo de la realización de la presente investigación a la Dra. Esperanza Martínez Romero, investigadora del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM por haber proporcionado las facilidades para realizar los experimentos conducentes a la identificación taxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) mediante en análisis de las secuencias de ARN ribosomal 16S. Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM y miembro de mi comité tutorial por su valiosa asesoría, misma enriqueció sustancialmente el desarrollo del presente trabajo. Al Dr. Blas Lotina Henssen, investigador de la Facultad de Química, UNAM por su colaboración en la realización de las evaluaciones del efecto de los compuestos microbianos sobre diversas actividades fotosintéticas. Al Dr. Alfredo Ortega Hernández, investigador del Instituto de Química por permitir realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio durante la época de crisis universitaria y por su decidida ayuda como miembro de mi comité tutorial. A la Dra. Amelia Farrés González Saravia, investigadora de la Facultad de Química, UNAM quien fungió como coasesor del presente

trabajo, por su importante asesoría durante el desarrollo experimental de la presente disertación. Al Dr. Juan Manuel Espíndola investigador del Instituto de Geofísica de la UNAM por proporcionar la muestra de suelo volcánica de donde se aislaron los actinomicetos objeto de estudio. Al Biólogo Marco Antonio Ortiz, Técnico Académico del IIB, UNAM por la identificación quimiotaxonómica de los actinomicetos de estudio. A los Químicos Julio Martínez y Marco Antonio Rogel, Técnicos académicos del CIFN por el apoyo técnico en la identificación taxonómica mediante el análisis del ADNr 16S de las cepas MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31). A la QFB Laura Escalante (Depto de Biotecnología, IIB, UNAM), al Ing. Abel Blancas (Planta Piloto, IIB, UNAM), a la M. C. Beatriz King (Depto. de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM), a la Dra. Perla Castañeda y a las maestras Laura Acevedo e Isabel Rivero (Depto. de Farmacia, Facultad de Química, UNAM) por su valiosa ayuda en varios aspectos técnicos a lo largo del desarrollo del presente trabajo de tesis.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz, al Q. Wilber Mathus (Instituto de Química, UNAM) y al M. en C. Atilano Gutiérrez (UAM, Iztapalapa) por el registro de los espectros de RMN. A la QFB Graciela Chavez, la Q. Marisela Gutiérrez (USAI, Facultad de Química, UNAM) y a la QFB Rocío Patiño (Instituto de Química, UNAM) por el registro de los espectros en el IR y las determinaciones de rotación óptica. Al Dr. Rubén Alfredo Toscano (Instituto de Química, UNAM) por los experimentos de difracción de rayos X de los antibióticos de tipo poliéter. Al IQ. Luis Velasco, al M. en C. Javier Pérez (Instituto de Química, UNAM) y a la Q. Georgina Duarte (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de los espectros de masas.

También quisiera expresar mi reconocimiento a los miembros del Jurado comisionado por su colaboración durante el proceso de revisión de este manuscrito, en

particular al Dr. Rogelio Pereda Miranda por sus valiosos comentarios que permitieron mejorar la versión final de la tesis.

A los prestadores del Servicio Social del Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia, en particular a Lucía Somilleda y a Adriana Gallardo y a mis compañeros del laboratorio, por su ayuda desinteresada, especialmente al Dr. Daniel Chávez y a la M. en C. Blanca Rivero.

De manera muy especial, expreso mi profundo agradecimiento a la Dra. Rachel Mata Essayag, investigadora de la Facultad de Química de la UNAM por su invaluable dirección de la presente investigación, a quien deseo hacer patente mi reconocimiento por su labor docente y constante ejemplo de superación académica. Con admiración y respeto agradezco infinitamente la paciencia, apoyo y confianza que me brindó.

Por último agradezco a todos mis profesores y a la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme el valioso tesoro de la educación.

DEDICATORIAS

A mis padres Balbina Lugo y Fidel Gutiérrez † por su amor, paciencia, motivación apoyo, comprensión y ejemplo, los cuales me permitieron cumplir este objetivo.

A mis hermanos José Fidel y María del Socorro por su cariño, comprensión y apoyo.

A mis sobrinos Carlos e Iván por darle alegría y esperanza a mi vida.

A mi familia por su cariño. En particular a mis abuelos Guadalupe Loza y Fidel Gutiérrez † por darme fuerza y motivación para seguir adelante.

A mis amigos entrañables Victoria Vera, Manuel García, Dea Herrera, Martha Macías y Samuel Estrada por compartir momentos importantes de mi vida.

A mis amigos de la Facultad de Química Carmen Aldana, Claudia Díaz, Rigel Granados, Omar Granados, Euclides Ávila, Carlos Esquivel, Pablo Campos, Adolfo Pérez, Gustavo Rosales, David Pérez y José Luis Trejo por su amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 124 Susana Rojas, Isabel Rivero, Blanca Rivero, Leda Gómez, Perla Castañeda, Perla Sánchez, Adelina Jiménez, Sandra Santillán, Laura Acevedo, Lupita Castorena, María del Carmen Ramírez, Mitzi Rodríguez,

Emma Martínez, Fausto Rivero, Daniel Chavez, Iliana Morales y Ma. Elena Torres por la ayuda desinteresada otorgada en todo momento incluyendo los más difíciles de mi vida.

A mis amigos de los Departamentos de Farmacia, Bioquímica y Biotecnología de la Facultad de Química: Dr. Rogelio Pereda, Dr. Moustapah Bah, Dra. Ma. Isabel Aguilar, Dr. Rafael Castillo, M. en C. Alicia Hernández, M. en C. Sergio Rodríguez, M. en C. Cecilia Juárez, Dr. Lahoucine Achnine, M. en C. Beatriz King, Dr. Adelfo Escalante y Biol. Alicia Marmolejo.

A mis amigos corredores por compartir el mismo gusto.

Otro cielo

La stranezza di un cielo che non è il tuo

CESARE PAVESE

No existe esponja para lavar el cielo
pero aunque pudieras enjabonarlo
y luego echarle baldes y baldes de mar
siempre te faltaría un pájaro en silencio

no existen métodos para tocar el cielo
pero aunque te estiraras como una palma
y lograras rozarlo en tus delirios
y supieras por fin cómo es al tacto
siempre te faltaría la nube de algodón

no existe un puente para cruzar el cielo
pero aunque consiguieras llegar a la otra orilla
a fuerza de memoria y pronósticos
y comprobaras que no es tan fácil
siempre te faltaría el pino del crepúsculo

eso porque se trata de un cielo que no es el tuyo
aunque sea impetuoso y desgarrado
en cambio cuando llegues al que te pertenece
no lo querrás lavar ni tocar ni cruzar
pero estarán el pájaro y la nube y el pino.

Mario Benedetti.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS Y ESQUEMAS	xiii
LISTA DE ESPECTROS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMEN	xxi
ABSTRACT	xxv
1. ANTECEDENTES.	1
1.1. Antecedentes de los actinomicetos como una fuente potencial de compuestos con actividad herbicida.....	1
1.2. El proceso de la fotosíntesis como un blanco de acción de fitotoxinas.....	28
1.3. Antecedentes del género <i>Actinomadura</i>	40
1.3.1. Consideraciones generales del género <i>Actinomadura</i>	40
1.3.2. Metabolitos secundarios del género <i>Actinomadura</i>	44
2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.	71
3. PARTE EXPERIMENTAL.	75
3.1 Aislamiento y mantenimiento de los actinomicetos.....	75
3.1.1. Aislamiento de los actinomicetos.....	75
3.1.2. Mantenimiento de los actinomicetos.....	77
3.2. Clasificación taxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31).....	77
3.2.1. Clasificación quimiotaxonómica.....	75

3.2.2. Identificación de las cepas MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) mediante el análisis de las secuencias del ARNr 16S.....	78
3.2.2.1. Extracción y purificación del ADN de los actinomicetos de estudio.....	80
3.2.2.2. Amplificación del ADNr 16S mediante RCP.....	
3.2.2.3. Clonación del producto de RCP en <i>Escherichia coli</i> mediante el vector pMOS, selección de las cepas transformadas aislamiento del ADN plasmídico.....	81
3.2.2.3.1. Reacción de ligación.....	82
3.2.2.3.2. Transformación.....	82
3.2.2.3.3. Identificación de las clonas con inserto.....	
3.2.2.4. Secuenciación y alineamiento de las secuencias de ADNr 16S.....	83
3.2.2.5. Construcción del árbol filogenético.....	85
3.3. Ensayos biológicos.....	85
3.3.1. Ensayos de preselección.....	85
3.3.1.1. Determinación del efecto de los actinomicetos sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	86
3.3.1.2. Determinación del efecto de antibiosis de los actinomicetos aislados sobre <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	87
3.3.2. Ensayos de selección.....	87
3.3.2.1. Evaluación de los extractos microbianos sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i>	88
3.3.2.2. Evaluación de los extractos microbianos sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca.....	88
3.3.3. Evaluación del potencial fitotóxico de extractos, fracciones cromatográficas y compuestos puros.....	88
3.3.3.1. Determinación del efecto de extractos, fracciones cromatográficas y compuestos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba.....	88

3.3.3.2. Evaluación del potencial fitotóxico de las fracciones cromatográficas mediante bioautografía.....	89
3.3.3.3. Determinación del efecto de los compuestos puros sobre algunas actividades fotosintéticas asociadas a la fase luminosa.	
3.3.3.3.1. Aislamiento de cloroplastos y cuantificación de clorofila.....	90
3.3.3.3.2. Determinación del efecto de los extractos y compuestos puros sobre la síntesis de ATP y la captación de protones.....	92
3.3.3.3.3. Determinación del efecto de los compuestos puros sobre el transporte de electrones no cíclico en condiciones basal, fosforilante y desacoplado.....	93
3.3.3.3.4. Determinación del efecto de los compuestos puros sobre la actividad de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa.....	94
3.3.3.4. Determinación del efecto del ácido fenilacético (220) y su derivado metilado (221) sobre el consumo de oxígeno en el proceso de la germinación.....	96
3.3.3.5. Evaluación del efecto de la maduramicina (199) sobre el crecimiento vegetal de especies vegetales selectas.....	97
3.3.4. Otros ensayos biológicos.....	98
3.3.4.1. Determinación de la toxicidad para <i>Artemia salina</i> L.....	
3.3.4.2. Determinación de la actividad citotóxica sobre diversas líneas celulares.....	99
3.4. Cultivo en medio líquido de los actinomicetos activos.....	99
3.4.1. Cultivo en pequeña escala.....	99
3.4.1.1. Preparación del inóculo.....	100
3.4.1.2. Proceso de fermentación.....	100
3.4.2. Cultivo en mediana escala.....	100
3.4.2.1. Preparación del inóculo.....	102
3.4.2.2. Proceso de fermentación.....	102
3.5. Preparación de los extractos orgánicos derivados del cultivo de los microorganismos activos.....	103

3.5.1. Preparación de los extractos orgánicos microbianos en pequeña escala.....	103
3.5.2. Preparación de los extractos orgánicos microbianos en mediana escala.....	104
3.6. Estudio químico de los extractos derivados del cultivo de las especies MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31).....	105
3.6.1. Procedimientos generales de análisis.....	105
3.6.1.1. Métodos cromatográficos.....	105
3.6.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	106
3.6.2. Estudio químico de los extractos derivados del cultivo de la especie MIV2B(9).....	107
3.6.2.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo de la especie MIV2B(9).....	107
3.6.2.2. Fraccionamiento secundario de la fracción activa F-5.....	108
3.6.2.3. Aislamiento y purificación del ácido fenilacético (220) de la fracción activa F-5 ₍₃₎	109
3.6.2.4. Preparación del éster metílico del ácido fenilacético.....	109
3.6.2.5. Aislamiento y purificación del ácido <i>S</i> (+) 12-metiltetradecanoico (225) y el ácido 14-metilpentadecanoico (226) de la fracción secundaria F-5 ₍₁₎	110
3.6.2.6. Aislamiento y purificación del antibiótico X-206 (218) de la fracción activa F-7.....	111
3.6.2.7. Aislamiento y purificación de la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222), 2-metilpropanamida (223) y la fenilacetamida (224) de la fracción activa F-8.....	111
3.6.3. Estudio químico del extracto derivado del cultivo de la especie MIV2B(31).....	112
3.6.3.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo de la especie MIV2B(31).....	112
3.6.3.2. Aislamiento y purificación de la maduramicina de la fracción activa F-2.....	113
3.6.3.3. Obtención del éster metílico de la maduramicina (213)...	113

3.6.2.3.1. Preparación del ácido libre de la maduramicina.....	113
3.6.2.3.2. Preparación del derivado metilado de la maduramicina (213).....	114
3.6.4. Estudio químico del extracto derivado del cultivo de la especie MIV2B(13).....	114
3.6.4.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo de la especie MIV2B(13).....	114
3.6.4.2. Aislamiento y purificación de las actinomicinas C1 (228) y C2 (229) de las fracciones activas F-5 y F-10.....	116
4. RESULTADOS Y DISCUSION	117
4.1. Aislamiento de los actinomicetos de estudio.....	119
4.2. Selección de los actinomicetos objeto de estudio.....	120
4.3. Clasificación taxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31).....	128
4.3.1. Clasificación quimiotaxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31).	128
4.3.1.1. Clasificación quimiotaxonómica del actinomiceto MIV2B(9).....	133
4.3.1.2. Clasificación quimiotaxonómica del actinomiceto MIV2B(13).....	134
4.3.1.3. Clasificación quimiotaxonómica del actinomiceto MIV2B(31).....	135
4.3.2. Clasificación taxonómica mediante el análisis de las secuencias del ARN ribosomal 16S de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31).....	136
4.3.2.1. Clasificación taxonómica mediante el análisis de las secuencias del ARNr 16S del actinomiceto MIV2B(31).....	137
4.3.2.2. Clasificación taxonómica mediante el análisis de las secuencias del ARNr 16S de los actinomicetos MIV2B(9) y MIV2B(13).....	139

4.4. Aislamiento y caracterización de los principios biodinámicos de los cultivos de las especies <i>Streptomyces</i> MIV2B(9), <i>Actinomadura</i> MIV2B(31) y el actinomiceto MIV2B(13).....	141
4.4.1. Cultivo en mediana escala de los microorganismos <i>Streptomyces</i> MIV2B(9), <i>Actinomadura</i> MIV2B(31) y el actinomiceto MIV2B(13).....	141
4.4.2. Estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo de la especie fitotóxica <i>Actinomadura</i> MIV2B(31).....	147
4.4.2.1. Aislamiento de los principios fitotóxicos del extracto derivado del cultivo de la especie <i>Actinomadura</i> MIV2B(31).....	147
4.4.2.2. Elucidación estructural de la maduramicina (199).....	147
4.4.3. Estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo de la especie fitotóxica <i>Streptomyces</i> MIV2B(9).....	165
4.4.3.1. Aislamiento de los principios fitotóxicos del extracto derivado del cultivo de la especie <i>Streptomyces</i> MIV2B(9).....	165
4.4.3.2. Elucidación estructural de los principios fitotóxicos del extracto derivado del cultivo de la especie <i>Streptomyces</i> MIV2B(9).....	171
4.4.3.2.1. Elucidación estructural del ácido fenilacético (220).....	171
4.4.3.2.2. Elucidación estructural del antibiótico X-206 (218).....	172
4.4.3.2.3. Elucidación estructural de la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222), la 2-metilpropanamida (223) y la fenilacetamida (224).....	174
4.4.3.2.4. Elucidación estructural de los ácidos <i>S</i> (+) 12-metiltetradecanoico (225) y 14-metilpentadecanoico (226).....	178
4.4.4. Estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo del actinomiceto MIV2B(13).....	181
4.4.3.1. Aislamiento y purificación de las actinomicina C1 (228) y C2 (229).....	182

4.4.3.2. Elucidación estructural de las actinomicina C1 (228) y C2 (229).....	182
4.5. Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos derivados del estudio químico biodirigido de las especies <i>Actinomadura</i> MIV2B(31) y <i>Streptomyces</i> MIV2B(9).....	185
4.5.1. Evaluación del potencial fitotóxico de la maduramicina y su éster metílico (213).....	186
4.5.1.1. Determinación del efecto de la maduramicina (199) sobre la germinación y el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba.....	187
4.5.1.2. Determinación del efecto de la maduramicina (199) sobre la producción de biomasa de especies vegetales selectas....	188
4.5.1.3. Determinación del efecto de la maduramicina (199), del éster metílico de la maduramicina (213) y la monesina (230) sobre diversas actividades fotosintéticas asociadas a la fase luminosa en cloroplastos aislados de espinaca.....	189
4.5.1.3.1 Síntesis de ATP y captación de protones.....	192
4.5.1.3.2. Transporte de electrones no cíclico.....	194
4.5.1.3.3. Actividad de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa.....	197
4.5.2. Evaluación del potencial citotóxico de la maduramicina.....	199
4.5.3. Evaluación del potencial fitotóxico del antibiótico X-206 (218), el ácido fenilacético (220), la fenilacetamida (224), el éster metílico del ácido fenilacético (221), la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222) y la 2-metilpropanamida (223).....	200
4.5.3.1. Efecto sobre la geminación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i>	202
4.5.3.2. Efecto del ácido fenilacético (220) y su derivado metilado (221) sobre el proceso de respiración durante la germinación de cuatro diferentes especies de semillas de prueba.....	203
4.5.3.3. Efecto sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca.....	207

5. CONCLUSIONES	209
6. PERSPECTIVAS	213
7. REFERENCIAS	215
APÉNDICE I.	
Comparación de las secuencias de los fragmentos de ADNr 16S de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) con las depositadas en la base de datos del GenBank.....	259
APÉNDICE II. Espectros.....	279

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Clasificación química de los herbicidas orgánicos.	2
Cuadro 2. Mecanismo de acción de los herbicidas orgánicos.	6
Cuadro 3. Distribución de las especies vegetales nocivas resistentes a las diferentes clases de herbicidas sintéticos.	9
Cuadro 4. Ejemplos de especies microbianas como fuentes productoras de compuestos con actividad fitotóxica.	10
Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos.	12
Cuadro 6. Productos naturales fitotóxicos derivados de actinomicetos con un mecanismo de acción novedoso.	21
Cuadro 7. Ejemplos selectos de productos naturales de origen vegetal con efecto sobre la fotosíntesis.	30
Cuadro 8. Ejemplos selectos de productos naturales de origen microbiano con efecto sobre la fotosíntesis.	38
Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género <i>Actinomadura</i> .	45
Cuadro 10. Antibióticos de tipo poliéter producidos por especies del género <i>Actinomadura</i> .	58
Cuadro 11. Agentes anticoccidia empleados en la medicina veterinaria en Estados Unidos de Norteamérica.	65
Cuadro 12. Composición química de los medios de cultivo empleados en los diversos procedimientos microbiológicos.	76
Cuadro 13. Características de cultivo en medio líquido de los microorganismos que resultaron activos en el ensayo de preselección.	101
Cuadro 14. Rendimiento de los extractos del caldo y el micelio derivados del cultivo en pequeña escala.	104
Cuadro 15. Producción de los extractos del caldo y el micelio derivados del cultivo en mediana escala.	105

	Pag.
Cuadro 17. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo combinado derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(9).	108
Cuadro 18. Fraccionamiento secundario de la fracción activa F-5	109
Cuadro 19. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo combinado derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(31).	112
Cuadro 20. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo combinado derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(13).	115
Cuadro 21. Preselección de los actinomicetos aislados de la muestra de suelo volcánico recolectada en el Complejo Tres Vírgenes, Santa Rosalía, Baja California Sur.	121
Cuadro 22. Efecto fitotóxico de los extractos derivados del cultivo en pequeña escala de los microorganismos que resultaron activos en el ensayo de preselección.	127
Cuadro 23. Clasificación quimiotaxonómica de los actinomicetos oxidativos de acuerdo a los marcadores químicos presentes en los hidrolizados celulares.	130
Cuadro 24. Características morfológicas, fisiológicas y composición de los hidrolizados celulares de los actinomicetos objeto de estudio químico.	133
Cuadro 25. Porcentajes de similitud e identidad de las secuencias del ADNr 16S del microorganismo MIV2B(31) comparadas con la base de datos de GenBank.	138
Cuadro 26. Porcentajes de similitud e identidad de las secuencias del ADNr 16S del microorganismo MIV2B(9) comparadas con la base de datos de GenBank.	139
Cuadro 27. Porcentajes de identidad de las secuencias del ADNr 16S del microorganismo MIV2B(13) comparadas con la base de datos de GenBank.	140
Cuadro 28. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala de <i>Streptomyces</i> MIV2B(9) y <i>Actinomadura</i> MIV2B(31).	142
Cuadro 29. Toxicidad para <i>Artemia salina</i> de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala del actinomiceto MIV2B(13).	145

	Pag.
Cuadro 30. Efecto citotóxico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala del actinomiceto MIV2B(13).	145
Cuadro 31. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la maduramicina (199).	149
Cuadro 32. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de la maduramicina (199).	150
Cuadro 33. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del éster metílico de la maduramicina (213).	152
Cuadro 34. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del éster metílico de la maduramicina (213).	153
Cuadro 35. Análisis del espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la maduramicina (199).	156
Cuadro 36. Características espectroscópicas (RMN ^{13}C) de los antibióticos de tipo poliéter.	157
Cuadro 37. Conectividades C-H de la maduramicina (199).	161
Cuadro 38. Constituyentes de la fracción secundaria F-5 ₍₁₎ .	169
Cuadro 39. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido fenilacético (220).	172
Cuadro 40. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222).	175
Cuadro 41. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la 2-metilpropanamida (223).	176
Cuadro 42. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la fenilacetamida (224).	177
Cuadro 43. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido <i>S</i> (+) 12-metiltetradecanoico (225).	179
Cuadro 44. Desplazamientos químicos RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del ácido <i>S</i> (+) 12-metiltetradecanoico (225).	179
Cuadro 45. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido 14-metilpentadecanoico (226).	180

	Pag.
Cuadro 46. Desplazamientos químicos RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del ácido 14-metilpentadecanoico (226).	180
Cuadro 47. Efecto de la maduramicina (199) y la monesina (229) sobre el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba.	188
Cuadro 48. Efecto de la maduramicina (199), el éster metílico de la maduramicina (213) y la monesina (230) sobre la síntesis de ATP y la captación de protones.	194
Cuadro 49. Efecto de la maduramicina (199), el éster metílico de la maduramicina (213) y la monesina (230) sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa.	197
Cuadro 50. Efecto de la maduramicina (199) sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos.	200
Cuadro 51. Evaluación del efecto del antibiótico X-206 (218) ácido fenilacético (220), el éster metílico del ácido fenilacético (221), la fenilacetamida (224), la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222) y la 2-metilpropanamida (223) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> .	203
Cuadro 52. Efecto del ácido fenilacético (220) y el éster metílico del ácido fenilacético (221) sobre la respiración en el proceso de la germinación de cuatro especies de semillas.	205
Cuadro 53. Evaluación del efecto del ácido fenilacético (220), el éster metílico del ácido fenilacético (221), la fenilacetamida (224), la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222) y la 2-metilpropanamida (223) sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca.	208
Cuadro 54. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del antibiótico X-206 (218).	331
Cuadro 55. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del antibiótico X-206 (218).	332

LISTA DE FIGURAS Y ESQUEMAS

	Pag.
Figura 1 Mecanismos de acción de los agentes fitotóxicos.	5
Figura 2 A. Ruta biosintética de la glutamina y el glutamato. B. Efecto de análogos de glutamato sobre la enzima glutamino sintetasa.	22
Figura 3 Análogos de glutamato que inhiben a la enzima glutamino sintetasa	23
Figura 4. Conversión de IMP a AMP y GMP. Estructuras de la hidantocidina y la 5-fosfohidantocidina.	25
Figura 5. Análogos sintéticos de fitotóxicas microbianas.	27
Figura 6. Efecto de la dihidrofusarubina (112) en los cloroplastos	37
Figura 7 Características morfológicas de los actinomicetos del género <i>Actinomadura</i> y <i>Streptomyces</i> .	43
Figura 8 Ruta biosintética de las pradimicinas y benanomicinas.	64
Figura 9 Antibióticos de tipo poliéter estructuralmente relacionados a la semduramicina.	69
Figura 10 Morfología microscópica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31).	132
Figura 11 Representación esquemática del operon ARN ribosomal.	137
Figura 12 Perfil cromatográfico (CLAE) de los extractos derivados del cultivo en pequeña y mediana escala de <i>Streptomyces</i> MIV2B(9).	143
Figura 13 Perfil cromatográfico (CLAE) de los extractos derivados del cultivo en pequeña y mediana escala de <i>Actinomadura</i> MIV2B(31).	144
Figura 14 Perfil cromatográfico (CLAE) de los extractos derivados del cultivo en pequeña y mediana escala del actinomiceto MIV2B(13).	146
Figura 15 Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-2 derivada del extracto del cultivo <i>Actinomadura</i> MIV2B(31).	148
Figura 16 Estructura y vista estereoscópica de la sal de sodio de la maduramicina.	164
Figura 17 Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-5 ₍₃₎ derivada del extracto del cultivo <i>Streptomyces</i> MIV2B(9).	166
Figura 18 Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-7 derivada del extracto orgánico del cultivo <i>Streptomyces</i> MIV2B(9)	167

	Pag.
Figura 19 Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-8 derivada del extracto del cultivo <i>Streptomyces</i> MIV2B(9).	168
Figura 20 Cromatograma de gases acoplado a la espectrometría de masas (CG-EM) de la fracción F-5 ₍₁₎ derivada de la fracción primaria del cultivo <i>Streptomyces</i> MIV2B(9).	169
Figura 21 Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-5 ₍₁₎ derivada del extracto orgánico del cultivo <i>Streptomyces</i> MIV2B(9).	170
Figura 22 Estructura y vista estereoscópica de la sal de sodio del antibiótico X-206	173
Figura 23 Cromatograma de líquidos (CLAE) de las fracciones F-5 y F-10 derivadas del extracto del cultivo del actinomiceto MIV2B(13).	183
Figura 24 Estructuras de las actinomicinas C1 (228) y C2 (229).	184
Figura 25 Efecto de la aplicación foliar de la maduramicina (199) (10 ⁻⁴ M) sobre el peso fresco (A) y la longitud de la plántula (B) de especies vegetales selectas	190
Figura 26 Efecto de la aplicación foliar de la maduramicina (199) (10 ⁻⁴ M) sobre <i>Phaseolus aureus</i> y <i>Trifolium alexandrinum</i>	191
Figura 27 Efecto de la maduramicina (199), del éster metílico de la maduramicina (213) y la monesina (230) sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca	193
Figura 28 Efecto de la maduramicina (199), del éster metílico de la maduramicina (213) y la monesina (230) sobre el transporte de electrones no cíclico en cloroplastos aislados de espinaca	196

ESQUEMAS

	Pag.
Esquema 1. Estrategia metodológica empleada en el presente estudio.	118
Esquema 2. Proceso de fragmentación para la pérdida concertada de agua y dióxido de carbono en los antibióticos de tipo poliéter que contienen en su estructura un sistema β al grupo carbonilo.	159

LISTA DE ESPECTROS

	Pag.
Espectro 1. Espectro en el IR de la maduramicina (199)	281
Espectro 2. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la maduramicina (199).	282
Espectro 3. Espectro de RMN ¹³ C de la maduramicina (199).	283
Espectro 4. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT de la maduramicina (199)	284
Espectro 5. Espectro de RMN ¹ H de la maduramicina (199).	285
Espectro 6. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C HMQC de la maduramicina (199).	286
Espectro 7. Espectro de RMN ¹ H-COSY de la maduramicina (199).	287
Espectro 8. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C HMBC de la maduramicina (199).	288
Espectro 9. Espectro en el IR del ácido fenilacético (220).	289
Espectro 10. Espectro de masas por impacto electrónico del ácido fenilacético (220).	290
Espectro 11. Espectro de RMN ¹³ C del ácido fenilacético (220).	291
Espectro 12. Espectro de RMN ¹ H del ácido fenilacético (220).	292
Espectro 13. Espectro en el IR del antibiótico X-206 (218).	293
Espectro 14. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ del antibiótico X-206 (218).	294
Espectro 15. Espectro de RMN ¹³ C del antibiótico X-206 (218).	2945
Espectro 16. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT del antibiótico X-206 (218).	296
Espectro 17. Espectro de RMN ¹ H del antibiótico X-206 (218).	297
Espectro 18. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C HMQC del antibiótico X-206 (218).	298
Espectro 19. Espectro de RMN ¹ H-COSY del antibiótico X-206 (218).	299
Espectro 20. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C HMBC del antibiótico X-206 (218).	300
Espectro 21. Espectro en el IR de la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222).	301
Espectro 22. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222).	302
Espectro 23. Espectro de RMN ¹³ C de la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222).	303
Espectro 24. Espectro de RMN ¹ H de la <i>S</i> (+) 2-metilbutanamida (222).	304
Espectro 25. Espectro en el IR de la 2-metilpropanamida (223).	305
Espectro 26. Espectro de masas por impacto electrónico de la 2-metilpropanamida (223).	306

	Pag.
Espectro 27. Espectro de RMN ^{13}C de la 2-metilpropanamida (223).	307
Espectro 28. Espectro de RMN ^1H de la 2-metilpropanamida (223).	308
Espectro 29. Espectro en el IR de la fenilacetamida (224).	309
Espectro 30. Espectro de masas por impacto electrónico de la fenilacetamida (224).	310
Espectro 31. Espectro de RMN ^{13}C de la fenilacetamida (224).	311
Espectro 32. Espectro de RMN ^1H de la fenilacetamida (224).	312
Espectro 33. Espectro en el IR del ácido <i>S</i> (+) 12-metiltetradecanoico (225).	313
Espectro 34. Espectro de masas del ácido <i>S</i> (+) 12-metiltetradecanoico (225).	314
Espectro 35. Espectro de RMN ^{13}C del ácido <i>S</i> (+) 12-metiltetradecanoico (225).	315
Espectro 36. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT del ácido <i>S</i> (+) 12-metiltetradecanoico (225).	316
Espectro 37. Espectro de RMN ^1H del ácido <i>S</i> (+) 12-metiltetradecanoico (225).	317
Espectro 38. Espectro en el IR del ácido 14-metilpentadecanoico (226).	318
Espectro 39. Espectro de masas del ácido 14-metilpentadecanoico (226).	319
Espectro 40. Espectro de RMN ^{13}C del ácido 14-metilpentadecanoico (226).	320
Espectro 41. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT del ácido 14-metilpentadecanoico (226).	321
Espectro 42. Espectro de RMN ^1H del ácido 14-metilpentadecanoico (226).	322
Espectro 43. Espectro en el IR de la actinomicina C1 (228).	323
Espectro 44. Espectro de masas modalidad FAB^+ de la actinomicina C1 (228).	324
Espectro 45. Espectro de RMN ^{13}C de la actinomicina C1 (228).	325
Espectro 46. Espectro de RMN ^1H de la actinomicina C1 (228).	326
Espectro 47. Espectro en el IR de la actinomicina C2 (229).	327
Espectro 48. Espectro de masas modalidad FAB^+ de la actinomicina C2 (229).	328
Espectro 49. Espectro de RMN ^{13}C de la actinomicina C2 (229).	329
Espectro 50. Espectro de RMN ^1H de la actinomicina C2 (229).	330

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Acetil:ACP-S-	Acetilcoenzima A: proteína acarreadora de acilos
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AdSS	Adenilsuccinato sintetasa
AMIPFAC	Asociación Mexicana de la industria de plaguicidas y fertilizantes
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr 16S	Ácido ribonucleico ribosomal 16S
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
ccf	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CF ₀	Complejo proteico de la enzima ATP sintetasa del cloroplasto
CF ₁	Complejo proteico de la enzima ATP sintetasa del cloroplasto
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas
CI ₅₀	Concentración inhibidora media
Cit b ₆ /f	Complejo citocromo b ₆ /f
CL ₅₀	Concentración letal media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
COSY	Correlation system (espectroscopia bidimensional de correlación homonuclear ¹ H- ¹ H)
CYC	Medio de cultivo de Czapec, extracto de levadura y casaminoácidos
d	Doblete
DEPT	Desacoplate enhancement proton test (experimento de desacoplamiento de protones)
DMSO	Dimetilsulfóxido

EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EMIE	Espectro de masas por impacto electrónico
FAB	Espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos
Fd	Ferredoxina
FS I	Fotosistema I
FS II	Fotosistema II
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GMP	Guanosina monofosfato
GS	Glutamino sintetasa
HEPES	Ácido N-(2-hidroxipiperazin-N'-(2-etansulfónico)
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C)
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation (espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C)
IMP	Inosina monofosfato
IPrOH	Alcohol isopropílico
IR	Infrarojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kb	Kilobases
L-DAP	L ácido 2,6-diaminopimélico
<i>m</i>	Multiplicidad
<i>m/z</i>	Unidades de masa/carga
MeOH	Alcohol metílico
MES	Ácido 4-morfolin-etanosulfónico
<i>meso</i> DAP	<i>meso</i> ácido 2,6-diaminopimélico
Mg^{2+} -ATPasa	Complejo multienzimático que se encarga de sintetizar ATP
MHz	Megahertz
MV	Metilviológeno
NADP	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida oxidado

NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida reducido
P ₆₈₀	Centro de reacción oxidado del fotosistema II
P ₇₀₀	Centro de reacción oxidado del fotosistema I
ppm	Partes por millón
PQ	Plastoquinona
Q _A	Quinona primaria del fotosistema II
Q _B	Quinona secundaria del fotosistema II
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
RDP	Ribosomal data project (proyecto de base de datos ribosomal)
Rib-5-P	Ribosa-5-fosfato
SDS	Duodecilsulfato de sodio
SSI	Solución salina isotónica
t	Triplete
TCA	Ácido tricloroacético
TMS	Tetrametilsilano
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
uma	Unidades de masa atómica
YM	Medio de cultivo de extracto de levadura y malta

RESUMEN

La presente disertación describe la investigación de productos naturales derivados de actinomicetos como una fuente potencial de compuestos herbicidas. Para el desarrollo de este proyecto de investigación se propuso una estrategia metodológica que inició con el aislamiento y la selección de especies fitotóxicas y que culminó con la caracterización química y evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos microbianos.

Se aislaron 94 cepas de actinomicetos de una muestra de suelo volcánica proveniente del Municipio de Santa Rosalía, Baja California. El proceso de selección de los microorganismos potencialmente productores de fitotoxinas permitió la detección de tres actinomicetos (3.2%) designados con las claves MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31). La clasificación taxonómica de las cepas mediante los criterios quimiotaxonómicos y de secuenciación de ARN ribosomales 16S permitió proponer que los microorganismos MIV2B(9) y MIV2B(13) pertenecen a los géneros *Streptomyces* y MIV2B(31) al género *Actinomadura*.

El estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo de *Actinomadura* MIV2B(31) (10.0 l) empleando el bioensayo del crecimiento radicular permitió el aislamiento y la purificación en alto rendimiento (4.94 g/l) de un producto con propiedades fitotóxicas caracterizado como la maduramicina. La evaluación del potencial fitotóxico de la maduramicina permitió establecer que este antibiótico posee propiedades inhibitoras del crecimiento vegetal de tipo preemergente y posemergente.

La determinación del efecto de la maduramicina sobre el crecimiento radicular de semillas de distintas especies demostró que el antibiótico posee una cierta selectividad sobre las especies vegetales nocivas (*Amaranthus hypochondriacus*; CI_{50} 18.5 μ M,

Echinocloa crusgalli; CI_{50} 20.2 μ M y *Trifolium alexandrinum*; CI_{50} 84.0 μ M) con respecto a las especies cultivables (*Triticum vulgare* CI_{50} 971.0 μ M y *Phaseolus aureus* CI_{50} 150.0 μ M). Por otro lado, la determinación del efecto de la maduramicina (10^{-4} M) sobre la producción de biomasa de especies vegetales selectas indicó que el producto disminuye el peso fresco y la longitud de la plántula de las especies *T. vulgare* y *P. aureus*, presentando en algunos casos una efectividad equiparable o mayor a la del Paraquat (10^{-4} M), herbicida comercial que se utilizó como un control positivo. La especie *T. vulgare* fue la especie más susceptible; el crecimiento de la plántula se redujo en un 42.2 % y el peso fresco en un 54.6 %. En el caso de *P. aureus*, los porcentajes de inhibición de la longitud de la plántula y del peso fresco fueron de 21.0 % y 36.8 % respectivamente.

Las evaluaciones del efecto de la maduramicina y su derivado metilado sobre diversas actividades fotosintéticas asociadas con la fase luminosa permitieron establecer que estos antibióticos se comportan como agentes desacoplantes de la fotosíntesis. Los valores de la CI_{50} de la síntesis de ATP desarrollados por estos productos fueron de 20.68 μ M y 5.0 μ M, respectivamente. El derivado metilado de la maduramicina demostró un efecto desacoplante mayor al del producto natural. El aumento de la actividad biológica podría deberse a un incremento en la lipofilia de la molécula.

Con la finalidad de establecer posibles efectos tóxicos de la maduramicina sobre el hombre y otros mamíferos, se determinó el efecto citotóxico sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos. Los valores de la concentración efectiva media (CE_{50}) del antibiótico para las líneas celulares de A-549 (Carcinoma de pulmón), MCF-7 (Carcinoma humana de pecho) y HT-29 (Adenocarcinoma de colon humano) fueron de 0.0380 μ g/ml, 0.0517 μ g/ml y 0.0112 μ g/ml respectivamente. Estos resultados constituyen una aportación

al conocimiento de las propiedades biológicas de la maduramicina y una advertencia del efecto citotóxico de este antibiótico.

El estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo de *Streptomyces* MIV2B(9) (3.6 l) empleando el bioensayo del crecimiento radicular permitió el aislamiento del antibiótico X-206 (7.86 mg/l), el ácido fenilacético (1.39 mg/l), la *S* (+) 2-metilbutanamida (1.39 mg/l), la 2-metilpropanamida (5.6 mg/l), la fenilacetamida (1.11 mg/l) y los ácidos *S* (+)12-metiltetradecanoico (7.0 mg/l) y 14 metilpentadecanoico (8.9 mg/l). La evaluación del potencial fitotóxico de estos productos permitió establecer que el antibiótico X-206 y el ácido fenilacético son los metabolitos fitotóxicos más importantes de este microorganismo. Ambos productos poseen propiedades fitotóxicas de tipo preemergente.

El antibiótico X-206, el ácido fenilacético y su derivado metilado inhiben la germinación de *A. hypochondriacus* a concentraciones de 500 μM , 1500 μM y 707.8 μM respectivamente. El crecimiento radicular de la semilla de prueba se inhibió por diferentes concentraciones de los productos. Los valores de la CI_{50} fueron de 27.5 μM , 173.5 μM y 9.92 μM respectivamente.

En la determinación del efecto del ácido fenilacético (100 μM) y su derivado metilado (100 μM) sobre la respiración durante la germinación de cinco diferentes semillas de prueba se observó que el éster metílico del ácido fenilacético inhibe el consumo de oxígeno en *P. ixocarpa* (62.5 %, 72 h), *L. multiflorum* (50.0 %, 24 h) y *A. hypochondriacus* (54.0 %, 24 h). En el caso del ácido fenilacético se observó un efecto inhibitorio al inicio del experimento y posteriormente, un efecto estimulante de la respiración en las semillas de *T. vulgare* (44.0 % de inhibición, 24 h y 14 % de estimulación, 72 h), *T. alexandrinum* (10 %

de inhibición, 24 h y 61.0 % de estimulación, 48 h) y *A. hypochondriacus* (23 % de inhibición, 24 h y 4 % de estimulación, 72 h).

Con respecto al efecto del ácido fenilacético, la *S* (+) 2-metilbutanamida, la 2-metilpropanamida, la fenilacetamida y el éster metílico del ácido fenilacético sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca, se observó que ninguno de estos metabolitos tienen un efecto significativo sobre esta actividad fotosintética.

La evaluación del efecto de los extractos orgánicos derivados del cultivo del actinomiceto MIV2B(13) (10 l) sobre la sobrevivencia de las larvas del crustáceo *Artemia salina* permitió determinar un notable efecto con valores de concentración letal media (CL_{50}) 0.0195 $\mu\text{g/ml}$ y 1.59 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Por otro lado, en las evaluaciones de citotoxicidad de estos extractos en un panel de diez líneas celulares derivados de tumores humanos, se determinó una potente actividad citotóxica. La mayor actividad se observó con los carcinomas de pulmón (A-549), pecho (MCF-7) y el adenocarcinoma de colón (HT-29) con valores de CE_{50} menores a 10^{-15} $\mu\text{g/ml}$. La actividad de los extractos sobre las restantes líneas celulares demostró una toxicidad significativa. Los valores de la CE_{50} fueron de 0.08, 0.2, 0.001, 0.7, 0.3, 0.01 y 0.012 $\mu\text{g/ml}$ para los carcinomas mamario (BC_1), pulmonar (Lu_1), nasofaríngeo (KB), nasofaríngeo resistente a vinblastina [KB-V (+VLB) y KB-V (-VLB)], de colon (Col_2) y el cáncer de próstata humano (CNCap) respectivamente.

El estudio químico biodirigido de los extractos citotóxicos permitió el aislamiento de dos antibióticos caracterizados como las actinomicinas C1 (0.83 mg/l) y C2 (0.083 mg/l). La actividad fitotóxica demostrada por los extractos orgánicos derivados del cultivo de esta especie se debe seguramente al efecto citotóxico de estos antibióticos.

ABSTRACT

As a part of a research program to discover herbicidal agents from microorganisms, it was found that the organic extracts prepared from the culture broth of three actinomycetes isolated from a volcanic soil induced inhibition of radicle growth of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* and ATP synthesis in spinach chloroplasts. The active microorganisms were codified as MIV2B(9), MIV2B(13) and MIV2B(31). Taxonomic studies of these strains performed by 16S ribosomal DNA amplification indicated that the strains are members of the genera *Streptomyces* [MIV2B(9) and MIV2B(13)] and *Actinomadura* [MIV2B(31)].

Bioactive-guided fractionation of an organic extract of the culture medium of *Actinomadura* MIV2B(31) using phyto-growth-inhibitory bioassay afforded maduramicin in high yields (4.94 g/l). The antibiotic was unequivocally characterised by X-ray analysis.

The phytotoxic potential of maduramicin was investigated by evaluating the pre and post emergent phytotoxic activity. The pre-emergent phytotoxic activity was investigated by determining the effect of the antibiotic on germination and radicle growth of five plant species. The post-emergent phytotoxic activity was established by evaluating the effect of foliar application of maduramicin (10^{-4} M) to 4-to-6 week old seedlings of two weed and two crop plant species. In addition, the effect of maduramicin and its methyl ester on several photosynthetic activities associated with the light reaction phase including ATP synthesis, proton uptake, electron transport (basal, phosphorylating and uncoupled conditions) and Mg^{2+} -ATPase activity, was investigated.

Phyto-growth inhibitory activity bioassay with maduramicin showed significant inhibition of radicle growth in *A. hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Trifolium*

alexandrinum, *Phaseolus aureus* and *Triticum vulgare*. The results obtained indicated that the antibiotic was more potent as growth inhibitor than as germination inhibitor. The weeds *A. hypochondriacus* (IC₅₀ 18.5 µM), *E. crusgalli* (IC₅₀ 20.02 µM) and *T. alexandrinum* (IC₅₀ 84.0 µM) were more sensitive to the treatment. It is important to notice that the effect of the antibiotic on *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli* was comparable to that of 2,4-D. On the other hand, the seedlings of *P. aureus* (IC₅₀ 971.0 µM) and *T. vulgare* (IC₅₀ 150.0 µM) were less sensitive to maduramicin, thus indicating some degree of selectivity among crop and weed species.

The study of the effect of maduramicin on 4-to-6 week old seedling indicated that the antibiotic produced inhibition of shoot elongation and fresh weight accumulation of *T. vulgare*, *P. aureus* and *T. alexandrinum*. *T. vulgare* exhibited the highest degree of inhibition on shoot elongation (42.2%) and fresh weight accumulation (54.6%). In addition, the antibiotic induced injury in *P. aureus* and *T. alexandrinum*. The injury includes chlorosis, necrosis, desiccation and leaf abscission.

On the other hand, the antibiotic and its methyl ester derivative inhibited photophosphorylation and proton uptake in isolated spinach chloroplasts. Both compounds also enhanced basal and phosphorylating electron transport and stimulated Mg²⁺-dependent ATPase activity, therefore, they behave as uncouplers of photophosphorylation being the methyl ester derivative more potent than the parent compound. According to these results maduramicin possesses pre and post-emergent plant growth inhibitory properties.

Bioactivity-directed fractionation of an organic extract prepared of the culture of *Streptomyces* MIV2B(9) led to the isolation of antibiotic X-206, phenylacetic acid, *S* (+)-2-methylbutyramide, 2-methylpropanamide, phenylacetamide, *S* (+) 12-methyltetradecanoic

acid and 14-methylpentadecanoic acid. The isolated compounds were characterised by spectral means (IR, NMR and EM). In the case of antibiotic X-206, the structure was confirmed by X-ray analysis. Antibiotic X-206, phenylacetic acid and phenylacetic methyl ester inhibited germination and radicle elongation of *A. hypochondriacus*.

In order to further explore the herbicidal potential of phenylacetic acid and its methylester derivative, their effects on oxygen uptake of five plant species was studied. Phenylacetic methyl ester inhibited oxygen uptake of *P. ixocarpa* (62.5 %, 72 h), *L. multiflorum* (50.0 %, 24 h) and *A. hypochondriacus* (54.0 %, 24 h). On the other hand, phenylacetic acid showed both inhibition and stimulation of respiration on *T. vulgare* (44.0 % inhibition, 24 h and 14 % stimulation, 72 h), *T. alexandrinum* (10 % inhibition, 24 h and 61.0 % stimulation, 48 h) and *A. hypochondriacus* (23 % inhibition, 24h and 4 % stimulation, 72 h).

Finally, mycelia and broth extracts derived from fermentation of *Streptomyces* MIV2B(13) showed lethality to brine shrimp with LC_{50} 1.59 and 0.0195 mg/ml, respectively. The effect of these extracts on ten human cancer cell lines was also investigated. The most intense cytotoxic activity was observed with A-549, MCF-7 and HT-29 ($EC_{50} < 10^{-15}$ mg/ml) cell lines. Bioguided fractionation of the cytotoxic extracts (18.0 g) led to the isolation of actinomycins C1 and C2.

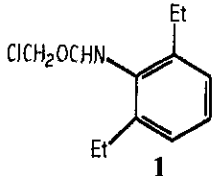
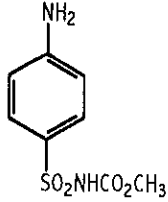
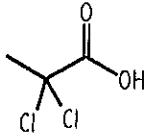
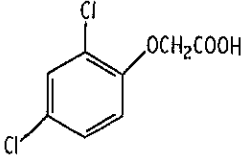
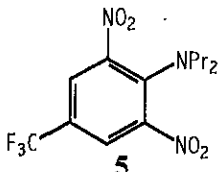
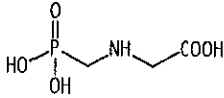
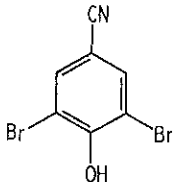
1. ANTECEDENTES

1.1 Actinomicetos como una fuente potencial de compuestos con actividad herbicida.

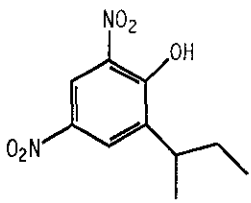
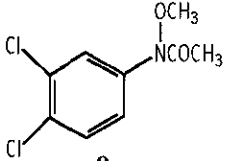
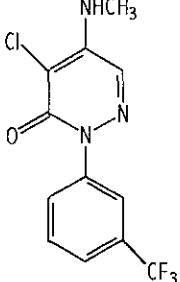
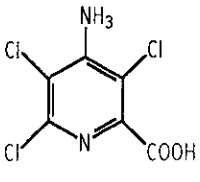
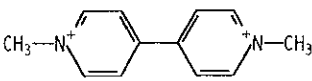
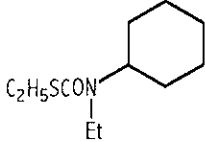
Estadísticas recientes han permitido establecer que existen aproximadamente 200 especies de plantas nocivas que ocasionan graves daños a los cultivos económicamente importantes a nivel mundial. Estas especies disminuyen seriamente la calidad, cantidad y el valor económico de los cultivos por competencia de luz, agua y nutrientes. Por otro lado, muchos de estos vegetales son hospederos y reservorios potenciales de patógenos de plantas y contaminantes en los cultivos (Hoagland, 1990; Percival y Baker, 1991).

Para combatir las pérdidas ocasionadas por las plantas nocivas, se emplean numerosos herbicidas principalmente de origen sintético. Estos agentes se clasifican de acuerdo a su naturaleza química en herbicidas orgánicos e inorgánicos. Históricamente, los herbicidas inorgánicos (sales inorgánicas) fueron los primeros en utilizarse para el control de las malezas, pero en la actualidad son poco empleados en las prácticas agrícolas. El grupo de los herbicidas orgánicos incluye un gran número de compuestos y tienen una mayor aplicación en la agricultura. En el Cuadro 1, se presenta una clasificación química de los herbicidas orgánicos de mayor uso en las prácticas agrícolas modernas (Linscott, 1981; Kirkwood, 1987; Parry, 1989).

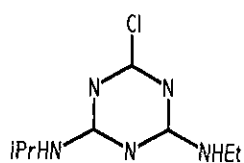
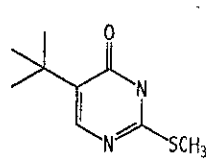
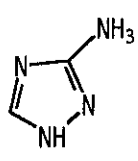
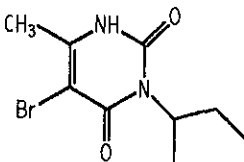
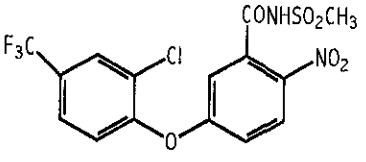
Cuadro 1. Clasificación química de los herbicidas orgánicos.

Grupo químico	Herbicida	Estructura
Acetamidas	Alaclor	 <p style="text-align: center;">1</p>
Carbamatos	Asulam	 <p style="text-align: center;">2</p>
Cloroalcanos	Dalapon	 <p style="text-align: center;">3</p>
Clorofenoxiácidos	2,4-D	 <p style="text-align: center;">4</p>
Dinitroanilinas	Trifuralina	 <p style="text-align: center;">5</p>
Glicinas	Glifosato	 <p style="text-align: center;">6</p>
Nitrilos	Bromoxinil	 <p style="text-align: center;">7</p>

Cuadro 1. Clasificación química de los herbicidas orgánicos (continuación).

Grupo químico	Herbicida	Estructura
Fenoles	Dinoseb	 <p style="text-align: center;">8</p>
Fenilureas	Linuron	 <p style="text-align: center;">9</p>
Piradiazinas	Norflurazona	 <p style="text-align: center;">10</p>
Piradinas	Picloram	 <p style="text-align: center;">11</p>
Sales cuaternarias de amonio	Paraquat	 <p style="text-align: center;">12</p>
Tiocarbamatos	Cicloato	 <p style="text-align: center;">13</p>

Cuadro 1. Clasificación química de los herbicidas orgánicos (continuación).

Grupo químico	Herbicida	Estructura
s-Triazinas	Atrazina	 14
As-triazinas	Metribuzina	 15
Triazoles	Amitrol	 16
Uracilos	Bromacil	 17
Difeniléteres	Flex	 18

Los agentes herbicidas ejercen su efecto fitotóxico por diversos mecanismos que afectan algunos procesos esenciales en el metabolismo vegetal. Entre los mecanismos de acción destacan aquellos que interfieren con el abasto de energía, la organización estructural, el crecimiento y la reproducción de la célula vegetal (Hassall, 1990; Hoagland,

1990, Gauvrit, 1992; 1996; Copping y Hewitt, 1998). En la Figura 1 se representa de manera esquemática los blancos de acción más importantes de los agentes fitotóxicos y en el Cuadro 2 se indican los sitios de acción sobre los cuales actúan las diferentes clases químicas de herbicidas orgánicos.

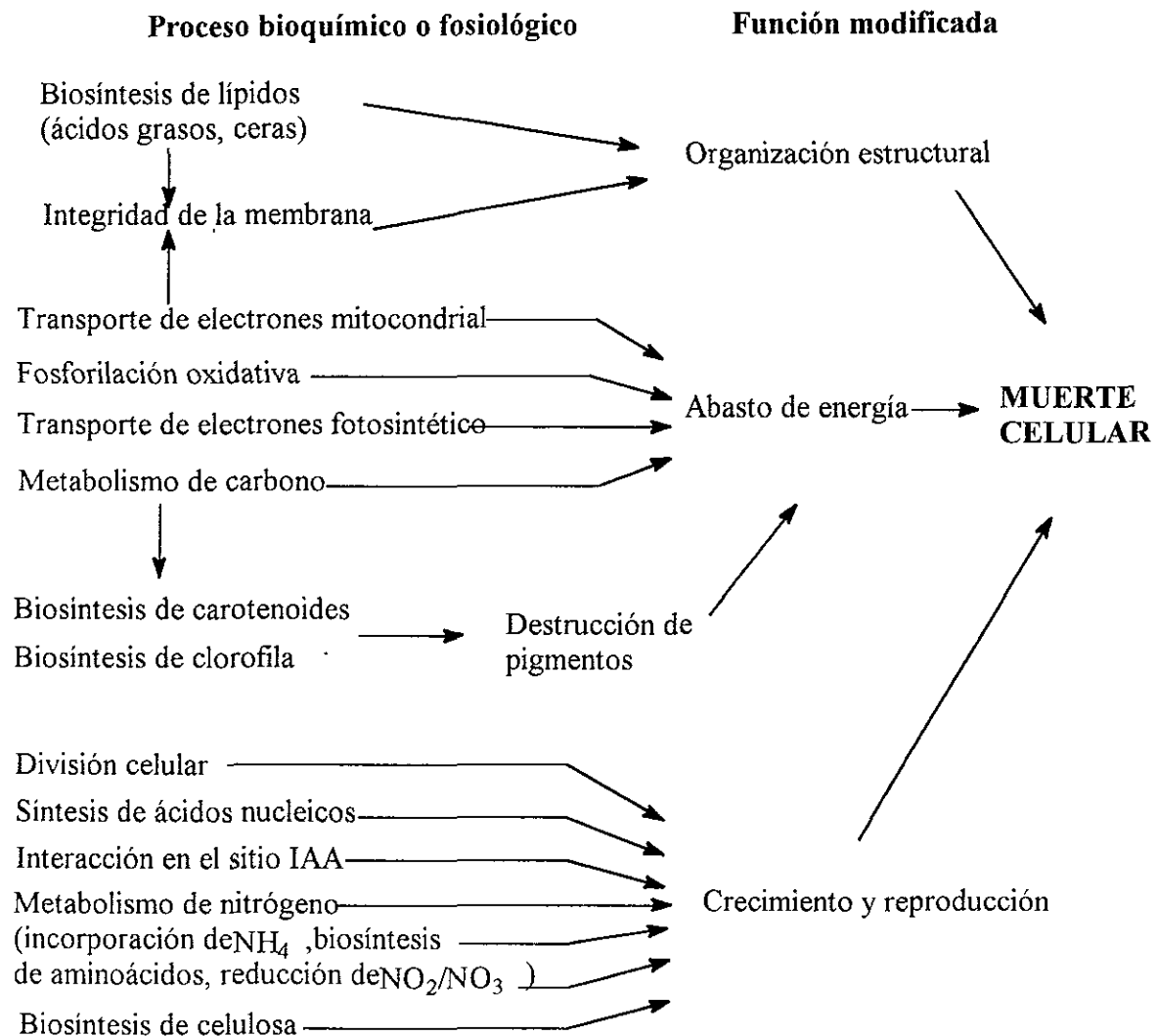


Figura 1 Mecanismos de acción de los agentes fitotóxicos (Hoagland, 1990).

Cuadro 2. Mecanismo de acción de los herbicidas orgánicos.

Proceso bioquímico o fisiológico	Herbicida o clase de herbicida																		
	Acetamidas	Carbamatos	Cloroalcanos	Clorénoxácidos	Dinitroanilinas	Glicinas	Nitrilos	Fenoles	Fenilureas	Piridiazinas	Piridinas	Sales cuaternarias	Tiocarbamatos	Triazinas	Triazoles	Uracilos	Fenac	Nitrofen	
Síntesis de Lípidos	X		X		X					X			X						
Formación de ceras		X	X					X					X						
Integridad de la membrana celular							X	X	X	X		X	X	X	X	X			
Fosforilación oxidativa	X	X		X	X		X	X	X		X		X	X	X				
Fotofosforilación							X				X	X						X	
Fotosíntesis	X	X					X		X	X	X	X	X	X		X			
Respiración	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X		X				
Glucólisis		X	X	X			X												
Formación de radicales libres							X					X			X				
Formación de porfirinas		X												X	X	X			

Cuadro 2. Mecanismo de acción de los herbicidas orgánicos (continuación).

Proceso bioquímico o fisiológico	Herbicida o clase de herbicida																			
	Acetamidas	Carbamatos	Cloralcanos	Clorfenoxiácidos	Dinitroanilinas	Glicinas	Nitrilos	Fenoles	Fenilureas	Piradiazinas	Piradinas	Salas cuaternarias	Tiocarbamatos	Triazinas	Triazoles	Uracilos	Fenac	Nitrofen		
División celular	X	X	X	X	X					X	X		X			X			X	
Elongación celular	X		X	X	X				X				X		X					
Metabolismo o síntesis de ácidos nucleicos	X	X		X			X	X	X	X	X		X	X	X				X	
Desbalance hormonal				X	X	X	X			X	X									
Metabolismo o síntesis de proteínas	X	X	X	X			X	X			X		X		X					
Síntesis de aminoácidos						X									X					
Transporte de IAA	X			X																X

La información resumida en el Cuadro 2 indica que los herbicidas de una clase química en particular pueden ejercer su efecto fitotóxico mediante diversos mecanismos. Sin embargo, se clasifican de acuerdo al efecto fitotóxico primario más relevante. Así, la inhibición del proceso fotosintético es el mecanismo de acción más importante de los herbicidas de los tipos triazina, piradiazina, fenilúrea y uracilo aunque estos compuestos afectan también la integridad de la membrana celular (triazinas, piradiazinas y uracilo), el metabolismo de ácidos nucleicos, proteínas o lípidos (piradiazinas y fenilúreas) y la formación de porfirinas (triazinas y uracilos).

Los herbicidas son generalmente menos tóxicos para los mamíferos que otro tipo de plaguicidas debido a que muchos de ellos están diseñados para actuar selectivamente sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos de los vegetales. Sin embargo, varias investigaciones en modelos animales han demostrado que ciertos herbicidas son agentes potencialmente carcinógenicos y teratogénicos (Engler y Levy, 1991; Fuhremann, 1991; Kawamura *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1996; Watanabe e Iwase, 1996; Asongalem y Akintonwa, 1997; Sathiakumar y Delzell, 1997; Calabrese, 1997, Ditch *et al.*, 1997; Hardell y Eriksson, 1999; Heydens *et al.*, 1999; Iyer *et al.*, 1999). Los estudios epidemiológicos, aunque algunas veces contradictorios, indican una correlación entre el uso de los herbicidas de los tipos fenóxido (Dich *et al.*, 1997; Hardell y Erickson, 1999) y triazinas (Neuberger, 1996; Dich *et al.*, 1997; Sathiakumar y Delzer, 1997) con algunos tipos de cáncer.

Otro de los problemas asociados al uso recurrente de los herbicidas orgánicos es la resistencia que han desarrollado ciertas especies vegetales a un gran número de herbicidas sintéticos. Recientemente, se descubrió que existen aproximadamente 57 especies de

plantas nocivas resistentes a las triazinas y otras 60 especies resistentes a uno o más de los herbicidas de las otras clases químicas (Holt *et al.*, 1993) (Cuadro 3). Por otro lado, el uso indiscriminado de los herbicidas y su persistencia en el ambiente han ocasionado problemas de contaminación ambiental (Putwain y Collin, 1989; Nakanishi, 1994; Grover *et al.*, 1997; Neuteind *et al.*, 1997; Charizopoulus y Papadopoulus-Mourkidu, 1999; Oettmeier, 1999; Pearce y Mackenzie, 1999).

Cuadro 3. Distribución de las especies vegetales nocivas resistentes a las diferentes clases de herbicidas sintéticos.

Herbicida o clase de herbicida	Número de especies con biotipos resistentes	Primer reporte de resistencia
Arilfenoxidos, propionatos y 1, 3-ciclohexanediona	8	1982
Imidazolina, sulfonilúreas y triazolopirimidina	8	1986
Amidas	2	1986
Aminotriazoles	2	1986
Arsenicales	1	1984
Benzonitrilos	1	1988
Sales de bipyridilio	18	1976
Carbamatos	2	1988
Dinitroanilinas	5	1973
Ácidos fenoxiacéticos	6	1962
Picloram	1	1988
Piridazinonas	1	1978
Úreas substituidas	7	1983
Triazinas	57	1968
Uracilos	2	1988

Debido a la necesidad de agentes herbicidas más selectivos, menos tóxicos y menos persistentes, en los últimos años se ha incrementado el interés por los herbicidas de origen natural. En este contexto, las plantas y los microorganismos constituyen una fuente importante de productos naturales con actividad fitotóxica de utilidad para desarrollo de agentes con mejores propiedades biológicas (Putnam, 1988; Okuda, 1992; Duke y Lydon, 1993; Tanaka y Omura, 1993; Hedin *et al*, 1994; Nair, 1994; Nakanashi, 1994; Duke y Abbas, 1995; Jaya y Dubey, 1999). Así, es un hecho bien documentado que la mayoría de los productos naturales con propiedades fitotóxicas provienen de los microorganismos del suelo en los que se incluyen principalmente a los hongos filamentosos, las bacterias y los actinomicetos de los más diversos géneros (Cuadro 4).

Cuadro 4. Ejemplos de especies microbianas como fuentes productoras de compuestos con actividad fitotóxica.

Microorganismo	Géneros
Hongos filamentosos	<i>Alternaria, Fusarium, Penicillium, Aspergillus, Cladosporium, Phoma, Colletotrichum, Helminthosporium.</i>
Bacterias	<i>Bacillus, Pseudomonas, Rhizobium, Xanthomonas.</i>
Actinomicetos	<i>Streptomyces, Kitasatosporia, Streptoverticillium, Saccharotrix, Thermoactinomyces, Nocardia, Streptosporangium, Actinoplanes.</i>

Un gran número de agentes fitotóxicos y reguladores del crecimiento vegetal identificados hasta la fecha son factores de virulencia de microorganismos fitopatógenos de tal forma que muchos de ellos están involucrados en las interacciones planta-patógeno. Así, los compuestos fitotóxicos derivados de patógenos que han sido aislados de malezas son más valiosos como herbicidas al considerar la selectividad de los mismos hacia especies

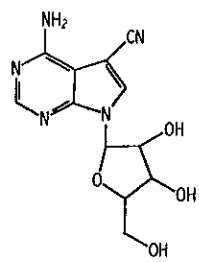
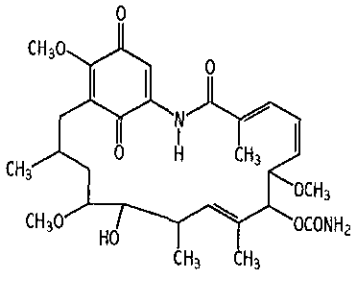
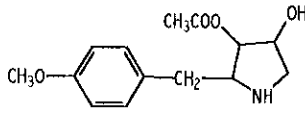
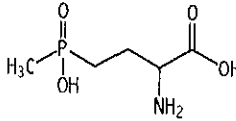
vegetales indeseables (Kenfield *et al.*, 1988; Hoagland, 1990). Sin embargo, los microorganismos no patogénicos han sido la fuente de compuestos naturales más utilizados por la industria agroquímica para el desarrollo de nuevos pesticidas ya que estos microorganismos son relativamente fáciles de cultivar comparados con los patógenos. Además, en el caso de los microorganismos fitopatógenos se ha encontrado un cierto grado de dificultad para inducir la producción de fitotóxicas durante su cultivo *in vitro* (Duke y Lydon, 1993).

En la investigación de los productos naturales con propiedades fitotóxicas derivados de microorganismos, los actinomicetos han sido objeto de diversos estudios los cuales han permitido el descubrimiento de una gran cantidad de moléculas con una amplia diversidad estructural como se puede constatar en los ejemplos resumidos en el Cuadro 5.

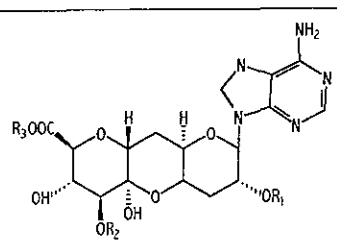
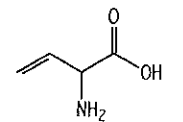
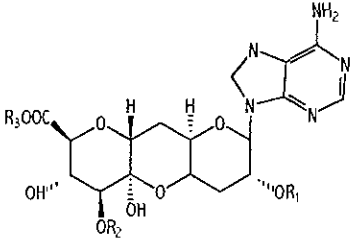
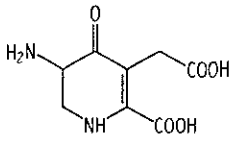
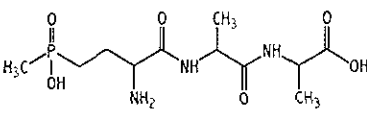
Los actinomicetos son microorganismos procariotes gram positivos que presentan un crecimiento miceliar en una etapa de su desarrollo. El grupo de los actinomicetales comprende 63 géneros y posee una gran diversidad bioquímica y ecológica. Estos microorganismos han demostrado ser la fuente más importante de metabolitos secundarios bioactivos. Se ha reportado que más del 70 % de los productos microbianos bioactivos son producidos por los actinomicetos y, en particular, aquellos pertenecientes al género *Streptomyces* (68 %) (Bérdy, 1989; Labeda y Shearer, 1990; Iwai y Takanashi, 1992; Nisbet, 1992; Omura, 1992a,b; Horan, 1994; Dairi *et al.*, 1999). Los actinomicetos se encuentran distribuidos en diferentes hábitats, pero el suelo es el reservorio natural de estos microorganismos, cuya función ecológica principal es la descomposición de la materia orgánica. Cabe destacar que los microorganismos del suelo viven en un ambiente fuertemente competitivo y, por lo tanto, han desarrollado la capacidad de producir

metabolitos secundarios como un mecanismo para la adaptación a los más diversos ecosistemas (Maplestone, 1992; Vinning, 1992).

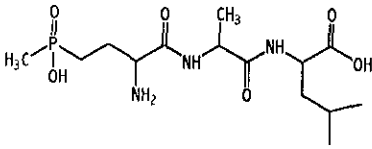
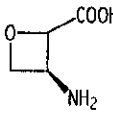
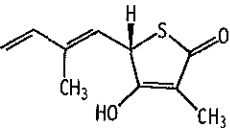
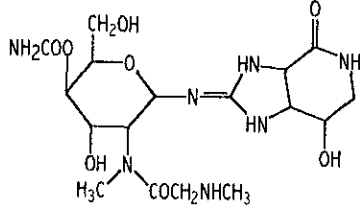
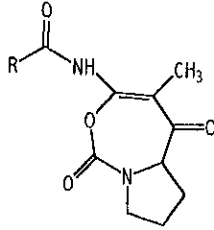
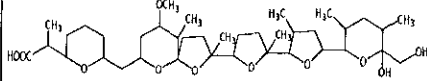
Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos.

Metabolito	Microorganismo productor	Estructura	Referencias
Toyocamicina	<i>S. toyocaensis</i>	 <p style="text-align: center;">19</p>	Tolman <i>et al.</i> , 1968 Yamada <i>et al.</i> , 1972
Geldanamicina	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> var. <i>geldanas</i>	 <p style="text-align: center;">20</p>	DeBoer <i>et al.</i> , 1970 DeBoer y Dietz, 1976
Anisomicina	<i>Streptomyces</i> N° 638	 <p style="text-align: center;">21</p>	Yamada <i>et al.</i> , 1972
Fosfinotricina	<i>S. viridochromogenes</i> <i>S. hygrosopicus</i>	 <p style="text-align: center;">22</p>	Kondo <i>et al.</i> 1973

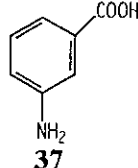
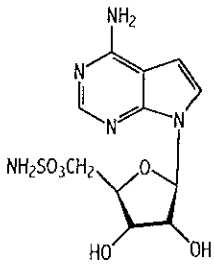
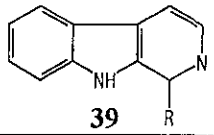
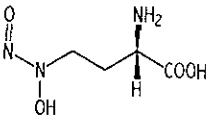
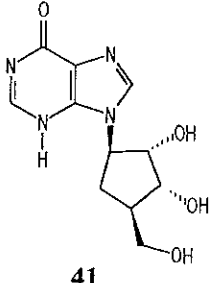
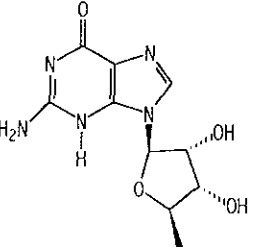
Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos (continuación).

Metabolito	Microorganismo productor	Estructura	Referencias
Herbicidinas A y B	<i>S. saganonensis</i>	 <p> R_1 R_2 R_3 23 A CH₃ CO(CH₂OH)C=CHCH₃ CH₃ 24 B CH₃ H CH₃ </p>	Arai <i>et al.</i> , 1976
Ácido 2-amino-3-butenoico (AMB)	<i>Streptomyces</i> sp.	 <p>25</p>	Lieberman <i>et al.</i> , 1977.
Herbimicinas A y B	<i>S. hygroscopicus</i> AM3672	 <p> R_1 R_2 26 A OCH₃ CH₃ 27 B H H </p>	Omura <i>et al.</i> , 1979
Gostatina	<i>Streptomyces sumanensis</i>	 <p>28</p>	Nishino y Muraa, 1983
Bialafos (antibiótico SF-1239)	<i>S. viridochromogenes</i> <i>S. hygroscopicus</i> .	 <p>29</p>	Bayer <i>et al.</i> , 1972 Lea <i>et al.</i> , 1984

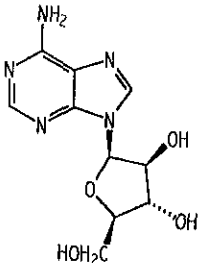
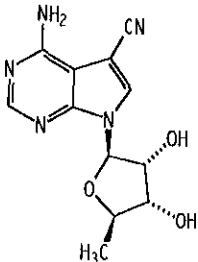
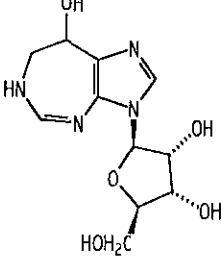
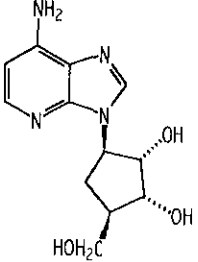
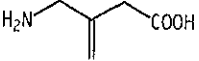
Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos (continuación).

Metabolito	Microorganismo productor	Estructura	Referencias
Fosalacina	<i>Kitasatosporia Phosalacinea</i> sp. nov. KA-338	 <p style="text-align: center;">30</p>	Omura <i>et al.</i> , 1984a
Oxetina	<i>Streptomyces</i> sp. OM-2317.	 <p style="text-align: center;">31</p>	Omura <i>et al.</i> 1984b
Tiolactomicina	<i>Nocardia</i> sp. N2-200	 <p style="text-align: center;">32</p>	Nishida <i>et al.</i> , 1984
Antibiótico 6241B	<i>Streptomyces</i> N° 6241 (SF701)	 <p style="text-align: center;">33</p>	Kida <i>et al.</i> , 1985
Ciclocarbamida A y B	<i>Streptoverticillium</i> sp.	 <p style="text-align: center;">R</p> <p>34 A CH₂CH(CH₃)₂</p> <p>35 B CH₂(CH₂)₃CH₃</p>	Isogai <i>et al.</i> , 1986
Nigericina (polieterina A)	<i>S. hygroscopicus</i>	 <p style="text-align: center;">36</p>	Heysey y Putnam, 1986

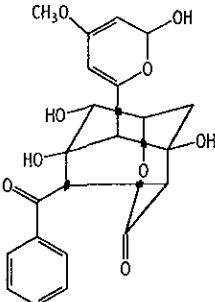
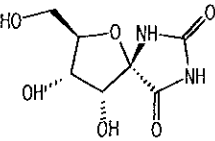
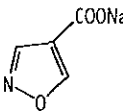
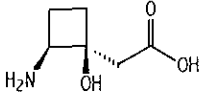
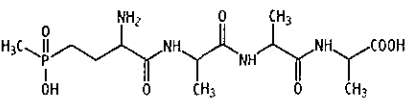
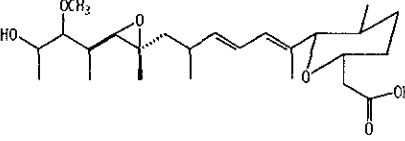
Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos (continuación)

Metabolito	Microorganismo productor	Estructura	Referencias
Gabaculina	<i>S. toyocaensis</i>	 <p style="text-align: center;">37</p>	May <i>et al.</i> , 1987
Antibiótico SF-2494	<i>S. mirabilis</i>	 <p style="text-align: center;">38</p>	Iwata <i>et al.</i> , 1987
Harmano (R CH ₃) y Norharmano (R H)	<i>Nocardia</i> sp.	 <p style="text-align: center;">39</p>	Yomosa <i>et al.</i> , 1987
Homoalanosina	<i>S. gahlaeus</i>	 <p style="text-align: center;">40</p>	Fushimi <i>et al.</i> , 1989
Coaristeromicina	<i>Streptomyces</i> sp A6308	 <p style="text-align: center;">41</p>	Ayer <i>et al.</i> , 1989
5-Desoxiguanosina	<i>Thermoactinomyces</i> sp A6019	 <p style="text-align: center;">42</p>	Ayer <i>et al.</i> , 1989

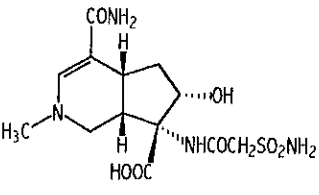
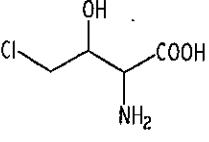
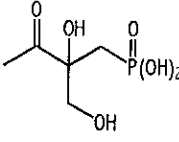
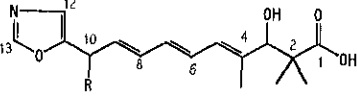
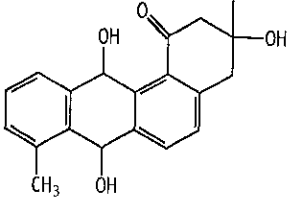
Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos (continuación).

Metabolito	Microorganismo productor	Estructura	Referencias
Adenina-9 β -D-arabinofuranosido (Ara-A)	<i>Actinoplanes</i> sp A9222	 <p style="text-align: center;">43</p>	Isaac <i>et al.</i> , 1991a
5-desoxitoyocamicina	<i>Streptomyces</i> sp A14345	 <p style="text-align: center;">44</p>	Isaac <i>et al.</i> , 1991a
Cofomicina	Actinomiceto A990	 <p style="text-align: center;">45</p>	Isaac <i>et al.</i> , 1991a
Aristeromicina	<i>Streptomyces</i> sp A6308	 <p style="text-align: center;">46</p>	Isaac <i>et al.</i> , 1991a
α -metileno β -alanina.	<i>Streptomyces</i> sp. A12701	 <p style="text-align: center;">47</p>	Isaac <i>et al.</i> , 1991b

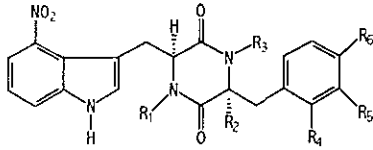
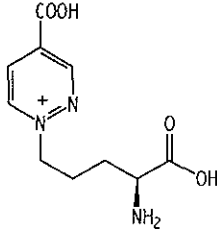
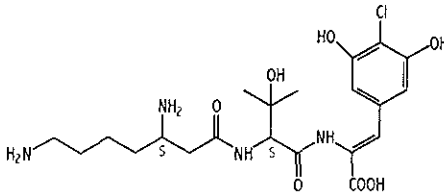
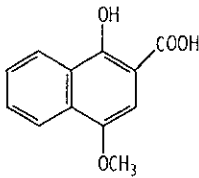
Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos (continuación)

Metabolito	Microorganismo productor	Estructura	Referencias
Vulgamicina	<i>Streptomyces</i> sp.	 <p style="text-align: center;">48</p>	Babczinski <i>et al.</i> , 1991.
Hidantocidina	<i>S. hygrosopicus</i> SANK 63584	 <p style="text-align: center;">49</p>	Nakajima <i>et al.</i> , 1991
Acido isoxazol-4-carboxilico	<i>Streptomyces</i> sp.	 <p style="text-align: center;">50</p>	Kobinata <i>et al.</i> , 1991.
Cis 2-amino-1-hidroxiciclobuno-1-ácido acético (CBAA)	<i>S. rochei</i> A13018	 <p style="text-align: center;">51</p>	Ayer <i>et al.</i> 1991
Triafos	<i>S. hygrosopicus</i> sp. KSB-1285	 <p style="text-align: center;">52</p>	Kato <i>et al.</i> , 1991
Herboxidieno	<i>S. chromofuscus</i>	 <p style="text-align: center;">53</p>	Miller-Wideman <i>et al.</i> , 1992.

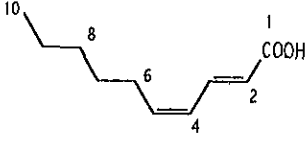
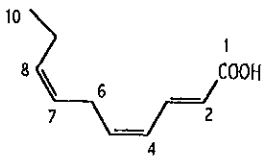
Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos (continuación).

Metabolito	Microorganismo productor	Estructura	Referencias
Altemicidina	<i>Streptomyces</i> sp. A5941	 <p style="text-align: center;">54</p>	Isaac <i>et al.</i> , 1992
4-clorotreonina	<i>Streptomyces</i> OH-5093	 <p style="text-align: center;">55</p>	Yoshida <i>et al.</i> , 1994
Fosfinotrixina	<i>Saccharothrix</i> sp. ST-888	 <p style="text-align: center;">56</p>	Takahashi <i>et al.</i> , 1995; Kimura <i>et al.</i> , 1995
Ftoxazolina	<i>Streptomyces</i> sp. OM-5714	 <p style="text-align: center;">R isómero</p> <p>57 A H 4Z, 6Z, 8E</p> <p>58 B OH 4Z, 6Z, 8E Diastereoisómeros</p> <p>59 C OH 4Z, 6Z, 8E Diastereoisómeros</p> <p>60 D OH 4Z, 6E, 8E</p>	Shiomi <i>et al.</i> , 1995
Hidrantomicina	<i>Streptomyces</i> sp. K93-5305	 <p style="text-align: center;">61</p>	Tanaka <i>et al.</i> , 1995

Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos (continuación).

Metabolito	Microorganismo productor	Estructura	Referencias																																																																						
Taxtominas	<i>S. scabies</i>	 <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> <th>R₄</th> <th>R₅</th> <th>R₆</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>62 A</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>63 B</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>64 C</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>65 D</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>66 E</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>67 F</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>68 G</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>69 H</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>70 I</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	62 A	CH ₃	OH	CH ₃	OH	H	H	63 B	CH ₃	OH	CH ₃	OH	H	H	64 C	CH ₃	H	H	H	H	H	65 D	CH ₃	OH	CH ₃	H	H	H	66 E	CH ₃	H	CH ₃	H	H	H	67 F	CH ₃	OH	CH ₃	H	H	OH	68 G	CH ₃	OH	CH ₃	H	OH	OH	69 H	CH ₃	OH	H	H	OH	H	70 I	H	OH	CH ₃	H	OH	H	King y Lawrence, 1996
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆																																																																			
62 A	CH ₃	OH	CH ₃	OH	H	H																																																																			
63 B	CH ₃	OH	CH ₃	OH	H	H																																																																			
64 C	CH ₃	H	H	H	H	H																																																																			
65 D	CH ₃	OH	CH ₃	H	H	H																																																																			
66 E	CH ₃	H	CH ₃	H	H	H																																																																			
67 F	CH ₃	OH	CH ₃	H	H	OH																																																																			
68 G	CH ₃	OH	CH ₃	H	OH	OH																																																																			
69 H	CH ₃	OH	H	H	OH	H																																																																			
70 I	H	OH	CH ₃	H	OH	H																																																																			
Piridazocidina	<i>Streptomyces</i> sp.	 <p style="text-align: center;">71</p>	Gerwick <i>et al.</i> , 1997																																																																						
Resormicina	<i>S. platensis</i>	 <p style="text-align: center;">72</p>	Igarashi <i>et al.</i> , 1997																																																																						
Acido 1-hidroxi-4-metoxi-2-naftoico	<i>Streptosporangium</i> ATCC 31213	 <p style="text-align: center;">73</p>	Pfeferle <i>et al.</i> , 1997																																																																						

Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos con actividad fitotóxica derivados de actinomicetos (continuación).

Metabolito	Microorganismo productor	Estructura	Referencias
Acido estilingico (ácido 2E, 4Z decadienoico)	<i>S. viridochromogenes</i> Tu 6105	 <p style="text-align: center;">74</p>	Maier <i>et al.</i> , 1999
Acido 2E, 4Z, 7Z decatrienoico	<i>S. viridochromogenes</i> Tu 6105	 <p style="text-align: center;">75</p>	Maier <i>et al.</i> , 1999

Las fitotoxinas microbianas son de interés tanto por la variedad estructural que presentan como por el novedoso mecanismo de acción mediante el cual ejercen su actividad biológica. Así, muchos de estos compuestos inhiben la biosíntesis de aminoácidos, almidón, clorofila, celulosa, ácidos grasos y purinas. En el Cuadro 6 se presentan algunos ejemplos de productos naturales derivados de actinomicetos con un mecanismo de acción novedoso. Dos de los mecanismos de acción más interesantes son la inhibición de las enzimas glutamino sintetasa (GS) y adenilo succinato sintetasa (AdSS), las cuales participan en la biosíntesis de glutamina y purinas respectivamente.

La glutamina (78) se forma a partir de glutamato (77) por la acción de la enzima GS. Esta reacción es bastante compleja e implica dos o más etapas intermediarias. Se ha observado que el γ -glutamilfosfato (76) funciona como un intermediario ligado a la enzima. La conformación extendida de la molécula del ácido glutámico (77) se une al centro activo

Cuadro 6. Productos naturales fitotóxicos derivados de actinomicetos con un mecanismo de acción novedoso.

Mecanismo de acción	Producto	Comentario	Referencias
	Fosfinotricina	Inhibe la enzima glutamino sintetasa	Baycr <i>et al.</i> , 1972
	Bialafos, Fosalacina	Antagonista de glutamina. El metabolismo por peptidasas libera al ingrediente activo: la fosfinotricina.	Kondo <i>et al.</i> , 1973; Leason, <i>et al.</i> , 1982; Omura <i>et al.</i> , 1984
	Homoalanosina	Antimetabolito de ácido aspártico y/o ácido glutámico	Fushimi <i>et al.</i> , 1989
	Gostatina	Inhibe la enzima aspartato aminotransferasa	Nishino y Muraa, 1983
Inhibición de la biosíntesis de aminoácidos	Gabaculina	Inhibe a las enzimas dependientes de fosfato de piridoxal y a la enzima gamaaminobutirato aminotransferasa.	Hill <i>et al.</i> , 1986; Soper y Manning, 1982
	Vulgamicina	Antagonista de la isoleucina. Detiene el crecimiento de la célula vegetal en la fase G1 del ciclo celular.	Babczinski <i>et al.</i> , 1991
	CBAA	Aparentemente interfiere en la biosíntesis o en la utilización de aminoácidos que contienen azufre.	Ayer <i>et al.</i> , 1991
Inhibición de la biosíntesis de almidón	Antibiótico 6421B	Inhibe la síntesis de almidón como un resultado de la inhibición de la síntesis de proteínas o de la respiración.	Kida <i>et al.</i> , 1985
Inhibición en la biosíntesis de clorofila	Gabaculina	Inhibe la síntesis de tetrahidropirrol vía la inhibición de la enzima aminolevulinato deshidratasa, responsable de la síntesis de 5'-aminolevulinato.	May <i>et al.</i> , 1987; Gardner y Gorton, 1989
Inhibición de la biosíntesis de celulosa	Ftozaxolina	La celulosa es un constituyente de las células vegetales, pero no de las de los mamíferos, por lo tanto es un blanco de acción con excelente selectividad.	Omura <i>et al.</i> , 1990
Inhibición de la síntesis de ácidos grasos	Tiolactomicina	El sitio específico de inhibición es la acetil-CoA.ACP-S-acetiltransferasa.	Nishida <i>et al.</i> , 1986
Inhibición de la biosíntesis de purinas	Hidantocidina	El producto del metabolismo de la hidantocidina, la 5'-fosfohidantocidina inhibe a la enzima adenilosuccinato sintetasa bloqueando la conversión de IMP a AMP.	Siehl <i>et al.</i> , 1996; Walters <i>et al.</i> , 1997

de la enzima en tres sitios específicos: los dos carbonilos y el grupo amino. La enzima GS acepta como sustrato tanto al estereoisómero D como al L del ácido glutámico (Figura 2A).

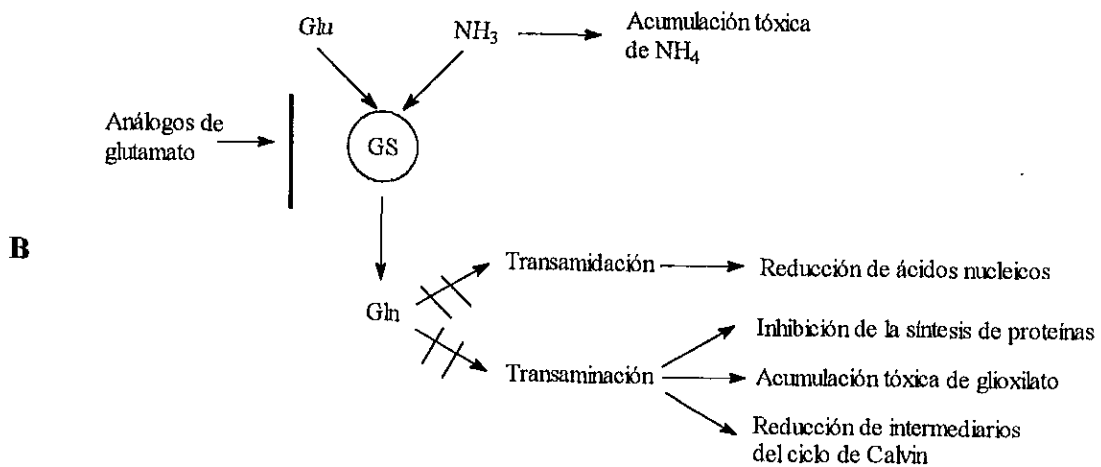
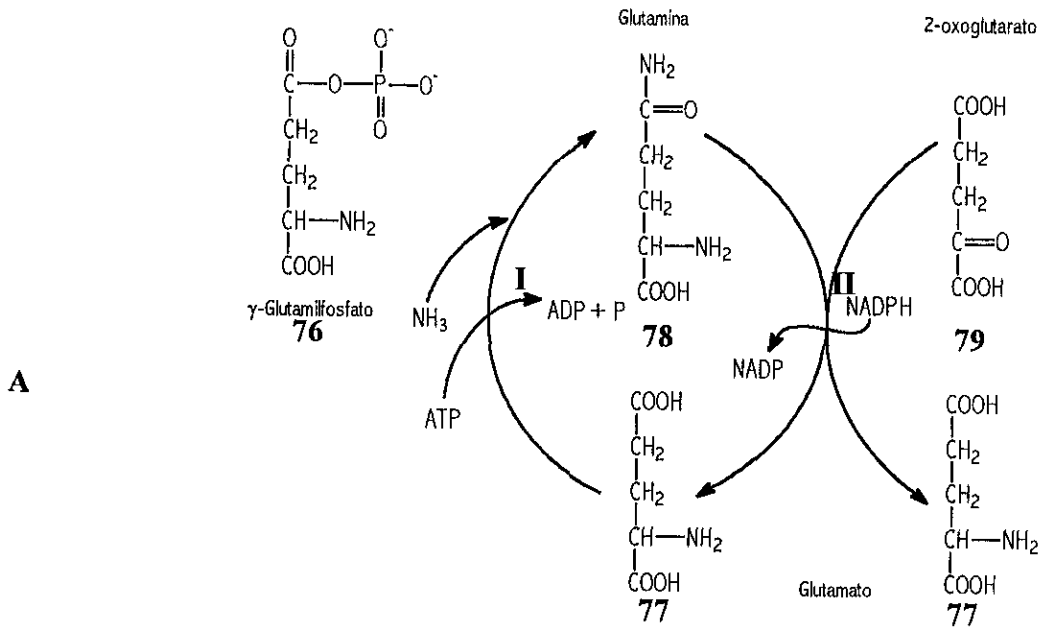
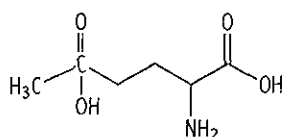


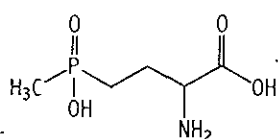
Figura 2 A. Ruta biosintética de la glutamina y el glutamato. **B.** Efecto de análogos de glutamato sobre la enzima glutamino sintetasa. **I:** glutamino sintetasa, **II:** glutamato sintetasa, **GS:** glutamino sintetasa, **Glu:** Glutamato, **Gln:** Glutamina

La enzima GS desempeña un papel de suma importancia en el metabolismo intermediario de los aminoácidos ya que la síntesis de glutamina (78) no solamente es la ruta principal de asimilación de nitrógeno en las plantas, sino que, además, funciona como donador de grupos amino en numerosas reacciones bioquímicas (Lehninger, 1990).

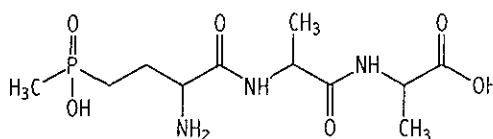
Los mayores efectos de la inhibición de la enzima GS son la acumulación de amonio y la reducción de glutamina. La acumulación de amonio es tóxica para las células vegetales y la reducción de glutamina impide los procesos de transamidación y transaminación de los cuales dependen la síntesis de nucleótidos, proteínas e intermediarios del ciclo de Calvin (Hoagland, 1990) (Figura 2B). Los productos microbianos que ejercen su efecto fitotóxico mediante la inhibición de la enzima GS son análogos del glutamato (77) y los más importantes son la fosfinotricina (56), el bialafos (29), la fosalacina (30) y la oxetina (31) (Figura 3).



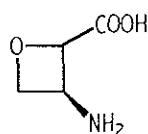
Glutamato 74



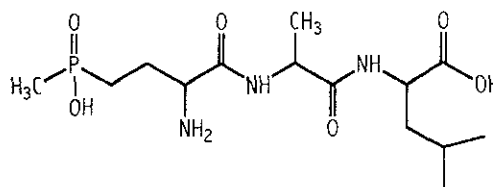
Fosfinotricina 56



Bialafos 29



Oxetina 31



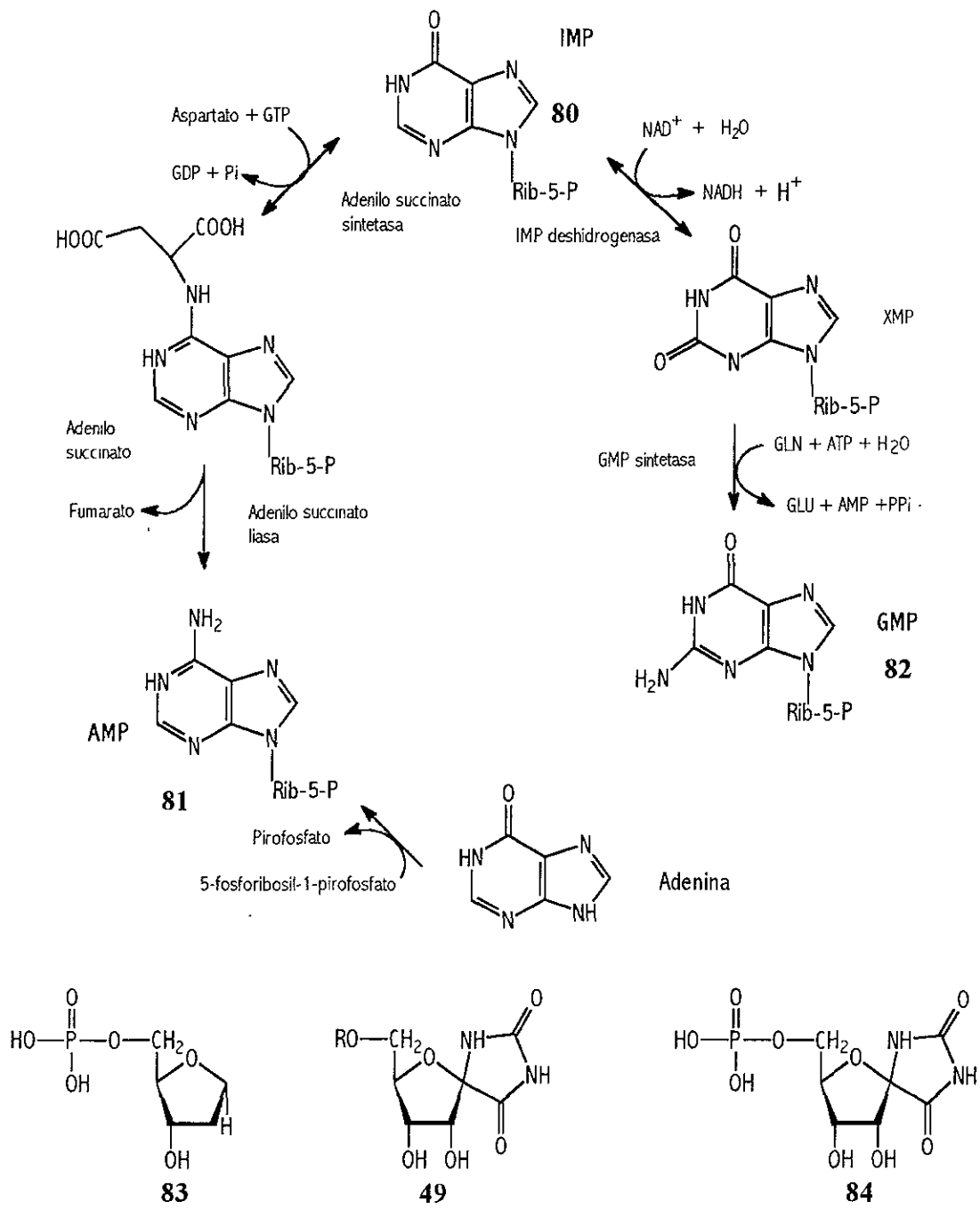
Fosalacina 30

Figura 3. Análogos de glutamato que inhiben a la enzima glutamino sintetasa.

La enzima AdSS participa en la conversión de la inosina monofosfato (IMP, **80**) a la adenosina monofosfato (AMP, **81**) en la síntesis de purinas (Figura 4). La ruta de formación de estas bases nitrogenadas constituye un aspecto importante en la biosíntesis de nucleótidos, proceso fundamental en todas las células puesto que éstos son los precursores directos del ADN y del ARN y participan en el metabolismo como coenzimas (Lehninger, 1990).

La (+) hidantocidina (**49**) es un metabolito aislado de una especie de *S. hygrosopicus* que inhibe la actividad catalítica de la enzima AdSS a través de un mecanismo desconocido. Se ha postulado que el metabolito activo es la 5-fosfohidantocidina (**84**), la cual se une a la enzima AdSS en el sitio del ácido inosínico (IMP, **80**), precursor de los ácidos adenílico (AMP, **81**) y guanílico (GMP, **82**) formando un complejo 1000 veces más estable que con el sustrato natural (Figura 4) (Siehl *et al.*, 1996; Walters *et al.*, 1997).

La gran diversidad estructural y el novedoso mecanismo de acción de las fitotoxinas microbianas han permitido generar modelos químicos para el desarrollo de nuevos herbicidas naturales o análogos generados a través de modificaciones químicas sencillas de los productos naturales. Así, el primer producto de origen microbiano empleado como herbicida comercial fue el Bialafos (**29**) (HERBIACE ®). Sus efectos fitotóxicos se presentan a una velocidad intermedia entre el paraquat (**12**) y el glifosato (**6**). El producto es metabolizado por los microorganismos del suelo con un tiempo de vida media de 20 a 30 días. El bialafos es un herbicida de amplio espectro limitado al mercado japonés y es utilizado en el tratamiento postemergente de las plantas nocivas que afectan los cultivos de arroz, trigo y frijol (Lea *et al.*, 1984; Tachibana y Kaneko, 1986).



Rib-5-P (ribosa 5-fosfato)

Hidantocidina

5-fosfohidantocidina

Figura 4. Conversión de IMP a AMP y GMP. Estructuras de la hidantocidina y la 5-fosfohidantocidina. IMP: inosina monofosfato, AMP: Adenosina monofosfato, XMP: xantosina monofosfato, GMP: guanosina monofosfato, Gln: glutamina, Glu: glutamato.

Algunos otros productos microbianos fitotóxicos han sido empleados como modelo estructural para la síntesis química, tal es el caso de la fosfinotricina (56) y la (+) hidantocidina (49). La fosfinotricina, un producto microbiano estructuralmente relacionado al bialafos aislado de diferentes especies de *Streptomyces*, fue sintetizado por primera vez en 1972. La versión sintética de la fosfinotricina es conocida como glufosinato y se comercializa bajo el nombre de BASTA (Bayer *et al.*, 1972; Kondo *et al.*, 1973; Hoescht AG, 1979). Es interesante indicar que el glufosinato es estructuralmente similar al glifosato (6, Cuadro 1), uno de los herbicidas sintéticos de mayor éxito comercial. Otro de los productos objeto de síntesis química es la (+) hidantocidina (49). La síntesis de este producto consiste de ocho pasos y se obtiene con un rendimiento del 36% (Früh *et al.*, 1996).

Además de la fosfinotricina y la (+) hidantocidina, otros productos microbianos fitotóxicos han funcionado como modelo estructural para la síntesis química de análogos. Ejemplo de ello lo constituyen la anisomicina (21) que funcionó como prototipo para la síntesis de la metoxifenona (85) (Murakata *et al.*, 1973) o la toyocamicina (19) que inspiró la síntesis de la sangivamicina (86), la tubercidina (87) y la herbiplanina (88) (Figura 5) (Schaefer, 1980).

La aplicación de las nuevas técnicas de biología molecular en el área de los productos naturales derivados de actinomicetos con propiedades fitotóxicas ha permitido el desarrollo biotecnológico de diversos productos microbianos. Estos estudios están dirigidos al mejoramiento de la producción por fermentación, a la clonación y sobreexpresión de los genes responsables de la biosíntesis de los metabolitos bioactivos y a la transformación genética de especies cultivables para producir especies transgénicas resistentes a estos productos.

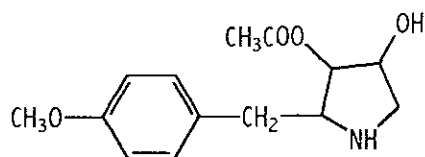
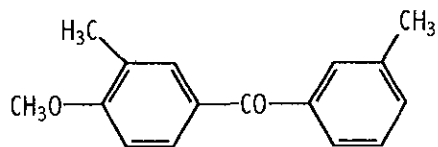
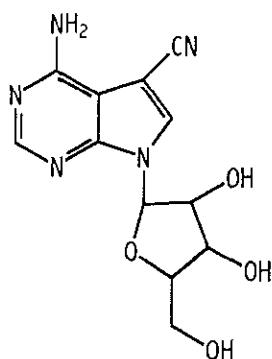
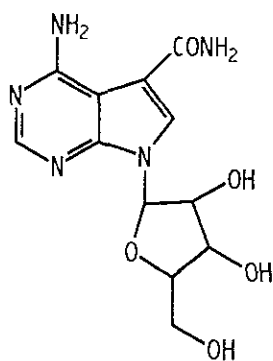
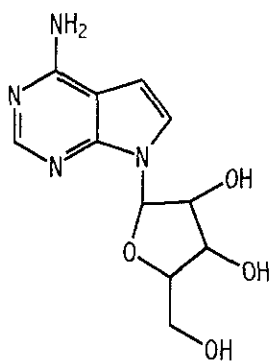
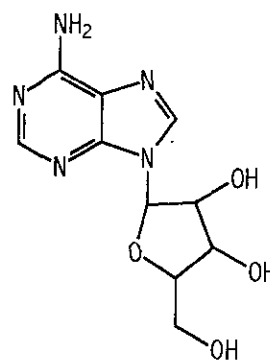
Asisomicina **21**Metoxifenona **85**Toyocamicina **19**Sangivacina **86**Tubercidina **87**Herbiplanina **88**

Figura 5. Análogos sintéticos de fitotóxicas microbianas.

Los productos microbianos de mayor desarrollo biotecnológico son el bialafos (**29**) y la fosfinitricina (**56**). En el caso del bialafos se ha logrado la optimización de su

producción por fermentación (Takebe *et al.*, 1988; 1995) y la obtención de cultivos transgénicos de tomate, tabaco, papa, alfalfa y caña de azúcar mediante la introducción del gen *bar*, el cual confiere resistencia al bialafos y a la fosfotricina (Kumada, *et al.*, 1988; Botterman y Leemans *et al.*, 1989). Por otro lado, se ha logrado la producción biotecnológica de fosfotricina en un reactor enzimático mediante la clonación y sobreexpresión de los genes que codifican para la transaminasa de *E. coli* k-12, específica para la producción de fosfotricina.

1.2. El proceso de la fotosíntesis como un blanco de acción de fitotóxicas

Aunque en un menor número, los herbicidas comerciales afectan reacciones metabólicas comunes a los eucariotes, muchos de ellos ejercen su efecto modificando diferentes eventos de la fisiología y el metabolismo vegetal. Así, más del 50% de los agentes herbicidas actúan específicamente sobre el proceso de la fotosíntesis (Bowes *et al.*, 1981; Linscott, 1981; Corbett, 1984; Mathis y Rutherford, 1984; Percival y Baker, 1991; Gauvrit, 1992; Copping y Hewitt, 1998). En este sentido, es importante destacar que la fotosíntesis es un proceso bioquímico exclusivo de los vegetales y, por lo tanto, constituye un blanco de acción altamente específico para las plantas (Mets y Thiel, 1989).

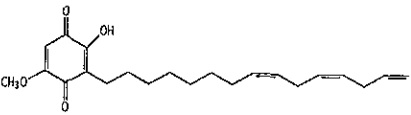
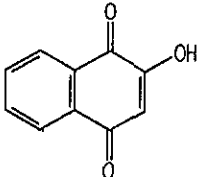
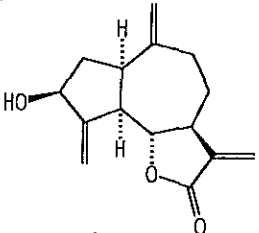
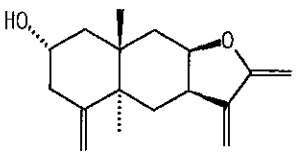
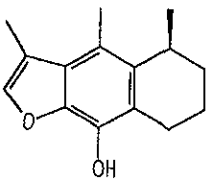
La mayoría de los herbicidas que actúan sobre el proceso de la fotosíntesis ejercen su efecto a través de alguno de los tres mecanismos siguientes: i) inhibición del transporte de electrones fotosintético, ii) inhibición de la fotofosforilación (inhibidores de la transferencia de energía) o iii) desacoplando el transporte de electrones de la síntesis de ATP (Moreland, 1980; Bowes *et al.*, 1981; Linscott, 1981; Corbett 1984; Mathis y Rutherford, 1984; Renger *et al.*, 1984; Percival y Baker, 1991; Gauvrit, 1992; Copping y Hewitt, 1998).

En general, los estudios del efecto de los productos naturales sobre el proceso de la fotosíntesis son escasos. En el caso de los productos de origen vegetal los primeros trabajos se efectuaron *in vivo* y los metabolitos ensayados incluyeron compuestos aromáticos simples tales como el ácido cinámico, el ácido benzoico y algunos de sus derivados (Einhlling *et al.*, 1985; Moreland y Novitsky, 1986), cumarinas como la escopoletina (Einhlling *et al.*, 1970) y flavonoides como la quercetina, la glucoquercetina (Harbone, 1980), la florizina (Einhlling, 1989; 1995) y el camferol (Arntzen *et al.*, 1982). En el Cuadro 7 se presentan algunos ejemplos selectos de productos naturales de origen vegetal con efecto sobre la fotosíntesis.

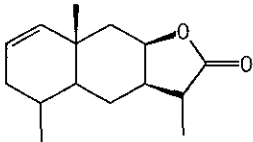
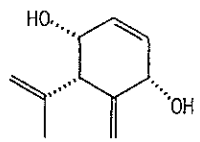
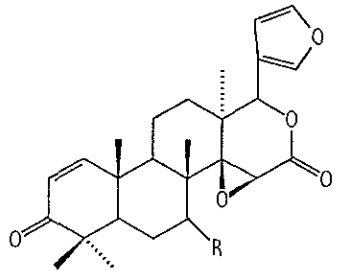
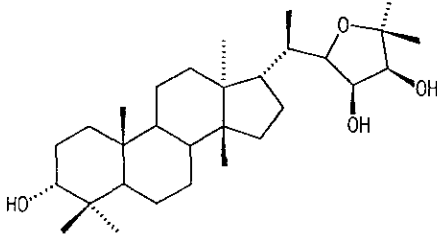
Uno de los productos naturales más investigados en relación a sus efectos sobre el proceso de la fotosíntesis es la sorgoleona (89). Este agente alelopático inhibe el desprendimiento de oxígeno en el fotosistema II (FS II) entre Q_A y Q_B (Streibig *et al.*, 1999). Los estudios de competencia con la sorgoleona y la atrazina marcada isotópicamente con ^{14}C indicaron claramente que la quinona se une en el mismo sitio que la atrazina a nivel de Q_B (González, 1997). Otra quinona que inhibe la fotosíntesis es la juglona (90), la cual induce la reducción de clorofila en *Lemna minor*, sin embargo a la fecha no se ha descrito su blanco de acción específico, pero se especula que no desacopla el transporte de electrones fotosintético (Heijl *et al.*, 1993; Einhlling, 1995).

En años recientes, Lotina-Hennsen y Mata han realizado un estudio sistemático de metabolitos secundarios aislados de especies vegetales de la flora mexicana con un potencial herbicida. Las fitotoxinas investigadas incluyen productos de naturaleza terpenoide, principalmente lactonas sesquiterpéticas, cumarinas (furanocumarinas, piranocumarinas y 4-fenilcumarinas), benzopiranos, cromenos y fenilpropanoides.

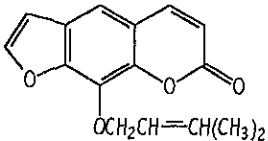
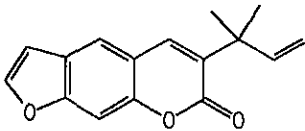
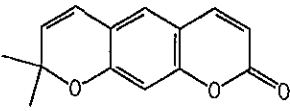
Cuadro 7. Ejemplos selectos de productos naturales de origen vegetal con efecto sobre la fotosíntesis.

Producto	Efecto sobre la fotosíntesis	Referencia
<p>Sorgoleona</p>  <p>89</p>	<p>Inhibidor del desprendimiento de oxígeno. El sitio de inhibición se localizó a nivel del fotosistema II entre Q_A y Q_B. El producto se une específicamente a Q_B.</p>	<p>González <i>et al.</i>, 1997</p>
<p>Juglona</p>  <p>90</p>	<p>Provoca la reducción del contenido de clorofila y la fotosíntesis, se especula que no inhibe el transporte de electrones fotosintético.</p>	<p>Heijl <i>et al.</i>, 1993; Einhlling, 1995</p>
<p>Zaluzazina</p>  <p>91</p>	<p>Inhibidor del transporte de electrones en el fotosistema II. El sitio de inhibición se localizó de agua a P680.</p>	<p>Lotina-Hennsen <i>et al.</i>, 1992</p>
<p>Ivalina</p>  <p>92</p>	<p>Inhibidor del transporte de electrones en el fotosistema II. El sitio de inhibición se localizó a nivel de la enzima que fotoliza el agua.</p>	<p>Bernal-Morales <i>et al.</i>, 1994</p>
<p>Cacalol</p>  <p>93</p>	<p>Inhibidor del transporte de electrones en el fotosistema II. El sitio de inhibición se localizó a nivel de la enzima que fotoliza el agua.</p>	<p>Lotina-Hennsen <i>et al.</i>, 1991</p>

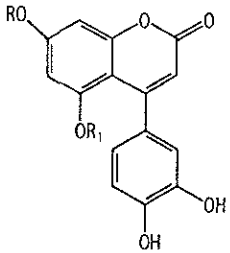
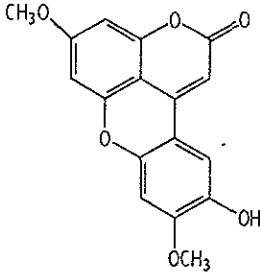
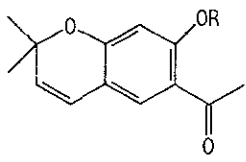
Cuadro 7. Ejemplos selectos de productos naturales de origen vegetal con efecto sobre la fotosíntesis (continuación).

Producto	Efecto sobre la fotosíntesis	Referencia
<p>Isoalloalantolactona</p>  <p>94</p>	<p>Inhibidor del transporte de electrones en el fotosistema II. El sitio de inhibición se localizó entre P680 y Q_A</p>	<p>Calera <i>et al.</i>, 1995a</p>
<p>Piquerol A</p>  <p>95</p>	<p>Inhibidor de la transferencia de energía.</p>	<p>Mendoza <i>et al.</i>, 1994</p>
<p>Gedunina (R: O₂CCH₃) 96 7-oxo-7-deacetoxigedunina (R: CO) 97</p> 	<p>Inhibidores de la transferencia de energía.</p>	<p>Achnine <i>et al.</i>, 1999</p>
<p>Odoranol</p>  <p>98</p>	<p>Inhibidor del transporte de electrones a nivel de la enzima que fotoliza el agua.</p>	<p>Achnine <i>et al.</i>, 1998</p>

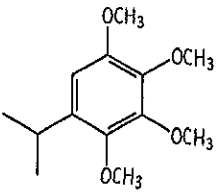
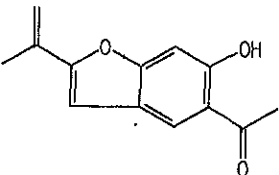
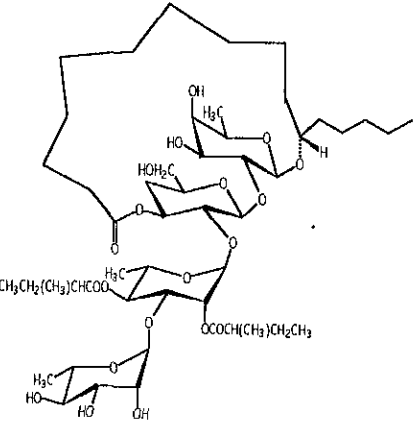
Cuadro 7. Ejemplos selectos de productos naturales de origen vegetal con efecto sobre la fotosíntesis (continuación).

Producto	Efecto sobre la fotosíntesis	Referencia
<p>Imperatorina</p>  <p>99</p>	<p>Agente desacoplante</p>	<p>Mata <i>et al.</i>, 1998</p>
<p>Chalapensina</p>  <p>100</p>	<p>Agente desacoplante e inhibidor de la transferencia de energía</p>	<p>Macías <i>et al.</i>, 1999</p>
<p>Xantiletina</p> <p>101</p>	<p>Inhibidor del transporte de electrones en el fotosistema I. El sitio de inhibición se localizó a nivel del complejo citocromo <i>b₆/f</i>y/o plastocianina</p>	<p>Macías <i>et al.</i>, 1999</p>
<p>3-(1',1'-dimetilalil)xantiletina</p>  <p>102</p>	<p>Agente desacoplante potente e inhibidor del transporte de electrones</p>	<p>Macías <i>et al.</i>, 1999</p>

Cuadro 7. Ejemplos selectos de productos naturales de origen vegetal con efecto sobre la fotosíntesis.

Producto	Efecto sobre la fotosíntesis	Referencia
<p>4-Fenilcumarinas</p>  <p>R R₁</p> <p>OCH₃ β-D-galactosil 103</p> <p>OH β-D-glucosil 104</p> <p>OCH₃ β-D-glucosil 105</p>	<p>Inhibidores de la transferencia de energía</p>	<p>Calera <i>et al.</i>, 1995b; 1996</p>
<p>3-hidroxi-4',7'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina</p>  <p>106</p>	<p>Inhibidores de la transferencia de energía. El sitio de acción se localizó a nivel del complejo CF₀ de la enzima ATPasa.</p>	<p>Calera <i>et al.</i>, 1995c</p>
<p>Encecalina (R: CH₃) 107 desmetilencecalina (H) 108</p> 	<p>Inhibidor del transporte de electrones en el fotosistema II. El sitio de inhibición se localizó entre P680 y Q_A</p>	<p>Castañeda <i>et al.</i>, 1998</p>

Cuadro 7. Ejemplos selectos de productos naturales de origen vegetal con efecto sobre la fotosíntesis.

Producto	Efecto sobre la fotosíntesis	Referencia
<p>1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenilbenceno)</p>  <p style="text-align: center;">109</p>	<p>Inhibidor del transporte de electrones en el fotosistema II. El sitio de inhibición se localizó entre P680 y Q_A</p>	<p>Jiménez <i>et al.</i>, 1998</p>
<p>Euparina</p>  <p style="text-align: center;">110</p>	<p>Inhibidor de la transferencia de energía.</p>	<p>Castañeda <i>et al.</i>, 1998</p>
<p>Tricolorina A</p>  <p style="text-align: center;">111</p>	<p>A bajas concentraciones actúa como agente desacoplante y altas concentraciones inhibe el transporte de electrones. El sitio de inhibición se localizó a nivel de Q_B.</p>	<p>Achnine <i>et al.</i>, 1999</p>

En su totalidad estos estudios se realizaron *in vitro* utilizando cloroplastos aislados de espinaca y los resultados permiten establecer que los compuestos ensayados afectan el proceso de la fotosíntesis a través de diversos mecanismos. Así, las lactonas

sesquiterpénicas zaluzazina C (91), ivalina (92), el cacalol (93) y la isoalloalantolactona (94) inhiben el transporte de electrones en el FS II. El cacalol y la ivalina actúan a nivel de la enzima que fotoliza el agua (Lotina-Hennsen *et al*, 1991; Bernal-Morales *et al*, 1994), en tanto que la zaluzazina C y la isoalloalantolactona inhiben el transporte de electrones de agua a P680 y de P680 a Q_A, respectivamente (Lotina-Hennsen *et al*, 1992; Calera *et al*, 1995). Otros terpenoides con un efecto sobre la fotosíntesis son el piquerol A (95), la gedunina (96), la 7-oxo-7-deacetoxigedunina (97) y el odoratol (98). Los productos 95, 96 y 97 se caracterizaron como inhibidores de la transferencia de energía (Mendoza, *et al.*, 1994; Achnine *et al*, 1999), en tanto que el odoratol se identificó como un inhibidor del transporte de electrones. El sitio de inhibición de este último se localizó a nivel de la enzima que fotoliza el agua (Achnine *et al*, 1998).

Con respecto a las cumarinas, las furanocumarinas, imperatorina (99) y chalepensina (100) se identificaron como agentes desacoplantes. En el caso de la chalepensina, se observó que este producto inhibe también la transferencia de energía (Mata *et al.*, 1998). Por otro lado, la piranocumarina, xantilentina (101) se caracterizó como un inhibidor del transporte de electrones en el PS I a nivel del complejo citocromo b₆/f y/o la plastocianina. La 3-(1',1'-dimetilalil)-xantilentina (102) se clasificó como un potente agente desacoplante y débil inhibidor del transporte de electrones (Macías *et al.*, 1999). Las 4-fenilcumarinas 103, 104 y 105 se identificaron como agentes desacoplantes, en tanto que el producto 106 se caracterizó como un inhibidor de la transferencia de energía. El sitio de inhibición de este último se localizó a nivel del complejo CF₀ de la enzima ATPasa (Calera *et al.*, 1995c; 1996).

En el caso de los cromenos, fenilpropanoides y benzofuranos se determinó que la encecalina (107), la desmetilencecalina (108) y el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-2-propenilbenceno

(109) son inhibidores del transporte de electrones en el FS II, su sitio de inhibición se localizó entre P680 y Q_A. En el caso de la euparina (110), el producto se caracterizó como un inhibidor de la transferencia de energía.

Un producto natural interesante lo constituye la tricolorina A (111), este producto de naturaleza macrocíclica demostró un potente efecto desacoplante a bajas concentraciones y un efecto inhibitor sobre el transporte de electrones a altas concentraciones. El sitio de inhibición se localizó a nivel de Q_B (Achnine *et al.*, 1999).

Una revisión más detallada que describe el efecto de diversos compuestos naturales aislados de especies selectas de la flora mexicana sobre el proceso de la fotosíntesis se presentan en tres trabajos de reciente publicación (Anaya, 1996; Mata *et al.*, 1996 y Lotina-Hennsen *et al.*, 1998).

En el caso de las fitotoxinas de origen microbiano el número de compuestos cuyo efecto sobre la fotosíntesis se ha estudiado es aún menor. Los productos microbianos investigados pertenecen a distintas categorías e incluyen benzoquinonas, quinolonas, cromonas, sesquiterpenoides y compuestos de naturaleza peptídica. En el Cuadro 8 se presentan ejemplos selectos de productos naturales de origen microbiano con un efecto sobre la fotosíntesis y a continuación se describirá brevemente la actividad de algunos de ellos.

La dihidrofusarubina (112), un producto aislado de *Fusarium solani* interfiere en el transporte de electrones a nivel del complejo ferredoxina, en donde actúa como un aceptor de electrones. Este hecho ocasiona la inhibición de la síntesis de NADPH y la fijación de dióxido de carbono. Por otro lado, la especie reducida de la dihidrofusarubina se reoxida en presencia de oxígeno molecular para generar radicales libres (especies de oxígeno reactivas), los cuales también son tóxicos para la célula vegetal (Heiser *et al.*, 1998) (Figura

6). El mismo mecanismo lo presenta la piridazocidina (71), un producto aislado de una especie de *Streptomyces* y que constituye el primer producto microbiano con este mecanismo de acción (Gerwick *et al.*, 1997). El modo de acción demostrado por la dihidrofusarubina y la piridazocidina es similar al de las sales de bupirilio las cuales se comportan como aceptores de electrones en el fotosistema I. Estos compuestos se autooxidan en presencia de oxígeno molecular y generan radicales libres. La autooxidación del compuesto se manifiesta como un consumo de oxígeno dependiente de la luz (Kurnert y Dodge, 1989).

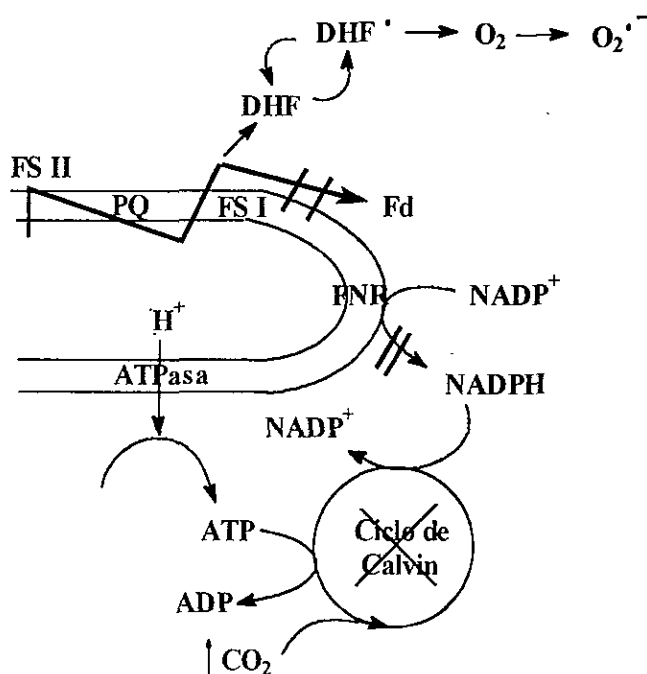
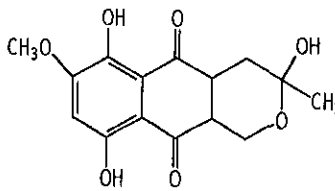
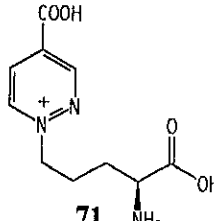
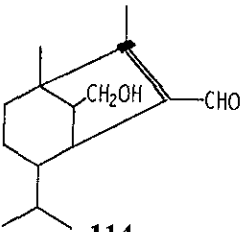


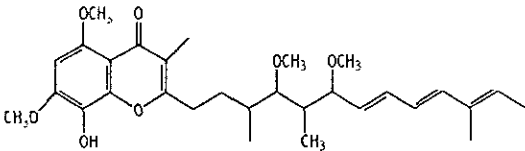
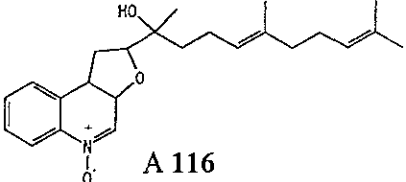
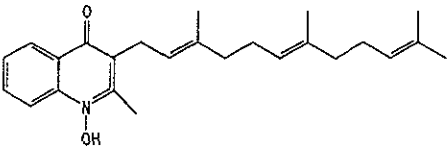
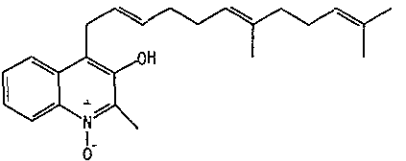
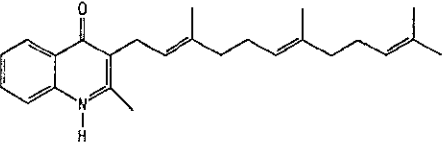
Figura 6. Efecto de la dihidrofusarubina (112) en los cloroplastos. La dihidrofusarubina después de ser reducida en el fotosistema I se reoxida en presencia de oxígeno molecular y se generan especies reactivas de oxígeno. DHF, dihidrofusarubina; Fd, ferredoxina; FNR, NADPH-ferredoxina-oxidoreductasa; PQ, plastoquinona; FSI, fotosistema I; FSII, fotosistema II.

La estigmatelina (115), una cromona aislada de *Stigmatella aurantica* y las auraquinas (116-119); quinolonas producidas por la misma especie inhiben el transporte de electrones a nivel del FS II y del complejo *b₆f* (Oettmeier *et al.*, 1985 ;1989).

Cuadro 8. Ejemplos selectos de productos naturales de origen microbiano con efecto sobre la fotosíntesis.

Producto	Efecto sobre la fotosíntesis	Referencia
<p>Dihidrofusarubina</p>  <p>112</p>	<p>Interfiere en la cadena transportadora de electrones formando especies reactivas de oxígeno. El producto actúan como aceptores de electrones a nivel del complejo ferredoxina. Este hecho trae como consecuencia la inhibición de la síntesis de NADPH y la fijación de dióxido de carbono.</p>	<p>Heiser <i>et al.</i>, 1998</p>
<p>Piridazozidina</p>  <p>71</p>	<p>Interfiere en la cadena transportadora de electrones formando especies reactivas de oxígeno</p>	<p>Gerwick <i>et al.</i>, 1997</p>
<p>Tentoxina [Ciclo(N-metil-L-alanil-L-leucil-N-metil-trans-dihidrofenilalanil-glicina)] 113</p>	<p>Inhibe la actividad de la enzima ATPasa, a nivel del factor de acoplamiento CF₁.</p>	<p>Artzen, 1972; Steele <i>et al.</i>, 1978; Reimer y Selman, 1978</p>
<p>Helmintosporol</p>  <p>114</p>	<p>Agente desacoplante clásico de la fotosíntesis.</p>	<p>Briquet <i>et al.</i>, 1998</p>

Cuadro 8. Ejemplos selectos de productos naturales de origen microbiano con efecto sobre la fotosíntesis (continuación).

Producto	Efecto sobre la fotosíntesis	Referencia
<p data-bbox="150 379 312 409">Estigmatelina</p>  <p data-bbox="420 631 474 661">115</p>	<p data-bbox="754 379 1118 510">Inhibe el transporte de electrones a nivel del FS II y el complejo <i>b₆f</i></p>	<p data-bbox="1133 379 1339 449">Oettmeier <i>et al.</i>, 1985</p>
<p data-bbox="150 687 289 717">Aurauquinas</p>  <p data-bbox="405 889 482 919">A 116</p>  <p data-bbox="405 1141 482 1171">B 117</p>  <p data-bbox="405 1393 482 1423">C 118</p>  <p data-bbox="405 1594 482 1624">D 119</p>	<p data-bbox="754 788 1118 959">Inhiben el transporte de electrones a nivel del FS II y el complejo <i>b₆f</i>. La aurauquina C es el producto más activo.</p>	<p data-bbox="1133 788 1339 858">Oettmeier <i>et al.</i>, 1989</p>

1.3. Antecedentes del género *Actinomadura*.

El actinomiceto más importante de este estudio fue identificado como una especie del género *Actinomadura* y, aparentemente, constituye una nueva fuente productora del importante antibiótico maduramicina. En consecuencia, se consideró pertinente presentar una breve descripción acerca de las características taxonómicas y de los metabolitos secundarios aislados de este género.

1.3.1. Consideraciones generales del género *Actinomadura*

El término *Actinomadura* proviene del vocablo griego *actinos* que significa rayo de luz y de *Madura*, nombre de una provincia de la India.

El género *Actinomadura* fue propuesto por Lechevalier y Lechevalier en 1970 para agrupar a una serie de actinomicetos aerobios que desarrollan micelios substrato y aéreo, producen esporas (artrosporas) en cadenas y cuyos hidrolizados celulares contienen meso-DAP (ácido 2,6-diaminopimélico) y madurosa (3-O-metil-D-galactosa). Estos mismos autores designaron como especie tipo a la *Actinomadura madurae*, uno de los agentes causales de un tipo de micetoma denominado "pie de Madura". Este padecimiento se caracteriza por ocasionar tumefacciones supurantes en la piel y tejidos subcutáneos y se generan cuando un suelo contaminado con esta especie penetra en las heridas. Estas infecciones cutáneas se presentan con mayor frecuencia en las extremidades inferiores. Inicialmente *A. madurae*, descubierta por Vincent en 1894 fue clasificada como *Streptothrix madurae*. Posteriormente, en 1896 Blanchard la reclasificó como *Nocardia madurae* (Vincent) Blanchard (Meyer, 1989).

En 1906, Laveran describió otro microorganismo causante de la enfermedad de pie de Madura y lo clasificó en primera instancia como *Micrococcus pelletieri* y,

posteriormente, como *Nocardia pellieteri*. Tanto la *N. madurae* de Blanchard como la *N. pellieteri* de Laveran carecían del micelio fragmentado típico del género *Nocardia*, considerándose entonces como especies atípicas. Más tarde Waksman y Henrici transfirieron a *N. pellieteri* y a *N. madurae* al género *Streptomyces*. Sin embargo, esta reclasificación también fue controversial y no fue sino hasta 1965 cuando Becker y colaboradores demostraron que los hidrolizados celulares de estos microorganismos contenían *meso* DAP (ácido meso-diamino pimélico) y un azúcar desconocido, la madurosa, posteriormente identificada por Lechevalier y Gerber (1970) como la 3-O-metil-D-galactosa. Este descubrimiento llevó a Lechevalier y Lechevalier a proponer el género *Actinomadura* para incluir a estas dos especies. Es importante indicar que los hidrolizados celulares de los microorganismos típicos del género *Nocardia* contienen *meso* DAP, galactosa y arabinosa y los del género *Streptomyces* contienen L-DAP y no contienen madurosa (Meyer, 1989).

El género *Actinomadura* pertenece al orden de los Actinomicetales y su inclusión en una familia todavía no está definida. Inicialmente, Lechevalier y Lechevalier colocaron al género dentro de la familia Thermoactinomycetaceae, cuyos miembros se caracterizan por formar endosporas, rasgo ausente en las especies de *Actinomadura*. En consecuencia se propuso una nueva familia, Thermomonosporaceae, para incluir a *Actinomadura* junto con *Microbispora*, *Microtetraspora* y otros géneros relacionados. Esta colocación fue de nueva cuenta cuestionada. De tal forma que Godfellow y Cross propusieron la creación de nueve "grupos agregados" con base en los criterios quimiotaxonómicos y de taxonomía numérica. Uno de los "grupos agregados" es el de los "Maduromicetos" el cual comprende a los géneros *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora* y *Streptosporangium* (Bergey, 1994).

Los microorganismos del género *Actinomadura* son bacterias gram positivas, no alcohol resistente, aerobias, quimiorganotrópicas y crecen en un intervalo de temperatura de 10 a 60° C. Desde el punto de vista morfológico las especies de este género se caracterizan por presentar una gran cantidad de hifas vegetativas ramificadas y un denso micelio substrato no fragmentado. Prácticamente todas las especies desarrollan un micelio aéreo, el cual puede presentar una coloración azul, café, crema, gris, verde, rosa, roja, blanca o amarilla. En la madurez el micelio aéreo forma cadenas de artrosporas cortas y ocasionalmente largas. Las cadenas de esporas pueden ser rectas, curvas o espirales irregulares. La superficie de las esporas puede tener una apariencia rugosa, irregular o suave (Meyer, 1989; Bergey, 1994).

En algunos casos las características microscópicas de los microorganismos del género *Actinomadura* se confunden con las del género *Streptomyces*. La principal diferencia radica en la magnitud del diámetro de las esporas. El diámetro de las esporas de las cepas de *Actinomadura* notablemente excede el diámetro de la hifa, mientras que el diámetro de las esporas de los microorganismos del género *Streptomyces* es similar al de la hifa (Figura 7). Las cepas de fuentes clínicas carecen de micelio aéreo y las colonias presentan una apariencia cartilaginosa (Meyer, 1989).

La composición de los hidrolizados celulares de los microorganismos del género *Actinomadura* contiene ácido meso 2,6-diaminopimélico, ácido N-acetilmurámico, galactosa, glucosa, manosa, ribosa y madurosa, esta última en ocasiones se encuentra en pequeña cantidad. De manera adicional, los hidrolizados presentan una mezcla compleja de ácidos grasos siendo los más abundantes el hexadecanoico, el 14-metilpentadecanoico y el 10-metiloctadecanoico. Estos organismos no producen ácido micólico y sus fosfolípidos

mayoritarios son el difosfatidilglicerol y el fosfatidilinositol. Contienen también las menaquinonas MK-9 (H₄, H₆, y H₈) (Meyer, 1989; Bergey, 1994).

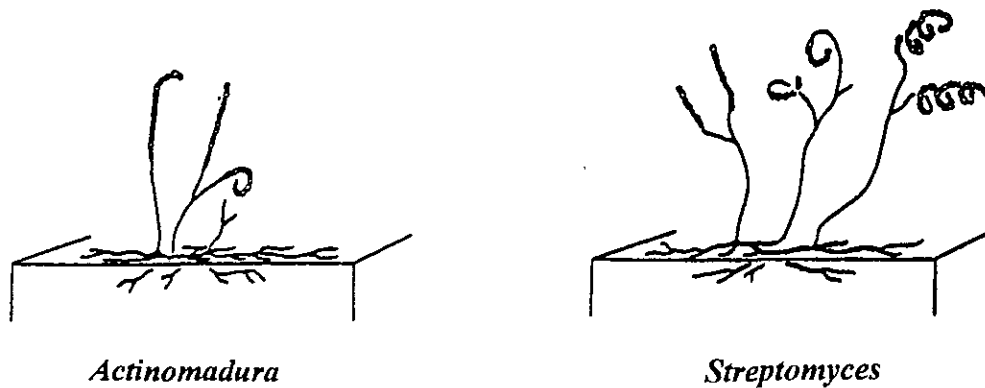


Figura 7. Características morfológicas de los actinomicetos del género *Actinomadura* y *Streptomyces* (Bergey, 1994).

Los miembros del género *Actinomadura* se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y de acuerdo a la información más reciente publicada en la literatura científica, este género comprende aproximadamente 27 especies. *A. atramentaria*, *A. aurantica*, *A. citrea*, *A. coerulea*, *A. cremea*, *A. echinospora*, *A. fibrosa*, *A. formosensis*, *A. fulvescens*, *A. hibisca*, *A. kijaniata*, *A. latina*, *A. libanotica*, *A. livida*, *A. luteofluorescens*, *A. macra*, *A. madurae*, *A. oligospora*, *A. pelletieri*, *A. rubrobrunea*, *A. rugatobispora*, *A. spadix*, *A. umbrina*, *A. verrucosospora*, *A. vinacee*, *A. viridis*, *A. yumaensis* (Kroppensted *et al.*, 1990;

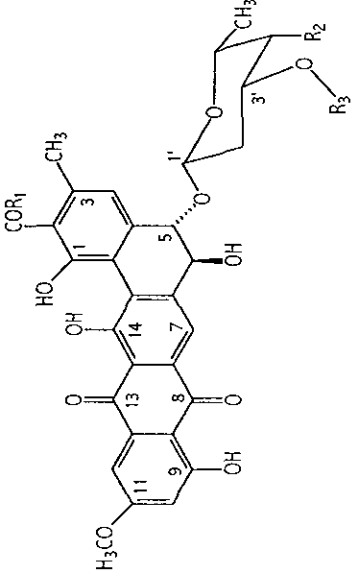
Berger, 1994; Trujillo y Godfellow, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Cabe destacar que la especie *Actinomadura formosensis* fue recientemente reclasificada del género *Thermomonospora* al género *Actinomadura* con base en el análisis de la secuencia del gen del que codifica para el ARN ribosomal 16S y sus características quimiotaxonómicas. En particular considerando la presencia de madurosa en los hidrolizados celulares del microorganismo (Zhang *et al.*, 1998).

La mayoría de las especies de *Actinomadura* son inocuas para animales y el hombre, sin embargo, las especies *A. madurae* y *A. pelletieri* son los agentes causales de actinomicetomas. La mayoría de los reportes de infecciones por estas especies son de áreas tropicales y subtropicales particularmente de Africa, México e India (Bedi *et al.*, 1978; Welfringer y Parache, 1987; Kamalam y Thambiah, 1987; Alteras *et al.*, 1988; Venugopal y Venugopal, 1991; Castañon-Olivares *et al.*, 1992; López-Martínez *et al.*, 1992; McNeil *et al.*, 1992; Dávila del Real *et al.*, 1996; Pérez-Blanco *et al.*, 1999).

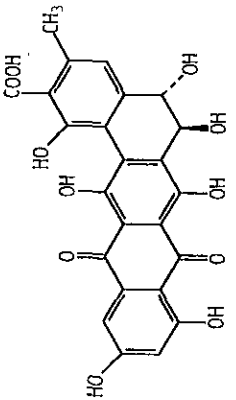
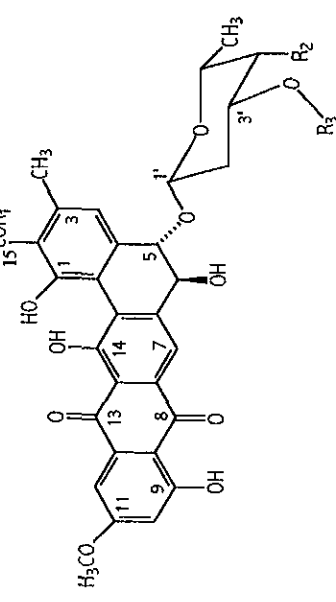
1.3.2. Metabolitos secundarios del género *Actinomadura*.

El género *Actinomadura* es una fuente importante de compuestos biodinámicos. Los metabolitos activos derivados de este género presentan una gran diversidad estructural y un amplio rango de actividades biológicas. Los productos más importantes aislados a la fecha a partir de los medios de cultivo de las distintas especies estudiadas incluyen 5,6-dihidrobenczo[a]naftacenoquinonas, benzoantraquinonas, nucleósidos, antraciclinas, ansamicinas, macrolactamas, macrólidos, aminoglicósidos, glucopéptidos, tetraciclinas y antibióticos de tipo poliéter. En los Cuadros 9 y 10 se presentan ejemplos selectos de los metabolitos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura*.

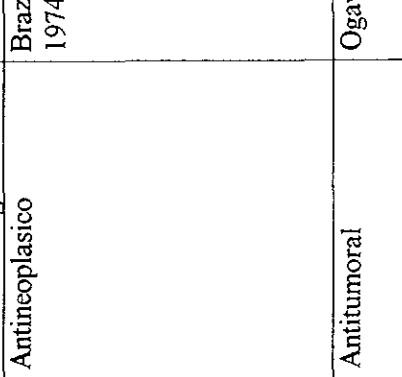
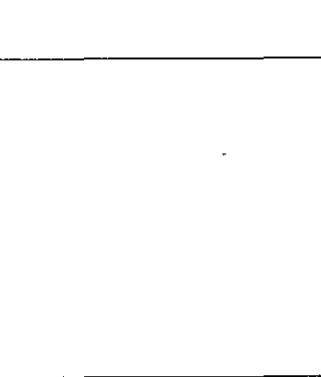

Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura*.

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
	<i>A. hibisica</i> P157 ATCC 53557	Antifúngica	Oki, <i>et al.</i> , 1988, 1990; Tsunakawa, <i>et al</i> 1989; Tomita <i>et al.</i> , 1990; Sawada <i>et al.</i> , 1990
<p>120 A</p> <p>121 B</p> <p>122 C</p> <p>123 D</p> <p>124 E</p> <p>125 L</p> <p>126 S</p> <p>Derivados semisintéticos (biosíntesis dirigida)</p> <p>127 FA-1</p> <p>128 FA-2</p> <p>129 BMS-181184</p> <p>130 BMS-181532</p> <p>131 FL</p> <p>132 FS</p> <p>133 FB</p>	<p><i>A. verrucosopora</i> subs. <i>neohibisica</i></p> <p><i>A. spinosa</i></p> <p><i>A. verrucosopora</i> <i>Actinomadura</i> sp. AB1236</p>	<p>Antifúngica Antifúngica y antiviral. Antifúngica</p>	<p>Saitoh, <i>et al.</i>, 1993a Saitoh, <i>et al.</i>, 1993b</p> <p>Furumai, <i>et al.</i>, 1993 Saitoh, <i>et al.</i>, 1993a Saitoh, <i>et al.</i>, 1993b; 1993c</p>

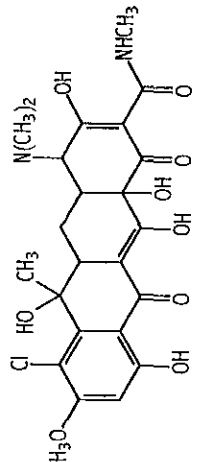
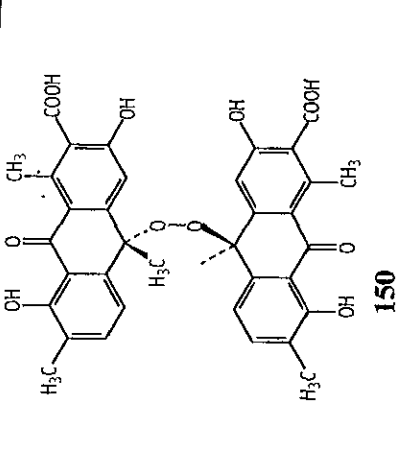
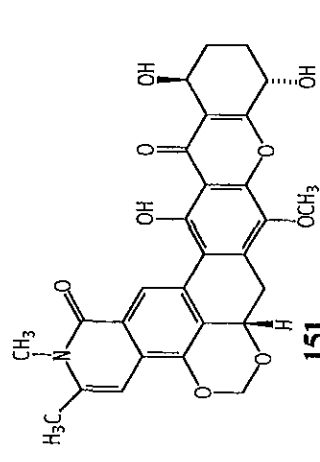
Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Pradimicinas</p>  <p> R_1 OH R_2 H R_3 H R_4 OH alanil CH_3 OH alanil CH_3 OH alanil OH OH OCH_3 H OCH_3 OH OH OH </p>	<p>Cepas mutantes de <i>A. hibisca</i> P157-2</p>	<p>Carecen de actividad antifúngica</p>	<p>Sawada, <i>et al.</i>, 1990</p>
<p>Benanomicinas</p>  <p> R_1 ala R_2 OH R_3 xilosil R_4 H ala NH_2 H ala OH ala NH_2OH H ala NH_2OH H glicil OH ala OH xilosil xilosil xilosil xilosil xilosil OCH_3 </p>	<p><i>Actinomadura</i> sp. 32MH193-16F4</p>	<p>Antifúngica</p>	<p>Kondo <i>et al.</i>, 1991</p>

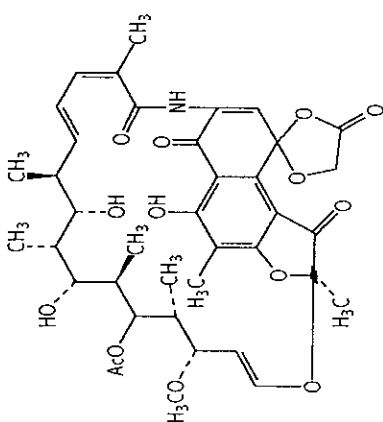
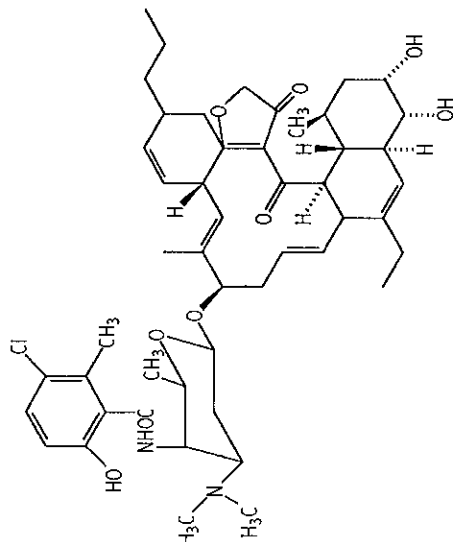
Cuadro 9 Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Carminomicinas</p>  <p>R I H II</p>	<i>A. carminata</i>	Antineoplásico	Brazhnikova <i>et al.</i> , 1974
<p>Rubeomicinas</p>  <p>R A COCH₃ (FA 1180A) B -CH(OH)CH₃ (FA 1180B)</p>	<i>A. roseoviolaceae</i>	Antitumoral	Ogawa <i>et al.</i> , 1981
<p>Maduramicina</p>  <p>C₈H₂₄O₁₀ +</p>	<i>A. rubra</i>	Antibacteriano	Fleck <i>et al.</i> , 1978; Strauss <i>et al.</i> , 1986

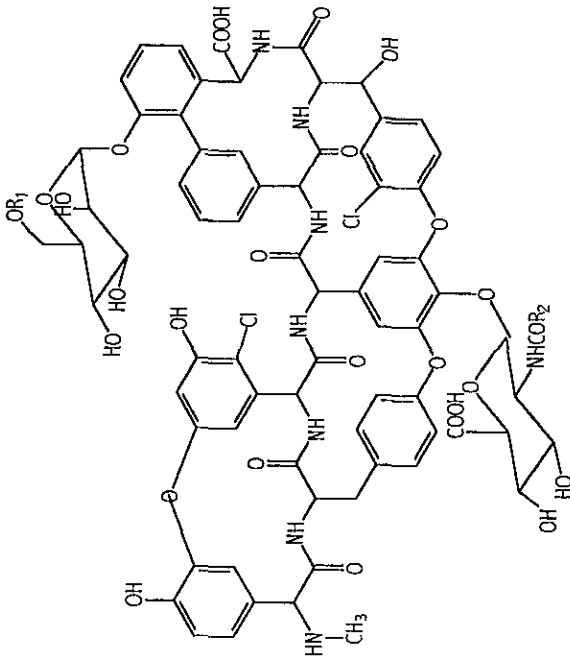
Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Sch 33256 2'-N-metil-8-metoxictetraciclina</p>  <p style="text-align: center;">149</p>	<p><i>A. brunea</i> SCC1676</p>	<p>Antibacteriana</p>	<p>Patel, <i>et al.</i>, 1987</p>
<p>Oxantromicina</p>  <p style="text-align: center;">150</p>	<p><i>Actinomadura</i> sp. SC1646</p>	<p>Antifungico, antibacteriano</p>	
<p>Simaomicina (LL-D-42067)</p>  <p style="text-align: center;">151</p>	<p><i>A. madurae</i></p>	<p>Antibacteriano, anticoccidia</p>	<p>Maiese <i>et al.</i>, 1990.</p>

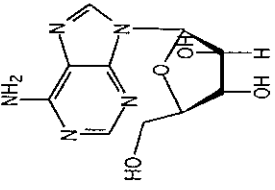
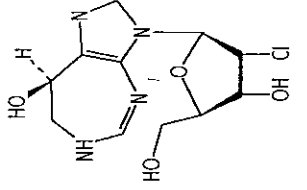
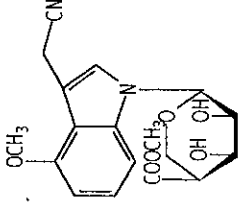
Cuadro 9 Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Rifamicina O</p>  <p>152</p>	<p><i>A. cremea</i></p>	<p>Antibacteriano</p>	<p>Gauze <i>et al.</i>, 1975</p>
<p>MM46115</p>  <p>153</p>	<p><i>A. pelletieri</i></p>	<p>Antiviral, antibacteriana</p>	<p>Ashton <i>et al.</i>, 1990</p>

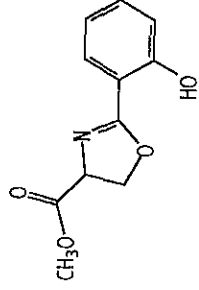
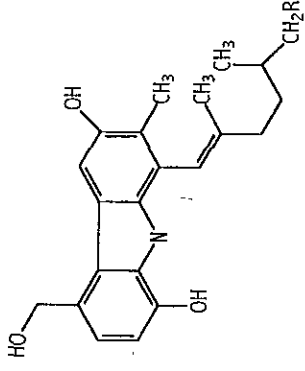
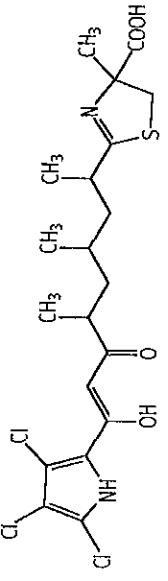
56 Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Parvocidinas</p>  <p style="text-align: right;"> R_1 H H H H H H COCH₃ COCH₃ </p> <p style="text-align: right;"> R_2 nC₉H₁₉ (CH₂)₇CH(CH₃)₂ nC₁₀H₂₁ (CH₂)₈CH(CH₃)₂ n(CH₂)₁₀CH₃ (CH₂)₈CH(CH₃)₂ n(CH₂)₁₀CH₃ </p>	<p><i>A. parvosata</i></p>	<p>Antibacteriana</p>	<p>Christensen, <i>et al</i>, 1987</p>

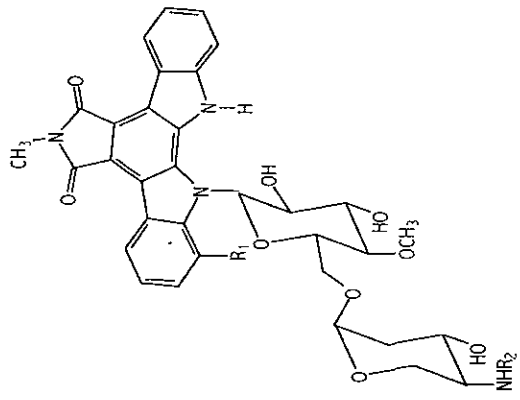
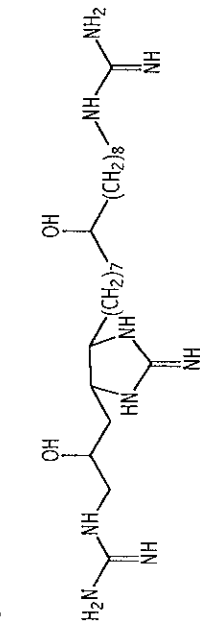
Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>2'-amino-2'-desoxiadenosina</p>  <p style="text-align: center;">161</p>	<i>Actinomadura</i> sp.	Inhibidor de la enzima adenosina desaminasa	Suhadlnik <i>et al.</i> , 1989
<p>2'-clorodesoxi-2'-desoxicoformicina</p>  <p style="text-align: center;">162</p>	<i>Actinomadura</i> sp.	Inhibidor de la enzima adenosina desaminasa	Suhadlnik <i>et al.</i> , 1989
<p>Antibiótico SF-2140</p>  <p style="text-align: center;">163</p>	<i>A. albolutea</i>	Antiviral	Tohyama <i>et al.</i> , 1984

Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>2-(2'-hidroxifenil)-2-oxazolin-4-carboxilato de metilo</p>  <p style="text-align: center;">164</p>	<p><i>Actinomadura</i> MJ 502-77F8</p>	<p>Antibacteriana</p>	<p>Sasaki <i>et al.</i>, 1997</p>
<p>Carbamazomadurasinas</p> <p style="text-align: center;">R H CH₃</p>  <p style="text-align: center;">165 A 166 B</p>	<p><i>A. madurae</i></p>	<p>Neuroprotector</p>	<p>Kotoda <i>et al.</i>, 1997</p>
<p>Tiazohalostatina</p>  <p style="text-align: center;">167</p>	<p><i>Actinomadura</i> sp. HQ24</p>	<p>Citoprotector</p>	<p>Yamagishi, <i>et al.</i>, 1993</p>

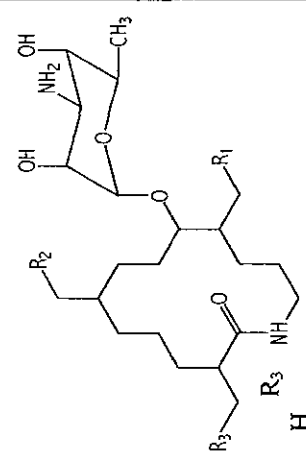
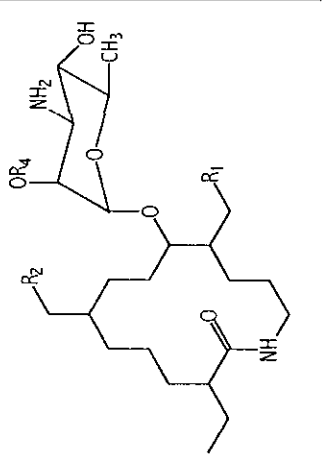
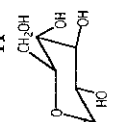
Cuadro 9 Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
 <p> R_1 Cl Cl H H </p> <p> R_2 CH₃ H CH₃ H </p>	<i>A. mellicaura</i> sp. nov. (SC 1655)	Antitumoral, antibacteriana	Matson <i>et al.</i> , 1989
<p>Antibiótico Sch 40873</p>  <p>172</p>	<i>Actinomadura</i>	Antifungico	Gullo <i>et al.</i> , 1991

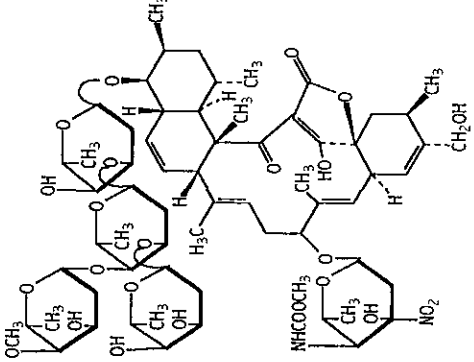
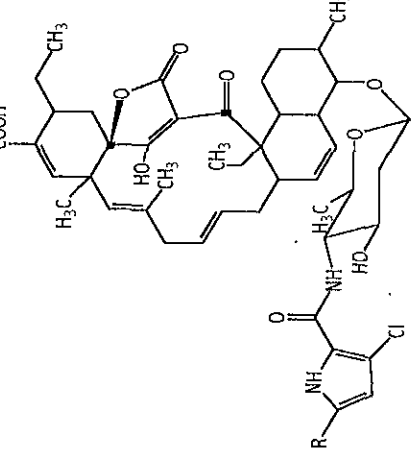
Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p data-bbox="374 1689 405 1870">Matlistatinas</p> <div data-bbox="405 1157 1224 1491"> </div>	<p data-bbox="374 741 405 949"><i>A. atramentaria</i></p>	<p data-bbox="374 471 405 713">Inhibidor de la enzima colagenasa tipo IV</p>	<p data-bbox="374 122 405 391">Ogita <i>et al.</i>, 1992; Haruyama <i>et al.</i>, 1994.</p>

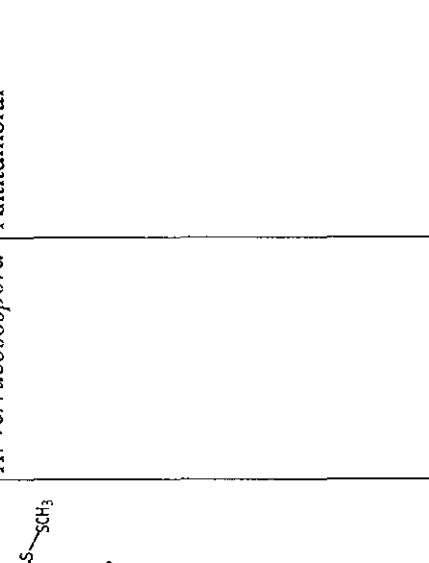
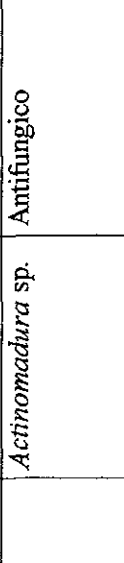
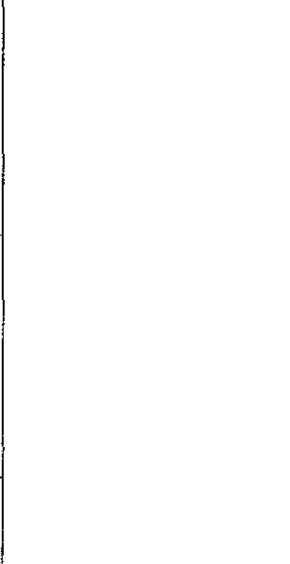
Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Macrolactamas	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
	<i>Actinomadura</i> spp. SC1776 SC1778 y SCC 1840	Antifúngica	Hedge, et al, 1992; 1993; Cooper et al., 1992
	 <p> R_1 H H H CH₃ </p> <p> R_2 H H CH₃ CH₃ </p> <p> R_3 H CH₃ CH₃ CH₃ </p>		
	 <p> R_1 H H H CH₃ </p> <p> R_2 H H CH₃ CH₃ </p> <p> R_3 H CH₃ CH₃ CH₃ </p> <p> R_4 H CH₃ CH₃ CH₃ CH₃ </p>		
			

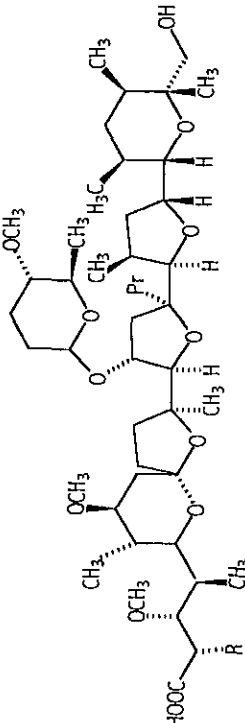
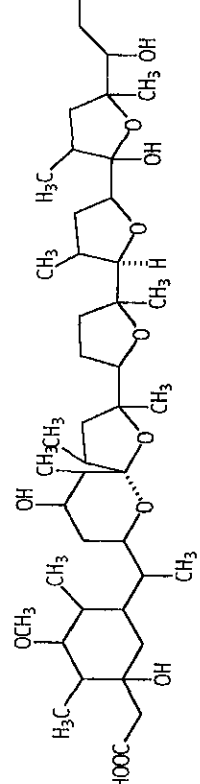
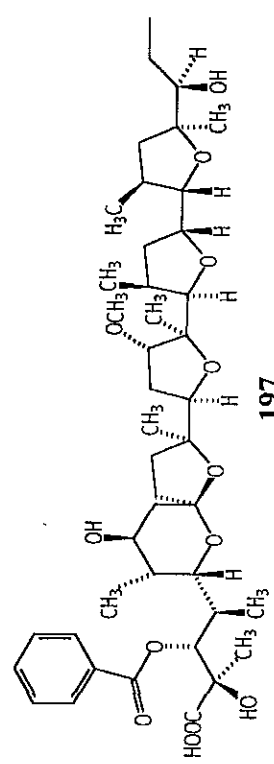
Cuadro 9. Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación).

Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p data-bbox="344 1538 374 1844">Kijaninicina (Sch 25663)</p>  <p data-bbox="851 1356 881 1407">187</p>	<p data-bbox="344 741 374 893"><i>A. kijiniata</i></p>	<p data-bbox="344 459 420 641">Antibacteriano, Antifúngico</p>	<p data-bbox="344 167 374 368">Waitz et al., 1981</p>
<p data-bbox="889 1639 919 1856">Decatronomicinas</p>  <p data-bbox="1289 1790 1350 1856">188 A 189 B</p> <p data-bbox="1259 1679 1350 1709">R H Cl</p>	<p data-bbox="889 681 964 893"><i>Actinomadura</i> sp. MK75-NF4</p>	<p data-bbox="889 469 919 641">Antibacteriano</p>	<p data-bbox="889 137 919 379">Momose, et al., 1999</p>

Cuadro 9 Ejemplos selectos de productos bioactivos derivados de actinomicetos del género *Actinomadura* (continuación)

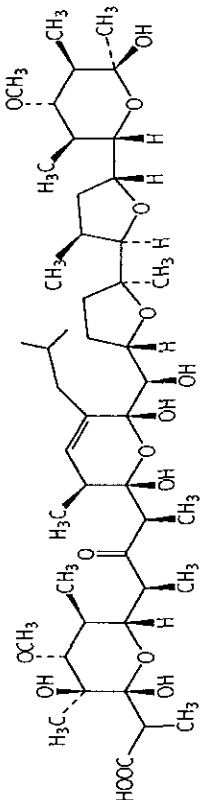
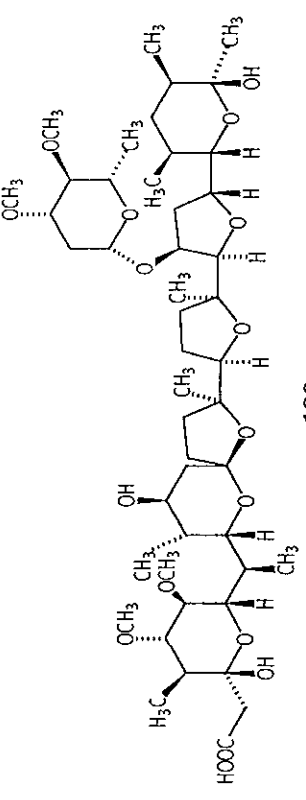
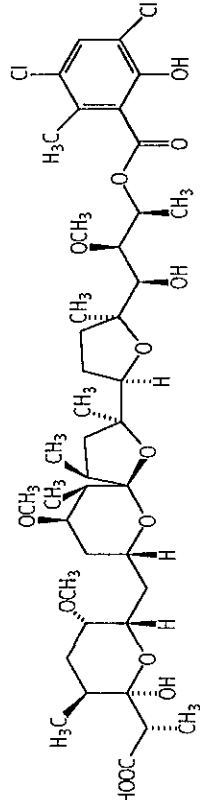
Producto	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Esperamicinas</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>R₁</p> <p>H</p> <p>H</p> <p>H</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>R₂</p> <p>X</p> <p>X</p> <p>H</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>R₃</p> <p>CH(CH₃)₂</p> <p>CH₂CH₃</p> <p>CH(CH₃)₂</p> </div> </div> 	<p><i>A. verrucosopora</i></p>	<p>Antitumoral</p>	<p>Konishi et al., 1985</p>
<p>X</p> 	<p><i>Actinomadura</i> sp.</p>	<p>Antifungico</p>	<p>Hedge et al., 1989</p>
<p>Antibiótico Sch 40873</p>  <p style="text-align: right;">193</p>			

Cuadro 10. Antibióticos de tipo poliéter producidos por especies del género *Actinomadura*.

Antibiótico	Especie	Clase ^a	Estructura	Referencia
CP 47,433 CP 47,434	<i>A. macra</i> ATCC 31286	3d	 <p>194 47, 433 CH₂CH₂CH₃ 195 47, 433 CH₂CH₃</p>	Tone <i>et al.</i> , 1979
CP 51,532 (Hidamicina)	<i>A. verrucosospora</i> ATCC 31466	3a	 <p>196</p>	Dobashi <i>et al.</i> , 1989
Cationomicina	<i>A. azurea</i> . FERM BP-83	3d	 <p>197</p>	Nakamura <i>et al.</i> , 1983.

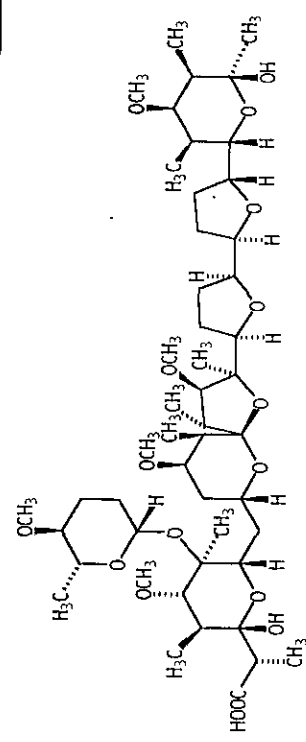
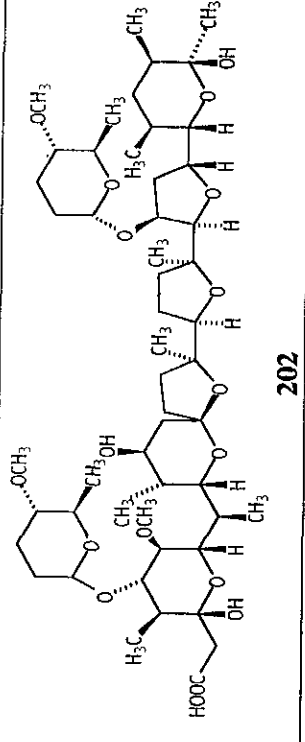
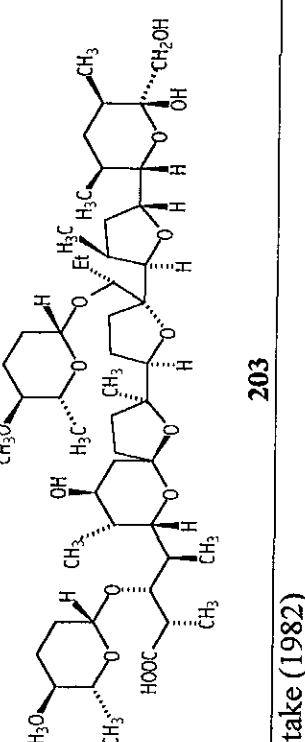
^a De acuerdo a la clasificación propuesta por Seto y Otake (1982)

Cuadro 10. Antibióticos de tipo poliéter producidos por especies del género *Actinomadura*.

Antibiótico	Especie	Clase ^a	Estructura	Referencia
UK41637	<i>A. cremea</i> . ATCC 31676		 <p style="text-align: center;">198</p>	Penrose <i>et al.</i> , 1982
Maduramicina	<i>A. yumcensis</i>	3a	 <p style="text-align: center;">199</p>	Labeda <i>et al.</i> , 1983
CP-54,883	<i>A. routienii</i> Huang sp. nov.	3c	 <p style="text-align: center;">200</p>	Cullen <i>et al.</i> , 1987; Bordner <i>et al.</i> , 1987

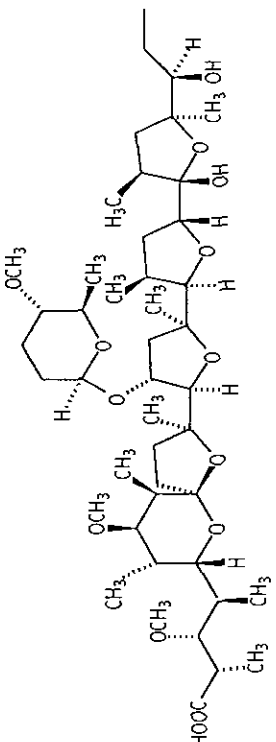
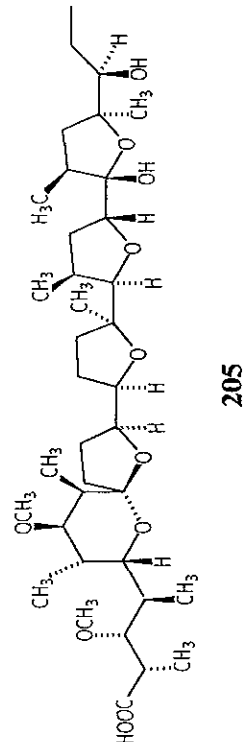
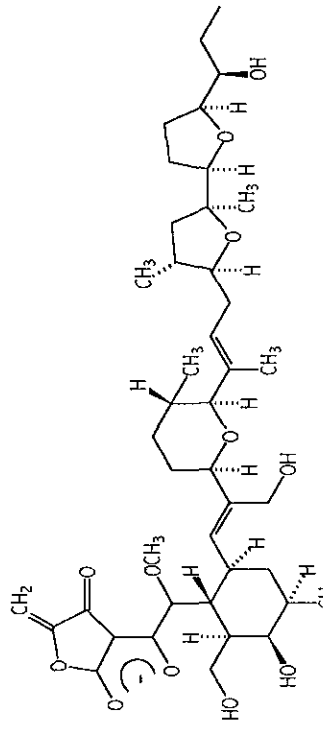
^a De acuerdo a la clasificación propuesta por Seto y Otake (1982)

Cuadro 10. Antibióticos de tipo poliéter producidos por especies del género *Actinomadura*.

Antibiótico	Especie	Clase ^a	Estructura	Referencia
27-metoxiseptamicina	<i>Actinomadura</i> sp. ATCC 53676	3c	 <p style="text-align: center;">201</p>	Dirlam <i>et al.</i> , 1992
UK-58,852	<i>A. roseorufa</i> ATCC 39697	3a	 <p style="text-align: center;">202</p>	Dirlam <i>et al.</i> , 1991
CP-82,996	<i>Actinomadura</i> sp. ATCC 53764	3d	 <p style="text-align: center;">203</p>	Dirlam <i>et al.</i> , 1990b

^a De acuerdo a la clasificación propuesta por Seto y Otake (1982)

Cuadro 10. Antibióticos de tipo políéter producidos por especies del género *Actinomadura*.

Antibiótico	Especie	Clase ^a	Estructura	Referencia
CP-84,657 (A 82810)	<i>Actinomadura</i> sp. ATCC 53708	3d	 <p style="text-align: center;">204</p>	Dirlam <i>et al.</i> , 1990a
Kjijimicina	<i>Actinomadura</i> sp. MI215-NF3	3d	 <p style="text-align: center;">205</p>	Takahashi <i>et al.</i> , 1990
SF 2487 (A 80577)	<i>Actinomadura</i> sp. SF 2487	4	 <p style="text-align: center;">206</p>	Hatsu <i>et al.</i> , 1990

Además de los productos antes mencionados también se han aislado antibióticos de tipo peptídico de estructura desconocida. Estos antibióticos se clasifican en cromopéptidos, oligopéptidos y oligonucleótidos y han demostrado propiedades antitumorales y antibacterianas (Kikuchi *et al.*, 1985; Koguchi *et al.*, 1986; Tunac *et al.*, 1985; Hanada *et al.*, 1991).

Los metabolitos microbianos derivados del género *Actinomadura* que han recibido una mayor atención son los compuestos de tipo 5,6-dihidrobenzo[a]naftacenoquinona y los antibióticos poliéter.

Las 5,6-dihidrobenzo[a]naftacenoquinonas poseen propiedades antifúngicas de amplio espectro e incluyen dos grupos de compuestos denominados con los nombres triviales de pradimicinas y benanomicinas (Cuadro 9). En general, estas quinonas se encuentran bajo la forma de glucósidos y contienen un aminoácido unido al carbono 15 del núcleo base. Los compuestos descritos a la fecha se diferencian entre sí por la naturaleza del aminoácido (D-alanina, glicina o serina) en C-15 y de la porción sacárida unida en C-5, generalmente un disacárido. Con excepción de los compuestos **130**, **133**, **140** y **141** que contiene una sola unidad sacárida.

En las pradimicinas y benanomicinas **120-128**, **131-133**, **139** y **141** el azúcar unido a la porción aglicona es un aminoazúcar, en tanto que la segunda unidad sacárida puede ser xilosa, glucosa o 3-sulfoglucosa. En algunas benanomicinas el grupo amino de la primera unidad se encuentra substituido por un grupo hidroxilo (**138**, **140**, **142** y **143**) (Cuadro 9).

El grupo de las pradimicinas está constituido aproximadamente por 18 compuestos (Cuadro 9), de los cuales siete son naturales (**120-126**), cuatro son producidas por cepas mutantes de especies del género *Actinomadura* (**134-137**) y las restantes se han obtenido a través de biosíntesis dirigida (**127-133**) (Oki *et al.*, 1988; 1990; Tsunakawa *et al.*, 1989;

Tomita *et al.*, 1990; Saitoh *et al.*, 1993a; 1993b; 1993c). Las pradimicinas M (134), N (135), O (136) y P (137) derivadas de cepas mutantes de *A. hibisca* P157-2 carecen del grupo disacarido y de la actividad antifúngica. Por otro lado, las pradimicinas derivadas de procesos de biosíntesis dirigida son análogos de las pradimicinas o de las benanomicinas naturales que poseen en su estructura el aminoácido serina en lugar del aminoácido alanina. Así, la pradimicina FL (131) es el derivado semisintético de la pradimicina L (125), este análogo demostró una actividad antifúngica mayor a la del correspondiente producto natural (Saitoh *et al.*, 1993a).

Una de las pradimicinas que ha recibido una mayor atención es la pradimicina BMS-181184 (129), un análogo de la pradimicina A (120) soluble en agua. Este compuesto fue producido exitosamente por fermentación de *Actinomadura* sp. en presencia de D-serina y D-cicloserina, ambos inhibidores de la enzima alanina racemasa. Actualmente este producto se encuentra en la fase de investigación clínica I para el tratamiento parenteral de infecciones. Se ha postulado que la actividad fungicida de las pradimicinas se debe a la unión de estos productos a la porción sacárida de la manoproteína de la superficie celular fúngica provocando alteraciones en las concentraciones intracelulares de potasio y en consecuencia severas alteraciones morfológicas (Shu *et al.*, 1998).

Kakinuma y colaboradores (1993) propusieron una ruta biosintética para las 5,6-dihidrobenzo[*a*]naftacenoquinona mediante el empleo de cepas mutantes de *A. verrucosospora* subs. *neohibisca* E-40 (productor de pradimicina) y *Actinomadura* sp. AB1236 (productor de benanomicina). La ruta biosintética consiste de siete pasos y se resume en la Figura 8.

Recientemente, se reportó la identificación y clonación del gen para la enzima policétido sintetasa, ésta enzima es esencial en la biosíntesis de la pradimicina A de *A.*

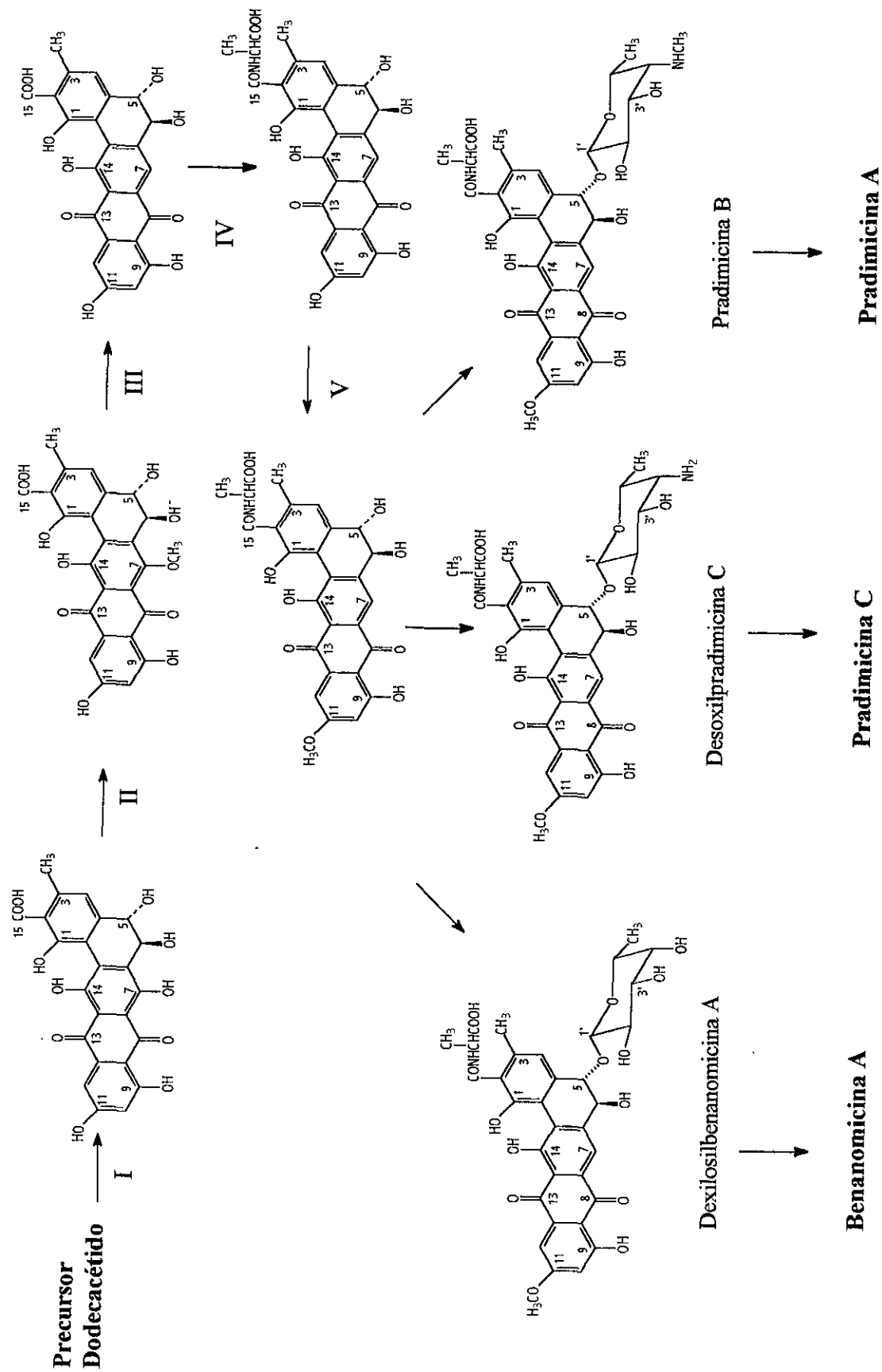


Figura 8. Ruta biosintética propuesta para las pradimicinas y las benanomicinas.

verrucospora. El análisis de la secuencia de un fragmento de 3.5 Kb (*Sal I-Sph I*) del gen demostró que las subunidades de la cetosintetasa tiene una gran similitud (59-89%) con las cetosintetasas involucradas en la biosíntesis de los antibióticos de tipo angucílico (Dairi *et al.*, 1999).

Los antibióticos de tipo polieter son metabolitos de naturaleza policétida que poseen propiedades ionóforicas. La importancia de estos metabolitos radica en su aplicación en la medicina veterinaria como agentes anticoccidia y promotores de crecimiento de aves (Osborne *et al.*, 1982; Ruff, 1982). Los antibióticos de tipo polieter empleados para este fin en Estados Unidos de Norteamérica son la monesina, la lasalocida, la narasina, la salinomicina y la maduramicina (Cuadro 11). Otros se utilizan como herramienta bioquímica para el estudio del transporte de cationes y para la construcción de electrodos selectivos (Suzuki y Tohda, 1993).

Cuadro 11. Agentes anticoccidia empleados en la medicina veterinaria en Estados Unidos de Norteamérica.

Nombre genérico	Nombre comercial	Compañía	Primer año de uso comercial	Dosis (g/t)
Monesina	Coban	Elanco products (Division of Eli Lilly y Co)	1971	99-120
Lasalocida	Avatec	Hoffmann-La Roche, Inc.	1977	75-125
Narasina	Monteban	Elanco products (Division of Eli Lilly y Co)	1981	60-79
Salinomicina	Bio-Cox	Agri-Bio (Division of A.H. Robins)	1982	44-66
Maduramicina	Cygro	American Cyanamid Co.	1985	5.0-6.0

Los microorganismos productores de antibióticos de tipo poliéter pertenecen a los géneros *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Actinomadura* y *Dactylosporangium*. Es interesante notar que aproximadamente la mitad de los antibióticos de tipo poliéter conocidos son producidos por diferentes cepas de las especies *S. hygrosopicus* y *S. albus* (Prosser y Palleroni, 1982). Sin embargo, el género *Actinomadura* biosintetiza un grupo importante de antibióticos de tipo poliéter de interés comercial.

Como puede observarse en el Cuadro 10, la mayoría de los antibióticos de tipo poliéter producidos por las especies del género *Actinomadura* pertenecen al grupo 3 en la clasificación propuesta por Seto y Otake (1982). Este grupo se caracteriza por presentar en su estructura un sistema espirocetal, carbonos de tipo hemiacetal y diversos grupos metoxilo. Algunos de ellos son monoglucósidos como en el caso de los antibióticos CP 47, 433 (194), CP-47.434 (195), la maduramicina (199), la desoxiseptamicina (201) y CP-84, 657 (204) o diglucósidos como los productos UK-58, 852 (202) y CP-82, 996 (203).

Dos productos interesantes desde el punto de vista estructural son los antibióticos CP-54, 883 (200) y SF2487 (206). El producto 200 contiene en su estructura un anillo aromático substituido con átomos de cloro. Por otro lado, el antibiótico 206 posee la particularidad de presentar una unidad de ácido aciltetrónico.

Los antibióticos de tipo poliéter de mayor interés comercial son la maduramicina y la semduramicina. La primera fue descubierta y caracterizada de manera independiente por dos laboratorios farmacéuticos: Hoffmann-La Roche y American Cyanamid. Hoffmann-La Roche lo designó como el antibiótico X-14868 A (Liu *et al.*, 1981), mientras que American Cyanamid acuñó el nombre genérico de maduramicina (Labeda *et al.*, 1983). El microorganismo productor del antibiótico es *A. yumaensis*; clasificado inicialmente como *Nocardia* X-14868.

A la fecha la maduramicina es el antibiótico de tipo poliéter empleado como agente anticoccidia más potente. El antibiótico es efectivo a la dosis de 5 ppm, lo cual resulta ser de 10 a 25 veces más activo que otros antibióticos empleados para este fin (Cuadro 11).

En las dos últimas décadas, la compañía Pfizer ha realizado un intenso trabajo de investigación encaminado a la obtención de antibióticos de tipo poliéter derivados de microorganismos del género *Actinomadura*. En este marco destaca el descubrimiento del antibiótico UK-58, 852 (202). Este producto fue aislado de un cultivo de *A. roseorufa* (ATCC 39697) y presentó actividad anticoccidia contra cinco especies de *Eimeria* a la dosis de 20 ppm (Ruddock *et al.*, 1990). Sin embargo, el producto fue poco tolerado por los animales utilizados en las distintas pruebas.

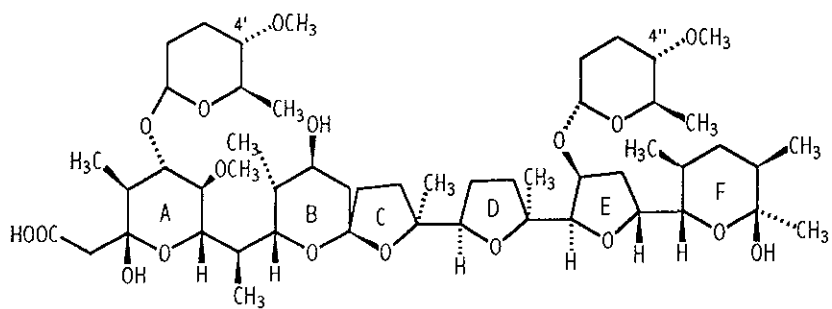
Con la finalidad de incrementar la potencia o el índice terapéutico del antibiótico 202, Glazer y colaboradores (1990) evaluaron la actividad anticoccidia y la tolerancia de diferentes derivados semisintéticos de UK-58,852 (ATCC 39697) en aves. Estos análogos de mayor polaridad se eliminaron con mayor facilidad y fueron mejor tolerados por los animales de prueba. Los resultados arrojados por esta investigación permitieron la obtención de un producto con mejores propiedades farmacológicas; la semduramicina (UK-61,689, 207). En este antibiótico el azúcar del anillo A de UK-58,852 se reemplazó por un grupo hidroxilo (Figura 9). La semduramicina se obtuvo también de manera eficiente mediante la hidrólisis de UK-58,852. Sin embargo, los investigadores estaban interesados en producir semduramicina directamente por fermentación. Para ello Glazer y colaboradores (1990) obtuvieron una mutante de *A. roseorufa* (ATCC 39697) en la cual la enzima glucosiltransferasa responsable de la glucosidación en el anillo A (última etapa en la biosíntesis de la semduramicina) se encontraba bloqueada. La cepa mutante productora de semduramicina se obtuvo en dos pasos. En primer lugar, se logró la obtención de una

mutante parcial que producía semduramicina y UK-58 852 en una relación aproximada de 9:1. La mutación subsecuente de esta cepa (ATCC 53 664) permitió obtener otra mutante capaz de biosintetizar la semduramicina sin la producción del antibiótico UK-58, 852. La semduramicina presentó una actividad anticoccidia comparable a la salinomicina y actualmente este producto se comercializa con el nombre de AVIAX.

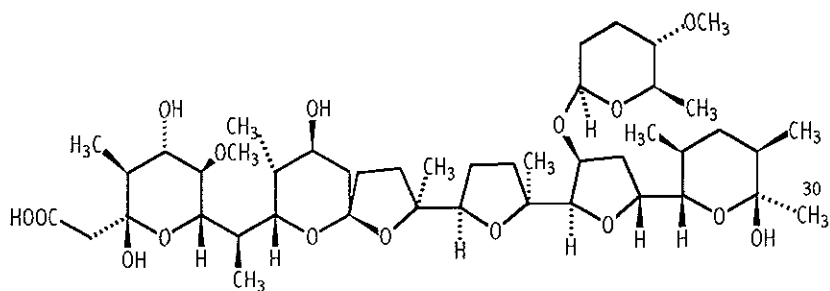
Durante el desarrollo del programa de mutación encaminado a la obtención de la cepa ATCC 53 664 productora de semduramicina, Dirlam y colaboradores (1991; 1992a) lograron la obtención de tres cepas mutantes (ATCC 53869, ATCC 53870 y la cepa 2634-606) de *A. roseorufa* (ATCC 53666) productoras de tres antibióticos de tipo polieter novedosos relacionados a la semduramicina y a UK-58,852. Estos productos fueron denominados CP-91, 243 (208), CP-91, 244 (209) y CP-120, 509 (210) (Figura 9).

En el producto 208 los sustituyentes del azúcar de los anillos A y E en las posiciones 4' y 4" son dos grupos hidroxilo en lugar de los grupos metoxilo de UK-58,852. En el caso del producto 209 el grupo metoxilo en C-4' se encuentra sustituido por un grupo hidroxilo. Por otro lado, el compuesto 210 se diferencia de la semduramicina en que el metilo de la posición 30 se encuentra sustituido por un grupo hidroximetileno. Los antibióticos demostraron actividad anticoccidia contra *Eimeria tenella* a 60 ppm y 25 ppm, respectivamente. Por otro lado CP-120, 509 (210) fue activo contra *Eimeria acervulina* a dosis en el intervalo de 30 y 60 ppm (Dirlam *et al.*, 1991a;b).

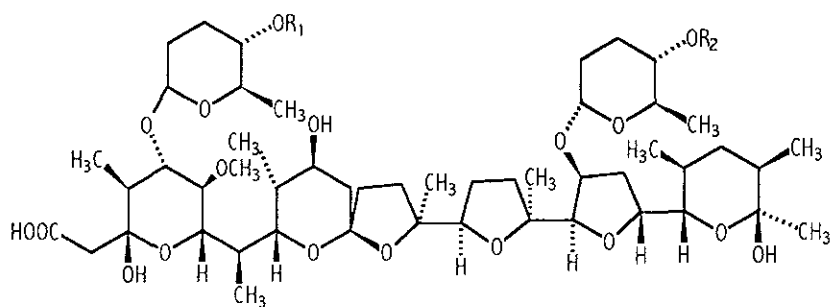
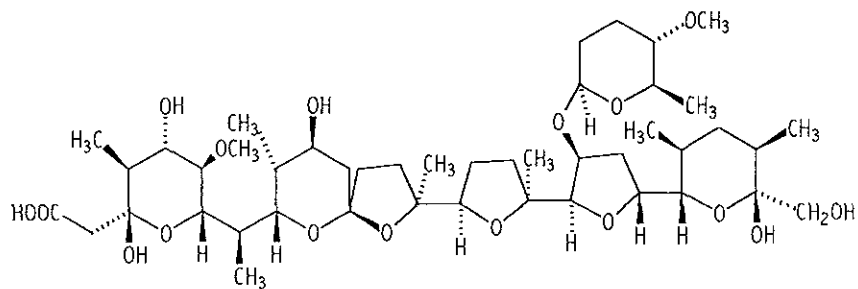
Por último, resulta interesante indicar que algunas especies del género *Actinomadura* han sido empleadas como sistema de biotransformación de productos naturales. Tal es el caso de la biotransformación de compactina (211) a pravastatina (212).



202, UK-58 852



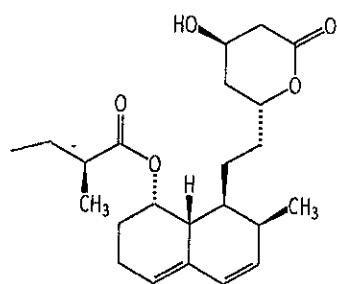
207; semduramicina

208; CP-91, 243; $R_1=R_2=OH$. 209; CP-91, 243; $R_1=OH$, $R_2=OCH_3$ 

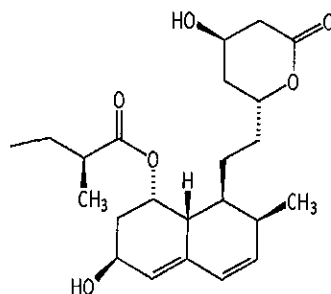
210; CP-120, 509

Figura 9 Antibióticos de tipo poliéter estructuralmente relacionados a la semduramicina.

La compactina (mevastatina) y la pravastatina aisladas de hongos filamentosos son inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril reductasa involucrada en la síntesis del colesterol (Dobs *et al.*, 1991; Jacob *et al.*, 1992). La pravastatina se emplea clínicamente en el tratamiento de la hipercolesterolemia (Shu, 1998). Este producto se obtiene por la hidroxilación de la compactina mediante la inducción de la actividad enzimática de hidroxilasas de origen microbiano. Peng y colaboradores (1997) reportaron la conversión de compactina a pravastatina por *Actinomadura* sp. 2966. El experimento consistió en adicionar a un cultivo de dos días una concentración determinada de compactina y continuar la incubación por uno a siete días. El grado de conversión se determinó calculando el porcentaje de compactina consumida y la cantidad de pravastatina producida. La biotransformación de compactina a pravastatina por *Actinomadura* sp. 2966 no requiere de inducción y es del orden de 65 a 88 % dependiendo de la concentración de la compactina y de la duración del experimento. Los mejores resultados se lograron cuando la compactina se agregaba en forma intermitente.



Compactina (211)



Pravastatina (212)

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Es un hecho bien documentado que las pérdidas de cultivos, como consecuencia de enfermedades y plagas, son cuantiosas y los gastos por el consumo de herbicidas son millonarios. Así por ejemplo, en Estados Unidos se gastan aproximadamente 3.6 billones de dólares en herbicidas (cifra que corresponde al 65% de los pesticidas empleados en ese país). En el caso de México, el volumen de plaguicidas utilizados durante el año de 1995 ascendió a 54,678.96 toneladas, de las cuales una parte sustancial correspondió a los insecticidas (47 %) y herbicidas (29 %) (Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes, AMIPFAC).

Como ya se indicó en la sección de antecedentes la mayoría de los herbicidas empleados para el control de plantas nocivas son de origen sintético y muchos son tóxicos para animales y el hombre. Asimismo, el uso recurrente de estos productos ha ocasionado problemas de contaminación ambiental y el desarrollo de resistencia de especies vegetales nocivas a los herbicidas de uso común. En consecuencia, en los últimos años se ha intensificado el interés por los herbicidas de origen natural ya que en contraste con los sintéticos son de acción más específica, presentan una mayor efectividad y son biodegradables. Esta última característica contribuye a disminuir los problemas de

contaminación ambiental (Okuda, 1992; Tanaka y Omura, 1993; Hedin *et al.*, 1994; Nair, 1994; Duke y Abbas, 1995; Jaya y Dubey, 1999).

En la investigación de los productos naturales con propiedades fitotóxicas los productos de origen microbiano han demostrado una eficacia mucho mayor para el control de plantas nocivas que los de origen vegetal (Hoagland, 1990; Isaac *et al.*, 1992; Porter y Fox, 1993; Tanaka y Omura, 1993; Duke y Abaas, 1995). Una explicación probable de este fenómeno radica en el hecho de que las plantas han desarrollado mecanismos de defensa químicos más efectivos para combatir microorganismos e insectos que para combatir especies vegetales (Duke y Abbas, 1995). Además estas fitotoxinas han demostrado una gran versatilidad en estructura y mecanismo de acción fitotóxica lo que ha permitido el desarrollo de productos con mejores propiedades biológicas. Actualmente, algunos de estos productos microbianos se producen de manera comercial mediante fermentación o síntesis química.

Por otro lado, los avances en la biotecnología han permitido la manipulación genética de microorganismos de interés industrial con la finalidad de mejorar el rendimiento y la calidad de la fermentación así como la biosíntesis de productos más eficaces y potentes. En el caso de compuestos con estructuras químicas complejas, probablemente la única opción viable para su producción es la biosíntesis por fermentación. En este contexto los microorganismos constituyen una fuente renovable de agentes fitotóxicos ofreciendo una alternativa económicamente importante para la obtención de *productos naturales bioactivos*.

Sin embargo, aún con las ventajas que ofrecen los microorganismos como nuevas fuentes productoras de compuestos bioactivos, en México dónde se cuenta con una amplia biodiversidad de microorganismos, incluyendo los actinomicetos, no se han realizado

estudios sistemáticos conducentes a explorar la potencialidad de estos microorganismos como fuentes productoras de metabolitos secundarios de interés medicinal y agroquímico.

En este contexto surgió la presente disertación doctoral, la cual tiene como objetivo principal la búsqueda de productos naturales microbianos con la finalidad de desarrollar nuevos agentes herbicidas biodegradables y de menor toxicidad.

A fin de cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Aislar los actinomicetos provenientes de una muestra de suelo volcánico de la zona de Santa Rosalía, Baja California.
2. Realizar la selección primaria de los microorganismos aislados mediante la determinación del efecto de los actinomicetos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y el efecto de antibiosis sobre *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Cultivar en pequeña escala (500 ml) las especies más activas en el medio de crecimiento apropiado y obtener los extractos orgánicos microbianos derivados del micelio y del caldo de cultivo.
4. Seleccionar los microorganismos productores de metabolitos fitotóxicos mediante la determinación del efecto de los extractos microbianos derivados de las especies preseleccionadas sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas *A. hypochondriacus* y la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca.
5. Cultivar en gran escala las especies seleccionadas y preparar los extractos microbianos correspondientes.

6. Realizar el estudio químico biodirigido de las especies fitotóxicas mediante el empleo de bioensayos de germinación y crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.
7. Evaluar el potencial fitotóxico de los compuestos microbianos mediante la determinación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba incluyendo semillas de especies cultivables y especies vegetales nocivas y sobre las actividades fotosintéticas de síntesis de ATP y de transporte de electrones (basal, desacoplado y fosforilante) en cloroplastos aislados de espinaca.
8. Establecer la estructura molecular de los constituyentes bioactivos mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas, así como métodos químicos, quiroópticos y de difracción de rayos X.
9. Proponer la realización de evaluaciones biológicas secundarias que escapen de los propósitos iniciales de este proyecto.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Aislamiento y mantenimiento de los actinomicetos.

3.1.1. Aislamiento de los actinomicetos.

Los actinomicetos se aislaron de una muestra de suelo recolectada al pie del volcán La Virgen del complejo volcánico Tres Vírgenes, Municipio de Santa Rosalía, Baja California Sur, empleando los métodos microbiológicos tradicionales. Para ello una muestra de suelo (1g) se diluyó 1:100 (p/v) con una solución salina estéril y se agitó en un vortex por tres minutos; posteriormente una alícuota de 0.2 ml de la suspensión resultante se vertió y expandió con una varilla de vidrio estéril sobre una superficie de agar CYC (Cuadro 12). El medio de cultivo inoculado se dejó reposar durante 20 minutos para favorecer la absorción de la suspensión de suelo y se incubó a 29° C durante 14 días. Al cabo de este período se analizaron las placas con la finalidad de identificar las cepas de los actinomicetos (Williams y Wellington, 1982; Brown, 1985; Hunter-Cervera *et al.*, 1986; Labeda y Shearer, 1990; Steele y Stowers, 1991; Horan, 1994).

La purificación de las cepas se realizó mediante agotamiento de asa en el mismo medio de cultivo empleado para el aislamiento. Al final de este proceso se logró el aislamiento de 94 cepas de actinomicetos y a cada una se le asignó una clave.

Cuadro 12. Composición química de los medios de cultivo empleados en los diversos procedimientos microbiológicos.

Medio de cultivo	Composición química	Referencia
CYC	Czapeck Dox liquid medium powder (nitrato de potasio, 2.0g, cloruro de potasio 0.5g, magnesio glicerol fosfato 0.5g, sulfato ferroso 0.01g, sulfato de potasio 0.35g, sacarosa, Oxoid) 30 g. Extracto de levadura (Difco) 2.0 g Casaminoácidos libre de vitaminas (Difco) 6.0 g Agar (Difco) 16 g Cicloheximida (Micostatin Squibb) 50 µg/ml Tetraciclina (Tetrex, Bristol) 45 µg/ml Agua destilada 1000 ml pH final 7.2 (NaOH)	(Hunter-Cervera <i>et al.</i> , 1986).
YM	Extracto de levadura (Difco) 4.0 g Extracto de malta (Difco) 10.0 g Glucosa (Oxoid) 4.0g Agar (Difco) 15.0 g Agua destilada 1000 ml pH final 7.2 (NaOH)	Roland, 1993
Arcamone	Glucosa 20g Levadura de cerveza 12.5g NaCl 2.0g CaCO ₃ 2.0g MgSO ₄ 1.0g ZnSO ₄ 0.01g Fe SO ₄ 0.01g Agua potable 1000 ml pH final de 7 (NaOH)	Arcamone <i>et al.</i> , 1969
Luria-Bertani (LB)	Triptona 10.0g Extracto de levadura 5.0g NaCl 10.0g Agar 15.0g Agua destilada 1000 ml	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

3.1.2. Mantenimiento de los actinomicetos.

Los actinomicetos aislados se mantuvieron viables en el medio de cultivo sólido de YM en tubos de ensayo de 16 × 150 mm. Los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) seleccionados para su estudio químico se liofilizaron empleando la metodología descrita en la literatura (Rudge, 1991). Cada microorganismo se sembró masivamente sobre una superficie de agar YM y se incubó a 29° C durante 7 días.

Al finalizar el período de incubación, la biomasa producida se desprendió con ayuda de una asa microbiológica y se suspendió en 5 ml de leche descremada estéril. Una alícuota (2 ml) de la suspensión resultante se vertió en ampulas de liofilización, las cuales se congelaron a -45° C bajo condiciones de vacío.

Las cepas liofilizadas de los microorganismos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) fueron depositadas en la colección de cultivos microbianos de interés biomédico del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los números de registro para cada una de ellas son BM-B-361, BM-B-366 y BM-B-355, respectivamente.

3.2. Clasificación taxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31).

3.2.1. Clasificación quimiotaxonómica.

La clasificación quimiotaxonómica de los actinomicetos denominados MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) se realizó mediante la identificación de la morfología macro y microscópica, las características fermentativas, el análisis de los hidrolizados de la pared celular de los microorganismos y la realización de pruebas bioquímicas selectas. La metodología empleada se describe con detalle en las referencias bibliográficas pertinentes

(Becker *et al.*, 1964; Shirling y Gottlieb, 1966; Sherman, 1967; Lechevalier, 1968; Bergey, 1994; Murray, 1994; Smithbert y Krieg, 1994).

3.2.2. Identificación de las cepas MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) mediante el análisis de las secuencias del ARN ribosomal 16S.

La identificación de las cepas MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) se llevó a cabo mediante el análisis de las secuencias del ARN ribosomal 16S de los productos de amplificación derivados de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). El producto de RCP obtenido de esta reacción enzimática se clonó en el vector pMOS*Blue* y se transformó *Escherichia coli*. A continuación se extrajo y se purificó el ADN plasmídico de la cepa transformada y se secuenció el inserto de ADNr 16S. Los datos compilados se examinaron para determinar la homología de secuencias del ADNr con las depositadas en las bases de datos del GenBank.

3.2.2.1. Extracción y purificación del ADN de los actinomicetos de estudio.

El ADN cromosomal de los actinomicetos objeto de estudio se aisló de los cultivos puros de acuerdo a los procedimientos descritos por Maniatis y colaboradores (1982), Marmur (1961) y Bickley y Owen (1991).

Un cultivo en YM (25 ml) de tres días para MIV2B(9) y MIV2B(13) o de cinco días para MIV2B(31) se centrifugó a 23 000 rpm durante 30 min a 4° C en una centrífuga Beckman J2-21, rotor de ángulo fijo JA-20. El sedimento celular se lavó y suspendió en TE (TRIS-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0). A la suspensión celular resultante se le adicionaron 25 ml de una solución de NaCl 5M y se incubó a temperatura ambiente (25° C) por 10 min. La suspensión microbiana se centrifugó a 23 000 rpm durante 20 min a 4° C; el

sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 10 ml de una solución TS (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 50mM, pH 8.0). A continuación se adicionaron 50 µl de una solución de SDS (20%, Sigma), se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y de nueva cuenta se centrifugó como se describió anteriormente. Al sedimento resuspendido en 3.5 ml de una solución de TSE [TRIS-HCl 50mM, sacarosa 0.75 M (Baker), EDTA 10 mM, pH 8.0] se le adicionó lisozima cristalina (Sigma) a una concentración final de 5 mg/ml y se incubó a 37° C por 1 hora con agitación ocasional. Al término de la incubación con Lisozima se adicionó 0.5 ml de una solución de Pronasa predigerida (Boheringer Mannheim) (10 mg/ml en una solución de TS). La muestra se homogeneizó en un vórtex a máxima velocidad y se incubó a 37° C durante 1 h. Una vez finalizado el período de incubación, la muestra se calentó a 65° C en un baño de agua y se adicionó una alícuota de 0.25 ml de una solución de SDS (20%). La incubación continuó por 10 min adicionales a 65° C. Después de este tratamiento, el lisado se mantuvo en refrigeración durante toda una noche. La suspensión lisada en refrigeración se clarificó por centrifugación (40 000 rpm) por 1 hora a 4° C. El sedimento se desechó y al sobrenadante se le adicionaron 6 volúmenes de etanol absoluto frío (Baker) mezclando manualmente e incubando exactamente 30 min a 4° C. El lisado se centrifugó a 15 000 rpm por 30 min a 4 °C El sobrenadante se descartó y el sedimento se secó al vacío y se resuspendió en 400 µl de agua destilada estéril. La integridad y calidad del ADN obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (Sigma) y su concentración se determinó mediante espectrofotometría.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

3.2.2.2. Amplificación del ADNr 16S mediante RCP

La amplificación del ADN 16S mediante RCP se llevó a cabo con un *kit* comercial Gibco Life Technologies y un par de *primers* universales para el gen 16 S ARNr (ADNr) (Weisburg, *et al.*, 1991). Las secuencias de los primer universales fueron las siguientes: *Primer* 5'→3' (fD₁): 5'-CCG-AAT-TCG-TCG-ACA-ACA-GAG-TTT-GAT-CCT-GGC-TCA-G-3'. *Primer* 3'→5' (rD₁): 5'-CCC-GGG-ATC-CAA-GCT-TAA-GGA-GGT-GAT-CCA-GCC-3' La reacción de RCP se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.5 ml con 100 µl de la siguiente mezcla de reacción: buffer para RCP 1X (TRIS-HCl 200 mM, pH 8.0, KCl 500 mM) (Gibco-BRL), MgCl₂ 1.5 mM, pH 8.0 (Gibco-BRL), 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Amersham), *AmpliTag* DNA Polimerasa recombinante (2.5 U/100µl) (Gibco-BRL), *primer* rD₁ (1.0 µM), *primer* fD₁ (1.0 µM) y ADN templado a una concentración final de 14 ng/µl. La mezcla de reacción se ajustó a 100 µl con agua destilada estéril y se cubrió con 50 µl de aceite mineral estéril (Baker). El programa de amplificación consistió en un ciclo de 94 °C (3 min), 35 ciclos de 94° C (1 min), 55° C (1 min) y 72° C (2 min) y un ciclo adicional de 72° C (3 min). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador multibloques (Robocycler 40 Statagene). Al término de la reacción de amplificación, una muestra de 10 µl de reacción se analizó mediante electroforesis en gel agarosa 1.5 % (Sambrook *et al.*, 1989). El producto de RCP se purificó siguiendo las especificaciones del *kit* Gene Clean II. (Amersham Pharmacia Biotech.).

3.2.2.3. Clonación del producto de RCP en *Escherichia coli* mediante el vector pMOS, selección de las cepas transformadas y aislamiento del ADN plasmídico.

El producto de RCP puro se clonó en *E. coli* mediante vector pMOS empleando el *kit* pMOS*Blue* Blunt Ended Cloning RP5110 (Amersham Pharmacia Biotech.) El procedimiento consistió en tres pasos principales: la reacción de ligación, la transformación y la identificación de las clonas con inserto.

3.2.2.3.1. Reacción de ligación.

Previa a la reacción de ligación, el producto de RCP purificado se sometió a un proceso denominado reacción pK. Para llevar a cabo dicha reacción se emplearon los componentes incluidos en el *kit* de clonación. Los componentes para esta reacción enzimática fueron: buffer pk 10X (incluido en el *kit*) (1 μ l), DTT 100 mM (0.5 μ l), cóctel enzimático pk (1 μ l), producto de amplificación (2 μ l), agua destilada (6.5 μ l). La mezcla resultante se incubó durante 40 min a 22° C y al término de la incubación se centrifugó 5 min (23 000 rpm a 4° C). El sedimento se desechó y el sobrenadante se incubó 10 min a 75° C. Una vez enfriada la mezcla de reacción se centrifugó (23 000 rpm a 4° C durante 5 min.), el sedimento se desechó y el sobrenadante se empleó para llevar a cabo la reacción de ligación.

Para una reacción de ligación estándar, 50 ng (0.03 pmol) del plásmido pMOS *Blue* Vector se ligó con 0.1 pmol del producto de amplificación (proporción molar aproximada del vector: inserto 1:2.5), en un tubo de 1.5 ml. Cada uno de los componentes empleados en la reacción de ligación se incluye en el *kit*., pMOS *Blue* Vector 50 ng/ μ l (1.0 μ l), producto

de amplificación (0.1 pmol aproximadamente) (2.0 μ l), ligasa ADN T4 (4 Unidades Weiss) (1.0 μ l). La mezcla de reacción se homogeneizó por pipeteo suave y se incubó 2 h a 22°C.

3.2.2.3.2. Transformación.

Una alícuota de 20 μ l de células competentes *E. coli* MosBlue (incluidas en el *kit* de clonación), se descongeló en hielo y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. A estas células se le adicionó 1 μ l de la reacción de ligación y se mezcló por agitación suave. El tubo con las células se incubó 30 min en hielo, se calentó exactamente 40 seg a 42° C en un baño de agua sin agitar, inmediatamente después se transfirió a un baño de hielo donde se mantuvo por 2 min. Al término de este proceso térmico, se agregaron 80 μ l de medio SOC (incluido en el *kit*) a temperatura ambiente, se incubó en agitación a 250 rpm durante 1 hora a 37° C.

Al término de la incubación, una alícuota de 50 μ l de la suspensión de células se sembró en placas de agar-Luria-Bertani (Cuadro12) suplementadas con IPTG (isopropil β -D- tiogalactopiranosido) 40 mM (Boheriger Manheim) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -galactosido) 80 μ g/ml (Boheriger Manheim). Estos compuestos se adicionaron bajo condiciones asépticas una vez que el medio agar-LB fue esterilizado y con una temperatura aproximada de 40° C (Asubel *et al.* 1992). Las cajas se incubaron toda la noche a 37° C.

3.2.2.3.3. Identificación de las clonas con inserto.

Las colonias blancas de *E. coli* resultantes de la transformación se transfirieron a tubos con 3 ml de caldo LB y se incubaron a a 37° C con agitación de 275 rpm durante 12 h. Un ml de cada uno de los cultivos resultantes se mezcló con glicerol (30%, Baker) y se

mantuvo en congelación a -70° C. Una alícuota de 1.5 ml del mismo cultivo se procesó para extraer el ADN plásmidico mediante el método alcalino empleando la metodología descrita en el *kit* High Pure Plasmid Isolation (Boehringer Mannheim).

Para confirmar la presencia de un inserto de aproximadamente 1.5 Kb, una alícuota de cada minipreparación de plásmido fue digerida simultáneamente con las enzimas de restricción *Hha*, *Msp*, *Hind* III y *Sau* 3 A (Gibco-BRL) a 37° C durante 12 horas en reacciones de 20 μ l. La digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% evaluando la presencia de una banda correspondiente al tamaño del plásmido (214 pares de bases) y de una banda de aproximadamente 1.5 Kb correspondiente al tamaño promedio del gen de ARNr 16S amplificado por RCP (Weisburg *et al.* 1991).

3.2.2.4. Secuenciación y alineamiento de la secuencia de ADNr 16S.

La colección de clonas recombinantes obtenidas se secuenció parcialmente para determinar la identidad de los ADNr 16S amplificados por RCP de la muestra de ADN microbiano. A partir de cada clona, se obtuvo una minipreparación de plásmidos recombinantes para ser empleado como molde en una reacción de secuenciación a partir de ADN de doble cadena. Se realizaron cultivos de 12 h en 3 ml de caldo LB. Una alícuota de 1.5 ml de cada cultivo se procesó de acuerdo al protocolo de preparación de templado de doble cadena descrito por Kovalenko y colaboradores (1994). Este protocolo permite la obtención de plásmidos libres de ARN y con un rendimiento promedio de hasta 5 μ g de ADN por 1.5 ml de un cultivo en saturación de *E. coli* portadora del plásmido.

La reacción de secuenciación realizada se basa en el proceso de *Dye Terminator Chemistry*, en el cual las reacciones de extensión de ADN son amplificadas linealmente y el

colorante marcador es incorporado al producto de reacción por la *AmpliTaq* ADN polimerasa. En este caso se emplearon cuatro colorantes fluorescentes distintos como marcadores, en donde un color equivale a cada una de las cuatro bases que forman al ADN. El producto purificado de la reacción de extensión es analizado en un equipo AB 373A Stretch DNA Sequencer, el cual hace uso de una detección electroforética que permite la separación de los productos de ADN marcados por fluorescencia como resultado de la reacción de secuenciación. Para todas las reacciones de secuenciación se empleó el *primer* universal M13/pUC (-40) 5'd(GTTTTCCCAGTCACGAC)3' (Amersham). Como resultado de este análisis se obtuvo una secuencia parcial de 650 bases para cada clona analizada.

Aproximadamente, la tercera parte de cada ADNr 16S fueron empleados para identificar cada filotipo único. Todas las secuencias únicas fueron analizadas en la base de datos nucleotídica no redundante del GenBank empleando el programa BLAST, disponible en la página principal de Internet del National Center for Biotechnological Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para corroborar su naturaleza como secuencia de ADNr 16S y su identidad. Las secuencias se alinearon con secuencias de referencia obtenidas del GenBank correspondientes a organismos reportados como blanco para la amplificación de ADNr 16S empleando el par de *primers* fD1+rD1 (Weisburg, *et al.* 1991). Se realizó un alineamiento empleando 650 nucleótidos de las secuencias de las clonas de los actinomicetos obtenidas junto con secuencias referencia en el programa CLUSTAL W 1.6 (Thompson *et al.* 1994). Los parámetros de alineamiento empleados fueron los presentados por el programa para un análisis de secuencias estándar.

3.2.2.5. Construcción del árbol filogenético.

Con el resultado obtenido del alineamiento se calculó una matriz de distancia de la tasa de sustitución de nucleótidos con el algoritmo de Jukes & Cantor (1969) empleando el programa DNADIST del paquete computacional para análisis filogenéticos PHYLIP V 3.5c (Phylogenetic Inference Package, Felsenstein, 1989).

El árbol filogenético se construyó por el método de “unión de vecinos” (neighbor-joining) empleando el programa NEIGHBOR del paquete PHYLIP V. 3.5c (Felsenstein, 1989). El programa NEIGHBOR construye un árbol por agrupamiento (*clustering*) sucesivo de linajes, colocando la longitud de las ramas como la unión de linajes.

Finalmente, todas las secuencias únicas fueron analizadas en el programa CHECK_CHIMERA de la Base de datos del Proyecto Ribosomal en la página principal de Internet del Ribosomal Database Project, RDP (<http://rdp.life.uiuc.edu/RDP>, Maidak *et al.* 1994), para detectar la presencia de posibles artefactos quiméricos resultantes de la amplificación por RCP.

3.3 Ensayos biológicos.

3.3.1. Ensayos de preselección.

Para la selección primaria de los actinomicetos de interés, las 94 cepas aisladas se evaluaron con la finalidad de determinar su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*. De manera adicional se determinó el efecto de antibiosis sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados derivados de estas evaluaciones permitieron seleccionar a los microorganismos que se cultivaron en pequeña escala para realizar las evaluaciones biológicas de selección.

3.3.1.1. Determinación del efecto de los actinomicetos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*.

Cada uno de los microorganismos aislados se sembró por estría sobre una placa de agar CYC sin antibióticos y se incubó a 29° C durante siete días. Al cabo del período de incubación, momento en el cual los actinomicetos se han desarrollado, se colocaron alrededor del crecimiento microbiano tres filas de 10 semillas de *A. hypochondriacus* desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio (1% v/v). En todos los casos, se realizaron los controles correspondientes (positivo y control de crecimiento) empleando el mismo procedimiento descrito con anterioridad. En el caso del control positivo, se colocó en lugar del actinomiceto a evaluar una tira de 3 x 0.5 cm de papel filtro impregnada con una solución de 2,4-D (2,4-Diclorofenoxiacético, 5µg/ml). Para el caso del control de crecimiento sólo se colocaron en las placas las semillas de prueba. De nueva cuenta cada una de las placas se incubó a 29° C en una cámara húmeda durante 24 horas adicionales para favorecer el desarrollo *A. hypochondriacus* (De Frank y Putnam, 1985; Mallik, 1997).

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron de manera cualitativa comparando el desarrollo de *A. hypochondriacus* en las placas que contenían los microorganismos de prueba con respecto a las del control de crecimiento. Los microorganismos que inhibieron en mayor grado el desarrollo de *A. hypochondriacus* se identificaron con tres cruces y las de menor efecto con una.

3.3.1.2. Determinación del efecto de antibiosis de los actinomicetos de prueba sobre *Saccharomyces cerevisiae*.

El microorganismo de prueba se sembró por picadura en placas de agar YM y se incubó a 29° C durante siete días. Al cabo del período de incubación se aplicó por aspersion una suspensión (A 0.5) de un cultivo de 12 h de *S. cerevisiae*. Posteriormente, las placas se incubaron a 29° C durante 24 h adicionales para favorecer el desarrollo de la levadura. Al cabo de este tiempo, se investigó la presencia de halos de inhibición alrededor del desarrollo del actinomiceto de prueba. El control de crecimiento de la levadura se realizó de la misma manera descrita con anterioridad sin sembrar al microorganismo de prueba y el control positivo consistió en discos de papel filtro (diámetro 0.5 mm) impregnados con una solución de nistatina (40 µg/ml). Los resultados se registraron mediante el promedio de los halos de inhibición de tres determinaciones.

3.3.2. Ensayos de selección.

Los ensayos de selección consistieron en evaluar la actividad biológica de los extractos orgánicos derivados del cultivo en pequeña escala de los microorganismos que resultaron activos en el ensayo de preselección. Las evaluaciones biológicas utilizadas fueron la determinación del efecto de los extractos microbianos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*, así como la valoración del efecto sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca.

3.3.2.1. Evaluación del efecto de los extractos microbianos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.

La evaluación del efecto de los extractos derivados del cultivo en pequeña escala de los microorganismos que resultaron activos en el ensayo de preselección sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* se realizó empleando la metodología que se describe en el punto 3.3.3.1. Cabe destacar que este bioensayo se usó a lo largo de todo el estudio para realizar la evaluación de las fracciones primarias y compuestos puros.

3.3.2.2. Evaluación del efecto de los extractos microbianos sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca.

La metodología empleada para la evaluación del efecto de los extractos derivados del cultivo en pequeña escala de los microorganismos que resultaron activos en el ensayo de preselección sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca se describe con detalle en el punto 3.3.3.2.

3.3.3. Evaluación del potencial fitotóxico de extractos, fracciones cromatográficas y compuestos puros.

3.3.3.1. Determinación del efecto de extractos, fracciones cromatográficas y compuestos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba.

La actividad inhibidora del crecimiento vegetal de los extractos microbianos, fracciones cromatográficas y compuestos puros se determinó mediante el empleo de los bioensayos de la germinación y crecimiento radicular sobre las semillas de *Amaranthus*

hipochondriacus, *Echinochloa crus-galli*, *Trifolium alexandrinum*, *Triticum vulgare* y *Phaseolus aureus* de acuerdo a los procedimientos descritos en la literatura (Anaya, 1991; Pereda-Miranda *et al*, 1993).

Los bioensayos se realizaron en cajas Petri de 6 cm de diámetro con cuatro réplicas por tratamiento. Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en el disolvente apropiado y se prepararon soluciones de diferentes concentraciones (500, 50 y 5 $\mu\text{g/ml}$), 1 ml de cada una de las soluciones resultantes se vertió en cajas Petri sobre un disco de papel filtro (Whatman N 1) y el disolvente se evaporó mediante una corriente de aire. Posteriormente, se colocaron doce semillas de la especie de prueba, humedeciendo el papel filtro con 3 ml de agua destilada. Se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, SIGMA) como un control positivo. El mismo protocolo se utilizó para los controles negativos que contenían únicamente disolvente. Las cajas de Petri se mantuvieron en la obscuridad a 29° C. La actividad fitotóxica se registró calculando el porcentaje de inhibición y midiendo la longitud de las raíces después de 24 h para *A. hipochondriacus*, 48 h para *E. crusgalli*, 72 h para *T. alexandrinum* y *T. vulgare* y 96 h para *P. aureus*. Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA ($p \leq 0.5$). Los valores de CI_{50} se determinaron mediante el análisis de probabilidad de Finney.

3.3.3.2. Evaluación del potencial fitotóxico de las fracciones cromatográficas mediante bioautografía.

La bioautografía se realizó en placas de vidrio (20 × 2.5 cm) recubiertas con gel de sílice 60 (gránulos de 0.63-0.2 mm, 230 mesh ASTM, Merck). La muestra a evaluar (2 mg) se disolvió en la mínima cantidad del disolvente apropiado y se aplicó sobre la superficie de

la cromatoplaaca empleando los métodos convencionales para la cromatografía en capa fina. Las placas sembradas con las muestras de prueba fueron eluidas utilizando en cada caso un sistema de elución adecuado. Al cabo de la elución, el disolvente se evaporó mediante una corriente de aire y se vertió sobre la placa desarrollada 15 ml de agar bacteriológico al 1% (DIFCO) a una temperatura de aproximadamente 30° C. Una vez solidificada la capa de agar se colocaron las semillas de *A. hypochondriacus* sobre toda la superficie de la cromatoplaaca. Las cromatoplaacas se incubaron en la obscuridad a 28° C en una cámara húmeda y la actividad fitotóxica se registró detectando las zonas de inhibición de la germinación o del crecimiento radicular comparadas con el control después de 24 horas de incubación. El mismo protocolo se utilizó para el control de crecimiento que contenía únicamente el disolvente de elución.

Para correlacionar las zonas de inhibición observadas con el factor de retención (rf) de cada uno de los constituyentes de la fracción cromatográfica objeto de evaluación, se utilizó un cromatograma obtenido bajo las mismas condiciones experimentales aplicadas a la placa cubierta con agar. Este se generó mediante el empleo del agente cromógeno adecuado para cada caso (Cuadro 16).

3.3.3.3. Determinación del efecto de los compuestos puros sobre algunas actividades fotosintéticas asociadas con la fase luminosa.

3.3.3.3.1. Aislamiento de los cloroplastos y cuantificación de la clorofila

Los cloroplastos se obtuvieron a partir de 30 g de hojas de espinacas frescas (*Spinacea oleracea* L.) verdes y turgentes. Todo el proceso de aislamiento se llevó a cabo en frío y obscuridad. Las hojas se lavaron con suficiente agua destilada para eliminar la tierra, se removió la nervadura central y el ápice. Posteriormente, se fragmentaron y

colocaron en el vaso de una licuadora previamente enfriado, conteniendo 150 ml del medio para aislar cloroplastos (sacarosa 400 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 20 mM y tricina 30 mM, ajustando a pH 8.0 con KOH). A continuación, se homogeneizaron en la licuadora (Osterizer, modelo L-21) durante 5 segundos intermitentes a velocidad máxima. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4° C (centrífuga Beckman J2-21, rotor de ángulo fijo JA-20). Por último, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 1 ml del medio de aislamiento (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Peña-Valdivia *et al.*, 1991).

La clorofila se cuantificó de acuerdo al método Strain y colaboradores (1971) como se describe a continuación: se transfirió una alícuota de 50 µl de la suspensión de cloroplastos a un matraz de 5 ml y luego se aforó con acetona al 80%. Esta suspensión se mantuvo en la obscuridad con la finalidad de extraer y disolver la clorofila, así como para evitar su degradación por la luz. Transcurrido este tiempo, la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm, con la finalidad de sedimentar las proteínas y otros residuos precipitados de los cloroplastos. Posteriormente, se cuantificó el contenido de clorofila mediante la determinación de la absorbancia a 663 y 645 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650). La concentración de la clorofila se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$[\text{Clorofila}] = 8.05 A_{663} + 20.29 A_{645}$$

$$[\text{Clorofila}] \mu\text{g clorofila ml}^{-1}$$

A: lectura de absorbancia de las muestras

8.05 y 20.29: coeficientes de extinción.

3.3.3.3.2. Determinación del efecto de los extractos y compuestos puros sobre la síntesis de ATP y la captación de protones.

La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre 8.0 y 8.1, para lo cual se utilizó un microelectrodo combinado (Orion) conectado a un potenciómetro (Corning Modelo 12) con escala expandida. El voltaje generado por los cambios de pH se transdujo en un registrador gráfico Gilson.

Para llevar a cabo la determinación, a 3 ml del medio de reacción (sorbitol 100 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, tricina 1mM y MV 50 μM, ajustado a pH 8 con KOH) se le adicionó ADP 1 mM, K₂HPO₄ 3 mM y el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 500 μM. Los extractos se evaluaron a la concentración de 500 μg/ml utilizando una concentración de cloroplastos equivalente a 60 μg de clorofila.

El cambio de pH en el medio de reacción se determinó después de un período de *iluminación de 1 minuto*. Como fuente de iluminación se empleó una lámpara de proyector de 250 watts. El haz luminoso se hizo pasar a través de una solución de CuSO₄ · 5 H₂O al 2% que sirve como filtro de luz y calor (lente de Izawa). El gradiente de protones producido se cuantificó por titulación, lo cual se realizó mediante la adición de 10 μl de una disolución estándar de KOH 0.07 N al medio de reacción, en presencia de cloroplastos sin iluminar (Peña-Valdivia *et al.*, 1991).

La velocidad de síntesis de ATP se calculó de la siguiente manera:

$$V=AH/C$$

V= Velocidad de la síntesis de ATP (μMol. de ATP mg⁻¹ Clorofila hr⁻¹).

A= μ Mol de H⁺ usados en la titulación / altura de la curva en cm.

H= Altura de la curva obtenida en cm en un minuto de iluminación.

C= Concentración de la clorofila empleada.

La captación de protones se realizó empleando la misma metodología excepto la adición de ADP y K_2HPO_4 . La velocidad de captación de protones se calculó de la siguiente manera:

$$0.07 \mu\text{equiv de KOH}/X_t \cdot 60 \text{ min/hr} \cdot 1/0.06 \text{ mg de clorofila, donde}$$

X_t = μequiv de protones consumidos en la reacción (altura de la curva obtenida en cm al adicional 10 μl de KOH 0.07 N).

3.3.3.3.3. Determinación del efecto de los compuestos puros sobre el transporte de electrones no cíclico en condiciones basal, fosforilante y desacoplado

La determinación del transporte de electrones se midió en tres condiciones diferentes (basal, fosforilante y desacoplado) y se evaluó indirectamente al monitorear la producción de oxígeno que se libera durante la fotólisis del agua con un oxímetro YSI y un electrodo Clark; en este electrodo de platino, el oxígeno se reduce agua. Si el electrodo de platino mantiene un voltaje de 0.7 V negativo respecto al de referencia (Ag/AgCl), circulará una corriente eléctrica directamente proporcional a la concentración de oxígeno que se libera o consume en la disolución. Entonces, la captación de oxígeno se considera como un parámetro para determinar el transporte de electrones total en la cadena redox, cuando se emplea el metilviológeno como aceptor final de electrones.

Para llevar a cabo la determinación del transporte de electrones basal, a 3 ml del medio de transporte de electrones (sacarosa 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, tricina 15 mM y metilviológeno 50 μM), se adicionaron de manera individual los compuestos de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 500 μM y la cantidad equivalente a 60 μg de

clorofila. La mezcla resultante se agitó y se iluminó empleando una lámpara de proyector de 150 wats, como se indicó previamente.

La determinación de los transporte de electrones fosforilante y desacoplado se llevó a cabo de manera similar al basal, con la diferencia de que en estos casos se adicionó ADP 1mM y K_2HPO_4 3mM en el primer transporte y NH_4Cl 3 mM (agente desacoplante) en el segundo de ellos.

En todos los casos, los controles se realizaron al inicio y al final de cada experimento. Estos consistieron en la mezcla de reacción mencionada para cada experimento sin la adición del compuesto a ensayar. La velocidad obtenida se comparó con la velocidad del control (Izawa, 1977; Trebs, 1983; Dilley, 1972) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$V = (0.4 \mu\text{eq de } K_3[Fe(CN)_6] / X_t \cdot X_p / 1 \text{ min } 60 \text{ min/hr} \cdot 1/0.060 \text{ mg de clorofila})$, donde: V: velocidad del flujo de electrones en $\mu\text{eq e}^- \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de clorofila.

X_p : pendiente obtenida de los trazos problemas

X_t : altura de la curva obtenida en cm al consumirse 0.4 $\mu\text{equiv de } K_3[Fe(CN)_6]$ al minuto de iluminación.

3.3.3.3.4. Determinación del efecto de los compuestos puros sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa.

La actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Mills y colaboradores (1980). Los cloroplastos se aislaron tal y como se indicó en el inciso 3.3.3.3.1., con la diferencia de que el sedimento obtenido se lavó con 2.0 ml del medio de aislamiento y se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 min. Posteriormente, se

reconstituyó con 1 ml del medio de resuspensión (sorbitol 0.35 mM, EDTA 2mM, MgCl₂ 1 mM y tricina a pH 7.6).

a) Activación de la enzima Mg²⁺-ATPasa.

A 0.1 ml de la suspensión de cloroplastos conteniendo 0.3 mg de clorofila por ml se adicionaron 0.25 ml del medio de activación (sorbitol 1.2 M, tricina 100 mM y 1500 unidades de catalasa, ajustando el pH a 8.0). Posteriormente, la mezcla de reacción se iluminó durante 90 segundos con un haz luminoso filtrado a través de un lente de Izawa y con agitación suave.

b) Hidrólisis de ATP y Cuantificación de fosfatos

Se mezclaron 0.1 ml de cloroplastos activados con 0.9 ml del medio de activación (MgCl₂ y tricina 15 mM, ajustando a pH 8.0). La hidrólisis de ATP se realizó en la obscuridad y con agitación suave durante 1 min. La reacción se suspendió al adicionar 500 µl de ácido tricloroacético al 20% en agua (p/v).

Las proteínas precipitadas con ácido tricloroacético se eliminaron por centrifugación durante 5 minutos a 200 rpm en una centrifuga clínica (modelo CL). El sobrenadante se utilizó para la determinación del fosfato liberado el cual se cuantificó por un método colorimétrico como se describe a continuación (Sumner, 1974):

A 1 ml del sobrenadante se adicionó 250 µl de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O al 6% (p/v), 250 µl de H₂SO₄ 7.5 N y 300 µl de agua destilada. La mezcla resultante se agitó y de inmediato se adicionaron 200 µl de una disolución de FeSO₄ al 10% (p/v en agua acidulada; H₂SO₄ 7.5N). La mezcla anterior se dejó en reposo durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman (modelo DU 650). Simultáneamente, se realizó una curva patrón con KH₂PO₄

empleando un rango de concentraciones de 0.5 μM a 1 μM , los datos de absorbancia a 660 nm se graficaron utilizando concentraciones crecientes de KH_2PO_4 y de esta curva se extrapolaron los valores de absorbancia del fosfato liberado al llevarse a cabo la hidrólisis de ATP.

3.3.3.4. Determinación del efecto del ácido fenilacético (220) y su derivado metilado (221) sobre el consumo de oxígeno en el proceso de germinación.

Para la determinación del efecto del ácido fenilacético (220) y su derivado metilado (221) sobre el consumo de oxígeno en el proceso de germinación se empleó un electrodo de Clark tipo- O_2 conectado a un oxímetro YSI (Modelo 5300). Las semillas de prueba fueron *Triticum vulgare*, *Trifolium alexandrinum*, *Physalis ixocarpa*, *Amaranthus hypochondriacus* y *Lolium multiflorum*. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, por triplicado y para cada semilla se realizó un control negativo.

Las semillas de prueba se desinfectaron usando una solución de hipoclorito de sodio (1%) durante 2 min, seguido de dos lavados con agua destilada. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de imbibición, el cual consistió en colocar las 300 semillas en cada caja de Petri (10 cm de diámetro), las cuales contenían discos de papel filtro humedecidos con agua destilada (5.0 ml). Transcurridos 30 min, se adicionaron a las cajas de Petri los compuestos objeto de estudio previamente disueltos en DMSO, en una concentración de 100 μM . Cada una de las cajas se sellaron con parafilm y se colocaron en una incubadora Fisher Scientific Modelo 750D a 30° C, en la oscuridad durante 24, 48 y 72 h.

En cada uno de los intervalos de tiempo de incubación y una vez calibrado el oxímetro se transfirió el contenido de cada una de las cajas de Petri a la celda y se

determinó la velocidad de consumo de oxígeno. El 100% de consumo de oxígeno en el control negativo corresponde a 1200 η átomos de oxígeno. La respiración de las semillas en presencia de los compuestos de prueba se calculó con respecto al control negativo el cual equivale al 100% de la respiración de cada semilla. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa de ANOVA ($p < 0.05$).

3.3.3.5. Evaluación del efecto de la maduramicina (199) sobre el crecimiento vegetal.

Para realizar este bioensayo se emplearon cuatro especies *Echinochloa crusgalli*, *Trifolium alexandrinum*, *Triticum vulgare* y *Phaseolus aureus*.

Seis semillas de cada especie se colocaron en recipientes conteniendo tierra de cultivo estéril. Las plantas se desarrollaron durante tres semanas en una cámara de crecimiento a 28° C y un ciclo de 12 h luz-obscuridad de ($236 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$). Transcurrido este tiempo, se trasladaron a una segunda cámara para completar su ciclo de crecimiento. Las condiciones de temperatura y fotoperíodo fueron 17-20° C y 16x8 (5:30x21:30), respectivamente.

El tratamiento de las especies vegetales consistió en la aplicación foliar de una solución (4×10^{-4} M) de maduramicina y Tween 80 (0.1 ml/l). La solución del antibiótico se aplicó de la punta a la base de la hoja empleando cotonetes de algodón. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado durante un mes de tratamiento y se emplearon Tween 80 (0.1 ml/l) y agua como controles negativos para cada caso. Como control positivo se utilizó el paraquat (10^{-4} M).

Para determinar la producción de biomasa, las plántulas se removieron de la tierra y las raíces se lavaron con agua destilada hasta eliminar por completo los residuos de tierra;

una vez lavadas se procedió a determinar el peso fresco y la longitud de cada una de las plántulas. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición con respecto al control de crecimiento. Todos los experimentos se basaron en un diseño aleatorio con estructura factorial. Los datos de elongación de la plántula y peso fresco se analizaron mediante ANOVA (Picman, 1986; Chen y Leather, 1990; Chen y Polatnick, 1991; Hoagland, 1996).

3.3.4. Otros ensayos biológicos.

3.3.4.1. Determinación de la toxicidad para *Artemia salina* Leach.

Los diferentes extractos, fracciones o compuestos puros se evaluaron utilizando el ensayo de toxicidad para *A. salina* de acuerdo a la metodología descrita por Anderson y colaboradores (1991). Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente forma: 20 mg de extracto fracción o compuesto puro objeto de evaluación se disolvieron en 2 ml del disolvente apropiado. De la solución resultante se transfirieron 5, 50 y 500 μl a tres viales y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío. Cada concentración se ensayó por triplicado.

Después de incubar los huevecillos de *A. salina* en un medio salino artificial durante 48 h. se transfirieron 10 crustáceos a cada uno de los frascos que contienen las muestras a evaluar y se aforó a 5 ml con medio salino artificial, para obtener así 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. De manera adicional, se realizaron diluciones subsecuentes para obtener concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$.

Los frascos se mantienen con iluminación artificial durante 24 horas, transcurrido este tiempo se procede a contar el número de crustáceos sobrevivientes. Para el cálculo de

la concentración letal media (CL_{50}) se utiliza el programa de análisis de probabilidad de Finney (Anderson *et al.*, 1991).

3.3.4.2. Determinación de la actividad citotóxica sobre diversas líneas celulares.

Las evaluaciones de citotoxicidad contra las líneas celulares HT-29 (adenocarcinoma de colon), MCF-7 (carcinoma de pecho) y A-549 (carcinoma de pulmón) se realizaron de acuerdo con los procedimientos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos (EU.UU.) en el "Purdue Cancer Center", Universidad Purdue, Indiana, EU.UU. Las evaluaciones de citotoxicidad contra las líneas celulares BC₁ (Carcinoma mamario), Lu₁ (Carcinoma de pulmón), Col₂ (Carcinoma de colon), KB (Carcinoma nasofaríngeo), KB-V (+VLB) y KB-V(-VLB) (Carcinoma nasofaríngeo resistente a vinblastina) y CNCap (Cáncer de próstata humano) se realizaron en el Departamento de Química Medicinal y Farmacognosia de la Universidad de Illinois, Chicago, E.U.A. Como control positivo se utilizó adriamicina y los resultados se expresaron en términos de concentración efectiva media (CE_{50}).

3.4. Cultivo en medio líquido de los actinomicetos activos.

Los microorganismos cultivados en pequeña escala fueron los designados con las claves MIV2B(1), MIV2B(8), MIV2B(9), MIV2B(13), MIV2B(25) y MIV2B(31) y que resultaron activos en el ensayo de preselección. Los cultivos resultantes se emplearon para la preparación de los extractos orgánicos en pequeña escala requeridos para su evaluación biológica

Los microorganismos que demostraron una mayor actividad biológica en los ensayos de selección se cultivaron en mediana escala. Las claves designadas de estos microorganismos fueron MIV2B(9) (3.6 l), MIV2B(13) (10 l) y MIV2B(31) (10 l). El cultivo en mediana escala se realizó con la finalidad de producir la biomasa necesaria para la preparación de los extractos orgánicos de los actinomicetos que resultaron más activos en los ensayos de selección.

3.4.1. Cultivo en pequeña escala.

3.4.1.1. Preparación del inóculo.

El inóculo empleado para efectuar el cultivo en pequeña escala se preparó sembrando una colonia pura de un cultivo fresco en medio sólido (YM) en un matraz Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 25 ml del medio de YM. El medio líquido inoculado se incubó a 29° C con agitación de 190 rpm durante 72 h.

3.4.1.2. Proceso de fermentación.

El cultivo en pequeña escala (600 ml) se realizó en matraces Fernbach de 2 l conteniendo 600 ml del medio de Arcamone (Cuadro 12) y 2 ml del inóculo correspondiente. Los matraces se incubaron a 29° C con agitación de 160 rpm durante 7 días. En el Cuadro 13 se resumen las características de cultivo en medio líquido de cada uno de los microorganismos.

Cuadro 13. Características del cultivo en medio líquido de los actinomicetos que resultaron activos en el ensayo de preselección.

Actinomiceto	Características del cultivo en medio líquido ^a	pH al final de la fermentación	Peso de la biomasa generada ^b (g)
MIV2B(1)	El microorganismo forma pellets y el medio de cultivo se observa de un color café translucido.	8.10	3.59
MIV2A(4)	El microorganismo crece en forma dispersa. El medio de cultivo se observa de un color café oscuro.	8.13	4.26
MIV2B(8)	El microorganismo crece en forma dispersa y abundante. El medio de cultivo se observa de un color café claro	8.35	3.89
MIV2B(9)	El microorganismo crece en forma dispersa. El medio de cultivo se observa de un color café oscuro.	8.13	4.44
MIV2B(13)	El microorganismo forma pellets y produce un pigmento amarillo a las 48 h de cultivo.	8.08	4.99
MIV2B(25)	El microorganismo crece en forma dispersa. El medio de cultivo se observa amarillento y de un olor muy desagradable.	8.23	3.39
MIV2B(31)	El microorganismo forma pellets pequeños, produce un pigmento café claro, el medio de cultivo se observa translúcido.	7.54	6.85

^a Características observadas a los 7 días de cultivo en el medio de Arcamone (29° C a 160 rpm)

^b Peso de la biomasa liofilizada

3.4.2. Cultivo en mediana escala.

3.4.2.1. Preparación del inóculo.

El inóculo utilizado para realizar el cultivo en mediana escala se preparó sembrando una colonia aislada de un cultivo fresco en medio sólido (YM) en un matraz Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 25 ml del medio de YM. El medio líquido inoculado se incubó a 29° C con agitación de 190 rpm, durante 72 h. El cultivo resultante se utilizó como preinóculo. Posteriormente 5 ml del preinóculo se sembraron en 100 ml del medio de Arcamone contenidos en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Estos matraces se incubaron a 29° C con agitación de 190 rpm durante 72 h. Cinco matraces cultivados en estas condiciones se emplearon como inóculo del cultivo en mediana escala.

3.4.2.2. Proceso de fermentación.

El cultivo en mediana escala de los microorganismos MIV2B(13) y MIV2B(31) se llevó a cabo en jarras de fermentación de 14 l conteniendo 10 l del medio industrial de Arcamone. Estas jarras se inocularon con 500 ml del inóculo correspondiente. El proceso de fermentación se efectuó a 29° C en un fermentador (Drive Assembly, New Brunswick Scientific) con agitación mediante propelas de 250 rpm y con aireación de 8-10 l/min durante siete días. El microorganismo MIV2B(9) se cultivó en mediana escala en matraces Ferbach de 2 litros conteniendo cada uno 600 ml del medio de Arcamone y 2 ml del inóculo. Los matraces se incubaron a 29° C con agitación de 160 rpm durante 7 días. Al cabo del período de incubación se reunió el contenido de los seis matraces para obtener 3.6 l del cultivo.

3.5. Preparación de los extractos orgánicos derivados del cultivo de los actinomicetos activos.

Los extractos orgánicos derivados del cultivo en pequeña escala se prepararon con el objeto de evaluar su actividad biológica mediante la realización de los ensayos de selección. Por otro lado, los extractos derivados del cultivo en mediana escala se prepararon con la finalidad de obtener una cantidad suficiente del extracto crudo para realizar los estudios químico conducentes al aislamiento y caracterización de los productos bioactivos.

Los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala se prepararon a partir del caldo de cultivo y del micelio generado durante el proceso de fermentación. La metodología empleada para la extracción se describe a continuación.

3.5.1. Preparación de los extractos orgánicos microbianos en pequeña escala.

Una vez finalizado el proceso de fermentación de los microorganismos preseleccionados, el caldo de cultivo y el micelio se separaron mediante centrifugación (centrífuga Beckman J2-21, rotor de ángulo fijo JA-20) a 10 000 rpm durante 10 min.

El extracto del caldo se preparó mediante sucesivas particiones con acetato de etilo. Por otro lado, el micelio liofilizado se extrajo mediante un proceso de maceración con una mezcla de diclorometano-metanol 1:1. (Abbas *et al.*, 1991; Lange *et al.*, 1993; Yabrough *et al.*, 1993). Los extractos se concentraron y los residuos se secaron al vacío. En el Cuadro 14 se indican los rendimientos de los extractos del caldo y el micelio de cada uno de los microorganismos cultivados en pequeña escala

Cuadro 14. Rendimiento de los extractos del caldo y el micelio derivados del cultivo en pequeña escala.

Microorganismo	Rendimiento ^a	
	Extracto del caldo	Extracto del micelio
MIV2B(1)	71.0 mg	267.5 mg
MIV2A(4)	71.0 mg	368.8 mg
MIV2B(8)	76.0 mg	392.5 mg
MIV2B(9)	100.0 mg	211.0 mg
MIV2B(13)	263.0 mg	931.0 mg
MIV2B(25)	80.0 mg	224.2 mg
MIV2B(31)	664.0 mg	1190.0 mg

^a Rendimiento de un cultivo de 600 ml.

3.5.2. Preparación de los extractos orgánicos microbianos en mediana escala.

Una vez concluido el proceso de fermentación, en todos los casos el caldo se separó del micelio mediante centrifugación del cultivo en una centrífuga (REMSA, Reliance de México, RPM 35) con tres fases de servicio continuo.

Los extractos del caldo y micelio se prepararon realizando el mismo procedimiento descrito en el inciso 3.5.1. empleando en cada extracción un volumen de disolvente igual a la cantidad de caldo de cultivo o micelio a extraer. En el Cuadro 15 se presentan los rendimientos de los extractos derivados del cultivo en mediana escala.

Cuadro 15. Producción de los extractos del caldo y el micelio derivados del cultivo en mediana escala.

Microorganismo	Volumen de cultivo	Rendimiento	
		Extracto del caldo	Extracto del micelio
MIV2B(9)	3.6 l	413 mg	387 mg
MIV2B(13)	10.0 l	9.6916 g	9.3952 g
MIV2B(31)	10.0 l	6.3016	1.9013

3.6. Estudio químico de los extractos derivados del cultivo de las especies MIV2B(9) MIV2B(13) y MIV2B(31).

3.6.1. Procedimientos generales de análisis.

3.6.1.1. Métodos cromatográficos.

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó en soporte de vidrio empacados con gel de sílice 60 Merck (gránulos de 0.63-0.2 mm, 230 mesh ASTM).

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio o cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice 60F₂₅₄ (20 × 20, 0.2 mm de espesor; Merck), varios eluyentes y los agentes reveladores que se indican en el Cuadro 16. Esta técnica permitió monitorear el desarrollo de las cromatografías en columna abierta, realizar purificaciones a nivel preparativo, verificar el desarrollo de las reacciones químicas efectuadas y comprobar la pureza de los productos obtenidos.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se llevó a cabo utilizando un sistema cromatográfico (Waters, Millipore Corp., Chromatography Division Milford MA, EU.UU) integrado por una bomba modelo 600 y un detector de luz ultravioleta de rearreglo

de diodos modelo 996 o un detector de índice de refracción modelo 410. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manejo de la información cromatográfica se llevó a cabo por un programa Millennium 2000 Software (Waters). Para la separación y purificación de los compuestos se utilizaron columnas de fase normal (microporasil TM, 125 A, tamaño de partícula 10 µm, Waters) y de fase reversa C-18 (Prep Nova-Pack ® HRC18, 60 A, tamaño de partícula 6 µm, Waters). de tipo analítico (3.9 × 300 mm) y semipreparativo (19 × 300 mm).

Cuadro 16. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente revelador	Composición	Referencia
Sulfato cérico	Sulfato cérico amoniacal 12.0 g H ₂ SO ₄ conc. 22.5 ml Hielo 350 g	Stahl, 1969
Vainillina	Vainillina 1.0 g Metanol 97.0 ml H ₂ SO ₄ conc. 0.8 ml	Ashwoth <i>et al.</i> , 1989
Ácido fosfomolibdico	Ácido fosfomolibdico 5.0 g Etanol 100 ml	Rupprecht <i>et al.</i> , 1990

3.6.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599 B. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica (¹H) y de carbono-13 (¹³C) se generaron en un aparato Varian UNITY PLUS 500, el cual se operó a una frecuencia de 500 MHz y 125 MHz, respectivamente. Los espectros de RMN

^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) del antibiótico X-206 se obtuvieron en un aparato Bruker DM X500. Los espectros se obtuvieron en CDCl_3 o C_6D_6 y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades δ (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como una referencia interna. Los espectros de masas se registraron en un aparato JEOL JMS-AX505HA mediante introducción directa a 70 eV. En tanto que los espectros de masas generados mediante bombardeo rápido de átomos (FAB) se obtuvieron en un aparato JEOL DX300, JMA 3500 usando alcohol nitrobenzílico como matriz. Las rotaciones específicas se midieron en un polarímetro JASCO DIP-360. El análisis de rayos X se llevó a cabo en un aparato Nicolet R3m.

Las secuencias analíticas que utilizaron la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un cromatografo de gases/espectrometro de masas Varian MAT 1125.

3.6.2. Estudio químico de los extractos derivados del cultivo de la especie MIV2B(9).

3.6.2.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo de la especie MIV2B(9)

El fraccionamiento del extracto derivado del cultivo de la especie MIV2B(9) (800 mg) se realizó mediante una cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice (80 g), utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo-metanol en diferentes proporciones. El volumen de los eluatos fue de 40 ml y se recolectó un total de 64 fracciones. La semejanza cromatográfica en capa fina permitió su reunión en 14 fracciones primarias. El efecto fitotóxico de cada una de las fracciones primarias se determinó mediante el ensayo bioautográfico (ver inciso 3.3.3.2). El efecto inhibitorio se concentró en

las fracciones F-5, F-7 y F-8. En el Cuadro 17 se resume el fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(9).

3.6.2.2. Fraccionamiento secundario de la fracción activa F-5.

El fraccionamiento secundario de la fracción activa F-5 (106.7mg) se realizó mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel sílice (16.0 g). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de hexano y acetato de etilo con incrementos de polaridad. Se obtuvo un total de 62 fracciones (4 ml) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica para obtener 7 fracciones secundarias. (Cuadro 18).

Cuadro 17. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo combinado derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(9).

Fracción	Elución	Peso (mg)
F-1	CHCl ₃ -MeOH 99:1	18.5
F-2	CHCl ₃ -MeOH 99:1	37.6
F-3	CHCl ₃ -MeOH 98:2	19.4
F-4	CHCl ₃ -MeOH 98:2	69.5
F-5 *	CHCl ₃ -MeOH 98:2	106.7
F-6	CHCl ₃ -MeOH 98:2	48.1
F-7 *	CHCl ₃ -MeOH 98:2	111.2
F-8 *	CHCl ₃ -MeOH 97:3	82.4
F-9	CHCl ₃ -MeOH 97:3	24.2
F-10	CHCl ₃ -MeOH 95:5	40.2
F-11	CHCl ₃ -MeOH 9:1	68.9
F-12	CHCl ₃ -MeOH 85:15	43.1
F-13	CHCl ₃ -MeOH 8:2	32.2
F-14	CHCl ₃ -MeOH 7:3	36.5

* Fracciones activas (bioautografía).

Cuadro 18. Fraccionamiento secundario de la fracción activa F-5

Fracción	Elución	Peso (mg)
F-5 ⁽¹⁾	Hexano:Acetato de etilo 9:1	80.0
F-5 ⁽²⁾	Hexano:Acetato de etilo 85:15	3.9
F-5 ⁽³⁾ *	Hexano:Acetato de etilo 85:15	9.2
F-5 ⁽⁴⁾	Hexano:Acetato de etilo 8:2	4.8
F-5 ⁽⁵⁾	Hexano:Acetato de etilo 7:3	3.1
F-5 ⁽⁶⁾	Hexano:Acetato de etilo 1:1	2.0
F-5 ⁽⁷⁾	Acetato de etilo	1.8

* Fracciones activas (bioautografía)

3.6.2.3. Aislamiento y purificación del ácido fenilacético (220) de la fracción activa F-5₍₃₎.

El aislamiento y purificación del ácido fenilacético (220) de la fracción activa F-5₍₃₎ (9.2 mg) se realizó mediante CLAE en una columna de gel de sílice (fase normal) utilizando un flujo de 8.3 ml/min y la mezcla ternaria de disolventes hexano:isopropanol:metanol (85:7.5:7.5). La detección se llevó a cabo a 215 nm. El ácido fenilacético se aisló como un sólido blanco (5 mg) con punto de fusión de 76-77° C y un tiempo de retención (t_R) de 13.7 min.

3.6.2.4. Preparación del éster metílico del ácido fenilacético (221).

Para preparar el éster metílico del ácido fenilacético (221) se utilizó una solución etérea de diazometano generada con una solución de hidróxido de potasio (5.0 g) en 7.5 ml de agua destilada, 25 ml de metanol y 21.9 g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald, Aldrich) en 45 ml de éter dietílico.

El ácido fenilacético (10 mg) se disolvió en éter dietílico (3 ml) y se adicionaron alícuotas del diazometano etéreo hasta que cesó la producción de nitrógeno y el color amarillo del reactivo (diazometano) persistió. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 30 minutos y se evaporó el disolvente. El éster metílico del ácido fenilacético se obtuvo como un líquido incoloro de olor afrutado.

3.6.2.5. Aislamiento y purificación del ácido *S* (+) 12-metil tetradecanoico (225), y el ácido 14-metilpentadecanoico (226) de la fracción secundaria F-5 (1).

El análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masas de la fracción secundaria F-5 (1) (80 mg) indicó que esta fracción está constituida por cinco componentes (Figura 20). Estos componentes fueron denominados con las claves F-5 (1A), F-5 (1B), F-5 (1C), F-5 (1D) y F-5 (1E) (Cuadro 38).

Los productos mayoritarios de esta mezcla fueron el ácido *S* (+) 12-metiltetradecanoico (225) (35.52 % abundancia relativa) y el ácido 14-metilpentadecanoico (226) (42.37% abundancia relativa).

El aislamiento y la purificación de los ácidos grasos mayoritarios se realizó mediante CLAE empleando una columna semipreparativa de fase reversa C₁₈. Para llevar a cabo el proceso de elución se utilizó una mezcla de acetonitrilo:agua (60:40) a una velocidad de flujo de 7.1 ml/min y detección a 202 nm. Los ácidos *S* (+) 12-metiltetradecanoico (*t_R* 5.82 min) y 14-metilpentadecanoico (*t_R* 8.12 min) se aislaron como sólidos blancos de apariencia cerosa con puntos de fusión de 24-26° y 62-63° C, respectivamente.

3.6.2.6. Aislamiento y purificación del antibiótico X-206 (218) de la fracción activa F-7.

El aislamiento del antibiótico X-206 (218) de la fracción activa F-7 (111.2 mg) se realizó también mediante CLAE utilizando una columna semipreparativa de gel de sílice (fase normal) y un detector de índice de refracción. En este análisis la fase móvil consistió en un sistema isocrático de hexano:isopropanol:metanol (89:5.5:5.5) con un flujo de 5.9 ml/min. El antibiótico (t_R 22.63 min) se obtuvo como un sólido blanco, el cual se recrystalizó de agua-acetona. El punto de fusión del producto cristalino fue de 185-187° C.

3.6.4.7. Aislamiento y purificación de la *S* (+) 2-metilbutanamida (222), 2-metilpropanamida (223) y la fenilacetamida (224) de la fracción activa F-8.

La *S* (+)-2-metilbutanamida (222), la 2-metilpropanamida (223) y la fenilacetamida (224), se aislaron de la fracción activa F-8 (74 mg) mediante CLAE empleando una columna de fase normal empacada con gel de sílice. Para el proceso de elución se utilizó una mezcla de hexano:isopropanol:metanol (85:7.5:7.5) y un flujo de 8.3 ml/min. En estas condiciones cromatográficas los productos tienen un tiempo de retención de 19.7 min, 21.05 min y 22.22 min, respectivamente. La *S* (+) 2-metilbutanamida (4.0 mg), la 2-metilpropanamida (20.0 mg) y la fenilacetamida (5.0 mg) se aislaron como sólidos blancos con puntos de fusión de 104-107° C, 111-114° C y 148-151° C, respectivamente.

3.6.3. Estudio químico del extracto derivado del cultivo de la especie MIV2B(31).

3.6.3.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo de la especie MIV2B(31)

La resolución del extracto orgánico derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(31) (8.66 g) se efectuó mediante cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice (218 g). Para el proceso de elución se utilizó un gradiente de cloroformo-metanol. El volumen de los eluatos fue de 50 ml y se colectó un total de 401 fracciones concentradas que fueron combinadas de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica (ccf) en 5 fracciones primarias. Las fracciones se evaluaron de manera independiente mediante el bioensayo del crecimiento radicular. El efecto inhibitorio se concentró en las fracciones F-2 a F-4. En el Cuadro 19 se resume el fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(31).

Cuadro 19. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo combinado derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(31).

Fracción	Elución	Peso (mg)	Porcentaje de Inhibición del crecimiento radicular ^a
F-1	CHCl ₃	0.706	32.10
F-2	CHCl ₃ -MeOH 97:3	5.35	79.07
F-3	CHCl ₃ -MeOH 95:5	1.12	65.5
F-4	CHCl ₃ -MeOH 8:2	0.429	85.35
F-5	CHCl ₃ -MeOH 1:1	0.635	25.5

^a Concentración de prueba: 200 µg/ml.

Porcentajes expresados en relación al crecimiento del control negativo P 0.05 (ANOVA).

3.6.3.2. Aislamiento y purificación de la maduramicina (199) de la fracción activa F-2.

El aislamiento de la maduramicina se realizó mediante CLAE utilizando una columna semipreparativa de fase normal y un detector de índice de refracción. En este análisis la fase móvil consistió en un sistema isocrático de hexano:isopropanol:metanol (89:5.5:5.5) con un flujo de 8.3 ml/ min. Este procedimiento permitió la obtención de 100 mg de la maduramicina (t_R 17.23 min). El antibiótico se obtuvo como un sólido blanco, el cual se recrystalizó de hexano. El punto de fusión del producto de recrystalización fue de 192-193° C.

3.6.3.3. Obtención del éster metílico de la maduramicina (213).

El éster metílico de la maduramicina se obtuvo mediante el tratamiento del ácido libre del antibiótico con una solución etérea de diazometano. La preparación del ácido libre de la maduramicina a partir de la sal de sodio (producto natural) se describe a continuación.

3.6.3.3.1. Preparación del ácido libre de la maduramicina.

Una solución de la sal de sodio de la maduramicina (200 mg) en CH_2Cl_2 (20 ml) se agitó con una solución de HCl 0.01N (20 ml) a temperatura ambiente durante 90 minutos, ajustando continuamente el pH de la fase acuosa a 2 mediante la adición de alícuotas de HCl 0.1 N. La fase orgánica se lavó con dos porciones de agua destilada, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó bajo presión reducida. El ácido libre de la maduramicina se obtuvo como sólido blanco (180 mg).

3.6.3.3.2. Preparación del derivado metilado de la maduramicina.

Para obtener el derivado metilado de la maduramicina se utilizó una solución etérea de diazometano preparada con una solución de hidróxido de potasio (5.0 g) en 7.5 ml de agua destilada, 25 ml de metanol y 21.9 g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald, Aldrich) en 45 ml de éter dietílico. El ácido libre de la maduramicina (200 mg) se disolvió en éter dietílico (10 ml); posteriormente se adicionaron alícuotas del diazometano etéreo hasta que cesó la producción de nitrógeno y el color amarillo del reactivo (diazometano) persistió. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 30 minutos después de los cuales se concentró y el producto de la reacción se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa. La elución se llevó a cabo con una mezcla de hexano:acetona 7:3. Como producto de este proceso se obtuvo 50 mg (25%) del derivado metilado (213).

3.6.4. Estudio químico del extracto derivado del cultivo de la especie MIV2B(13).

3.6.4.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo de la especie MIV2B(13).

El fraccionamiento del extracto fitotóxico y citotóxico derivado del cultivo en mediana escala del microorganismo MIV2B(13) (19.0 g) se realizó mediante cromatografía en columna abierta empacada con de gel de sílice (610 g). El proceso de elución se llevó a cabo con diclorometano y mezclas de diclorometano:metanol en diferentes proporciones. El volumen de los eluatos fue de 150 ml y se colectó un total de 119 fracciones. El análisis cromatográfico (ccf) de las fracciones primarias permitió reunir las en 16 fracciones combinadas de acuerdo a la semejanza cromatográfica (F-1 a F-16).

Las fracciones combinadas fueron evaluadas de manera independiente mediante el bioensayo de la toxicidad contra *A. salina*. La mayor toxicidad se concentró en las

fracciones 4 a 10. En el Cuadro 20 se resume el fraccionamiento biodirigido del extracto derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(13).

Cuadro 20. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo combinado derivado del cultivo del microorganismo MIV2B(13).

Fracción	Elución	Peso (mg)	Porcentaje de mortalidad contra <i>A. salina</i>
F-1	CH ₂ Cl ₂	841.2	0.0
F-2	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 97:3	816.2	0.0
F-3	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 97:3	477.0	46.7
F-4	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 97:3	38.1	86.7
F-5	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 96:4	240.8	100
F-6	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 96:4	17.4	100
F-7	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 96:4	104.5	100
F-8	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 96:4	57.5	100
F-9	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 96:4	4.3	100
F-10	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 96:4	298.5	100
F-11	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 95:5	2.184 g	90.0
F-12	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	165.5	3.3
F-13	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	301.3	63.3
F-14	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	816.9	0.0
F-15	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 97:3	213.0	0.0
F-16	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 7:3	2 8587 g	0.0

Concentración de prueba: 10 µg/ml.

Porcentajes expresados en relación al crecimiento del control negativo P 0.05 (ANOVA).

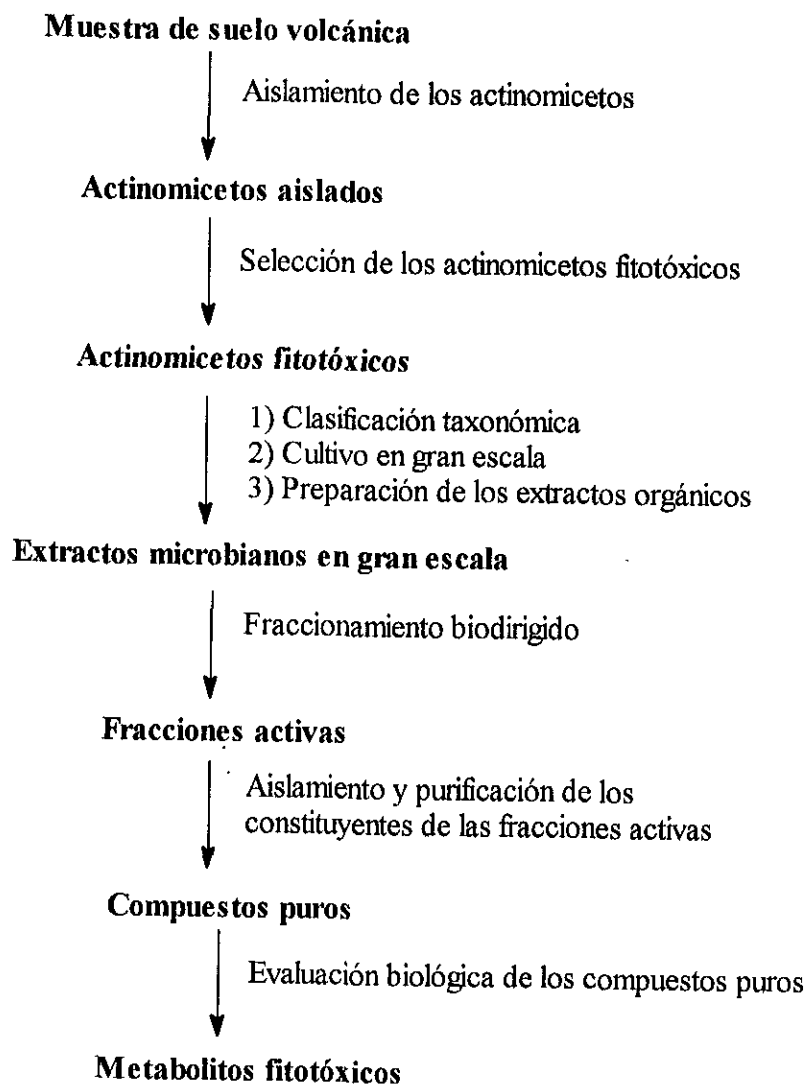
3.6.4.2. Aislamiento y purificación de las actinomicinas C1 (227) y C2 (228).

Las actinomicinas C1 (227) y C2 (228) se aislaron de las fracciones activas F-5 (240.8 mg), F-7 (104.5 mg), F-8 (57.5 mg) y F-10 (298.5 mg) mediante CLAE utilizando una columna semipreparativa de fase reversa C-18 y un detector de luz ultravioleta con detección a 413 nm. En este análisis la fase móvil consistió en un sistema isocrático de acetonitrilo con un flujo de 5.9 ml/min. Este procedimiento permitió la obtención de 12 mg de la actinomicina C1 (t_R 11.75 min) y 8 mg de la actinomicina C2 (t_R 10.62 min). Los productos se aislaron como sólidos de color naranja con puntos de fusión de 246-247° C y 237-239° C.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo de este estudio se diseñó la estrategia metodológica que se resume en el Esquema 1. Esta estrategia comprende las etapas que se enumeran a continuación y los resultados derivados de este trabajo de investigación se discutirán en el mismo orden.

- 1 Aislamiento de los actinomicetos presentes en una muestra de suelo volcánico.
- 2 Selección de los actinomicetos objeto de estudio.
3. Clasificación taxonómica de los actinomicetos objeto de estudio.
4. Cultivo en gran escala de los microorganismos seleccionados.
5. Preparación de los extractos orgánicos en gran escala.
- 6 Fraccionamiento biodirigido de los extractos microbianos.
7. Aislamiento y purificación de los constituyentes de las fracciones activas.
- 8 Elucidación estructural de los productos aislados.
- 9 Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos puros



Esquema 1. Estrategia metodológica empleada en el presente estudio.

4.1. Aislamiento de los actinomicetos objeto de estudio.

La selección de la muestra de suelo para el aislamiento de los microorganismos se basó en consideraciones de tipo ecológico. Es importante indicar que la diversidad estructural de los metabolitos secundarios depende de la influencia selectiva del medio ambiente (Vinning, 1992) y que cada tipo de suelo tiene un espectro característico de microorganismos. Un estudio realizado en Japón indicó que las características del suelo influyen en la diversidad microbiana y el número de actinomicetos presentes. Los resultados derivados de ese estudio indicaron que los suelos de tipo arcilloso, agrícola y volcánico constituyen la mejor fuente de actinomicetos (Iwai y Takahasi, 1992).

Las características del suelo volcánico proporcionan la posibilidad de aislar actinomicetos adaptados a condiciones adversas con una capacidad metabólica desarrollada para sobrevivir en dichas condiciones. En este sentido se ha postulado que la producción de los metabolitos secundarios se induce cuando se presentan condiciones adversas o como una ventaja evolutiva de los microorganismos para su adaptación (Vinning, 1992; Maplestone *et al.*, 1992, Nisbet, 1992)

La muestra de suelo seleccionada para el aislamiento de los actinomicetos fue recolectada al pie del volcán La Virgen del complejo volcánico Tres Vírgenes, Municipio de Santa Rosalía, Baja California Sur, México. El aislamiento de los microorganismos se realizó de acuerdo a los métodos microbiológicos convencionales empleando el medio de cultivo de Czapeck. La composición química de este medio permite el aislamiento selectivo de los actinomicetos y la identificación de este tipo de microorganismos se basó en el análisis de la morfología colonial (Williams y Wellington, 1982; Hunter-Cervera, 1986; Labeda y Shearer, 1990; Bergey, 1994; Horan, 1994). Mediante la aplicación de este método se aisló un total de 94 cepas de actinomicetos las cuales se identificaron con una

clave y se mantuvieron viables en el medio sólido de YM en tubos de ensayo de 16 × 125 mm.

4.2. Selección de los actinomicetos objeto de estudio.

La selección de los actinomicetos objeto de estudio se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos en la literatura para la detección de microorganismos productores de fitotóxicas microbianas (DeFrank y Putnam, 1985; Blumaerová *et al*, 1989; Okuda, 1992; Takahashi, *et al*, 1995; Mallik, 1997). El proceso de selección se efectuó en dos etapas. En la primera de ellas se llevó a cabo una selección primaria a partir de las 94 cepas de los actinomicetos aislados mediante la determinación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriaccus* (DeFrank y Putnam, 1985; Blumaerová, 1989; Mallik, 1997) y mediante la evaluación de su efecto de antibiosis contra la levadura *S. cerevisiae* (Barry y Thornberry, 1991). Es importante destacar que la evaluación de este efecto de antibiosis se realizó considerando que la levadura es un organismo eucariote, como lo son también las especies vegetales, por lo tanto si los productos microbianos inhiben algún proceso bioquímico o fisiológico de una célula eucariote microbiana existe una cierta probabilidad de que ejerza el mismo efecto sobre las células vegetales.

La evaluación del efecto de los actinomicetos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* se realizó empleando la metodología descrita en la sección experimental. Los resultados se registraron de manera cualitativa y se indican en el Cuadro 21. Los microorganismos más activos se identificaron con tres cruces y los de menor actividad con una. El efecto de antibiosis se verificó mediante la medida del halo de inhibición del crecimiento de la levadura y los resultados se indican en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Preselección de los actinomicetos aislados de la muestra de suelo volcánico recolectada en el Complejo Tres vírgenes, Santa Rosalía Baja California Sur.

Nº de cepa	Clave	Efecto sobre <i>A. hypochondriacus</i> ^b	Efecto sobre <i>S. cerevisiae</i> (halo de inhibición, cm) ^a
1	MI4A(2)	NE	0.25
2	MI4A(8)	NE	0.10
3	MI3A(10)	NE	0.17
4	MII1(7)	NE	0.00
5	MII1(12)	++	0.00
6	MII2(1)	NE	0.20
7	MII2(2)	NE	0.10
8	MII2(4)	NE	0.00
9	MII2(10)	+	0.25
10	MII2(11)	NE	0.00
11	MII2(12)	NE	0.25
12	MII2(14)	NE	0.22
13	MII2(15)	NE	0.10
14	MII2(19)	+	0.27
15	MII2(20)	NE	0.00
16	MII2(21)	NE	0.00
17	MII2(23)	NE	0.00
18	MII2(24)	NE	0.00
19	MII2(25)	NE	0.00
20	MII2(26)	+	0.25
21	MII2(27)	NE	0.10
22	MII2(29)	++	0.20
23	MII2(30)	NE	0.15
24	MII2(31)	NE	0.15
25	MII2(32)	NE	0.10

^a Promedio de tres determinaciones.

^b NE. sin efecto, (+): efecto escaso, (++) : efecto moderado, (+++): efecto considerable.

Cuadro 21. Preselección de los actinomicetos aislados de la muestra de suelo volcánico recolectada en el Complejo Tres vírgenes, Santa Rosalía Baja California Sur (continuación).

Nº de cepa	Clave	Efecto sobre <i>A. hypochondriacus</i>	Efecto sobre <i>S. cerevisiae</i> (halo de inhibición, cm) ^a
26	MII2(33)	NE	0.00
27	MII2(34)	NE	0.00
28	MII2(35)	+	0.25
29	MII2(36)	NE	0.10
30	MII2(37)	NE	0.10
31	MII2(38)	NE	0.00
32	MII2(39)	NE	0.25
33	MII2(43)	NE	0.00
34	MII2(44)	NE	0.27
35	MII3(2)	+	0.15
36	MII3(4)	+	0.00
37	MII3(5)	NE	0.12
38	MII3(9)	NE	0.00
39	MII3(8)	NE	0.00
40	MII3(11)	NE	0.00
41	MII3(12)	++	0.20
42	MII3(13)	NE	0.22
43	MII3(14)	NE	0.00
44	MII3(15)	NE	0.15
45	MII3(16)	NE	0.00
46	MII3(17)	NE	0.00
47	MII3(19)	NE	0.00
48	MII3(22)	NE	0.15
49	MII3(23)	+	0.00

^a Promedio de tres determinaciones.

^b NE. sin efecto, (+): efecto escaso, (++) : efecto moderado, (+++) : efecto considerable.

Cuadro 21. Preselección de los actinomicetos aislados de la muestra de suelo volcánico recolectada en el Complejo Tres vírgenes, Santa Rosalía Baja California Sur (continuación).

Nº de cepa	Clave	Efecto sobre <i>A. hypochondriacus</i>	Efecto sobre <i>S. cerevisiae</i> (halo de inhibición, cm) ^a
50	MII3(24)	NE	0.10
51	MIII1C(3)	NE	0.00
52	MIII1C(14)	NE	0.00
53	MIII1C(15)	+	0.15
54	MIII1C(16)	NE	0.00
55	MIV2A(4)	+++	0.40
56	MIV2A(6)	NE	0.00
57	MIV2B(1)	++	0.35
58	MIV2B(2)	NE	0.00
59	MIV2B(3)	NE	0.12
60	MIV2B(4)	NE	0.10
61	MIV2B(5)	NE	0.27
62	MIV2B(6)	NE	0.00
63	MIV2B(7)	NE	0.00
64	MIV2B(8)	++	0.80
65	MIV2B(9)	+++	0.40
66	MIV2B(10)	NE	0.00
67	MIV2B(11)	NE	0.20
68	MIV2B(12)	NE	0.00
69	MIV2B(13)	++	0.32
70	MIV2B(14)	NE	0.00
71	MIV2B(15)	NE	0.00
72	MIV2B(16)	NE	0.00

^a Promedio de tres determinaciones.

^b NE sin efecto, (+): efecto escaso, (++) efecto moderado, (+++): efecto considerable.

Cuadro 21. Preselección de los actinomicetos aislados de la muestra de suelo volcánico recolectada en el Complejo Tres vírgenes, Santa Rosalía Baja California Sur (continuación).

Nº de cepa	Clave	Efecto sobre <i>A. hypochondriacus</i>	Efecto sobre <i>S. cerevisiae</i> (halo de inhibición, cm) ^a
73	MIV2B(18)	NE	0.00
74	MIV2B(19)	NE	0.00
75	MIV2B(20)	NE	0.00
76	MIV2B(23)	+	0.00
77	MIV2B(24)	NE	0.00
78	MIV2B(25)	+	0.45
79	MIV2B(27)	NE	0.00
80	MIV2B(28)	NE	0.20
81	MIV2B(29)	NE	0.00
82	MIV2B(30)	NE	0.00
83	MIV2B(31)	+++	0.50
84	MII1(4)	NE	0.00
85	MI2A(7)	NE	0.0
86	MIV2B(5)	NE	0.00
87	MI3A(3)	NE	0.00
88	MI3B(1)	NE	0.10
89	MI5(6)	NE	0.00
90	MII2(16)	NE	0.00
91	MII2(28)	NE	0.00
92	MII1C(17)	NE	0.00
93	MII1C(7)	NE	0.00
94	MIII2B(4)	NE	0.00

^a Promedio de tres determinaciones.

^b NE. sin efecto, (+): efecto escaso, (++) : efecto moderado, (+++) : efecto considerable.

La inhibición del desarrollo de la especie vegetal de prueba y el efecto de antibiosis contra *S. cerevisiae* debida al desarrollo de los actinomicetos indica que los metabolitos secundarios producidos por estos microorganismos poseen propiedades herbicidas potenciales (DeFrank y Putnam, 1985; Bérdy, 1989; Mallik, 1997). El empleo de este bioensayo en la búsqueda de fitotoxinas ha permitido identificar nuevas fuentes de productos con propiedades herbicidas (Defrank y Putnam, 1985; Blumaerová *et al.*, 1989; Okuda, 1992; Takahashi *et al.*, 1995).

Como se observa en el Cuadro 21, las cepas número 55, 57, 64, 65, 69, 78 y 83 con las claves MIV2A(4), MIV2B(1), MIV2B(8), MIV2B(9), MIV2B(13), MIV2B(25) y MIV2B(31), respectivamente, demostraron un efecto inhibitor del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y del desarrollo de *S. cerevisiae*. Estos microorganismos se consideraron como los actinomicetos potencialmente productores de metabolitos fitotóxicos.

En la segunda etapa de selección, las siete cepas de los actinomicetos fitotóxicos se cultivaron en pequeña escala (600 ml) en las condiciones apropiadas (ver sección experimental, inciso 3.4.1.). Al cabo de la fermentación se separó el caldo del micelio y se prepararon los extractos orgánicos correspondientes, los cuales se ensayaron para determinar su actividad fitotóxica. Los ensayos de la segunda etapa de selección se realizaron con la finalidad de verificar la producción de fitotoxinas en medio líquido. Se ha observado que en algunos casos los microorganismos que producen toxinas en medio sólido no siempre las producen cuando se cultivan en un medio líquido (Defrank y Putnam, 1985).

La determinación de la actividad fitotóxica potencial de los extractos microbianos consistió en evaluar su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y su efecto sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca. Esta última evaluación permitiría detectar herbicidas con un efecto sobre la fotosíntesis y se realizó calculando la velocidad de la síntesis de ATP en los cloroplastos aislados de espinaca en presencia del extracto microbiano (500 µg/ml) comparada con la velocidad de la síntesis de ATP en condiciones basales (sin adición de extracto).

Con la finalidad de conocer la actividad de los extractos microbianos sobre otros sistemas bioquímicos y fisiológicos se evaluó su toxicidad para el crustáceo *Artemia salina*. Los resultados derivados de la segunda etapa de evaluaciones biológicas de selección se resumen en el Cuadro 22. La inhibición del crecimiento radicular se encuentra expresada en valores de la concentración inhibitoria media (CI_{50}), el efecto sobre la síntesis de ATP en porcentaje de inhibición y la toxicidad para *A. salina* en valores de la concentración letal media (CL_{50}).

Como se desprende de los resultados resumidos en el Cuadro 22, las especies más activas contra *A. hypochondriacus* fueron MIV2B(9) y MIV2B(31). En ambos casos la actividad fitotóxica se presentó tanto en el extracto derivado del caldo como en el extracto derivado del micelio. Los extractos derivados del cultivo de estas dos especies también demostraron un efecto inhibitor de la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca. Los extractos derivados del caldo de los microorganismos MIV2B(9) y MIV2B(31) inhibieron la síntesis de ATP en un 97.0 % y 87.0 %, respectivamente. Los correspondientes a las cepas MIV2B(8) y MIV2B(13) presentaron un efecto fitotóxico

moderado, los valores de CI_{50} del crecimiento radicular fueron del orden de 200 $\mu\text{g/ml}$ y los porcentajes de inhibición de la síntesis de ATP fueron de 62.0 % y 56.0 % respectivamente.

Cuadro 22. Efecto fitotóxico de los extractos derivados del cultivo en pequeña escala de los microorganismos que resultaron activos en el ensayo de preselección.

Actinomiceto	Extracto	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a <i>A. hypochondriacus</i>	% inhibición de la síntesis de ATP ^b	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$) <i>A. salina</i> ^c
MIV2B(1)	Caldo	> 500	ND	> 500
	Micelio	> 500		> 500
MIV2A(4)	Caldo	> 500	ND	12.19
	Micelio	> 500		> 500
MIV2B(8)	Caldo	248.86	62.0	> 500
	Micelio	194.15	ND	> 500
MIV2B(9)	Caldo	11.61	97.0	22.02
	Micelio	124.86	ND	140.23
MIV2B(13)	Caldo	153.37	56.0	0.1895
	Micelio	197.28		1.59
MIV2B(25)	Caldo	> 500	ND	161.46
	Micelio	> 500		36.98
MIV2B(31)	Caldo	58.41	87.0	342.09
	Micelio	45.45	ND	450.03

^a CI_{50} : concentración inhibidora media del crecimiento radicular

^b Porcentaje de inhibición de la síntesis de ATP (500 $\mu\text{g/ml}$).

^c CL_{50} : concentración letal media.

ND. No determinada.

Por último, los extractos derivados del cultivo de la especie MIV2A(4), MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(25) fueron tóxicos para *A. salina*. Los valores de CI_{50} de los extractos obtenidos del caldo y del micelio para cada una de las especie se resumen en el Cuadro 22. En esta evaluación, la especie más tóxica fue MIV2B(13), los valores de CL_{50} calculados para el caldo y el micelio fueron de 0.1895 $\mu\text{g/ml}$ y 1.59 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Con base en los resultados derivados de las evaluaciones de esta segunda etapa de selección, se escogieron los microorganismos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) para realizar los estudios químicos biodirigidos.

4.3. Clasificación taxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31).

La clasificación taxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) se realizó con base en el criterio quimiotaxonómico y el análisis de las secuencias del ARNr 16S. En primera instancia, los resultados derivados de la clasificación quimiotaxonómica permitieron proponer el género de cada microorganismo y el análisis de las secuencias del ARNr 16S confirmar los resultados de la clasificación quimiotaxonómica.

4.3.1. Clasificación quimiotaxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31).

El criterio quimiotaxonómico considera las características morfológicas (micro y macroscópicas), las características oxidativas o fermentativas y la composición de los hidrolizados celulares de un actinomiceto. La descripción morfológica de los actinomicetos consistió en la identificación de las características del micelio (aéreo y substrato), el tipo, número y la disposición de las esporas y la identificación de otras estructuras microbianas (Bergey, 1994).

La determinación de las características oxidativas o fermentativas de los microorganismos se realizó evaluando su capacidad para desarrollarse en condiciones aerobias o anaerobias. Con base en estas características, los actinomicetos se dividen en dos grandes grupos denominados actinomicetos oxidativos y actinomicetos fermentativos. Los primeros requieren de oxígeno para su desarrollo y son considerados, por lo tanto, como aerobios estrictos. Por otro lado, los actinomicetos fermentativos son anaerobios estrictos o anaerobios facultativos (Lechevalier, 1977; Pine, 1977).

El análisis de los hidrolizados celulares permite la identificación de los marcadores químicos de un tipo de pared celular en particular. En el caso de los actinomicetos oxidativos, los géneros se organizan en cuatro grupos diferentes de acuerdo a los aminoácidos y azúcares (marcadores) presentes en la pared celular (Lechevalier, 1977; Pine, 1977; Bergey, 1994). Los marcadores químicos son: L o *meso* DAP (ácido 2, 6-diaminopimélico), arabinosa, galactosa, xilosa, madurosa, fucosa, ramnosa, y manosa (Bergey, 1994). En el Cuadro 23 se indican los géneros de los actinomicetos oxidativos clasificados de acuerdo a la presencia los marcadores químicos en la pared celular.

Los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) se identificaron como bacterias gram positivo, no alcohol resistente que presentan un crecimiento micelial después de siete a catorce días de incubación (Figura 10, Cuadro 24). Estas características permitieron identificar a los microorganismos en estudio como miembros del orden de los Actinomicetales. A continuación se describe la clasificación quimiotaxonómica de cada uno de los actinomicetos aislados.

Cuadro 23. Clasificación quimiotaxonómica de los actinomicetos oxidativos de acuerdo a los marcadores químicos presentes en los hidrolizados celulares.

Aminoácido diagnóstico ^a	Azúcar diagnóstico ^b	Género
Ausencia DAP	Xilosa	<i>Actinoplanes</i>
	Madurosa NA	<i>Actinomadura</i>
		<i>Oerskovia</i>
		<i>Jonesia</i>
		<i>Promicromonospora</i>
L-DAP	NA	<i>Nocardioides</i>
		<i>Terrabacter</i>
		<i>Intrasporangium</i>
		<i>Streptomyces</i>
		<i>Kitasatosporia</i>
		<i>Streptovercillium</i>
		<i>Kineosporia</i>
		<i>Sporichthya</i>
meso-DAP ^c	Xilosa y arabinosa	<i>Micromonospora</i>
		<i>Catellatospora</i>
		<i>Glycomyces</i>
		<i>Dactylosporangium</i>
		<i>Actinoplanes</i>
		<i>Ampullariella</i>
		<i>Pilimelia</i>
		<i>Frankia</i>
		Madurosa
	<i>Microbispora</i>	
	<i>Microtetraspera</i>	
	<i>Planobispora</i>	
	<i>Planomonospora</i>	
	<i>Spirillospora</i>	
	<i>Streptosporangium</i>	
	<i>Dermathophilus</i>	
	<i>Frankia</i>	

Cuadro 23. Clasificación quimiotaxonómica de los actinomicetos de acuerdo a los marcadores químicos presentes en los hidrolizados celulares (continuación).

Aminoácido diagnóstico	Azúcar diagnóstico	Género
meso-DAP	Fucosa	<i>Frankia</i>
		<i>Actinoplanes</i>
	Ramnosa y galactosa	<i>Saccharothrix</i>
	Ramnosa, galactosa y manosa	<i>Streptoalloteichus</i>
	Galactosa	<i>Kitasatosporia</i>
	Arabinosa y galactosa	<i>Nocardia</i>
		<i>Rhodococcus</i>
		<i>Gordona</i>
		<i>Tsukamurella</i>
		<i>Actinobispora</i>
		<i>Pseudonocardia</i>
		<i>Saccharomonospora</i>
		NA
	<i>Actinopolyspora</i>	
	<i>Amycolata</i>	
	<i>Amycolaptosis</i>	
	<i>Kibdeloporangium</i>	
	<i>Actinokineosporia</i>	
	<i>Pseudoamycolata</i>	
	<i>Thermoactinomyces</i>	
	<i>Thermomonospora</i>	
<i>Nocardopsis</i>		
<i>Actinosynnema</i>		
<i>Geodermatophilus</i>		

^a DAP: ácido diamino pimélico, ^b NA: ausencia azúcar diagnóstico ^c pueden encontrarse también las formas hidroxiladas de DAP.

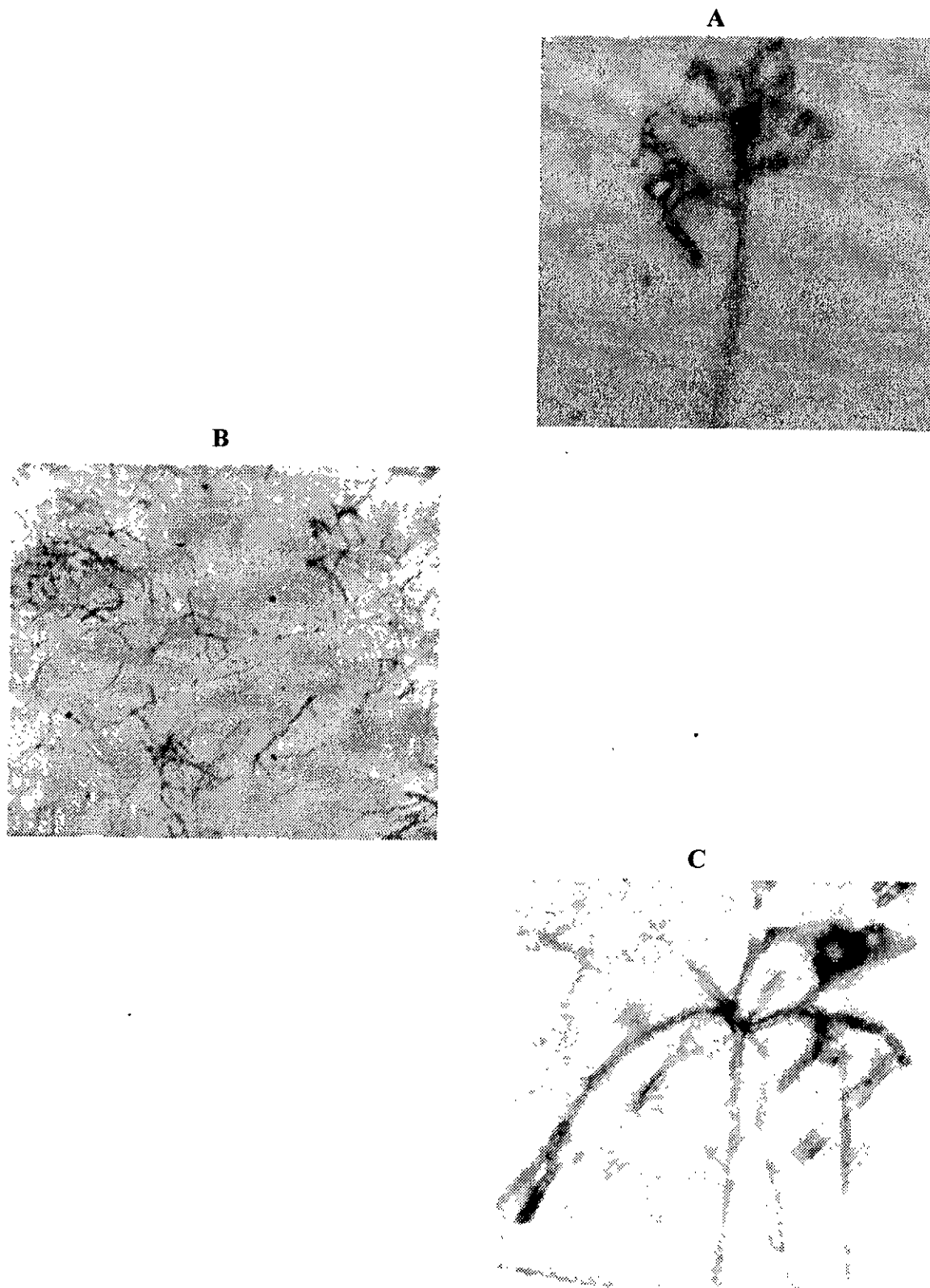


Figura 10. Morfología microscópica de los actinomicetos MIV2B(9) (A), MIV2B(13) (B) y MIV2B(31) (C).

Cuadro 24. Características morfológicas, fisiológicas y composición de los hidrolizados celulares de los actinomicetos objeto de estudio químico.

Actinomiceto	Morfología ^a	Fisiología	Pruebas bioquímicas	Marcadores químicos
MIV2B(9)	Colonias de color blanco-grisáceo. Micelio vegetativo de color rosa, microsifonado (0.5 μm diam) con ramificaciones y esporas	Aerobio estricto. Temp. de crecimiento: 30-37°C	Catalasa (+) Hidrólisis de caseína (+)	L-DAP Glucosa Galactosa
MIV2B(13)	Colonias de color blanco con apariencia algodonosa y suave. Micelio vegetativo microsifonado (0.35 μm), con filamentos, presencia de bastones cortos y ausencia de endosporas. Produce un pigmento amarillo difusible.	Anaerobio facultativo. Temp. de crecimiento: 30-37°C	Catalasa (-)	Ausencia de L y meso DAP
MIV2B(31)	Colonias de color grisáceo-verdoso. Micelio aéreo ramificado, presencia de esporas de igual tamaño (1 μm) en cadenas	Aerobio estricto. Temp de crecimiento: 30-37 °C	Hidrólisis de caseína (+) Hidrólisis de xantina (+) Catalasa (-)	meso DAP Galactosa Madurosa

^a Características morfológicas de los microorganismos desarrollados en el medio de YM.

4.3.1.1. Clasificación quimiotaxonómica del actinomiceto MIV2B(9).

El microorganismo MIV2B(9) se identificó como un actinomiceto aerobio estricto u oxidativo que produce colonias de color blanco-grisáceo, micelio vegetativo de color rosa microsifonado (0.5 μm) y micelio aéreo con ramificaciones y cadenas de esporas (Figura

10 A). El análisis del hidrolizado celular de esta cepa permitió identificar al L-DAP, la glucosa y la galactosa como los marcadores químicos mayoritarios. Debido a que los géneros que contienen L-DAP en su pared celular no se pueden diferenciar entre sí por algún azúcar diagnóstico (Cuadro 23), sus características microscópicas y bioquímicas proporcionaron la mayor información para proponer la identificación genérica del microorganismo.

Una característica importante del microorganismo MIV2B(9) es la disposición en cadena de las esporas (Figura 10, A). Los géneros de este grupo que tienen esta característica son *Streptomyces* y *Streptoverticillium*. La diferencia morfológica entre estos dos géneros radica en el hecho de que *Streptoverticillium* presenta ramificaciones en el micelio aéreo (verticilios) y cada ramificación posee en su ápice cadenas de esporas (Bergey, 1994). En el análisis microscópico de la cepa MIV2B(9) no se observaron las ramificaciones características de este género. Por otro lado, los resultados positivos de las pruebas bioquímicas de catalasa y de la hidrólisis de caseína son característicos del género *Streptomyces*. Así, la información derivada del análisis químico y microscópico del actinomiceto MIV2B(9) permitió proponer que se trataba de una especie del género *Streptomyces*.

4.3.1.2. Clasificación quimiotaxonómica del actinomiceto MIV2B(13).

La cepa MIV2B(13) se identificó como un actinomiceto anaerobio facultativo debido a que el microorganismo tiene la capacidad de desarrollarse tanto en condiciones aerobicas como en anaerobicas (atmósfera de CO₂).

El grupo de los actinomicetos fermentativos (anaerobios estrictos y anaerobios facultativos) incluyen a los géneros *Actinomyces*, *Arachnia*, *Bacterionema*, *Bifidobacterium*

y *Rothia* (Pine, 1977). Sin embargo, algunas especies del género *Streptomyces* pueden crecer en concentraciones reducidas de oxígeno o en concentraciones altas de dióxido de carbono (Bergey, 1994). Debido a que los géneros *Bifidobacterium* y *Rothia* son anaerobios estrictos, la identificación preliminar del microorganismo MIV2B(13) se limitó a los géneros *Actinomyces*, *Arachnia*, *Bacterionema* y *Streptomyces*. Una característica relevante del microorganismo MIV2B(13) es su capacidad de desarrollarse en una atmósfera de dióxido de carbono. De los actinomicetos antes mencionados solo *Actinomyces* y *Streptomyces* poseen esta habilidad (Bergey, 1994). Por otro lado, el análisis microscópico del actinomiceto MIV2B(13) permitió identificar un micelio microsifonado ($0.35 \mu\text{m}$), con filamentos, presencia de bastones cortos y ausencia de endosporas (Figura 10, B). De acuerdo con estos resultados, el actinomiceto MIV2B(13) se consideró, en primera instancia como un microorganismo del género *Actinomyces*.

4.3.1.3. Clasificación quimiotaxonómica del actinomiceto MIV2B(31).

El microorganismo MIV2B(31) se identificó como un actinomiceto aerobio estricto de colonias color gris-verdoso, micelio aéreo ramificado con esporas ($1 \mu\text{m}$) en cadenas (Figura 10, C). El análisis del hidrolizado celular de este microorganismo permitió identificar al *meso* DAP, la galactosa y la madurosa como los marcadores químicos mayoritarios. Como se puede observar en el Cuadro 23, los géneros de actinomicetos que contienen *meso* DAP comprenden un gran grupo de microorganismos. Este grupo se subdivide en siete categorías de acuerdo a los azúcares presentes en los hidrolizados celulares, sin embargo, dentro de este grupo se consideran ciertos géneros que no contienen un azúcar diagnóstico en particular que permita su identificación. Por lo tanto, la

identificación générica del microorganismo MIV2B(31) se basó principalmente en su morfología microscópica. La comparación de las características morfológicas microscópicas del microorganismo MIV2B(31) con las descritas en la literatura para cada uno de los 38 géneros de actinomicetos que contienen *meso* DAP en su pared celular permitió determinar que sólo los géneros *Actinopolyspora*, *Microtetraspora*, *Actinomadura* y *Kitasatospora* presentan las características morfológicas descritas para MIV2B(31) (Bergey, 1994). Con respecto a los azúcares diagnóstico, la galactosa y la madurosa solamente se encuentra en los géneros *Actinomadura* y *Microtetraspora*. En consecuencia el actinomiceto MIV2B(31) podría ser clasificado dentro de los géneros *Actinomadura* o *Microtetraspora*.

4.3.2. Clasificación taxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2B(31) mediante el análisis de las secuencias del ARN ribosomal 16 S.

La clasificación taxonómica de los actinomicetos mediante el análisis de las secuencias del ARNr 16S se realizó considerando que el ADN que codifica para el ARNr se encuentra altamente conservado en estructura y funcionalidad en todos los organismos y es diferente para cada especie. En las bacterias el ADN que codifica para el ARN está arreglado en un operón que consiste en tres genes, los cuales representan a los ARNr 16S, 23S y 5S. Estos genes son cotranscritos como un solo precursor de ARN 30S y subsecuentemente procesado. Dentro de los genes del ARNr existen regiones de secuencias conservadas intercaladas con regiones de secuencia variable. Las regiones constantes y las variables del gen se comparan para determinar la homología de secuencias y así identificar taxonómicamente a los actinomicetos, establecer relaciones evolutivas y construir árboles filogenéticos (Smith *et al.*, 1991) (Figura 11).

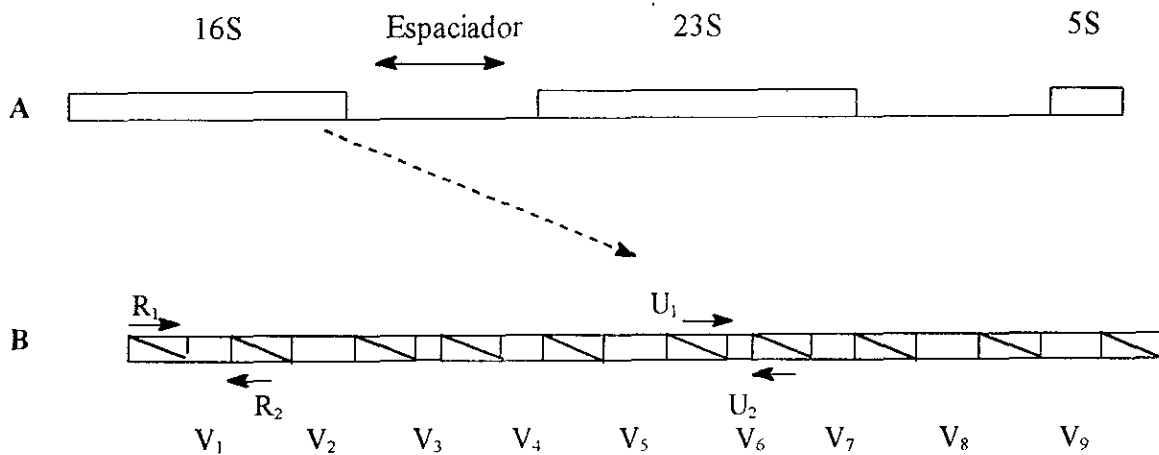


Figura 11. Representación esquemática del operón ARN ribosomal procariote. **A.** Cada operon de ARNr consiste de tres genes 16S, 23S y 5S. **B.** Gen 16S en el que se muestran las regiones constantes y las regiones variables (V₁-V₉). Se indica también la posición de los *primers* para amplificar las regiones variables V₁ (R₁ y R₂) y V₆ (U₁ y U₂)

La identificación taxonómica de los actinomicetos MIV2B(9), MIV2B(13) y MIV2(31) se llevó a cabo mediante la comparación de las secuencias de un fragmento del ADNr 16S de cada microorganismo con las descritas en la base de datos del GenBank y así determinar la homología de secuencias (porcentajes de identidad y de similitud).

4.3.2.1. Clasificación taxonómica mediante el análisis de las secuencias del ARN ribosomal 16 S del actinomiceto MIV2B(31).

La comparación de la secuencia del fragmento de ADNr 16 S (544 pares de bases) del actinomiceto MIV2B(31) con las depositadas en la base de datos del GenBank se presenta en el Apéndice I y los porcentajes de identidad y de similitud se resumen en el

Cuadro 25. De acuerdo con los porcentajes de similitud, este microorganismo podría correlacionar con las especies *Pseudonocardia* Str.PA151, (99.491 % de similitud), *Actinomadura madurae* (99.445 % de similitud), *Actinomadura yumaensis* (99.389 % de similitud), o *Actinomadura formosensis* (99.202 % de similitud). Cabe mencionar que esta última especie fue recientemente reclasificada en el género *Actinomadura* con base en evidencias de tipo quimiotaxonómicas y el análisis de las secuencias del ARNr 16S (Zhang *et al.*, 1998). Los resultados publicados por Zhang y colaboradores (1998) indicaron que los porcentajes de similitud entre *Thermomonospora* y *Actinomadura* oscilan en el intervalo de 88 a 96 %. La mayor analogía de secuencias se encontró con *T. formosensis* y los miembros del género *Actinomadura*, con un 96.5 % de similitud entre *T. formosensis* y *A. madurae*, especie tipo del género *Actinomadura*.

Cuadro 25. Porcentajes de similitud y de identidad de las secuencias del ADNr 16S del microorganismo MIV2B(31) comparadas con la base de datos de GenBank.

Espece	Porcentaje de similitud	Porcentaje de identidad
<i>Pseudonardiacae</i> str. PA151	99.491	97.964
<i>Actinomadura madurae</i>	99.455	97.820
<i>Actinomadura yumaensis</i>	99.389	97.963
<i>Actinomadura formosensis</i>	99.202	97.606
<i>Thermomonospora curvata</i>	97.319	95.71

Las secuencias del ARNr 16S del actinomiceto MIV2B(31) y de los microorganismo con los cuales se determinó homología de secuencias se emplearon para construir un árbol filogenético (Apéndice I) mediante el método de unión de vecinos (ver sección experimental, inciso 3.2.2.5.).

Los resultados antes descritos aunados a los obtenidos de los experimentos quimiotaxonómicos permiten proponer que el actinomiceto MIV2B(31) pertenece al género *Actinomadura*. Aparentemente, el actinomiceto MIV2B(31) es diferente a la especie *Actinomadura yumaensis* reportada previamente como único organismo productor de la maduramicina

4.3.2.2. Clasificación taxonómica mediante el análisis de las secuencias del ARN ribosomal 16S de los actinomicetos MIV2B(9) y MIV2B(13).

Siguiendo una estrategia similar a la señalada para el microorganismo MIV2B(31) se analizaron los resultados de la comparación de las secuencias de los actinomicetos MIV2B(9) y MIV2B(13). De acuerdo con los porcentajes de identidad resumidos en el Cuadro 26 para el actinomicetos MIV2B(9), este microorganismo presenta una mayor semejanza con *Streptomyces* cepa mp2b, *Streptomyces fumanus* y *Streptomyces* cepa mp2. De estos resultados se desprende que el actinomiceto MIV2B(9) pertenece al género *Streptomyces*.

En el caso del microorganismo MIV2B(13) el análisis preliminar del ARN 16S permitió evidenciar que este microorganismo pertenece al género *Streptomyces*. En el Cuadro 27 se resumen los porcentajes de identidad determinados como resultado de la comparación de las secuencias del microorganismo MIV2B(13) con las depositadas en la base de datos del GenBank. Estos resultados indican que el actinomiceto de estudio presenta un cien por ciento de identidad con *Streptomyces* cepa mp2b y con *Streptomyces* cepa mp2. Es evidente que los resultados quimiotaxonómicos discrepan de los resultados derivados del análisis de las secuencias del ARNr 16S. Por lo tanto es necesario secuenciar una mayor parte del gen para corroborar la taxonomía de este microorganismo. Dada esta

discrepancia, en el presente trabajo se designará a este microorganismo como actinomiceto MIV2B(13).

Cuadro 26. Porcentajes de similitud y de identidad de las secuencias del ADNr 16S del microorganismo MIV2B(9) comparadas con la base de datos de GenBank.

Especie	Porcentaje de similitud	Porcentaje de identidad
<i>Streptomyces</i> cepa mp2b	98.371	98.371
<i>Streptomyces fumanus</i>	98.242	98.242
<i>Streptomyces</i> cepa mp2	98.176	97.568
<i>Streptomyces malayensis</i>	97.839	97.250
<i>Nocardioides thermolilaceus</i>	97.441	97.441
<i>Streptomyces pallidus</i>	97.260	97.260
<i>Streptomyces</i> 11AG8	94.466	94.446

Cuadro 27. Porcentajes de similitud y de identidad de las secuencias del ADNr 16S del actinomiceto MIV2B(13) comparadas con la base de datos de GenBank.

Especie	Porcentaje de similitud	Porcentaje de identidad
<i>Streptomyces</i> cepa mp2b	100	100
<i>Streptomyces</i> cepa mp2	99.399	100
<i>Nocardioides thermolilaceus</i>	99.563	99.563
<i>Streptomyces fumanus</i>	99.271	99.563
<i>Streptomyces pallidus</i>	99.271	99.271
<i>Streptomyces malayensis</i>	98.684	99.123
<i>Streptomyces</i> 11AG8	98.834	98.834

4.4. Aislamiento y caracterización de los principios biodinámicos de los cultivos de las especies *Streptomyces* MIV2B(9), *Actinomadura* MIV2B(31) y el actinomiceto MIV2B(13).

4.4.1. Cultivo en mediana escala de los microorganismos *Streptomyces* MIV2B(9), *Actinomadura* MIV2B(31) y el actinomiceto MIV2B(13).

Con la finalidad de aislar los metabolitos responsables de la actividad biológica que presentaron los extractos derivados del cultivo en pequeña escala de *Streptomyces* MIV2B(9), *Actinomadura* MIV2B(31) y el actinomiceto MIV2B(13) se realizaron las fermentaciones de cada uno de los microorganismos en una mayor escala. El cultivo en mediana escala de *Streptomyces* (3.6 l) se realizó en matraces Fernbach de dos litros (29°C/160 rpm) y los cultivos de *Actinomadura* (10 l) y del actinomiceto MIV2B(13) (10 l) en jarras de fermentación de 14 litros (29°C/250 rpm/aereación 8-10 l/min). En los tres casos el medio de cultivo empleado fue el industrial de Arcamone. Los extractos orgánicos en mediana escala se prepararon utilizando el mismo procedimiento descrito para el cultivo en pequeña escala.

Para verificar la reproducibilidad del cultivo en mediana escala con respecto al correspondiente en pequeña escala, se comparó la actividad biológica y el perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de cada microorganismo.

La actividad biológica investigada en los extractos orgánicos derivados del cultivo de los microorganismos *Streptomyces* MIV2B(9) y *Actinomadura* MIV2B(31) fue la evaluación del efecto de los extractos microbianos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. En el caso del actinomiceto MIV2B(13), las evaluaciones biológicas incluyeron la determinación de la toxicidad de los extractos microbianos contra

El perfil cromatografico de los extractos microbianos se llevo a cabo mediante CCF y CLAE. Las condiciones cromatograficas empleadas para el análisis se especifican en los cromatogramas correspondientes, ilustrados en las Figuras 12, 13 y 14.

Los resultados de la actividad fitotóxica (Cuadro 28) y el perfil cromatográfico de los extractos orgánicos derivados del cultivo en pequeña y mediana escala de los microorganismos *Streptomyces* MIV2B(9) y *Actinomadura* MIV2B(31) (Figuras 12 y 13) permitieron determinar que no existen diferencias significativas entre estos cultivos.

Cuadro 28. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala de *Streptomyces* MIV2B(9) y *Actinomadura* MIV2B(31).

Extracto	Crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i>			
	CI ₅₀ (µg/ml)			
	Pequeña escala		Mediana escala	
Microorganismo	Caldo	Micelio	Caldo	Micelio
<i>Streptomyces</i> MIV2B(9)	11.61	124.86	12.19	130.83
<i>Actinomadura</i> MIV2B(31)	58.42	46.57	58.37	48.19

Por el contrario, los resultados de la determinación de la toxicidad para *A. salina* (Cuadro 29) y la citotoxicidad (Cuadro 30) en contra de 10 líneas celulares de los extractos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala del actinomiceto MIV2B(13) indicaron que se presentó una disminución en la actividad biológica cuando los extractos procedían del cultivo en mediana escala. Por otro lado, el perfil cromatográfico de ambos extractos (Figura 14) demostró que existen diferencias en su composición química.

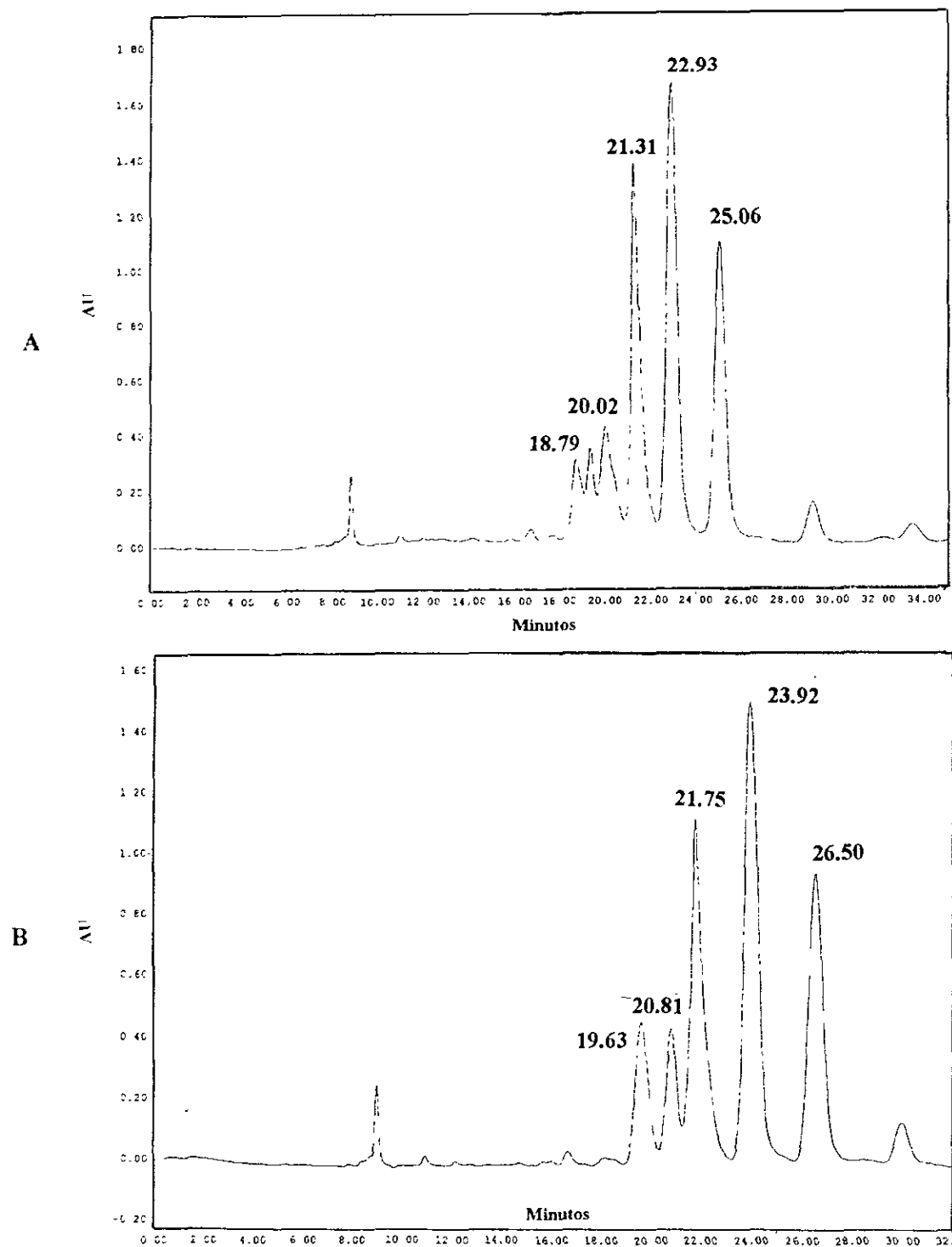


Figura 12. Perfil cromatográfico (CLAE) del extracto orgánico derivado del cultivo de *Sireptomycetes* MIV2B(9). Condiciones de análisis: Equipo Waters: Detector de UV (Waters 996 UV con arreglo de diodos). Longitud de onda λ 215 nm. Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 \times 3.9 mm, 125 A, 10 μ m). Fase móvil, Hex-iPrOH-MeOH (85:7.5:7.5) Flujo 0.35 ml/min. **A.** Cultivo en pequeña escala. **B.** Cultivo en mediana escala.

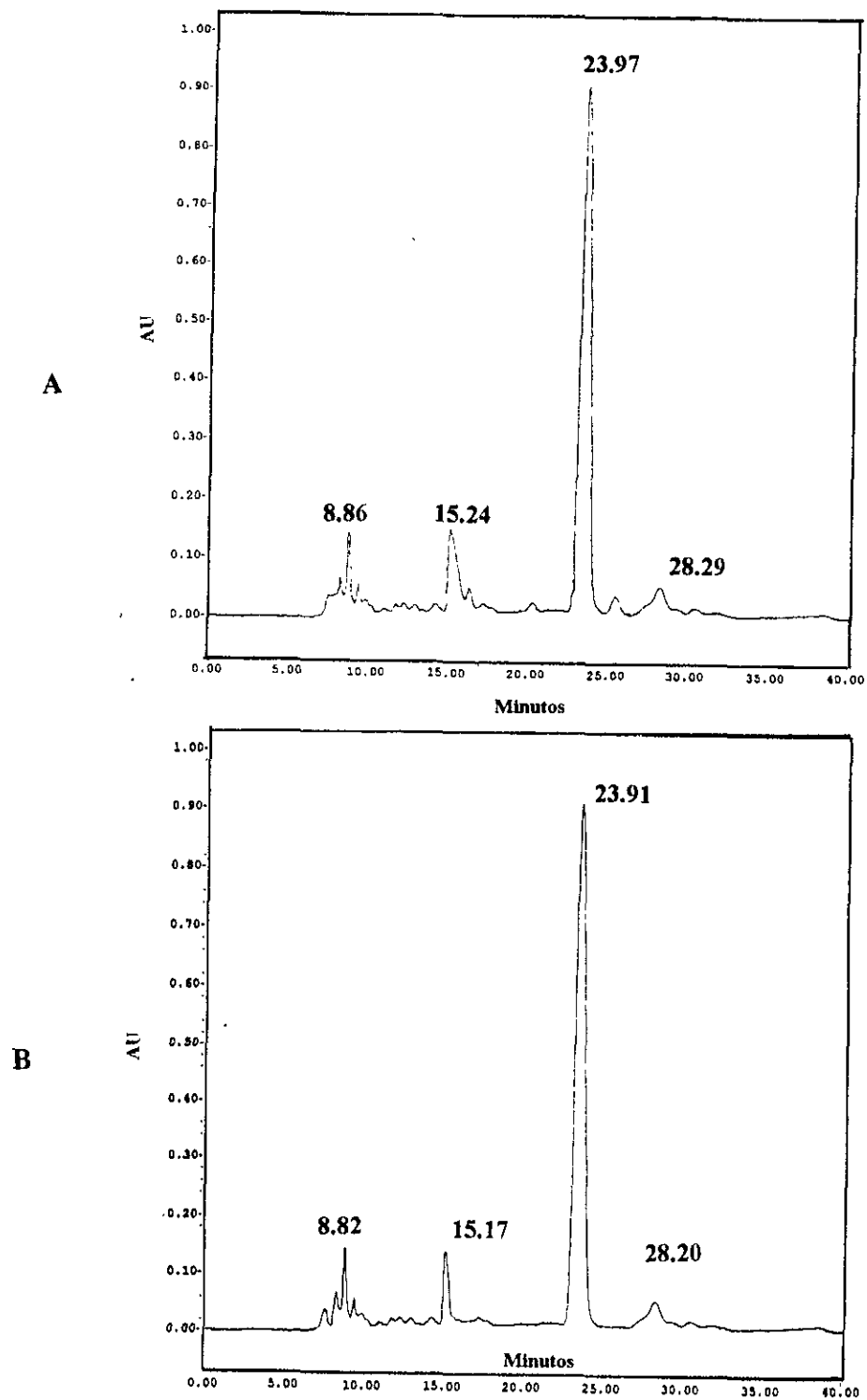


Figura 13. Perfil cromatográfico (CLAE) del extracto orgánico derivado del cultivo de *Actinomadura* MIV2B(31). Condiciones de análisis: Equipo Waters; Detector de UV (Waters 996 UV con arreglo de diodos). Longitud de onda λ 202 nm. Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 \times 3.9 mm, 125 A, 10 μ m). Fase móvil, Hex-*i*PrOH-MeOH (89:5.5:5.5). Flujo 0.35 ml/min. **A.** Cultivo en pequeña escala. **B.** Cultivo en mediana escala.

Cuadro 29. Toxicidad para *Artemia salina* de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala del actinomiceto MIV2B(13).

Extracto	Toxicidad para <i>A. salina</i>			
	CL ₅₀ (µg/ml)			
	Pequeña escala		Mediana escala	
Microorganismo	Caldo	Micelio	Caldo	Micelio
<i>Actinomyces</i> sp	0.19	5.70	1.59	11.92

Cuadro 30. Efecto citotóxico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala del actinomiceto MIV2B(13)

Extracto	Línea celular CE ₅₀ (µg/ml)									
	A-549	MCF-7	HT-29	BC1	Lu1	Col2	KB	KB-V (+VLB)	Kb-V (+VLB)	LNCap
	Pequeña escala			Mediana escala						
Caldo	<10 ⁻¹⁵	<10 ⁻¹⁵	<10 ⁻¹⁵	0.08	0.2	0.01	0.001	0.7	0.3	0.012
Micelio	ND	ND	ND	0.1	0.2	0.1	0.05	2.1	0.8	0.075
Control	0.00447	0.0897	0.0162	0.01	0.01	0.02	0.001	0.09	0.07	0.009

A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma humano de pecho), HT-29 (adenocarcinoma de colon), BC1. (carcinoma mamario), Lu1, (carcinoma de pulmón), Col2, (carcinoma de colon), KB, (carcinoma nasofaríngeo), KB-V (+VLB), (carcinoma nasofaríngeo resistente a vinblastina), LNCap (cáncer de próstata humano) Control: adriamicina

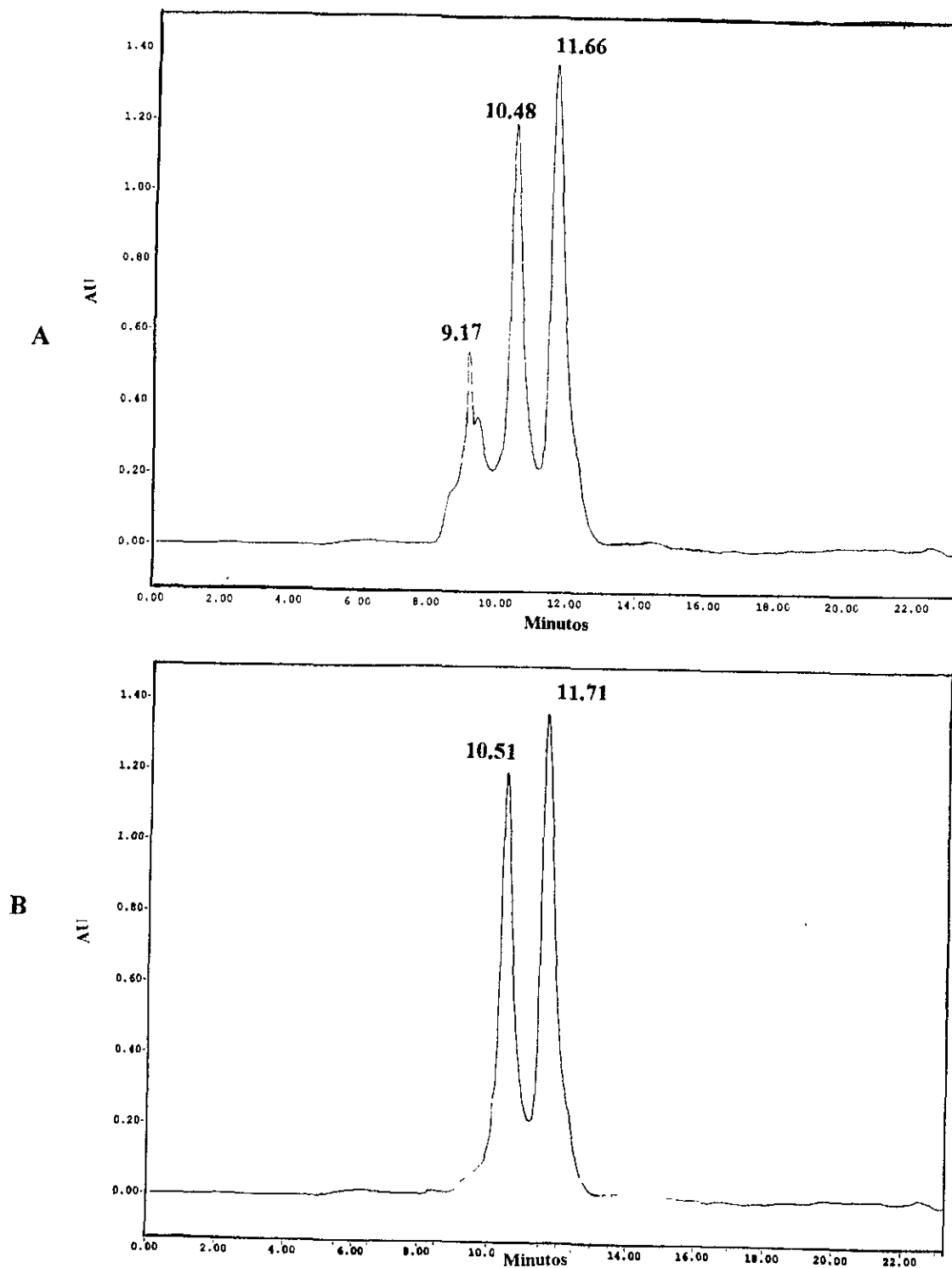


Figura 14. Perfil cromatográfico (CLAE) del extracto orgánico derivado del cultivo del actinomiceto MIV2B(13). Condiciones de análisis: Equipo Waters; Detector de UV (Waters 996 UV con arreglo de diodos). Longitud de onda λ 260 nm. Columna de fase reversa C-18 (Prep Nova-Pack HRC 18, 300 \times 3.9 mm, 60 A, 6 μ m). Fase móvil. Acetonitrilo. Flujo 0.25 ml/min.

A. Cultivo en pequeña escala. **B.** Cultivo en mediana escala.

4.4.2. Estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo de la especie fitotóxica *Actinomadura* MIV2B(31).

4.4.2.1. Aislamiento de los principios fitotóxicos del extracto derivado del cultivo de la especie *Actinomadura* MIV2B(31).

El extracto crudo combinado (8.66 g) derivado del cultivo de *Actinomadura* MIV2B(31) se sometió a una cromatografía en columna abierta utilizando como eluyentes mezclas de cloroformo y metanol con incrementos de polaridad. Este proceso condujo a la obtención de cinco fracciones primarias (F-1 a F-5). La actividad fitotóxica de las fracciones se evaluó determinando su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* como se describe en la sección experimental. Los resultados de estas evaluaciones (Cuadro 19) permitieron determinar que la actividad fitotóxica se concentraba en las fracciones F-2 a F-4.

La purificación por CLAE (Figura 15) de la fracción activa F-2 (5.35 g) permitió el aislamiento de la sal de sodio de la maduramicina (4.94 g) El rendimiento en relación al peso seco del extracto fue de 57.0 % (4.94 g/l)

4.4.2.2. Elucidación estructural de la maduramicina (199).

La maduramicina (199) se obtuvo en forma de cristales incoloros y presentó las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas resumidas en los Cuadros 31 y 32. La elucidación estructural del antibiótico se realizó mediante el análisis de los espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, DEPT, HMQC, HMBC, IR y del espectro de masas modalidad FAB $^-$.

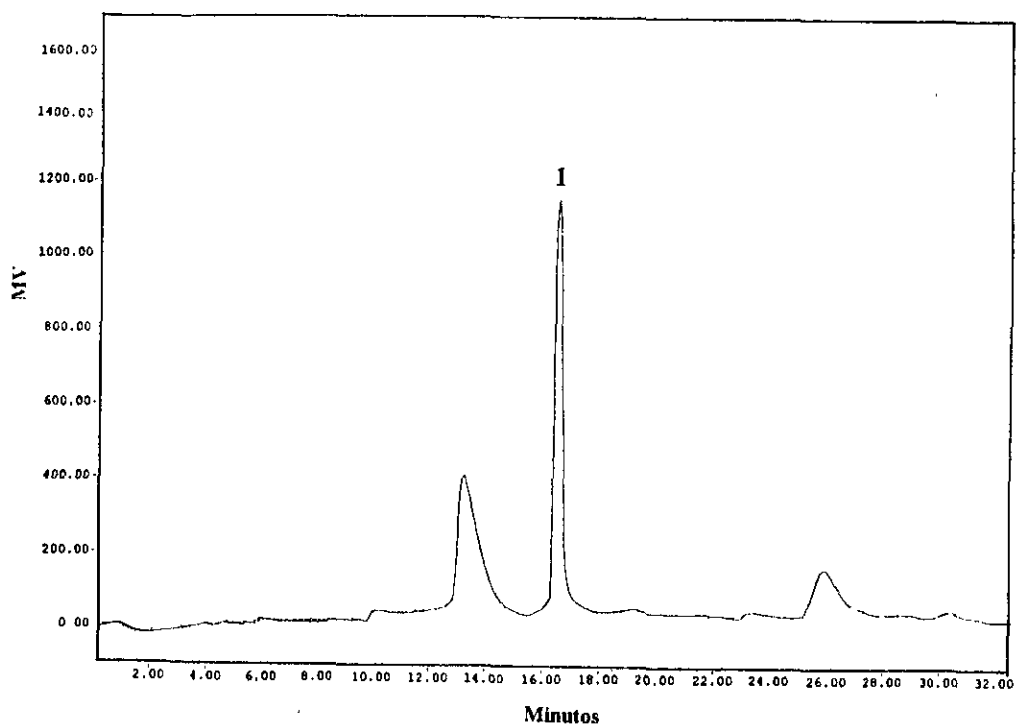
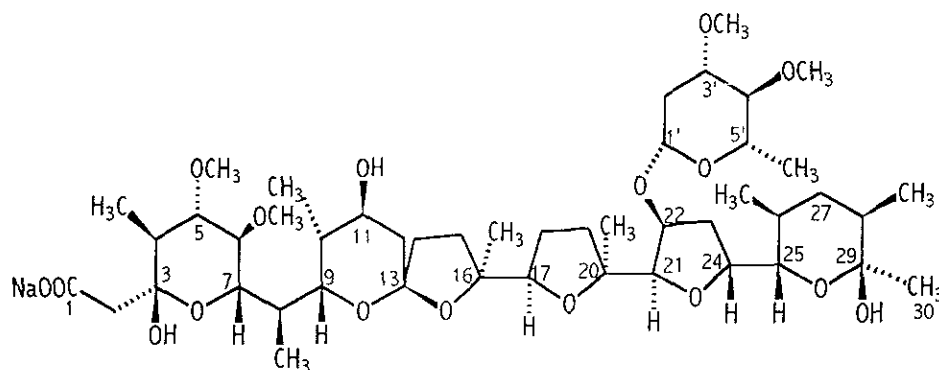


Figura 15. Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-2 derivada del extracto del cultivo de *Actinomadura MIV2B(31)*. Condiciones de análisis: Equipo Waters; Detector de índice de refracción. Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 X 19 mm, 125 A, 10 μ m). Fase móvil, Hexano-*i*PrOH-MeOH (89:5.5:5.5). Flujo 5.9 ml/min. 1; maduramicina (t_R 17.23 mn).

El espectro en el IR (Espectro 1) del producto presenta bandas de absorción para grupos hidroxilo (3269 cm^{-1}) y para un carbonilo de carboxilato (1614 cm^{-1}). La presencia de este grupo funcional se comprobó mediante la obtención del éster metílico (**213**) (Cuadros 33 y 34). Este último se generó por tratamiento del producto natural con una solución de ácido clorhídrico seguido de la metilación del ácido libre con una solución etérea de diazometano.

Cuadro 31. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la maduramicina.

199

p.f. 192-193° C

[α]²⁰ 0.051 (C· 1.0, CHCl₃)P.M. 939 uma EM-FAB⁺ (alcohol nitrobencílico)FM C₄₇H₇₉O₁₇ NaIR ν max (película, cm⁻¹): 3269, 2973, 2882, 1614, 1379, 1099

Espectro 1

EM FAB⁺, *m/z* (int. rel) 939 [M+Na], (54 %), 877 [M+Na -CO₂-H₂O], (100 %), 763 [877-C₆H₁₀O₂] (22 %), 735 [M+Na-C₉H₁₆O₄],(72 %), 701 [877- C₈H₁₆O₄],(13 %), 593 [877-C₁₃H₁₆O₇],(18 %), 535 [877- C₁₇H₂₆O₇],(28 %), 451 [877- C₂₂H₃₄O₈],(24 %), 23 [Na](78 %)

Espectro 2

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃). Cuadro 32

Espectro 5

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) Cuadro 32

Espectro 3

La fórmula molecular del producto **199** se estableció como C₄₇H₇₉O₁₇Na por espectrometría de masas modalidad FAB⁻ (Espectro 2) Esta fórmula molecular permite calcular ocho grados de insaturación El análisis conjunto de los espectros de RMN ¹³C (Espectro 3) y RMN ¹³C modalidad DEPT (Espectro 4) permitió identificar 47 señales de carbono y determinar el tipo de carbono que corresponde a cada una de las señales (Cuadro 36)

Cuadro 32. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de la maduramicina (**199**).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (m, J en Hz) ^a
1	179.3	_____
2	45.5	Ha: 2.5 (d, 1H, $J=12.5$); Hb: 2.16 (d, 1H, $J=12.5$)
3	97.7	_____
4	45.5	1.45, m
5	85.7	3.31, (dd, 1H, $J=10.25$, 8.5)
6	81.9	3.14 (dd, 1H, $J=9.5$ y 8.5)
7	67.4	3.7 (dd, 1H, $J=9.5$ y 3.0)
8	33.3	1.99, m
9	67.7	4.21 (dd, 1H, $J=10.75$ y 2.0)
10	33.6	1.8, m
11	70.0	3.94 (d, 1H, $J=2.5$)
12	33.8	Ha: 1.89 (dd, 1H, $J=14.5$ y 3.5); Hb: 1.62 (dd, 1H, $J=14.5$ y 2.0)
13	107.5	_____
14	39.0	Ha: 1.98, m; Hb: 1.7, m
15	33.4	Ha: 1.99, m; Hb: 1.72, m
16	84.6	_____
17	82.2	3.54, m
18	26.8	Ha: 1.7, m; Hb: 1.43, m
19	32.0	Ha: 2.32; m, Hb: 1.55, m
20	84.7	_____
21	86.8	4.1 (d, 1H, $J=3.5$)
22	75.5	4.41 (t, 1H, $J=4.0$)

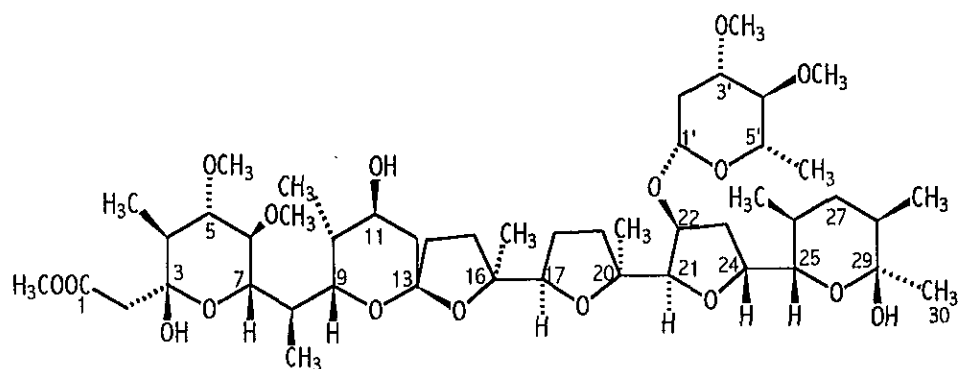
^a m, multiplicidad.

Cuadro 32. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de la maduramicina (**199**) (continuación).

Posición	δ_c	δ_H (m, J en Hz) ^a
23	30.2	Ha: 1.2, m; Hb: 1.8, m
24	79.7	4.43 (dd, 1H, J= 5.0 y 2.0)
25	72.9	3.95 (dd, 1H, J= 10.75 y 2.0)
26	33.3	1.21, m
27	36.4	Ha: 1.41, m; Hb: 1.31, m
28	39.9	1.44, m
29	98.0	_____
30	26.0	1.29 (s, 3H)
C-1'	95.8	4.39 (dd, 1H, J= 9.75 y 2.0)
C-2'	36.8	Ha: 2.16, m, Hb: 1.37, m
C-3'	80.8	3.27 (ddd, 1H J=11.5, 8.5 y 5.5)
C-4'	86.7	2.71 (t, 1H, J=9.0)
C-5'	71.3	3.18 (dq, 1H, J=9.0 y 6.0)
OMe-C-5	60.6	3.55 (s, 3H)
OMe-C-6	59.0	3.54 (s, 3H)
OMe-C-3'	57.1	3.42 (s, 3H)
OMe-C-4'	60.7	3.56 (s, 3H)
Me-4	11.9	1.01 (d, 3H, J=6.5)
Me-8	11.0	1.05 (d, 3H, J=6.5)
Me-10	10.4	0.85 (d, 3H, J=6.0)
Me-16	27.6	1.49 (s, 3H)
Me-20	22.4	1.21 (s, 3H)
Me-26	17.6	0.86 (d, 3H, J=6.5)
Me-28	16.9	0.92 (d, 3H, J=6.0)
Me-5'	17.9	1.27 (d, 3H, J=6.0)

^a m: multiplicidad

Cuadro 33. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del éster metílico de la maduramicina.



213

p.f. 112 °C

P.M. 953 uma EM-FAB⁺ (alcohol nitrobenílico)

FM C₄₈H₈₂O₁₇ Na

IR ν max (película, cm⁻¹): 2977, 2936, 2882, 1715, 1459, 1377, 1096.

EM FAB⁺, *m/z* (int. rel) 953 [M+Na] (11 %), 895 [M+Na-C₂H₃O₂+H] (4 %), 737 [895-C₈H₁₄O₃] (7%), 719 [895-C₈H₁₆O₄] (11 %), 59 (100%).

RMN ¹H (500MHz, CDCl₃). Cuadro 34.

RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃). Cuadro 34.

Por otro lado, el espectro de RMN ¹H (Espectro 5) presentó señales de protones unidos a C-O, señales de metinos, metilenos, metilos y metoxilos. Cabe destacar que en los espectros de RMN no se observaron señales de carbonos de tipo sp². En consecuencia, el índice de deficiencia de hidrógeno calculado para la fórmula molecular corresponde a anillos de naturaleza heterocíclica a juzgar por el número de carbonos unidos a oxígeno. La presencia de diversas señales de carbono unidos a oxígeno y de carbonos metílicos en el espectro de RMN ¹³C, así como las bandas de absorción en el IR para los grupos hidroxilo y carbonilo de carboxilato sugirió que este producto era de origen policétido.

Cuadro 34. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del éster metílico de la maduramicina (**213**).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (m, J en Hz) ^a
1	172.6	_____
2	43.1	Ha: 2.5 (d, 1H, $J=12.5$); Hb: 2.16 (d, 1H, $J=12.5$)
3	96.0	_____
4	45.6	1.45, m
5	85.0	3.31 (dd, 1H, $J=10.25, 8.5$)
6	81.6	3.14 (dd, 1H, $J=9.5$ y 8.5)
7	68.3	3.7 (dd, 1H, $J=9.5$ y 3.0)
8	33.3	1.99, m
9	68.3	4.21 (dd, 1H, $J=10.75$ y 2.0)
10	33.6	1.8, m
11	64.5	3.94 (d, 1H, $J=2.5$)
12	33.3	Ha: 1.89 (dd, 1H, $J=14.5$ y 3.5); Hb: 1.62 (dd, 1H, $J=14.5$ y 2.0)
13	107.5	_____
14	38.7	Ha: 1.98, m; Hb: 1.7, m
15	34.2	Ha: 1.99, m; Hb: 1.72, m
16	84.9	_____
17	82.0	3.54, m
18	27.1	Ha: 1.7, m; Hb: 1.43, m
19	31.9	Ha: 2.32, m; Hb: 1.55, m
20	83.0	_____
21	86.2	4.1 (d, 1H, $J=3.5$)
22	75.6	4.41 (t, 1H, $J=4.0$)
23	31.8	Ha: 1.2, m; Hb: 1.8, m
24	78.0	4.43 (dd, 1H, $J=5.0$ y 2.0)

^a m multiplicidad

Cuadro 34. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del éster metílico de la maduramicina (**213**) (continuación).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (m, J en Hz) ^a
25	73.6	3.95 (dd, 1H, $J=10.75$ y 2.0)
26	33.3	1.21, m
27	36.6	Ha: 1.41, m; Hb: 1.31, m
28	39.7	1.44, m
29	97.7	
30	95.8	1.29 (s, 3H)
C-1'	95.8	4.39 (dd, 1H, $J=9.75$ y 2.0)
C-2'	36.8	Ha: 2.16, m; Hb: 1.37, m
C-3'	80.8	3.27 (ddd, 1H $J=11.5, 8.5$ y 5.5)
C-4'	86.8	2.71 (t, 1H, $J=9.0$)
C-5'	71.3	3.18 (dq, 1H, $J=9.0$ y 6.0)
OMe-C-1	60.2	3.55 (s, 3H)
OMe-C-5	60.7	3.42 (s, 3H)
OMe-C-6	60.2	1.49 (s, 3H)
OMe-C-3'	56.8	3.56 (s, 3H)
OMe-C-4'	60.8	3.54 (s, 3H)
Me-4	11.9	0.92 (d, 3H, $J=6.0$)
Me-8	10.5	1.27 (d, 3H, $J=6.0$)
Me-10	10.5	0.85 (D, 3H, $J=6.0$)
Me-16	28.5	1.01 (d, 3H, $J=6.5$)
Me-20	23.23	1.05 (d, 3H, $J=6.5$)
Me-26	17.8	1.21 (s, 3H)
Me-28	14.6	0.86 (d, 3H, $J=6.5$)
Me-5'	17.9	0.85 (d, 3H, $J=6.0$)

^a m: multiplicidad

Dentro de los productos microbianos de origen policétido destacan los antibióticos de tipo poliéter. Desde el punto de vista biosintético estos antibióticos se generan por la ruta acetato-malonato a través de la condensación de unidades acetato, malonato, propionato y butirato. Estos antibióticos contienen en la molécula de tres a seis anillos de tetrahydrofurano y tetrahydropirano. Más de la mitad de los antibióticos poliéter conocidos tienen de una a cuatro funciones de éter cíclico formando sistemas mono y diespirocetálicos.

Estos productos se caracterizan por presentar en un extremo de la molécula un grupo carboxilo y en el otro una función hidroxilo. De manera adicional, todos poseen en su estructura varios grupos metilo y funciones de tipo cetálico y hemicetálico. Estos antibióticos se presentan en la naturaleza como ácidos libres o formando sales con cationes metálicos de los grupos I y II (Taylor *et al.*, 1982; Robinson, 1991).

Los antibióticos de tipo poliéter se dividen en cinco grupos estructurales de acuerdo a sus características espectroscópicas (RMN ^{13}C) (Seto y Otake, 1982). En el Cuadro 36 se resumen las características espectroscópicas de cada uno de los cinco grupos estructurales de los antibióticos de tipo poliéter

Las características del espectro de RMN ^{13}C del producto (Cuadro 35) permitió identificarlo como un miembro del grupo 3 muy similar a la lonomicina (217) (Seto y Otake, 1983). Los miembros de este grupo se caracterizan por presentar una estructura base conformada por tres anillos de tetrahydropirano (anillos A, B y F), tres anillos de tetrahydrofurano (anillos C, D y E) y un sistema espirocetal formado por los anillos B y C (216, Cuadro 36). Los miembros del grupo 3 presentan en su estructura de uno a cinco grupos metoxilo y de dos a tres funciones hemicetálicas.

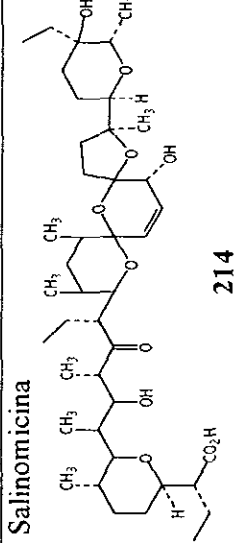
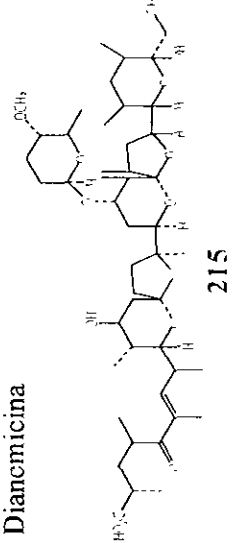
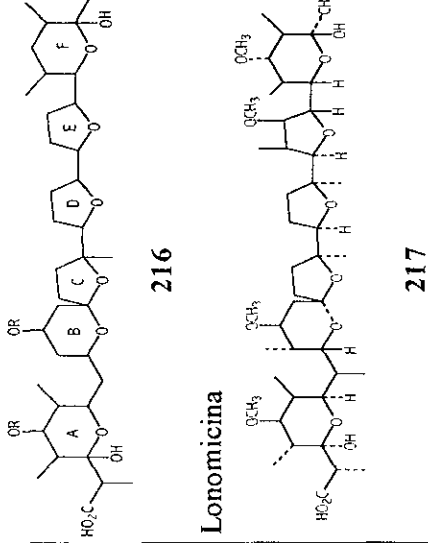
Cuadro 35. Análisis del espectro de RMN ¹³ C-DEPT de la maduramicina (199).

δ_c	Tipo de carbono
179.3	Carbonilo de carboxilato
107.5	Espirocetalico
97.7	Hemicetalico
96.9	Hemicetalico
95.8	Acetalico
13 señales en la región de 65 a 90	13 metinos unidos a oxígeno
4 señales que aparecen de 57 a 61	4 metoxilos
Una señal a 45.5*	un metino y un metileno
Una señal a 45.5	un metino y un metileno
8 señales de 25 a 42	8 metilenos
4 señales de 35 a 45	4 metinos
9 señales de 0 a 30	9 metilos

* señal equivalente

Una prueba adicional para comprobar que el producto pertenece al grupo 3 es la presencia del fragmento de m/z 877 en el espectro de masas (Espectro 2). Este fragmento constituye el pico base del espectro y corresponde a la pérdida concertada de dióxido de carbono y agua. Esta pérdida es característica de los antibióticos de tipo poliéter que contienen en su estructura un sistema hemicetal β al grupo carbonilo. El proceso de fragmentación propuesto se presenta en el Esquema 2 (Siegel *et al.*, 1987).

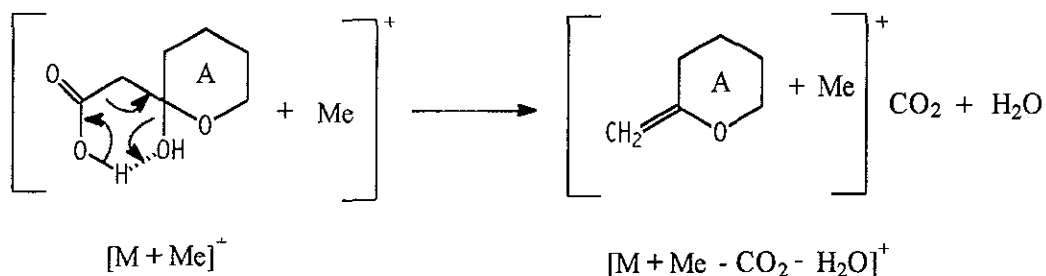
Cuadro 36. Características espectroscópicas (RMN ^{13}C) de los antibióticos de tipo poliéter.

Grupo	Característica estructural	Antibiótico tipo	Subgrupos y ejemplos
Grupo 1	Los miembros de este grupo se caracterizan por tener en su estructura una función cetona. En el espectro de RMN la señal aparece en el intervalo de 210-220 ppm	<p>Salinomicina</p>  <p style="text-align: center;">214</p>	<p>1a. Tipo lasalocida</p> <p>1b. Tipo Salinomicina</p> <p>1c. Tipo Noboritomicinas A y B</p> <p>1d. Tipo Lisocellin</p>
Grupo 2	Los antibióticos de este grupo poseen en su estructura una cetona α,β insaturada. Este ionóforo se identifica en el espectro de RMN por la presencia de señales aproximadamente a 206, 134 y 146 ppm	<p>Dianemicina</p>  <p style="text-align: center;">215</p>	NS
Grupo 3	Los antibióticos de este grupo, excepto monesina, tienen un esqueleto común (216). El espectro de resonancia presenta señales debidas a grupos metoxilo en el intervalo de 50-62 ppm. El número de funciones metoxilo varía de una (mutalomicina) a cinco (K-41A y K-41B). Algunos antibióticos de este grupo contienen carbonos de tipo hemiacetalico.	<p>Lonomicina</p>  <p style="text-align: center;">216</p> <p style="text-align: center;">217</p>	<p>3a. Lonomicina.</p> <p>3b. Carriomicina</p> <p>3c. Nigericina</p> <p>3d. Monesina</p>

Cuadro 36. Características espectroscópicas (RMN ¹³C) de los antibióticos de tipo poliéter (continuación).

Grupo	Característica estructural	Antibiótico tipo	Subgrupos
Grupo 4	Los miembros de este grupo se caracterizan por presentar carbonos de tipo hemiacetalico; no contienen sistemas espiro y carecen de funciones metoxilo.	<p>X-206</p> <p>218</p>	NS
Grupo 5	Los antibióticos de este grupo no presentan características comunes con los miembros de los otros grupos. Pueden contener anillos heterocíclicos con nitrógeno.	<p>A23187</p> <p>219</p>	NS

NS. No se proponen subgrupos.



Esquema 2. Proceso de fragmentación propuesto para la pérdida concertada de agua y dióxido de carbono en los antibióticos de tipo poliéter que contienen en su estructura un sistema hemiacetal β al grupo carbonilo. M, ión molecular; Me, metal.

Para determinar la estructura molecular del antibiótico se utilizó como modelo estructural a la Isonomicina (217). La comparación de las señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C del producto natural con la de este último permitió asignar prácticamente todos los carbonos. Posteriormente el análisis de los espectros de 1H - ^{13}C HMQC (Espectro 6) y 1H - 1H COSY (Espectro 7) permitió la asignación de los hidrógenos. El espectro de RMN 1H (Espectro 5) del producto es de naturaleza compleja y las señales más relevantes se describen a continuación

A campos bajos se observan las señales de los hidrógenos unidas a funciones oxigenadas. Así las señales para los protones H-22 aparece como un triplete centrado en δ_H 4.48 ($J=4.0$ Hz) y el protón anómero (H-1') aparece como un doble de dobles centrado en

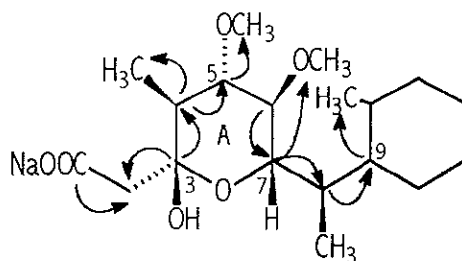
δ_H 4.39 ($J=9.75$, 2.0 Hz). Las señales correspondientes a los protones de los metinos unidos a los oxígenos de los anillos heterocíclicos y al hidroxilo aparecen en δ_H 4.43 (H-24), δ_H 4.2 (H-9), δ_H 4.1 (H-21), δ_H 3.95 (H-25), δ_H 3.7 (H-7), δ_H 3.54 (H-17) δ_H 3.94 (H-11). En δ_H 3.42, 3.54, 3.55 y 3.56 se observan cuatro singuletes asignables a los metoxilos ubicados en las posiciones C-3', C-6, C-5 y C-4', respectivamente. Por último, las señales de los metinos unidos a los grupos metoxilo aparecen en δ_H 3.31, 3.14, 3.27 y 2.71 asignados a H-5, H-6, H-3' y H-4', respectivamente.

Los protones del metileno correspondientes a C-2 se observaron como un sistema AB en δ_H 2.5 y 2.16 ($J=12.5$ Hz). El resto de los metilenos que forman parte de los anillos heterocíclicos aparecen como multipletes en el intervalo de δ_H 2.3-1.2.

A campos altos se observaron tres singuletes en δ_H 1.49, 1.29 y 1.21 asignables a los metilos CH₃-16 CH₃-30 y CH₃-20 y seis dobletes en δ_H 1.27, 1.01, 1.05, 0.92, 0.86 y 0.85 correspondientes a los metilos unidos a los grupos metino de las posiciones C-5, C-4, C-8, C-28, C-26 y C-10, respectivamente.

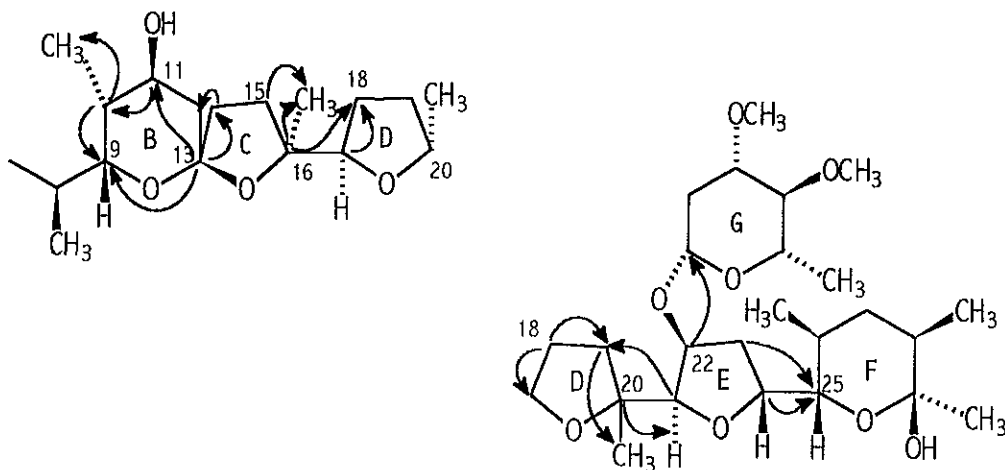
Para establecer la estructura plana del antibiótico, el análisis del espectro de ¹³C-¹H HMBC (Espectro 8) fue de gran utilidad y permitió establecer las estructuras parciales observadas en el Cuadro 37. La integración de las mismas permitió proponer que el compuesto es la maduramicina (199) (Liu *et al.*, 1981; 1982; Labeda *et al.*, 1983; Rajan *et al.*, 1984; McGahren *et al.*, 1986; Ellestad *et al.*, 1986; Tsou *et al.*, 1987). Finalmente, el producto se identificó como tal de manera inequívoca mediante cristalografía de rayos X. En la Figura 16 se presenta una vista estereoscópica de la sal de sodio de la maduramicina.

Cuadro 37. Conectividades C-H de la maduramicina (199).



δ_c	δ_H (m, <i>J</i> en Hz) ^a
1 (179.3)	H _{2a} (2.5, d, <i>J</i> 12.5). H _{2b} (2.16, d, <i>J</i> 12.5).
2 (45.5)	
3 (97.7)	H _{2a} , H _{2b} , CH-4 (1.45, m), CH ₃ -4 (1.0, d, <i>J</i> 6.5)
4 (45.5)	CH ₃ -4, CH-5 (3.3, dd, <i>J</i> 8.5, 10.5)
5 (85.7)	CH-6 (3.14, dd, <i>J</i> 8.5, 9.5), CH ₃ -4, OCH ₃ -5 (3.55), OCH ₃ -6 (3.56)
6 (82.0)	OCH ₃ -6, CH-7 (3.7, dd, <i>J</i> 3.0, 9.5)
7 (67.2)	CH-6, CH ₃ -8 (1.45, d, <i>J</i> 6.5), OCH ₃ -6
8 (33.3)	CH-9 (4.21, dd, <i>J</i> 2.0, 10.75), CH-7 (3.7, dd, <i>J</i> 3.0, 9.5)
9 (67.7)	CH ₃ -10 (0.85, d, <i>J</i> 7.0), CH-11 (3.9, da, <i>J</i> 2.5), CH-8 (1.99, m), CH ₃ -8 (1.45, d, <i>J</i> 6.5)
CH ₃ -4 (12.0)	CH-4
OCH ₃ -5 (60.6)	CH-5
OCH ₃ -6 (59.0)	CH-6, CH-7
CH ₃ -8 (11.0)	CH-8

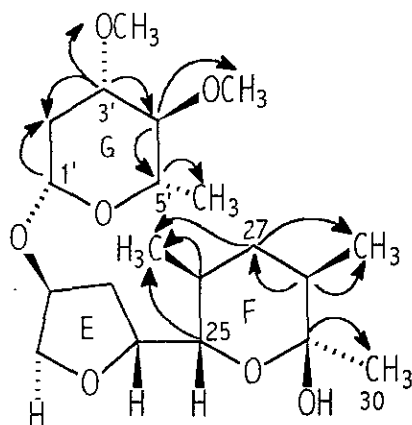
^a m: multiplicidad

Cuadro 37. Conectividades C-H de la maduramicina (199) (continuación).

δ_c	δ_H (m, J en Hz) ^a
10 (33.6)	CH-9 (4.21, dd, J 2.0, 10.75), CH ₃ -10, H _{12a} (1.88, dd, J 3.5, 14.5), H _{12b} (1.62, dd, J 2.0, 14.5)
11 (70.0)	CH-10, CH ₃ -10
12 (33.8)	
13 (107.5)	CH-9, CH-11, H _{12b} (1.62, dd, J 2.0, 14.5), H _{15a} (1.96, m), H _{15b} (1.72, m), CH-14
14 (39.0)	H _{12a} , H _{15a} , H _{15b}
15 (33.4)	H _{14b} (1.7, m), CH ₃ -16 (1.49)
16 (84.6)	H _{18b} (1.43, m), H _{14a} (1.98, m), CH ₃ -16
17 (82.2)	H _{18b} , H _{19b} (1.55, dd, J 4.5, 9.0), H _{14b} , CH ₃ -16
CH ₃ -10 (10.4)	CH-10
18 (26.8)	H _{19a} (2.32, td, J 2.5, 11.0), C-17
19 (32.0)	CH ₃ -20 (1.2), CH-21 (4.1, d, J 3.5)
20 (84.5)	CH-21 (4.1, d, J 3.5), H _{18a} (1.7, m), H _{18b} , H _{19a} , CH ₃ -20
21 (86.8)	H _{19a} , H _{23b} (1.8, m), CH ₃ -20
22 (75.1)	H _{23b} (1.8), CH _{1'} (4.4, dd, J 2.0, 9.75)
23 (30.2)	CH-21, CH-25 (3.97, dd, J 2.0, 10.75)
24 (79.9)	H _{23a} (2.18, m), CH-22 (4.47, t, J 4.0), CH-25

^a m: multiplicidad

Cuadro 37. Conectividades C-H de la maduramicina (199) (continuación).



δ_C	δ_H (m, J en Hz) ^a
25 (72.9)	H _{23a} , CH ₃ -26 (0.87, d, J 6.5)
26 (33.3)	CH ₃ -26, H _{27b} (1.42, m)
27 (36.4)	CH ₃ -28 (0.92, d, J 6.5), CH ₃ -26
28 (39.9)	H _{27a} (1.31, m), H _{27b} , CH ₃ -28, CH ₃ -30 (1.28)
29 (96.9)	CH ₃ -28, CH ₃ -30
30 (26.03)	
CH ₃ -26 (17.6)	CH-26
CH ₃ -28 (16.9)	CH-28
1' (95.8)	H _{2'a} (2.16), H _{2'b} (1.37, dd J 2.0, 12.5)
2' (36.8)	CH-1' (4.4, dd, J 2.0, 9.75)
3' (80.8)	H _{2'a} , H _{2'b} , CH-4' (2.7, t, J 9.0), OCH ₃ -3' (3.42)
4' (85.6)	CH-5' (3.18, dq, J 6.0, 9.0), OCH ₃ -4' (3.55), CH ₃ -5' (1.29, d, J 6.0),
5' (71.3)	CH-4', CH ₃ -5', OCH ₃ -4'
OCH ₃ -4' (60.75)	CH-4
OCH ₃ -3' (57.08)	CH-3' (3.18, ddd, J 5.0, 8.75, 11.5)
CH ₃ -5' (17.87)	CH-5'

^a m: multiplicidad

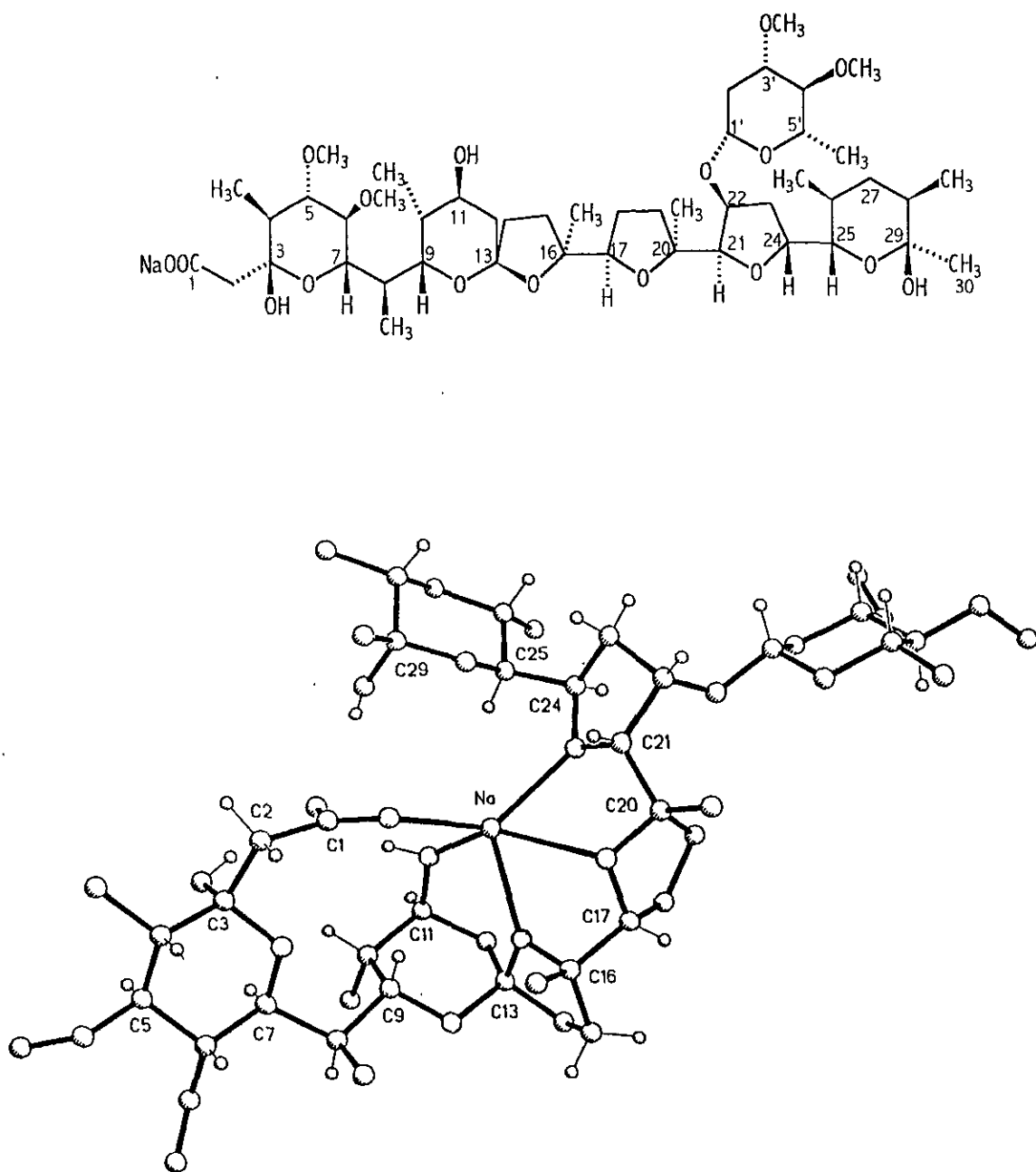


Figura 16. Estructura y vista estereoscópica de la sal de sodio de la maduramicina.

4.4.3. Estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo de la especie fitotóxica *Streptomyces* MIV2B(9).

4.4.3.1. Aislamiento de los principios fitotóxicos del extracto derivado del cultivo de la especie *Streptomyces* MIV2B(9).

El extracto fitotóxico (800 mg) derivado del cultivo de *Streptomyces* MIV2B(9) se sometió a una cromatografía en columna abierta utilizando como eluyentes cloroformo y mezclas de cloroformo y metanol con incrementos de polaridad. Este proceso condujo a la obtención de 14 fracciones primarias (F-1 a F-14). La actividad fitotóxica de las fracciones primarias se evaluó mediante un método bioautográfico empleando como semilla de prueba *Amaranthus hypochondriacus*. El análisis bioautográfico de las fracciones primarias permitió determinar que la actividad biológica se concentraba en las fracciones F-5, F-7 y F-8 (Cuadro 17), por lo que se procedió a la separación de los constituyentes de las fracciones activas.

La fracción F-5 (106.7 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta utilizando como eluyentes hexano y mezclas de hexano y acetato de etilo con incrementos de polaridad. Este proceso condujo a la obtención de siete fracciones secundarias (F-5₍₁₎ a F-5₍₇₎). El análisis bioautográfico de las fracciones secundarias permitió determinar que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción F-5₍₃₎ (Cuadro 18). La purificación por CLAE (Figura 17) de la fracción activa F-5₍₃₎ (9.2 mg) permitió el aislamiento del ácido fenilacético (**220**). El producto se aisló como un sólido blanco (5.0 mg) con punto de fusión de 76-77° C, su rendimiento en relación al peso seco del extracto fue de 0.625 % (1.39 mg/l)

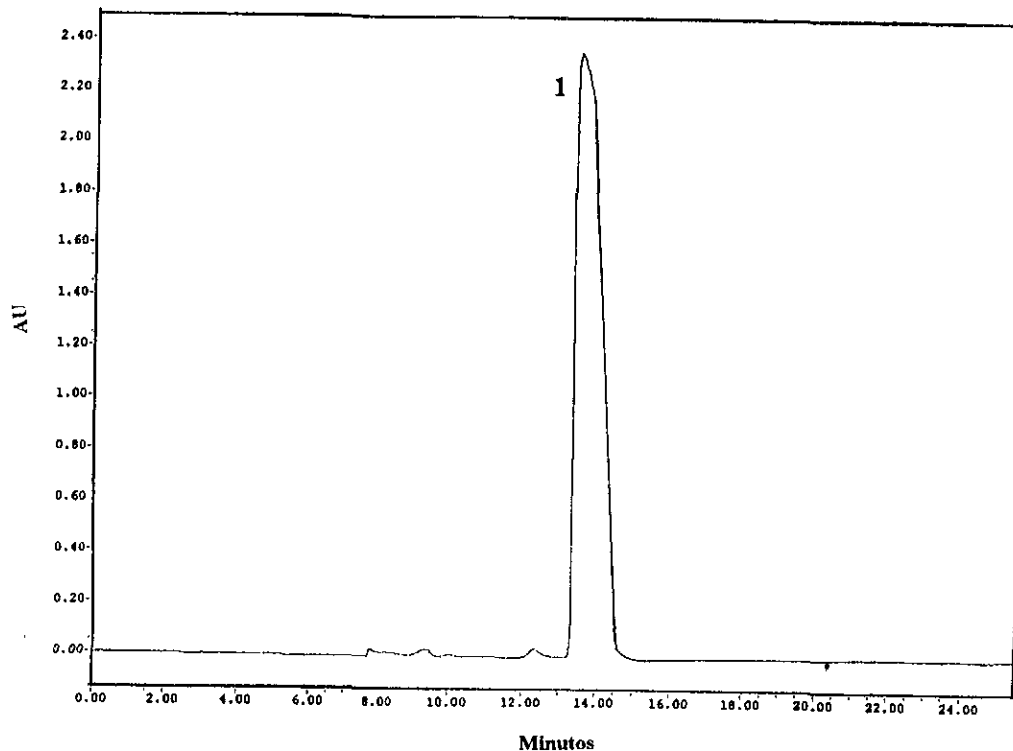


Figura 17. Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-5₍₃₎ derivada del extracto del cultivo de *Streptomyces* MIV2B(9). Condiciones de análisis: Equipo Waters; Detector de UV, λ 215 nm. Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 \times 19 mm, 125 A, 10 μ m). Fase móvil, Hexano-*i*PrOH-MeOH (85:7.5:7.5); Flujo 8.3 ml/min. 1; ácido fenilacético (t_R 13.7 min).

La fracción activa F-7 (111.2 mg) estaba constituida por un producto mayoritario (antibiótico X-206) que se purificó por CLAE (Figura 18). El antibiótico X-206 (**218**) se obtuvo como un sólido blanco (28.3 mg) con punto de fusión de 185-187° C. El rendimiento del producto en relación al peso seco del extracto fue de 3.54 % (7.86 mg/l).

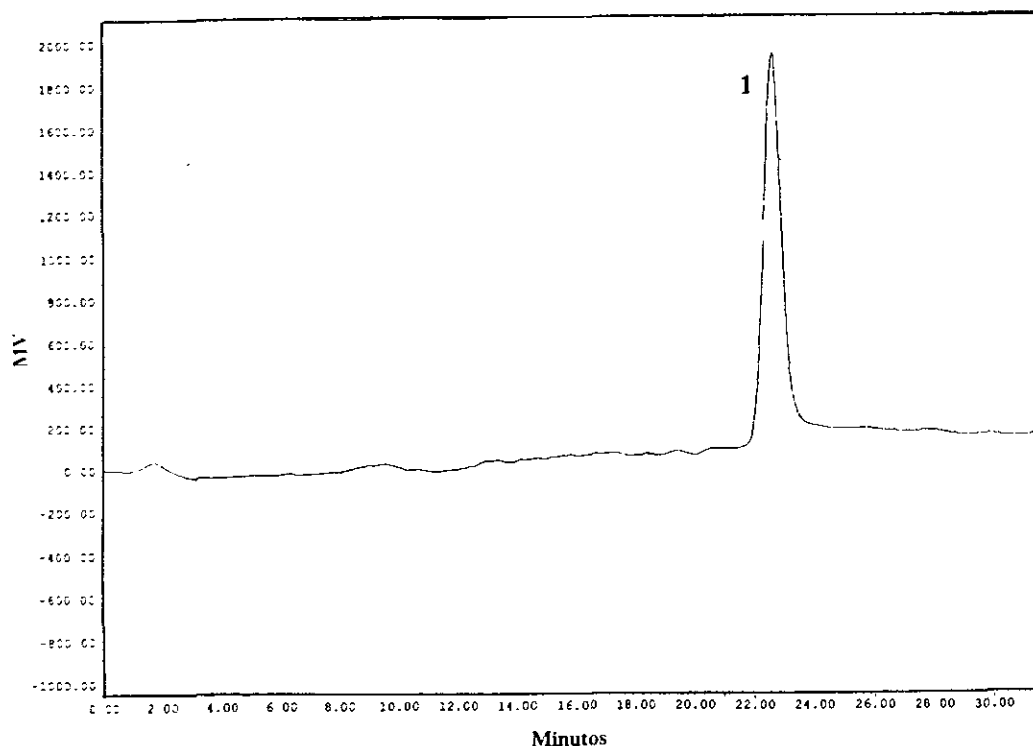


Figura 18. Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-7 derivada del extracto del cultivo de *Streptomyces* MIV2B(9). Condiciones de análisis Equipo Waters; Detector de índice de refracción. Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300×19 mm, 125 A, $10 \mu\text{m}$). Fase móvil, Hexano-iPrOH-MeOH (89:5.5:5.5); Flujo 5.9 ml/min 1: antibiótico X-206 (t_R 22.63 min).

La separación por CLAE de la fracción F-8 (82.4 mg) permitió la obtención de una mezcla constituida por tres amidas (Figura 19). Cromatografías sucesivas de la mezcla de amidas permitieron la separación en forma pura de la *S* (+) 2-metilbutanamida (**222**) (5.0 mg), la 2-metilpropanamida (**223**) (20.0 mg) y la fenilacetamida (**224**) (4.0 mg). Estos productos se aislaron como sólidos blancos con puntos de fusión de $104\text{-}107^\circ\text{C}$, $111\text{-}114^\circ\text{C}$ y $148\text{-}151^\circ\text{C}$, respectivamente. El rendimiento en relación al peso seco del extracto de

cada una de las amidas fue de 0.625 % (1.39 mg/l), 2.5% (5.6 mg/l) y 0.5 % (1.11 mg/l), respectivamente.

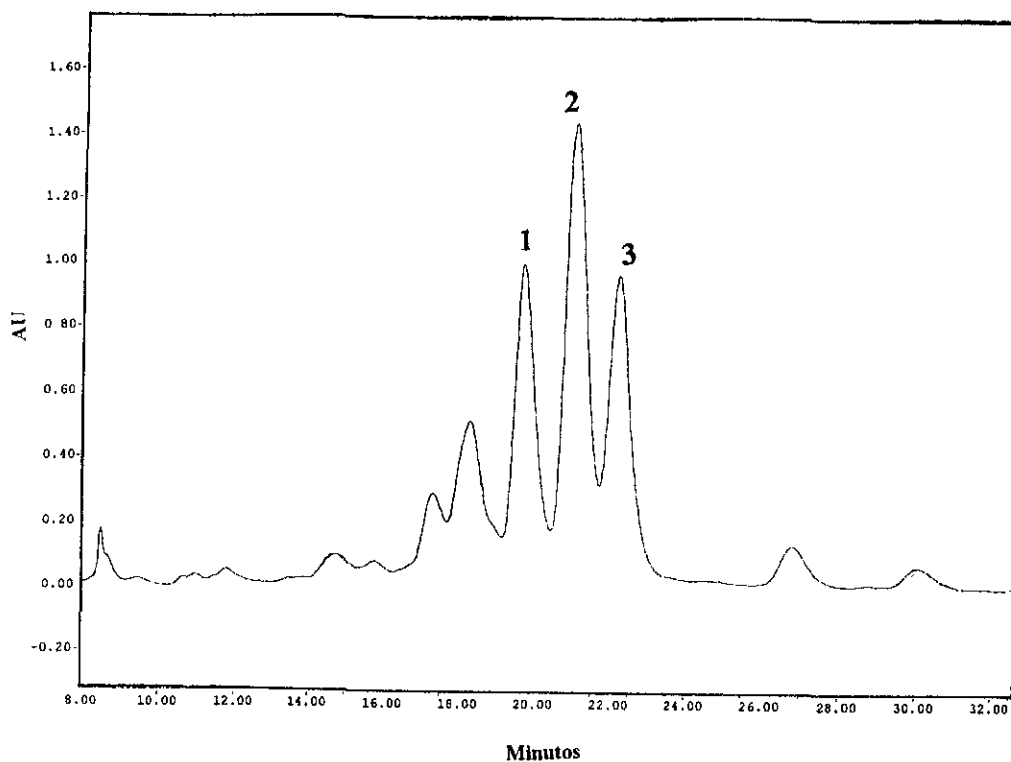


Figura 19. Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-8 derivada del extracto del cultivo de *Streptomyces* MIV2B(9). Condiciones de análisis: Equipo Waters; Detector de UV, λ , 215 nm. Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 \times 19 mm, 125 A, 10 μ m). Fase móvil, Hexano-*i*PrOH-MeOH (85:7.5:7.5); Flujo 5.9 ml/min 1; *S* (+) 2-metilbutananida, 2; 2-metilpropananida, 3 fenilacetamida

Por último y aún cuando la fracción F-5₍₁₎ (80 mg) no presentó un efecto inhibitor significativo sobre el crecimiento vegetal en el análisis bioautográfico, se decidió identificar los constituyentes individuales mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). El cromatograma generado por la fracción F-5₍₁₎ (Figura 20) demostró la presencia de cinco constituyentes mayoritarios (Cuadro 38).

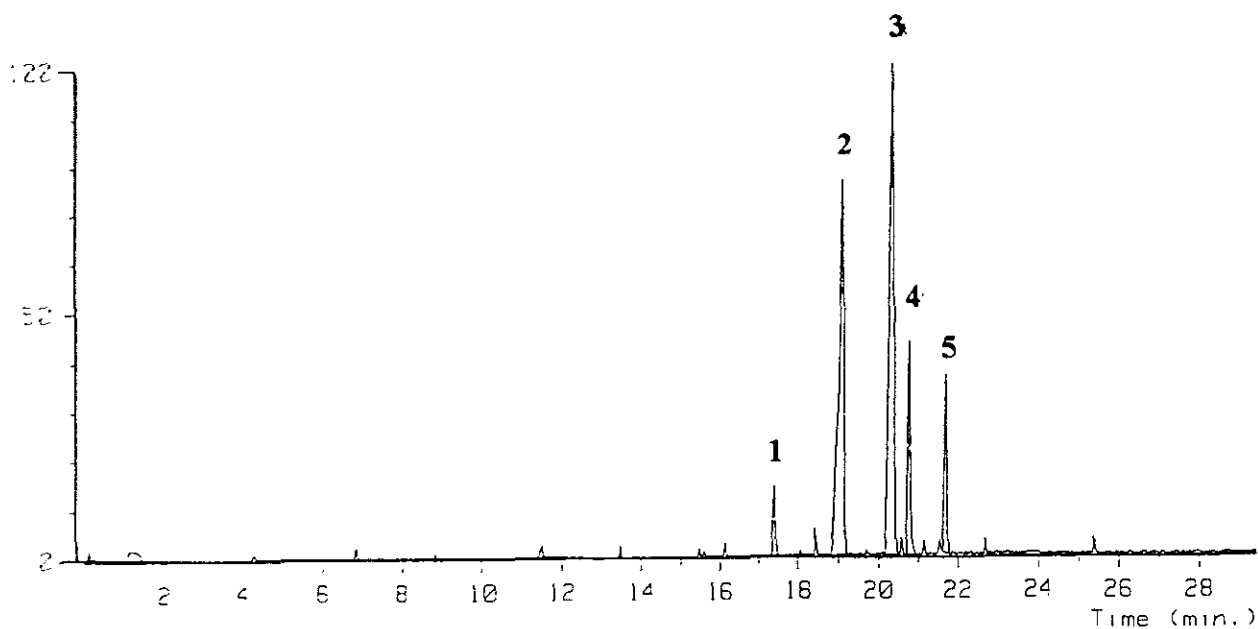


Figura 20 Cromatograma de gases acoplado a la espectrometría de masas (CG-EM) de la fracción F-5₍₁₎ derivada de la fracción primaria F-5 del cultivo de *Streptomyces* MIV2B(9). Condiciones cromatográficas: columna capilar, DB-1 (30 m, 0.25 mm D.I., 0.25 μm); temperatura de la columna, 120→280 °C/min; gas acarreador, helio (30 cm/seg; 2 ml/min); tamaño de la muestra 0.015 mg/μl. **1**; F-5_(1A), **2**; F-5_(1B), **3**; F-5_(1C), **4**; F-5_(1D), **5**, F-5_(1E).

Cuadro 38. Constituyentes de la fracción secundaria F-5₍₁₎

Constituyente	Tiempo de retención (min.)	Abundancia relativa (%)	Fórmula molecular	Ion molecular
F-5 _(1A)	17.43	3.22	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228
F-5 _(1B)	19.13	35.52	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242
F-5 _(1C)	20.38	42.37	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
F-5 _(1D)	20.78	10.72	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
F-5 _(1E)	21.70	8.18	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270

Los productos de mayor abundancia en la mezcla fueron F-5_(1B) (35.52 %) y F-5_(1C) (42.37 %). El análisis detallado de sus espectros de masas permitió determinar que estos componentes son ácidos grasos de cadena lineal de 15 y 16 átomos de carbono. La purificación de F-5_(1B) y F-5_(1C) mediante CLAE (Figura 21) permitió el aislamiento de los ácidos *S* (+) 12-metiltetradecanoico (**225**) (25.3 mg) y 14-metilpentadecanoico (**226**) (32.0 mg). Los productos se obtuvieron como sólidos blancos de apariencia cerosa con puntos de fusión de 24-26° C y 62-63° C, respectivamente. El rendimiento en relación al peso seco del extracto de los ácidos *S* (+) 12-metiltetradecanoico y 14-metilpentadecanoico fueron de 3.16 % (7.0 mg/l) y 4.0 % (8.9 mg/l), respectivamente.

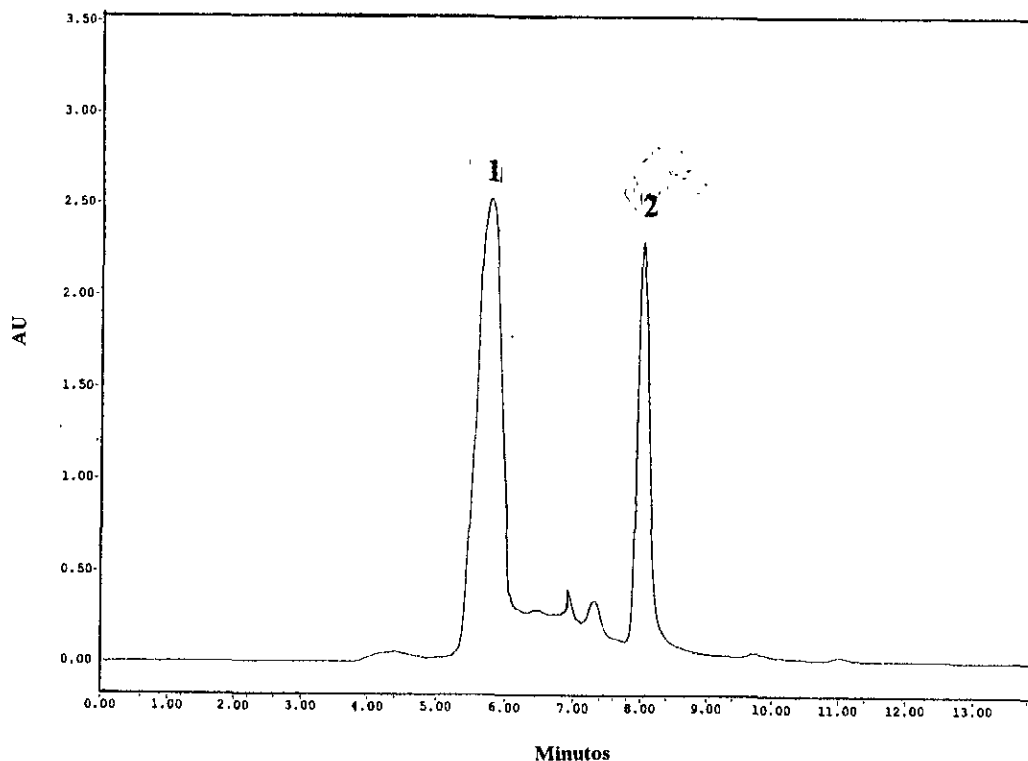


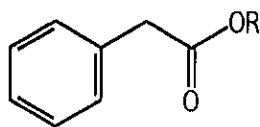
Figura 21. Cromatograma de líquidos (CLAE) de la fracción F-5₍₁₎ derivada de la fracción primaria F-5 del cultivo de *Streptomyces* MIV2B(9). Condiciones de análisis: Equipo Waters; Detector de UV, λ , 202 nm Columna C₁₈ (Waters, Prep Nova-Pack, HRC18, 300 × 19 mm, 60 Å, 6 μ m). Fase móvil, acetonitrilo:agua (60:40), Flujo 7.1 ml/min. 1; ácido *S* (+) 12-metiltetradecanoico, (t_R 5.82 min), 2, ácido 14-metilpentadecanoico (t_R 8.12 min).

4.4.3.2. Elucidación estructural los principios fitotóxicos del extracto derivado del cultivo de la especie *Streptomyces* MIV2B(9).

4.4.3.2.1. Elucidación estructural del ácido fenilacético (220).

El ácido fenilacético (220) se aisló como un polvo blanco con punto de fusión de 76-77° C. El espectro en el IR (Espectro 9) presenta bandas de absorción para grupos hidroxilo (3092-2924 cm^{-1}) y carbonilo de ácido conjugado (1699 cm^{-1}). La fórmula molecular del compuesto se estableció como $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$ mediante espectrometría de masas por impacto electrónico. Esta fórmula permite calcular cinco grados de insaturación de los cuales cuatro se asignan a un anillo bencénico y el otro al carbonilo evidenciado en el espectro en el IR. La presencia de las señales de m/z 91 y 92 en el espectro de masas, correspondiente al ion tropilio confirma la presencia del anillo aromático (Espectro 10). El espectro de RMN ^{13}C (Espectro 11) presenta seis señales asignables a un carbonilo de ácido (δ_{C} 178.09), un metileno bencílico (δ_{C} 41.03), un carbono aromático cuaternario (δ_{C} 133.18) y a tres señales de metinos aromáticos (δ_{C} 129.35, 128.63 y 127.34) dos de las cuales son señales equivalentes. En el espectro de RMN ^1H (Espectro 12) se observa un multiplete a δ_{H} 7.32 que integra para cinco hidrógenos asignables a los protones del anillo aromático y un singulete a δ_{H} 3.53 que integra para dos protones correspondientes al metileno bencílico. Las constantes espectroscópicas (Cuadro 39) se encontraron en perfecta armonía con las previamente descritas para el ácido fenilacético (Johns *et al.*, 1969; Scott, 1972, Harrison *et al.*, 1984, Probst *et al.*, 1987).

Cuadro 39. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido fenilacético.



220; R=H

221; R=CH₃

p.f. 76-77 °C

P.M. 136 una EMIE

FM C₈H₈O₂

IR ν max (película, cm⁻¹) 3092, 3032, 2964, 2924, 1699, 1407, 1228 Espectro 9

EMIE m/z (int. rel.): 136 [M]⁺ (98%), 92 [M-CO₂]⁺ (60%), 91 [M-CO₂H] (100%) Espectro 10

RMN ¹H (300 MHz): 7.32 (5H, m), 3.64 (2H, s) Espectro 12

RMN ¹³C (75 MHz): 178.09, 133.18, 129.35, 128.63, 127.34, 41.03 Espectro 11

4.4.3.2.2. Elucidación estructural el antibiótico X-206 (218).

La elucidación estructural del antibiótico **218** se realizó mediante el análisis de los espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT, HMQC, HMBC, IR del espectro de masas modalidad FAB⁺ empleando una estrategia similar a la de maduramicina. Este análisis permitió proponer que el metabolito corresponde al antibiótico X-206, aislado previamente de *Streptomyces* X-206. Cabe destacar, que este producto ocupa una posición de importancia histórica como uno de los tres primeros poliéter con propiedades ionóforas descubierto hace casi 50 años (Berger *et al.*, 1951; Blount y Westley, 1975; Seto *et al.*, 1979; Evans *et al.*, 1988). Esta investigación constituye la segunda descripción del aislamiento de este producto a partir de una fuente natural.

La identificación inequívoca de este producto se realizó mediante un análisis de difracción de rayos X. En la Figura 22 se presenta una vista estereoscópica de la sal de sodio del antibiótico X-206 y en los Cuadros 54 y 55 del Apéndice II se presentan sus constantes espectroscópicas y espectrométricas así como los espectros correspondientes.

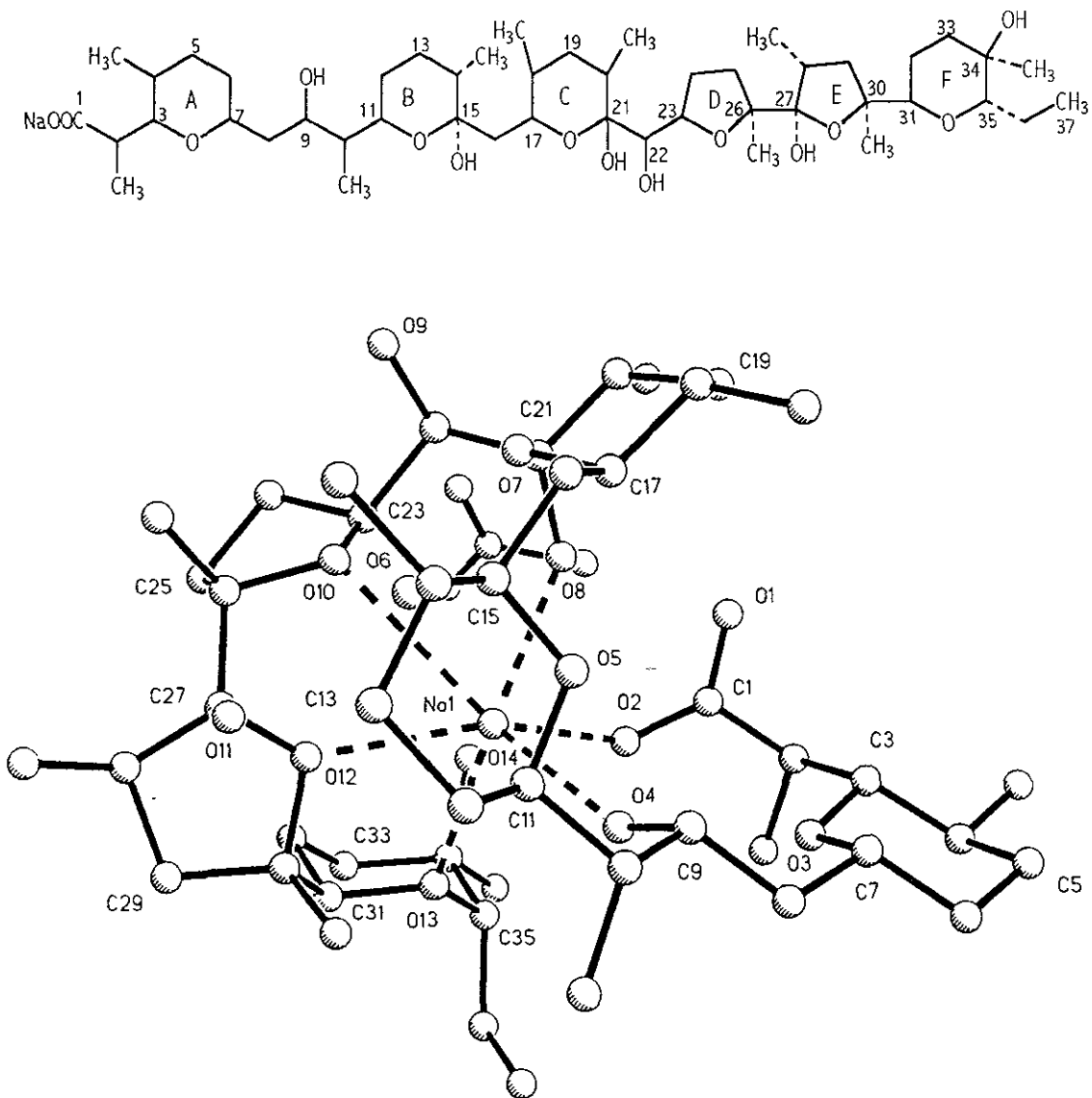


Figura 22. Estructura y vista estereoscópica de la sal de sodio del antibiótico X-206.

4.4.3.2.3. Elucidación estructural la *S* (+) 2-metilbutanamida (222), la 2 metilpropanamida (223) y la fenilacetamida (224).

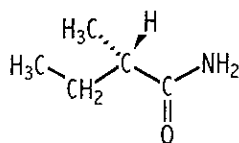
Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la *S* (+) 2-metilbutanamida (222), la 2 metilpropanamida (223) y la fenilacetamida (224) se resumen en los Cuadros 40 a 42. A continuación se describe la elucidación estructural de las tres amidas.

Los espectros en el IR (Espectros 21, 25 y 29) de los productos 222, 223 y 224 presentan bandas de absorción asociadas con la presencia de una función amida (N-H: 3352-3178, 3350-3178, 3522-3408 cm^{-1} , respectivamente y CO: 1661, 1637 y 1678 cm^{-1} , respectivamente). Las fórmulas moleculares de las amidas se establecieron como $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}$, $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$ y $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$, respectivamente por espectrometría de masas modalidad FAB^+ o por impacto electrónico. En el caso de los compuestos 222 y 223, la fórmula molecular permite calcular un grado de insaturación, asignado al carbonilo. Para el compuesto 224 se calcularon cinco grados de insaturación: uno asignable al carbonilo y los cuatro restantes a un anillo aromático. Los espectros de RMN ^1H (Espectros 24, 28 y 32) de 222, 223 y 224 presentan una señal en δ_{H} 5.35, 5.6 y 5.4, respectivamente que integran para dos protones y que desaparece con la adición de agua deuterada. Esta señal se asignó a los dos protones de una amida primaria. Por otro lado, los espectros de RMN ^{13}C (Espectros 23, 27 y 31) de 222, 223 y 224 presentan una señal de carbonilo en δ_{C} 179.98, 179.93 y 173.31, respectivamente, asignadas al carbonilo de la función amida.

El espectro de RMN ^{13}C del producto 222 (Espectro 23) presenta además de la señal del carbonilo cuatro señales de carbono asignable a un metino (δ_{C} 42.4), un metileno (δ_{C} 27.2) y a dos metilos (δ_{C} 17.4 y 11.0). El espectro de RMN ^1H (Espectro 24) de este

producto presenta un sextuplete a δ_H 2.2 que integra para un hidrógeno atribuible al metino en la posición dos, un doble quintupleteado que corresponde a cada uno de los hidrógenos del único metileno, un doblete y un triplete que integran para tres hidrógenos cada uno asignables a los metilos de C-2 y C-4 (Cuadro 40). El valor de la rotación óptica de **222** indica que el producto corresponde al enantiómero *S* (lit. $[\alpha]_D^{25} +22.4$). El enantiómero *R* de la amida no está descrito en la literatura, sin embargo en el caso de los ácidos correspondientes, los valores de rotación óptica para la forma *S* y *R* son $[\alpha]_D^{25} +19.2$ y -13.2 , respectivamente (Elks y Granellin, 1999).

Cuadro 40. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la *S* (+) 2-metilbutanamida.



222

p.f. 104-107°C

P.M. 101 uma EM-FAB⁺ (alcohol nitrobenílico), m/z 102 [M+H]

FM C₅H₁₁NO

$[\alpha]^{25} + 25$

IR ν max (CHCl₃, cm⁻¹): 3352, 3178, 2931, 2963, 1661, 1459, 1421, 1307, 1284. Espectro 21

EMIE m/z (int. rel.): 101 [M]⁺ (1 %), 73 [M-C₂H₄]⁺ (100%), 44 [M-C₄H₉]⁺ (22%),

29 [M-C₃H₇NO] (60%)

Espectro 22

RMN ¹H: 5.35 (s) (2H), 2.2 (sex. *J* 6.9) (1H), 1.68 (quin, *J* 7.1) (1H), 1.47 (quin, *J* 6.8) (1H),

1.16 (d. *J* 6.8) (3H), 0.94 (t, *J* 7.3) (3H)

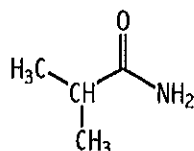
Espectro 24

RMN ¹³C: 179.98, 42.40, 27.24, 17.4, 11.8

Espectro 23

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 28) del producto **223** se observa, además de los protones de la amida, un septuplete a δ_{H} 2.43 que integra para un hidrógeno y un doblete en δ_{H} 1.18 que integra para seis hidrógenos. Por otro lado, en el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 27) del producto se observa además del carbonilo, una señal en δ_{H} 34.97 y otra en δ_{H} 19.51, estas señales corresponden a un metino y a los dos metilos identificados en el espectro de RMN ^1H . Así, la estructura de **223** corresponde a la 2-metilpropanamida (Puza, *et al.*, 1965).

Cuadro 41. Constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas de la 2-metilpropanamida.



223

p.f. 111-114 °C

P.M. 87 uma EMIE

FM $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$

IR ν max (CHCl_3): 3350, 3178, 2966, 2932, 1637, 1427, 1295, 1145

Espectro 25

EM-FAB⁺, m/z (int. rel.): 87 $[\text{M}]^+$ (48%), 72 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ (55%), 59 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$ (32%), 44 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ (100%), 43 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{NO}]^+$ (68%).

Espectro 26

RMN ^1H : 5.6 (s)(2H), 2.43 (sept, J 6.94) (1H), 1.18 (d, J 6.92) (6H)

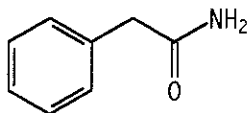
Espectro 28

RMN ^{13}C : 179.93, 34.97, 19.51

Espectro 27

Los espectros de RMN del producto **224** resultaron muy similares al del ácido fenilacético (**220**) difiriendo principalmente en la presencia de las señales atribuibles a la función amida. Así en el espectro de RMN ^{13}C se observó una señal en δ_{C} 173.31 en lugar de la señal en δ_{C} 178.09 correspondiente al ácido carboxílico (Cuadro 42). La comparación de los desplazamientos químicos del producto con los descritos en la literatura para la fenilacetamida confirmaron su identidad (Takai *et al.*, 1963; Sakai *et al.*, 1984; Dillman y Cardellina, 1991; Parameswaran *et al.*, 1997)

Cuadro 42. Constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas de la fenilacetamida.



224

p.f. 148-151°C

P.M. 135 uma EMIE

FM $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$

IR ν_{max} (CHCl_3 cm^{-1}): 3522, 3469, 3408, 2649, 2563, 2478, 1678, 1585, 1491 **Espectro 29**

EMIE m/z (int. rel.): 136, $[\text{M}+\text{H}]^+$ (30%), 135 $[\text{M}]^+$ (15%), 92 $[\text{M}-\text{CONH}]^+$ (100%), 91 $[\text{M}-\text{CONH}_2]^+$ (98%) **Espectro 30**

RMN ^1H (300 MHz): 5.4 (s) (2H), 7.39-7.28 (m, 5H), 3.6 (s) (2H) **Espectro 32**

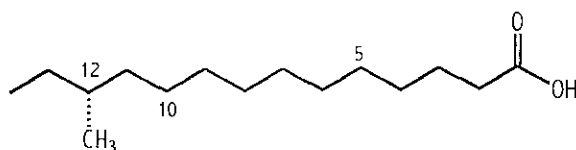
RMN ^{13}C (75 MHz): 173.31, 134.87, 129.41, 129.11, 127.50, 43.35 **Espectro 31**

4.4.3.2.4. Elucidación estructural los ácidos *S* (+) 12-metiltetradecanoico (225) y 14-metilpentadecanoico (226).

Los ácidos *S* (+)12-metil tetradecanoico **225** (Omura *et al.*, 1986; Ishida-Okawara *et al.*, 1991; Kitahara *et al.*, 1995) y 14-metilpentadecanoico **226** (Fujii *et al.*, 1970; Omura *et al.*, 1986) se aislaron como sólidos de color blanco de apariencia cerosa. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de estos productos se resumen en los Cuadros 44 a 47.

Los espectros en el IR de los productos **225** y **226** (Espectros 33 y 38) presentan bandas de absorción para hidroxilo (3518 cm^{-1}), para alcanos ($2928, 2856, 1466\text{ cm}^{-1}$) y para carbonilo de ácido (1709 cm^{-1}). La fórmula molecular de los compuestos se estableció como $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$ y $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$, respectivamente mediante espectrometría de masas por impacto electrónico. La fórmula de los dos compuestos permite calcular un grado de insaturación asignable al carbonilo. En los espectros de RMN ^{13}C de (Espectros 35 y 40) se observan 15 y 16 señales de carbono, respectivamente. En ambos casos una de ellas corresponde al grupo carbonilo y las demás a los carbonos de la cadena alifática. En los espectros de ^{13}C modalidad DEPT de los ácidos *S* (+) 12-metiltetradecanoico (Espectro 36) y 14-metilpentadecanoico (Espectro 41) se observaron 11 y 12 señales de metilenos, respectivamente. En ambos casos se observó una señal de metino y dos de metilo (Cuadros 44 y 46).

Cuadro 43. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido *S* (+) 12-metiltetradecanoico.



225

p.f. 24-26°C

P.M. 242 uma EMIE

FM C₁₅H₃₀O₂[α]²⁵ + 22 (C:1.0, CHCl₃)IR ν max (CHCl₃, cm⁻¹) 3518, 2928, 2856, 1709, 1466

Espectro 33

RMN ¹H (300 MHz): 2.35 (2 H, t, *J* 7.5 Hz), 1.63 (2 H, quint, *J* 7.2 Hz), 1.21-1.35 (19 H), 0.85 (3 H, t, *J* 6.6 Hz), 0.84 (3 H, d, *J* 6.9 Hz)

Espectro 37

RMN ¹³C: Cuadro 44

Espectro 35

EMIE *m/z* (int. rel.): 242 [M]⁺ (50%), 213 [M-C₂H₅]⁺ (20%), 185 [M-C₄H₉]⁺ (70%), 129 [M-C₈H₁₇]⁺ (42%), 73 [M-C₁₂H₂₅]⁺ (58%), 57 [M-C₉H₁₆O₂]⁺ (100%)

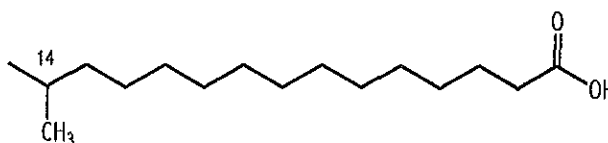
Espectro 34

Cuadro 44. Desplazamientos químicos RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del ácido *S* (+) 12-metiltetradecanoico (225)

Número de carbono	Desplazamiento químico (ppm)
1-COOH	179.4
2-CH ₂	34.0
3-CH ₂	24.7
4-CH ₂	29.1
5-CH ₂	29.9
6-CH ₂	29.2
7-CH ₂	29.4
8-CH ₂	29.6

Número de carbono	Desplazamiento químico (ppm)
9-CH ₂	29.5
10-CH ₂	27.1
11-CH ₂	36.5
12-CH	34.4
13-CH ₂	29.7
14-CH ₃	11.4
12-CH ₃	19.2

Cuadro 45. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido 14-metilpentadecanoico.



226

p.f. 62-63°C

P.M. 256 uma EMIE

FM C₁₆H₃₂O₂IR ν max (CHCl₃, cm⁻¹) 3518, 2928, 2856, 1709, 1466

Espectro 38

RMN ¹H (300 MHz): 2.35 (2 H, t, *J* 7.5 Hz), 1.63 (2 H, quint, *J* 7.2 Hz), 1.21-1.35 (20 H), 1.51 (1H, sep., *J* 6.6 Hz), 0.85 (6 H, t, *J* 6.6 Hz)

Espectro 42

RMN ¹³C: Cuadro 46

Espectro 40

EMIE *m/z* (int. rel.): 256 [M]⁺ (82%), 213 [M-C₃H₇]⁺ (45%), 199 [M-C₄H₉]⁺ (10%), 185 [M-C₅H₁₁]⁺ (22%), 171 [M-C₆H₁₃]⁺ (20%), 157 [M-C₇H₁₅]⁺ (19%), 143 [M-C₈H₁₇]⁺ (8%), 129 [M-C₉H₁₉]⁺ (48%), 73 [M-C₁₃H₂₇]⁺ (75%), 43 [M-C₁₃H₁₅O₂]⁺ (100%)

Espectro 39

Cuadro 46. Desplazamientos químicos RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del ácido 14-metilpentadecanoico (226).

Número de carbono	Desplazamiento químico (ppm)	Número de carbono	Desplazamiento químico (ppm)
1-COOH	179.4	9-CH ₂	29.5
2-CH ₂	31.9	10-CH ₂	29.7
3-CH ₂	24.7	11-CH ₂	30.0
4-CH ₂	29.1	12-CH	27.4
5-CH ₂	29.4	13-CH ₂	39.1
6-CH ₂	29.2	14-CH	28.0
7-CH ₂	29.4	15-CH ₃	22.7
8-CH ₂	29.6	14-CH ₃	22.7

El espectro de masas de los compuestos **225** y **226** mostró un perfil típico de hidrocarburo con pérdidas de 14 unidades consecutivas (Budzikiewicz *et al.*, 1964). Los espectros de RMN ^1H (Espectros 37 y 42) de ambos compuestos presentan también el perfil típico de hidrocarburos saturados (Lindeman y Adams, 1971). En el espectro de RMN ^1H (Espectro 37) del ácido *S* (+) 12-metiltetradecanoico se observan un triplete (δ_{H} 0.85) y un doblete (δ_{H} 0.84) asignables a dos metilos lo que indica la presencia de una ramificación en la cadena alifática. El espectro de masas del ácido *S* (+) 12-metiltetradecanoico (Espectro 34) presenta 2 pérdidas de 29 y 57 unidades correspondientes a los iones C_2H_5^+ y C_4H_9^+ , respectivamente. Estas pérdidas sugieren la presencia de una ramificación en la posición 12. Esta ramificación origina un centro estereogénico en la molécula. La propiedad dextrorrotatoria ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} +22$) demostrada por el ácido 12-metiltetradecanoico confirmó que pertenecía a la serie configuracional 2 *S* (Kitahara *et al.*, 1995). En el espectro de RMN ^1H (Espectro 42) del ácido 14-metilpentadecanoico se observa un septuplete a δ_{H} 1.51 asignable a un metino y un doblete a δ_{H} 0.85 que integra para seis protones que corresponde a dos metilos. Estas señales características del grupo isopropilo indican una ramificación en la posición C-14 de la molécula. En el espectro de masas del ácido 14-metilpentadecanoico (Espectro 39) se observa una pérdida de 43 unidades que corresponde al fragmento C_3H_7 . Esta pérdida confirma la ramificación en la posición 14 de la molécula.

4.4.4. Estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo de la especie fitotóxica y citotóxica, actinomiceto MIV2B(13).

El extracto crudo combinado (180 g) derivado del cultivo del actinomiceto MIV2B(13) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta utilizando como

eluyentes diclorometano y metanol con incrementos de polaridad. Este proceso condujo a la obtención de 15 fracciones primarias (F-1 a F-15). La actividad biológica de las fracciones se evaluó determinando su toxicidad para *A. salina*. Los resultados derivados esta evaluación (Cuadro 20) permitieron determinar que la actividad citotóxica se concentraba en las fracciones F-3 a F-10 y en la fracción F-12. En consecuencia, se procedió al aislamiento de los constituyentes mayoritarios de las fracciones activas.

4.4.4.1. Aislamiento y purificación de las actinomicinas C1 (228) y C2 (229).

Las actinomicinas C1 (8.3 mg) y C2 (15.0 mg) se aislaron de las fracciones F-10 (298.5mg) y F-5 (240.8 mg), respectivamente mediante CLAE (Figura 23). Los productos se aislaron como sólidos de color naranja con puntos de fusión de 246-247° C y 237-239° C, respectivamente. Los rendimientos en relación al peso seco del extracto de las actinomicinas C1 y C2 fueron aproximadamente de 0.046 % (0.83 mg/l) y 0.083 % (0.083 mg/l), respectivamente.

4.4.4.2. Elucidación estructural de las actinomicinas C1 (228) y C2 (229).

La actividad citotóxica demostrada por los extractos microbianos, así como las características espectroscópicas y espectrométricas de los productos **228** y **229** permitieron proponer que los compuestos aislados corresponden a las actinomicinas. Estos antibióticos se caracterizan por presentar en su estructura una parte cromófora y una parte peptídica (peptido α y peptido β). Se han descrito en la literatura alrededor de 30 actinomicinas. La diferencia estructural entre ellas radica en la composición de la parte peptídica de su estructura (Buckingham, 1999).

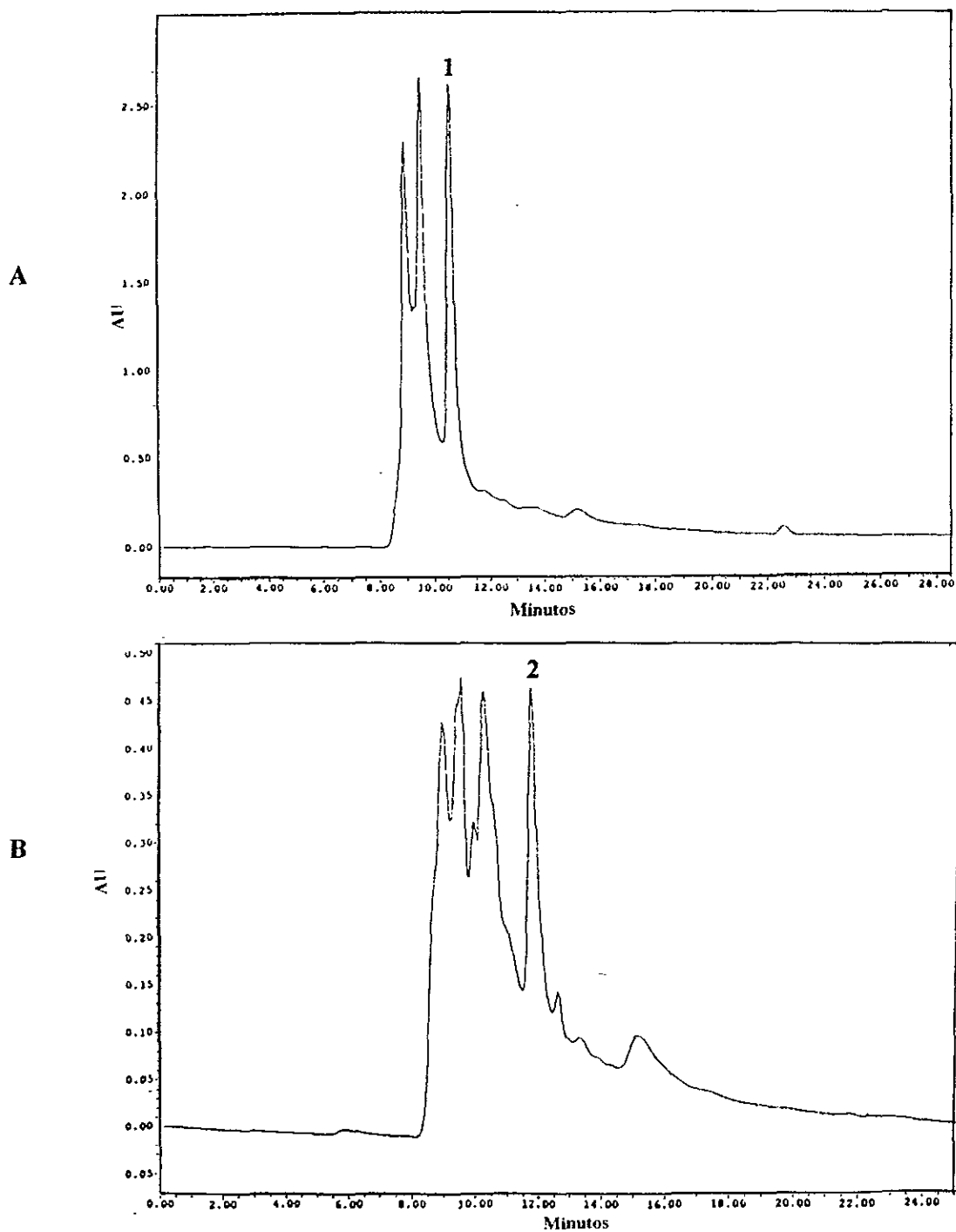
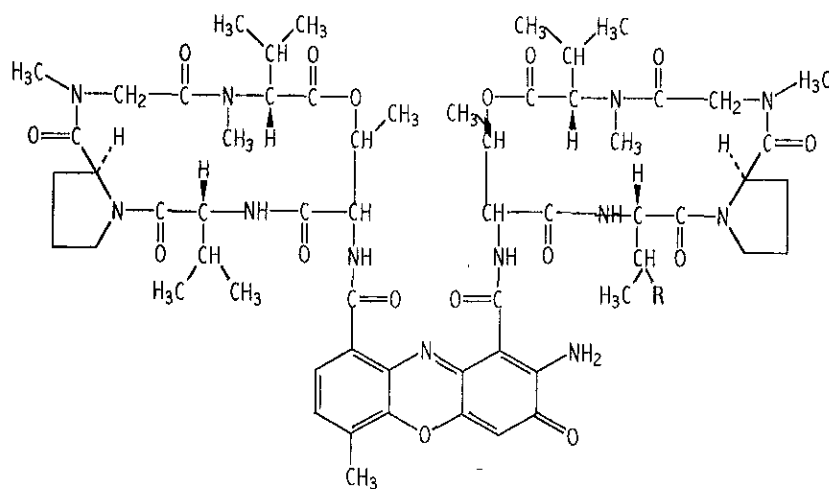


Figura 23. Cromatograma de líquidos (CLAE) de las fracciones F-5 (A) y F-10 (B) derivadas del extracto orgánico del cultivo del actinomiceto MIV2B(13). Condiciones de análisis: Equipo Waters; Detector de UV, λ , 413 nm Columna C_{18} (Waters, Prep Nova-Pack, HRC18, 300 X 19 mm, 60 A, 6 μ m). Fase móvil, acetonitrilo, flujo 5.9 ml/min. 1: actinomicina C2 (t_R 10.62 min), 2; actinomicina C1 (t_R 11.75 min).

La comparación de los datos espectroscópicos de los productos con los descritos en la literatura para estos antibióticos permitió identificar a los productos **228** y **229** como las actinomicinas C1 y C2, respectivamente (Hollstein *et al.*, 1974; Mauger y Thomas, 1981; Martin *et al.*, 1986) (Figura 25). Dado que estos dos productos se han descrito en múltiples ocasiones en la literatura, no se consideró pertinente la discusión de su elucidación estructural. En el Apéndice II se anexan los espectros correspondientes.



228, R: CH₃; **229**, R: CH₂CH₃

Figura 24. Estructuras de las actinomicinas C1 (**228**) y C2 (**229**).

4.5 Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos derivados del estudio químico biodirigido de las especies *Actinomadura* MIV2B(31) y *Streptomyces* MIV2B(9).

De acuerdo a la estrategia diseñada para el desarrollo de la presente investigación se realizaron los ensayos biológicos conducentes a determinar el potencial fitotóxico de los compuestos aislados. La evaluación del potencial fitotóxico consistió en determinar la actividad fitotóxica de tipo preemergente y posemergente. La actividad fitotóxica preemergente se evaluó mediante la determinación del efecto de los compuestos sobre la germinación y el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba. La actividad fitotóxica de tipo posemergente se evaluó mediante la determinación del efecto de los compuestos sobre la producción de biomasa de especies vegetales selectas y mediante la evaluación de su efecto sobre diversas actividades fotosintéticas asociadas a la fase luminosa en cloroplastos aislados de espinaca

En el caso de los productos obtenidos de *Streptomyces* MIV2B(9) se evaluó el potencial fitotóxico del ácido fenilacético (**220**), la *S* (+)-2-metilbutanamida (**222**), la 2-metilpropanamida (**223**) y la fenilacetamida (**224**). De *Actinomadura* MIV2B(31) se evaluó a la maduramicina (**199**). De manera adicional, se determinó el efecto fitotóxico de los ésteres metílicos de la maduramicina (**213**) y del ácido fenilacético (**221**). Los ésteres metílicos de ambos productos se prepararon por tratamiento con CH_2N_2 del ácido libre correspondiente como se indica en la sección experimental (incisos 3.6.2.4. y 3.6.3.3.).

Con respecto al antibiótico X-206 (**218**) aislado de *Streptomyces* MIV2B(9), Shavit y colaboradores (1970) reportaron el efecto de diferentes sales de este antibiótico sobre la fotofosforilación y el transporte de electrones en cloroplastos. En consecuencia, en este

trabajo de investigación sólo se determinó la actividad fitotóxica de tipo preemergente utilizando como semilla de prueba *A. hypochondriacus*. Por otro lado, debido a que las actinomicinas C1 y C2 aisladas del actinomiceto MIV2B(13) demuestran una potente actividad citotóxica no se determinó el potencial fitotóxico de estos metabolitos.

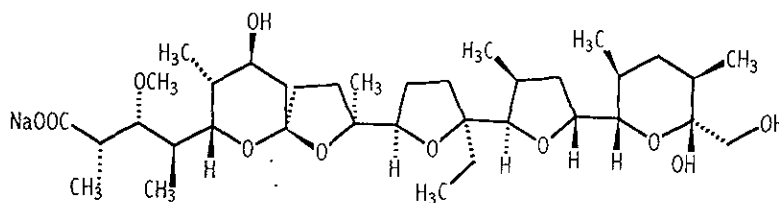
4.5.1. Evaluación del potencial fitotóxico de la maduramicina (199) y su éster metílico (213).

La maduramicina es un antibiótico de tipo poliéter de importancia comercial ampliamente utilizado en la medicina veterinaria para combatir la coccidiosis y como promotor de crecimiento de aves y ganado (Liu *et al.*, 1983). Dentro de los antibióticos de tipo poliéter que se emplean para este fin, la maduramicina es el producto más activo (Cuadro 11) y se comercializa bajo la forma de sal de amonio con el nombre de CYGRO® (American Cyanamid Company).

Las investigaciones relacionadas al metabolismo de la maduramicina en aves y roedores indican que la mayor parte del producto se excreta sin metabolizar, aunque también se han identificado metabolitos producto de la O-desmetilación de uno o más grupos metoxilo, de la hidroxilación y de la conjugación con el ácido glucorónico (Brown y Rajan, 1986; Stout *et al.*, 1989; 1991). De tal forma que la maduramicina se introduce en el medio ambiente debido a la excreción de los animales que lo consumen. Sin embargo, el efecto de la maduramicina sobre el crecimiento vegetal no ha sido investigado.

4.5.1.1. Determinación del efecto de la maduramicina (199) sobre la germinación y el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba.

La determinación del efecto de la maduramicina sobre la germinación y el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección experimental. Las semillas de prueba empleadas fueron tres especies vegetales nocivas (*Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli* y *Trifolium alexandrinum*) y dos especies cultivables (*Phaseolus aureus* y *Triticum vulgare*). Como controles positivos se emplearon a la monesina (230), un antibiótico de tipo poliéter con propiedades fitotóxicas de tipo pre y posemergente (Heysey y Putnam, 1986; Hoagland, 1996) y al herbicida comercial 2,4 D (ácido 2, 4-diclorofenoxiacético).



Monesina (230)

Los resultados derivados de este estudio indicaron que la maduramicina inhibió la germinación de las semillas *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli* y *T. alexandrinum* a una concentración de 500 μM . Las especies *P. aureus* y *T. vulgare* fueron menos sensibles al tratamiento. Por otro lado, el crecimiento radicular de todas las semillas de prueba se inhibió por en tratamiento con diferentes concentraciones del antibiótico. Los valores de la concentración inhibidora media (CI_{50}) del crecimiento radicular de la maduramicina

calculados para cada una de las semillas de prueba (Cuadro 47) indican que las semillas de las especies nocivas de *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli* y *T. alexandrinum* fueron más sensibles a los antibióticos. Es importante indicar que el efecto de la maduramicina sobre *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* fue comparable al del herbicida comercial. Por otro lado, las semillas de *T. vulgare* y *P. aureus* fueron un orden de magnitud menos sensibles a la maduramicina indicando así un cierto grado de selectividad sobre las semillas de especies nocivas con respecto a las semillas de las especies cultivables.

Cuadro 47. Efecto de la maduramicina y la monesina sobre el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba.

Semilla de prueba	CI ₅₀ (µM)		
	Maduramicina	Monesina	2,4-D
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	18.5	6.7	13.1
<i>Echinochloa crus galli</i>	20.2	96.0	13.9
<i>Trifolium alexandrinum</i>	84.0	41.0	5.32
<i>Triticum vulgare</i>	971.0	41.6	19.4
<i>Phaseolus aureus</i>	150.0	17.9	16.7

4.5.1.2. Determinación del efecto de la maduramicina (199) sobre la producción de biomasa de especies vegetales selectas.

La evaluación de la actividad fitotóxica postemergente *in vivo* se realizó mediante la determinación del efecto de la aplicación foliar de una solución de concentración 1×10^{-4} M de maduramicina sobre dos especies cultivables: *Phaseolus aureus* (Leguminoseae) y *Triticum vulgare* (Graminaceae) y dos especies nocivas: *Trifolium alexandrinum* (Leguminoseae) y *Echinochloa crusgalli* (Graminaceae). El tratamiento se llevó a cabo

durante un mes y los controles positivo y negativo fueron paraquat (10^{-4} M) y Tween 80 (0.01%), respectivamente. Una vez finalizado el tratamiento se verificó la producción de biomasa mediante la determinación del peso fresco y la longitud de la plántula, para ello se calculó el porcentaje de reducción de estos parámetros comparados con el control de crecimiento y el control de Tween 80, este último no presentó efecto alguno sobre las especies vegetales de prueba.

Los resultados representados en la Figura 25 indican que la maduramicina reduce el peso fresco y la longitud de la plántula de las especies *T. alexandrinum*, *T. vulgare* y *P. aureus*. La especie *T. vulgare* fue la especie más susceptible. El crecimiento de la plántula se redujo en un 42.2 % y el peso fresco en un 54.6%. En el caso de *P. aureus*, los porcentajes de inhibición de la longitud de la plántula y del peso fresco fueron de 21.0% y 36.8%, respectivamente. Es importante hacer notar que el efecto del antibiótico sobre estas especies es comparable o mayor que el efecto del control positivo (paraquat 10^{-4} M). Por el contrario, la especie *E. crusgalli* fue más resistente al tratamiento. En el caso de las especies *T. alexandrinum* y *P. aureus* se observó además necrosis, clorosis, desecación y ruptura de las hojas después del tratamiento (Figura 26).

4.5.1.3. Determinación del efecto de la maduramicina (199), el éster metílico de la maduramicina (213) y la monesina (230) sobre diversas actividades fotosintéticas asociadas a la fase luminosa en cloroplastos aislados de espinaca.

Las actividades fotosintéticas investigadas en este trabajo fueron la síntesis de ATP, la captación de protones, el transporte de electrones fotosintético en condiciones basal, desacoplante y fosforilante y la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa. La metodología empleada para la realización de cada una de estas actividades se describen con detalle en la

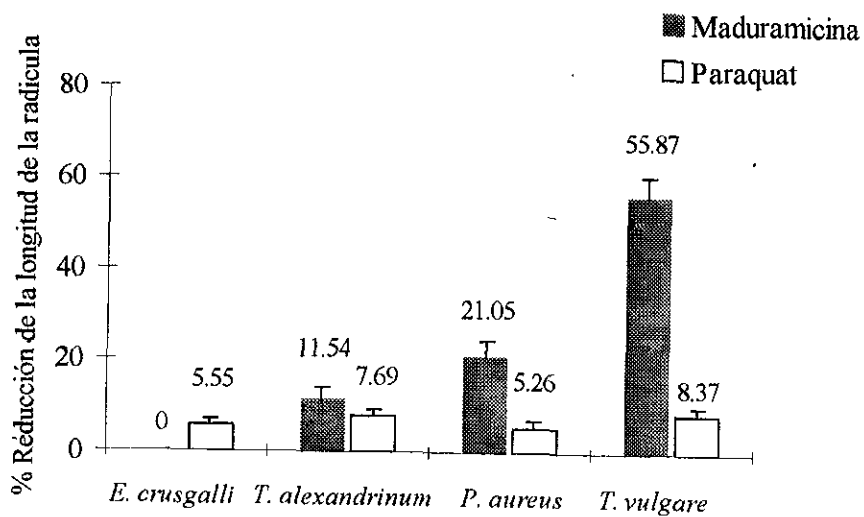
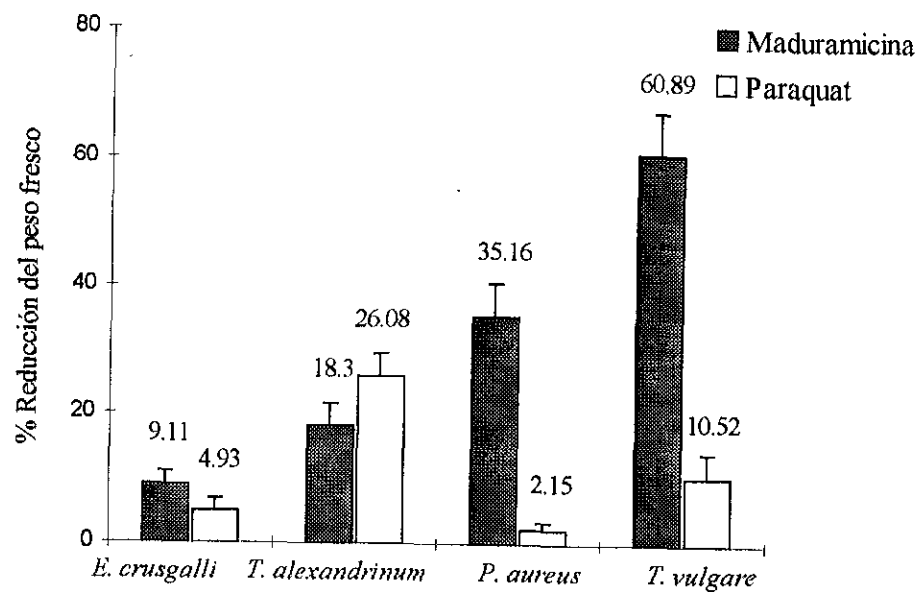


Figura 25. Efecto de la aplicación foliar de la maduramicina (199) ($10^{-4}M$) sobre el peso fresco (A) y la longitud de la plántula (B) de especies vegetales selectas.

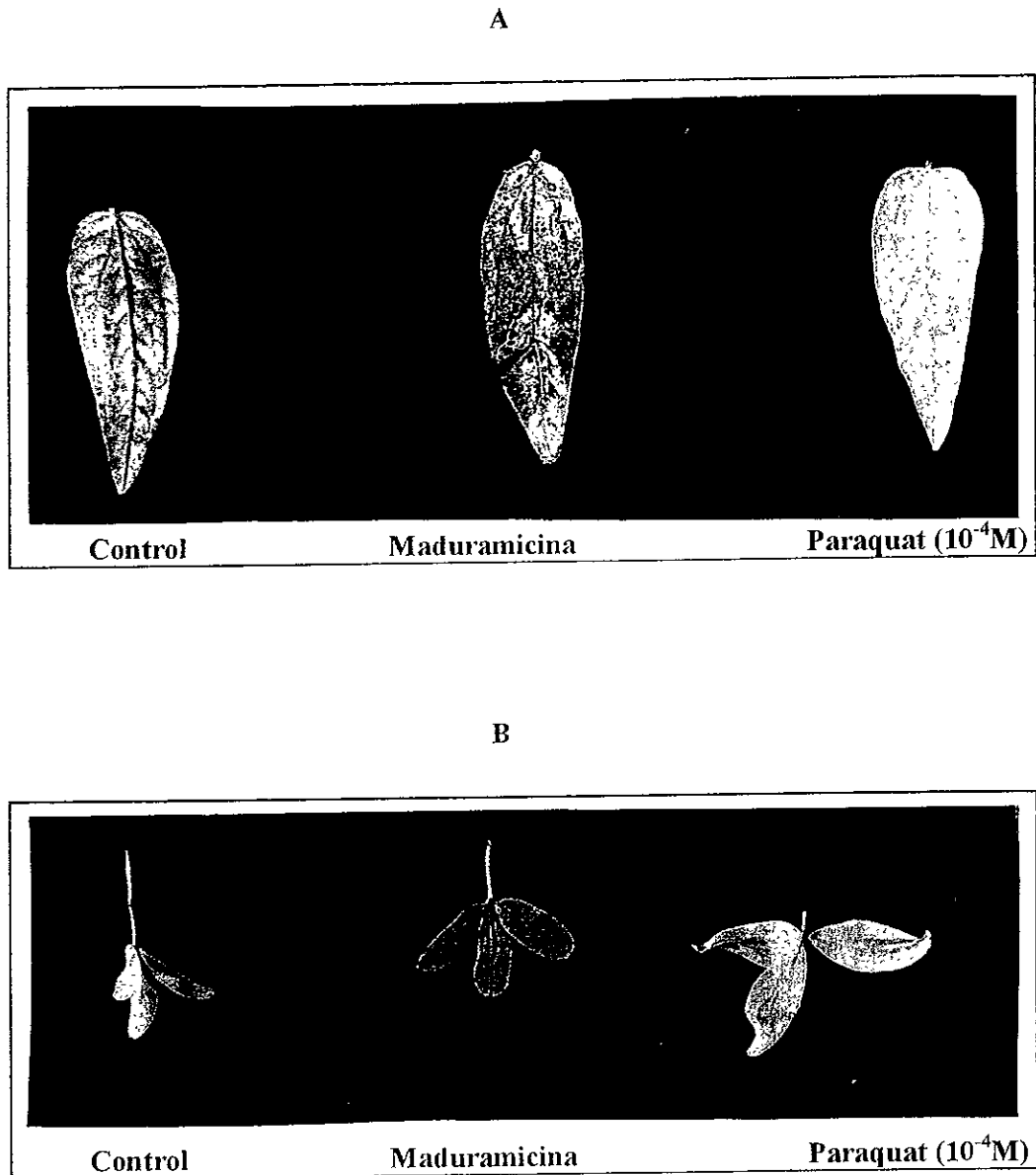


Figura 26. Efecto de la aplicación foliar de maduramicina (10^{-4} M) sobre *Phaseolus aureus* (A) y *Trifolium alexandrinum* (B).

sección experimental (inciso 3.3.3.3.). En cada una de las evaluaciones se comparó el efecto de la maduramicina y de su éster metílico con el demostrado por la monesina.

4.5.1.3.1. Síntesis de ATP y la captación de protones.

La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre pH 8.0 y 8.1, tal y como se indica en la sección experimental (Peña-Valdivia *et al.*, 1991). Este procedimiento se basa en determinar los cambios de pH en el medio de reacción inducido por la síntesis de ATP en presencia de ADP y Pi (Calera *et al.*, 1996). Cabe destacar que durante la síntesis de ATP a pH 8, la enzima H⁺-ATPasa consume irreversiblemente un protón por cada molécula de ATP sintetizada de acuerdo a la siguiente reacción: $ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+ \rightarrow ATP^{4-} + H_2O$. En consecuencia, la variación de pH debido al consumo de protones es proporcional a la cantidad de ATP generada.

Como se observa en la Figura 27, la maduramicina (199), el éster metílico de la maduramicina (213) y la monesina (230) inhibieron de manera dependiente de la concentración la fotofosforilación y la captación de protones de agua a metilviológeno en cloroplastos aislados de espinaca. La síntesis de ATP fue totalmente inhibida por los tres antibióticos a 500 μM, 25.0 μM y a 30.0 μM, respectivamente. Los valores de la concentración inhibidora media de los antibióticos para la síntesis de ATP y la captación de protones se resumen en el Cuadro 48.

La teoría de la transducción de Mitchel (Mitchell, 1977) predice que la inhibición de la captación de protones y de la síntesis de ATP debe de ser de la misma magnitud y de manera paralela cuando los compuestos de prueba se comportan como agentes

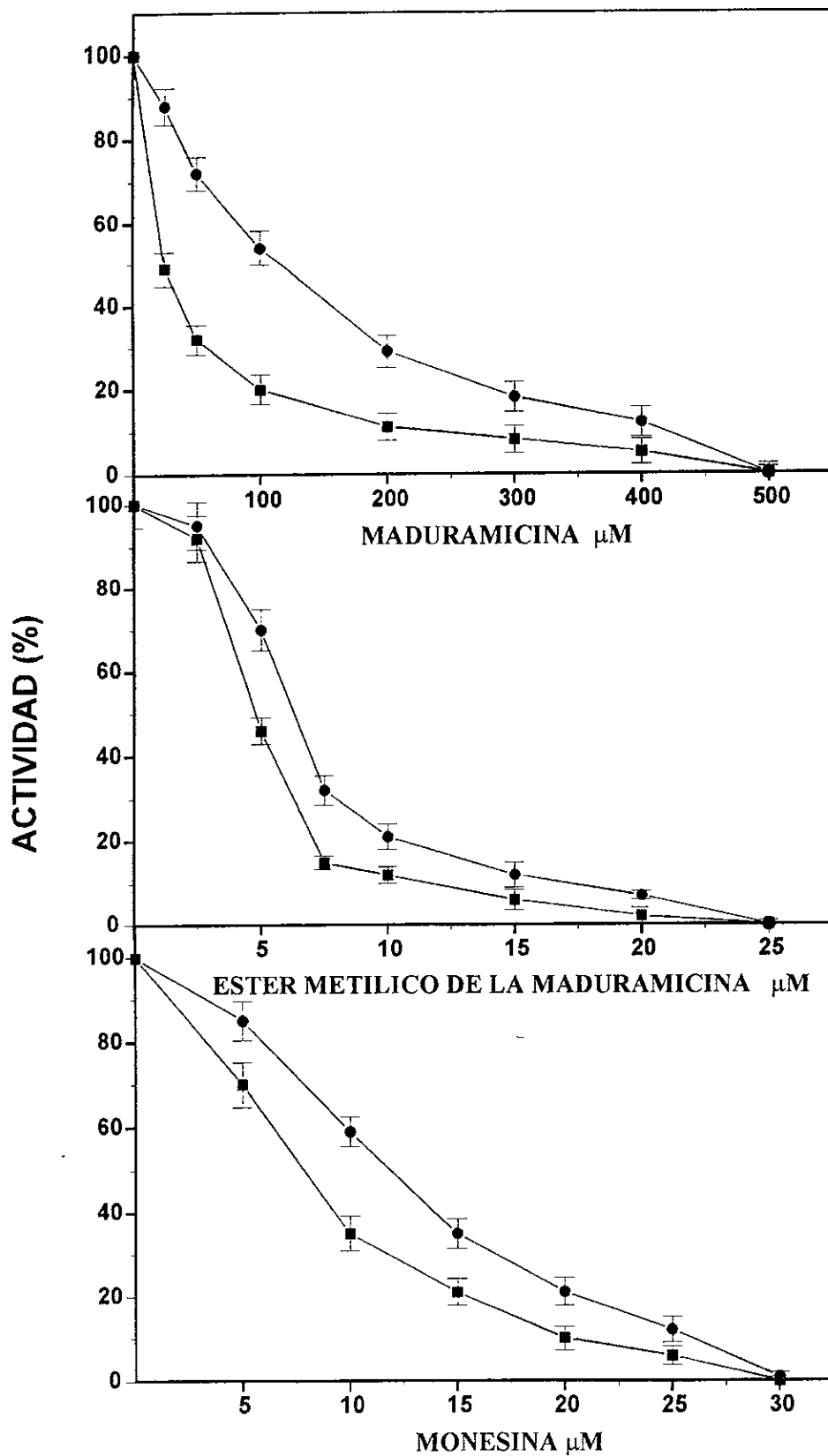


Figura 27. Efecto de la maduramicina (199), el éster metílico de la maduramicina (213) y la monesina (230) sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca.

desacoplantes. Los resultados ilustrados en la Figura 27 indican que los compuestos de prueba presentan este comportamiento.

Cuadro 48. Efecto de la maduramicina, el éster metílico de la maduramicina y la monesina sobre la síntesis de ATP y la captación de protones.

Antibiótico	CI ₅₀ (μM)	
	Síntesis de ATP	Captación de protones
Maduramicina	20.68	96.55
Ester metílico de la maduramicina	5.0	6.38
Monesina	8.12	12.08

4.5.1.3.2. Transporte de electrones no cíclico.

Para determinar el mecanismo de acción mediante el cual los compuestos inhiben la síntesis de ATP, se determinó el efecto *in vitro* de los mismos sobre el transporte de electrones fotosintético no cíclico, empleando el agua como un donador natural de electrones y el MV como un aceptor final de electrones. Para este ensayo se emplearon tres condiciones experimentales diferentes: basal, desacopado y fosforilante.

En primer lugar se evaluó el transporte de electrones basal mediante la determinación del flujo de electrones dependiente de la luz en el medio basal. En el caso de que el compuesto active el flujo en estas condiciones, significa que está actuando como un desacoplante clásico, puesto que disipa el gradiente de protones generado con el consecuente incremento en el flujo de electrones (Terada, 1990). En la segunda determinación se midió el transporte de electrones desacoplado, para lo cual se adicionó al medio de reacción basal NH₄Cl como un agente desacoplante. Este último, promueve la

disipación de gradiente de protones generado en la cadena fotosintética, observándose una velocidad máxima del flujo de electrones. Si el compuesto inhibe el flujo de electrones bajo estas condiciones se le considera como un inhibidor del transporte de electrones acoplado a la síntesis de ATP, es decir un inhibidor clásico de la reacción de Hill (McCarty, 1977; Trebs, 1972; Mitchell, 1977). Por último, se determinó el transporte de electrones fosforilante y para ello se adicionó al medio de reacción basal ADP y Pi y así permitir la actividad catalítica de la enzima H^+ -ATPasa. Los compuestos que activan este transporte, lo hacen por un mecanismo de desacoplamiento, por el contrario, si lo desactivan, significa que afectan a la cadena redox y, por lo tanto, son inhibidores de la reacción de Hill. Los inhibidores de la transferencia de energía afectan directamente a la enzima H^+ -ATPasa que cataliza el proceso de fosforilación. Por lo tanto, la velocidad de los transporte de electrones en las condiciones basal y desacoplante no se afectan y el transporte fosforilante se inhibe (Izawa y Good, 1983).

En la Figura 28 se muestra que el transporte de electrones no cíclico de agua a metilviológeno en condiciones basal y fosforilante fueron estimulados por adición de diferentes concentraciones de los tres antibióticos, por el contrario el transporte de electrones desacoplado no fue afectado.

Como ya se indicó con anterioridad, los compuestos que estimulan el transporte de electrones basal y fosforilante se comportan como un desacoplante clásico. Los agentes desacoplantes rompen el gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP. En respuesta a este efecto, se estimula el transporte de electrones para generar nuevamente el gradiente electroquímico.

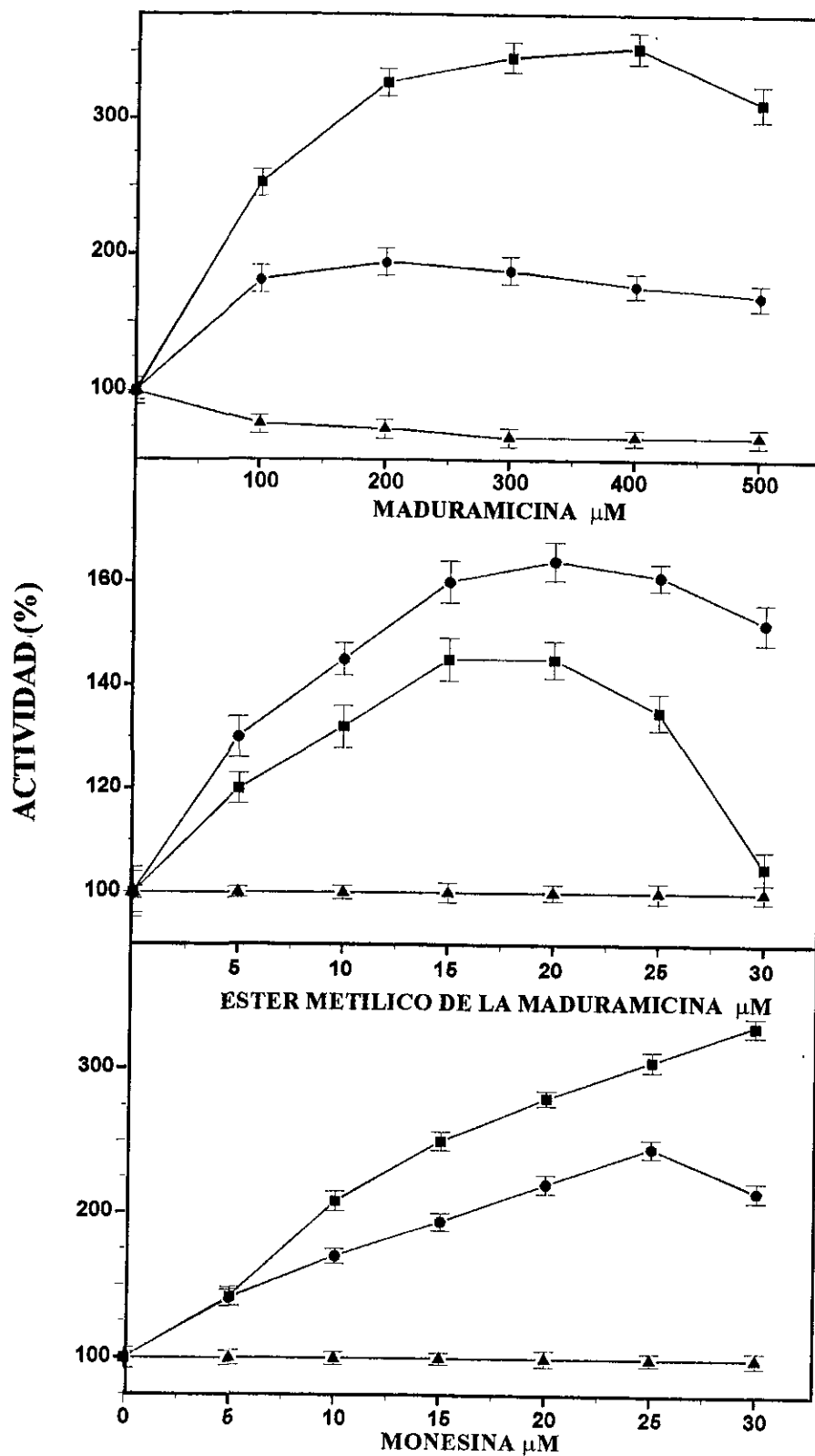


Figura 28. Efecto de la maduramicina (199), el éster metílico de la maduramicina (213) y la monesina (230) sobre el transporte de electrones en cloroplastos aislados de espinaca.

4.5.1.3.3. Actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa.

Con la finalidad de caracterizar la actividad desacoplante de los antibióticos (199) y (213) se determinó su efecto sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa. La habilidad de los productos de estimular la actividad de la enzima se mide indirectamente monitoreando la cantidad de ATP hidrolizada en condiciones de oscuridad.

La magnitud del efecto estimulante de los tres antibióticos sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa es de alrededor de un 300% con respecto al control (Cuadro 49). Estos resultados confirman también que la maduramicina y su éster metílico se comportan como agentes desacoplantes (Terada, 1990)

Cuadro 49. Efecto de la maduramicina, el éster metílico de la maduramicina y la monesina sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa.

Antibiótico	Concentración (μM)	Actividad de Mg^{2+} -ATPasa (%) ^a
Control	0.0	100 \pm 4
Maduramicina	100	346 \pm 12
Ester metílico de la maduramicina	10	268 \pm 9
Monesina	10	279 \pm 9
Cloruro de amonio	1.5x10 ³	317 \pm 10

^a El valor de la actividad de la enzima fue de 389 0 $\mu mol Pi mg Chl h^{-1}$ y es equivalente al 100% de actividad.

La actividad inhibidora de la maduramicina (199) y su derivado metilado (213) sobre la síntesis de ATP y la captación de protones, el efecto estimulante en el transporte de

electrones basal y fosforilante, así como la activación de la enzima Mg^{2+} -ATPasa indican que este compuesto se comporta como un desacoplante clásico en los cloroplastos.

Los resultados encontrados en el presente estudio constituyen la primera demostración de que los antibióticos de tipo poliéter no afectan el transporte de electrones desacoplado y, en consecuencia, de que no afectan directamente la cadena transportadora de electrones durante la fotosíntesis. También se demuestra por vez primera el efecto estimulante de la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa. En estudios anteriores Shavit y colaboradores (1967; 1970) demostraron el efecto desacoplante en cloroplastos de los antibióticos monesina (utilizado como control en este estudio), lasalocida A, antibiótico X-206, y dianemicina. En estos estudios se evaluó el efecto de los antibióticos sobre la síntesis de ATP y la captación de protones y la magnitud del efecto fue comparable al desarrollado por la maduramicina.

El mecanismo propuesto para el efecto desacoplante en cloroplastos de estos productos es la disipación del gradiente electroquímico vía intercambio de catión/ H^+ mediante el transporte de estos iones a través de las membranas biológicas. La capacidad ionóforica de estas moléculas depende de que adopten una conformación pseudocíclica de naturaleza hidrofóbica. Esta conformación pseudocíclica se logra mediante la formación de un puente de hidrógeno entre el hidrógeno de un hidroxilo de un extremo de la molécula y los pares de electrones libres del oxígeno del carbonilo del otro extremo de la molécula (Figuras 16 y 22). Los oxígenos de los anillos tetrahydrofurano y tetrahydropirano coordinan al catión y éste a su vez neutraliza la carga negativa del carboxilato. Este elegante diseño molecular proporciona a los antibióticos de tipo poliéter la conformación necesaria para conducir cationes a través de las membranas biológicas disminuyendo así el gradiente electroquímico por un mecanismo de difusión pasiva (Shavit *et al.*, 1967; 1970).

Los valores de la concentración inhibidora media de la síntesis de ATP (Cuadro 48) indican que el éster metílico de la maduramicina resultó ser cuatro veces más potente como agente desacoplante que el producto natural. Este efecto podría ser explicado por un aumento en la lipofilia de la molécula por la introducción del grupo metilo, hecho que incrementa la difusión del derivado metilado a través de la membrana tilacoidal.

Finalmente, los resultados del efecto de la maduramicina sobre la germinación y crecimiento radicular de las semillas de prueba, así como el efecto desacoplante en los cloroplastos aislados de espinacas permiten establecer que la maduramicina posee propiedades inhibitorias del crecimiento vegetal de tipo pre y pos emergente.

4.5.2. Evaluación del potencial citotóxico de la maduramicina (199).

Con la finalidad de establecer posibles efectos tóxicos de la maduramicina (199) sobre el hombre y otros mamíferos, se determinó la actividad citotóxica *in vitro* sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos (Cuadro 50). La maduramicina demostró efectos tóxicos sobre las líneas celulares A-549, MCF-7 y HT-29 con valores de la concentración inhibidora media (CE_{50}) de 3.84×10^{-2} , 5.17×10^{-2} y 1.12×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La citotoxicidad demostrada por la maduramicina fue comparable a la de la adriamicina, empleada en este estudio como control positivo. Estos resultados constituyen una aportación al conocimiento de las propiedades biológicas de la maduramicina y una advertencia del efecto citotóxico de este antibiótico.

Con respecto a otras propiedades biológicas de la maduramicina, es interesante indicar que este antibiótico ha demostrado actividad nematocida y en contra del *Plasmodium falciparum* uno de los agentes etiológicos del paludismo. En 1985 Wood

reportó que la maduramicina inhibe el desarrollo de nemátodos en animales y en el suelo. Por otro lado, Oronsky (1985) empleó la maduramicina (10^{-7} - 10^{-8} M) y combinaciones de la misma con diversos agentes antimaláricos para inhibir la proliferación de *P. falciparum* en eritrocitos.

Cuadro 50. Efecto de la maduramicina sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos.

	CE ₅₀ (µg/ml)		
	A-549	Línea celular MCF-7	HT-29
Maduramicina	3.84×10^{-2}	5.17×10^{-2}	1.12×10^{-2}
Adriamicina	7.98×10^{-3}	6.25×10^{-2}	2.92×10^{-2}

A-549, carcinoma de pulmón; MCF-7, carcinoma de pecho; HT-29; adenocarcinoma de colon.

4.5.3. Evaluación del potencial fitotóxico del antibiótico X-206 (218), el ácido fenilacético (220), la fenilacetamida, (224) el éster metílico del ácido fenilacético (221), la S (+)2-metilbutanamida (222) y la 2-metilpropanamida (223).

El ácido fenilacético (220), la fenilacetamida, (224) y el éster metílico del ácido fenilacético (221) se han aislado de diversas fuentes naturales incluyendo vegetales (Johns y Lamberton, 1969; Kan-Fan *et al*, 1970; Ong *et al.*, 1998), microorganismos (Catlin *et al.*, 1968; Shridar y Mahadevan, 1979; Erdmann y Khalil, 1986; Love *et al.*, 1987; Screeramulu *et al.*, 1987; Kawazu *et al.*, 1996; Burkhead *et al.*, 1998; Wu, 1978; Iacobellis y DeVay, 1987; Nair y Burke, 1988; Hirota *et al.*, 1993) y esponjas (Dillman y Cardellina, 1991; Parameswaran *et al*, 1997). Por otro lado, la S (+) 2-metilbutanamida (222) y la 2-metilpropanamida (223) son derivados de los ácidos S (+) 2-metilbutanoico y 2-

metilpropanoico, respectivamente. Estas dos amidas junto con la 3-metilbutanamida fueron previamente aisladas de un cultivo de *Streptomyces murseii* (Puza *et al.*, 1965).

El ácido fenilacético (**220**) y la fenilacetamida (**224**) han sido identificados como reguladores del crecimiento vegetal. Ambos productos ejercen un efecto estimulante sobre el crecimiento vegetal de algunas especies o bien un efecto inhibitor sobre otras. Así el ácido fenilacético estimula el crecimiento vegetal de las especies de tomate (Ricci *et al.*, 1996), maíz (Sarwai y Frankenber, 1995), girasol, trigo (Dubouchet y Zouzu, 1992) y frijol (Small y Morris, 1990). En contraste, inhibe la germinación de lechuga (Nair y Burke, 1988), cebolla, mostaza, frijol, soya, girasol y lino (Lakpale *et al.*, 1996) e inhibe el crecimiento radicular de semillas de amaranto (*A. leucocarpus*) y pasto (*E. crusgalli*) (Anaya *et al.*, 1992). Por su parte, la fenilacetamida estimula el crecimiento de avena (Isogai *et al.*, 1967) e inhibe el crecimiento radicular de semillas de arroz, lechuga, mijo y nabo (Takai *et al.*, 1963).

En este trabajo de investigación, la evaluación del potencial fitotóxico del ácido fenilacético (**220**), su éster metílico (**221**), la fenilacetamida, (**224**), la *S* (+)2-metilbutanamida (**222**) y la 2-metilpropanamida (**223**) consistió en determinar el efecto de los productos sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus* y sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca. En el caso del antibiótico X-206 (**218**), sólo se evaluó su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. De manera adicional, se evaluó el efecto del ácido fenilacético (**220**) y su derivado metilado (**221**) sobre la respiración durante el proceso de germinación de diversas semillas de prueba.

4.5.3.1. Efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.

La determinación del efecto de los productos **218**, **220-224** sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección experimental (inciso 3.3.3.1.). Los resultados derivados de esta evaluación indicaron que el antibiótico X-206 (**218**), el ácido fenilacético (**220**) y su éster metílico (**221**) inhiben la germinación de la semilla de prueba a una concentración de 500 μM , 1500 μM y 707 μM , respectivamente. Por otro lado, el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* se inhibió por diferentes concentraciones de los productos **218**, **220**, **221**. Los valores de la CI_{50} calculados para estos compuestos se resumen en el Cuadro 51. El antibiótico X-206 (**218**) inhibió el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* con un valor de la CI_{50} de 27.5 μM . Por otro lado, el ácido fenilacético (**220**) y su derivado metilado (**221**) inhibieron el crecimiento radicular de la semilla de prueba con un valor de CI_{50} de 173.5 μM y 9.92 μM , respectivamente. Es interesante indicar que el efecto del ácido fenilacético sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* resultó ser 12 veces mayor al de su amida correspondiente (CI_{50} 2180 μM) y 13 veces menor al control positivo (2,4-D). Por otro lado, el éster metílico del ácido fenilacético fue 17 veces más activo que el ácido libre y demostró un efecto comparable al herbicida comercial 2,4-D.

En el caso de la 2-metilpropanamida (**223**) y la *S* (+) 2-metilbutanamida (**222**), los productos no demostraron un efecto inhibitor de la germinación o del crecimiento radicular de la semilla de prueba a concentraciones menores de 1000 μM .

Considerando los antecedentes descritos en la literatura relacionados al efecto inhibitor de la germinación del ácido fenilacético sobre semillas de diversas especies vegetales y los resultados derivados de esta investigación se decidió evaluar el efecto del

ácido fenilacético y su derivado metilado sobre la respiración en el proceso de germinación de cuatro diferentes especies de semillas.

Cuadro 51. Efecto del antibiótico X-206, el ácido fenilacético, la fenilacetamida, el éster metílico del ácido fenilacético, la 2-metilpropanamida y la *S (+)*-2-metilbutanamida sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*

Producto	CI ₅₀ <i>A. hypochondriacus</i> (μ M)
Antibiótico X-206	27.5
Acido fenilacético	173.5
Ester metílico del ácido fenilacético	9.92
Fenilacetamida	2180
<i>S (+)</i> -2-metilbutanamida	>1000
2-metilpropanamida	>1000
2,4-D	15.2

4.5.3.2. Efecto del ácido fenilacético (220) y su derivado metilado (221) sobre el proceso de la respiración durante la germinación de cuatro diferentes especies de semillas de prueba.

El proceso de la germinación inicia con la toma de agua de las semillas y concluye con la elongación de los ejes embrionarios. Es decir cuando las semillas secas embeben agua se promueven una serie de eventos, los cuales, tienen como resultado final la emergencia de la radícula. Este último evento indica que se ha completado la germinación (Bewley y Black, 1994).

La germinación es un evento que requiere de energía y, por lo tanto, depende de la glucólisis y de la respiración de la semilla de tal forma que las únicas sustancias que se consumen en este proceso son agua y oxígeno.

De manera general, la germinación comprende tres fases (Mayer y Poljakoff, 1989; Bewley y Black, 1994). La fase I o imbibición, es el paso inicial y esencial para que se lleve a cabo la germinación. Durante la fase II (llamada también fase lag), se llevan a cabo los principales eventos metabólicos previos a la emergencia de la radícula: respiración, síntesis de proteínas, ADN y ARN y división celular. Finalmente, durante la fase III se inicia la elongación de la radícula. La duración de cada una de estas fases depende de las propiedades distintivas de las semillas, por ejemplo, permeabilidad, tamaño de la semilla y captura de oxígeno, además de las condiciones dominantes durante la fase de imbibición (temperatura y contenido de humedad).

Dado el efecto demostrado por el ácido fenilacético y su derivado metilado sobre el proceso de la germinación, se procedió a determinar su efecto sobre la respiración de semillas durante la germinación. Las especies de prueba empleadas fueron semillas de *Triticum vulgare* (trigo), *Trifolium alexandrinum* (trébol), *Physalis ixocarpa* (tomate), *Lolium multiflorum* (pasto) y *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto). La respiración de las semillas se monitoreó por 24, 48 y 72 h mediante la determinación del consumo de oxígeno en presencia de los productos **220** y **221** a una concentración de 100 μM . Los resultados derivados de este bioensayo (Cuadro 52) se expresaron en valores porcentuales con respecto al control negativo, el cual se realizó para cada semilla en ausencia de los compuestos de prueba. La velocidad de consumo de oxígeno del control se consideró como

el 100 % de actividad. De manera general, el efecto demostrado por estos compuestos sobre la respiración depende del tiempo de imbibición y del tipo de semilla empleada.

Cuadro 52. Efecto del ácido fenilacético y su éster metílico sobre la respiración en el proceso de la germinación de cuatro especies de semillas.

Especie vegetal	Porcentaje de alteración de la respiración ^a					
	Acido fenilacético			Ester metílico del ácido fenilacético		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>T. vulgare</i>	-44.0	-4.0	14.0	-10.0	-7.0	-9.0
<i>T. alexandrinum</i>	-10.0	+61.0	+3.0	-20.0	-8.0	+18.0
<i>P. ixocarpa</i>	0.0	0.0	+4.0	-3.0	-44.0	-62.5
<i>L. multiflorum</i>	0.0	+38.0	0.0	-50.0	-35.0	-27.0
<i>A. hypochondriacus</i>	-23.0	0.0	+4.0	-54.0	-35.0	-20.0

^a con respecto al control el cual equivale al 100% de respiración. (-) inhibición, (+) estimulación

El ácido fenilacético inhibe la respiración de *T. vulgare* a las 24 h en un 44.0 %, sin embargo a las 48 h la inhibición es solo del 4.0 % y a las 72h se estimuló la respiración en un 14.0 %. Un efecto parecido se observó en *A. hypochondriacus* con un 23.0 % de inhibición a las 24 h y un 4.0 % de estimulación de la respiración a las 72 h. En el caso de las semillas de *T. alexandrinum*, el producto 220 inhibe la respiración en un 10% a las 24 h, pero al cabo de las 48 y 72 h la estimuló en un 61.0 % y 3.0 %, respectivamente. En el caso de *P. ixocarpa* y *L. multiflorum*, el ácido fenilacético provoca la estimulación de la respiración en un 4.0 % (48 h) y 38 % (72 h.), respectivamente.

Por otro lado, el éster metílico del ácido fenilacético induce una disminución de la respiración de *P. ixocarpa* a las 24, 48 y 72 h en un 3%, 44% y 65.5%, respectivamente.

Con respecto a la repuesta de las semillas de *L. multiflorum*, a las 24h se observó una inhibición del 50%, sin embargo a las 48 y 72 h este efecto inhibitor disminuye en un 35% y 27%, respectivamente. Este mismo efecto se observó en la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus* y en un menor grado en *T. vulgare* y *T. alexandrinum* (Cuadro 52).

El éster metílico del ácido fenilacético inhibió el consumo de oxígeno en *P. ixocarpa*, *L. multiflorum* y *A. hypochondriacus* debido posiblemente, a la inhibición de algún intermediario de la fosforilación oxidativa lo cual provoca una disminución en el flujo de electrones y a la postre una inhibición también del proceso de la respiración (Van Sumere *et al.*, 1971). En el caso del ácido fenilacético se observó un efecto inhibitor al inició del experimento y posteriormente un efecto estimulante de la respiración en las semillas de *T. vulgare* y *T. alexandrinum* y en un menor grado en *P. ixocarpa* y *A. hypochondriacus*. La activación de la respiración en estas especies de prueba podría deberse probablemente a un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, lo que implica una inhibición en el suministro de ATP y, en consecuencia, la inhibición del crecimiento vegetal (Van Sumere *et al.*, 1971). Se ha postulado que el mecanismo regulador del crecimiento vegetal del ácido fenilacético es de carácter auxínico (Anaya *et al.*, 1992; Hirota *et al.*, 1993; Ricci, 1996; 1997). Sen y Sherman (1996) reportaron que algunas auxinas inhiben la actividad de la enzima ATPasa aislada de cacahuate, sin embargo el ácido fenilacético no ejerce efecto alguno sobre la actividad de esta enzima. Por otro lado, Cruz-Ortega y colaboradores (1988) reportaron que los extracto etanólicos de maíz, especie de la cual se ha aislado el ácido fenilacético inhiben el transporte de electrones y disminuyen el consumo de oxígeno en mitocondrias de sandía (Anaya *et al.*, 1992; 1995).

4.5.3.3. Efecto sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca.

La determinación del efecto de los productos **218**, **220-224** sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca se realizó utilizando la misma metodología que para los antibióticos de tipo poliéter. Los valores de la concentración inhibidora media de la síntesis de ATP para cada uno de los productos se presentan en el Cuadro 53.

Los resultados derivados de esta evaluación indican que la fenilacetamida (**224**), el éster metílico del ácido fenilacético (**220**), la *S* (+)2-metilbutanamida (**222**) y la 2-metilpropanamida (**223**) no tienen un efecto significativo sobre la síntesis de ATP, por lo tanto, no interfieren en el proceso de la fotosíntesis. En el caso del ácido fenilacético (**220**), este producto demostró un efecto poco significativo con un valor de la CI_{50} de 837.63 μ M.

En síntesis, la evaluación del potencial fitotóxico de los productos **218**, **220-224** indicaron que solo el antibiótico X-206 (**218**), el ácido fenilacético (**220**) y su éster metílico (**221**) tienen un efecto fitotóxico de tipo preemergente. Probablemente, debido a las propiedades ionóforas del antibiótico X-206, este producto ejerce su efecto fitotóxico mediante el desacoplamiento de la síntesis de ATP como ocurre con la maduramicina. Por otro lado, el ácido fenilacético y su derivado metilado afectan la respiración de las semillas de prueba probablemente mediante un efecto desacoplante de la fosforilación oxidativa o por la inhibición de algún intermediario de la cadena respiratoria mitocondrial, respectivamente.

Cuadro 53. Evaluación del efecto del ácido fenilacético, la fenilacetamida, el éster metílico del ácido fenilacético, la 2-metilpropanamida y la *S* (+)-2-metilbutanamida sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca.

Producto	CI ₅₀ de la síntesis de ATP μM
Ácido fenilacético	837.63
Ester metílico del ácido fenilacético	>1000
Fenilacetamida	>1000
2-metilpropanamida	>1000
<i>S</i> (+)-2-metilbutanamida	>1000

Finalmente, los resultados de la evaluación biológica de los productos aislados de los extractos fitotóxicos derivados de los cultivos de *Actinomadura* MIV2B(31) y *Streptomyces* MIV2B(9) permiten establecer que el producto responsable de la actividad fitotóxica de *Actinomadura* MIV2B(31) es la maduramicina (199). En el caso *Streptomyces* MIV2B(9) los productos fitotóxicos más importantes son el antibiótico X-206 (218) y el ácido fenilacético (220).

Es importante resaltar que el éster metílico del ácido fenilacético tiene un efecto fitotóxico de tipo preemergente importante. El efecto inhibitor del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* de este producto fue comparable al desarrollado por el herbicida comercial 2,4-D.

5. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación indican que la selección de microorganismos mediante la aplicación de bioensayos apropiados constituye una estrategia adecuada para el descubrimiento de agentes fitotóxicos. Sin embargo, la selección de la muestra de suelo mediante un criterio ecológico en conjunto con los ensayos clásicos de determinación del potencial fitotóxico como una estrategia de selección primaria, no siempre garantiza el aislamiento de microorganismos que biosinteticen productos biodinámicos con estructuras novedosas.

El estudio multidisciplinario de *Actinomadura* MIV2B(31) conllevó al descubrimiento de una nueva especie productora del importante antibiótico maduramicina, ampliamente utilizado en la medicina veterinaria como un agente anticoccidia y promotor de crecimiento. La evidencia más importante que permitió establecer que *Actinomadura* MIV2B(31) constituye una nueva especie productora de este antibiótico se basó en el análisis de la secuencia del ARNr 16S. Cabe destacar que el rendimiento de la maduramicina a partir del medio de cultivo obtenido del proceso de fermentación de *Actinomadura* MIV2B(31) (4.94 g/l) fue considerablemente mayor al reportado en la

patente original (aproximadamente 0.146g/l) que describe el aislamiento de este antibiótico a partir de *A. yumaensis*.

El estudio de las propiedades herbicidas de la maduramicina indicó que el antibiótico posee propiedades inhibitorias del crecimiento vegetal de tipo pre y posemergentes. La determinación del efecto de la maduramicina sobre el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba permitió comprobar que el antibiótico posee una selectividad sobre especies vegetales nocivas (*Amaranthus hypochondriacus*; CI_{50} 18.5 μ M, *Echinochloa crusgalli*; CI_{50} 20.2 μ M y *Trifolium alexandrinum*; CI_{50} 84.0 μ M) con respecto a especies cultivables (*Triticum vulgare* CI_{50} 971.0 μ M y *Phaseolus aureus* CI_{50} 150.0 μ M). Por otro lado, el efecto posemergente del antibiótico fue más pronunciado sobre las especies cultivables. La maduramicina redujo el peso fresco y la longitud de la plántula de las especies *T. vulgare* y *P. aureus*, presentando en algunos casos una efectividad equiparable o mayor a la del paraquat (10^{-4} M). La especie *T. vulgare* fue la especie más susceptible; el crecimiento de la plántula se redujo en un 42.2 % y el peso fresco en un 54.6 %. En el caso de *P. aureus*, los porcentajes de reducción de éstos parámetros fueron de 21.0 % y 36.8 %, respectivamente.

Las evaluaciones del efecto de la maduramicina y su derivado metilado sobre diversas actividades fotosintéticas asociadas con la fase luminosa permitieron establecer que estos antibióticos se comportan como agentes desacoplantes de la fotosíntesis. Los valores de la CI_{50} de la síntesis de ATP de estos productos fueron de 20.68 μ M y 5.0 μ M, respectivamente. El derivado metilado de la maduramicina demostró un efecto desacoplante mayor al del producto natural. El aumento de la actividad biológica podría deberse a un incremento en la lipofilia de la molécula.

La magnitud de los efectos fitotóxicos que produjo la maduramicina en las distintas pruebas realizadas en el presente estudio, comparable a la demostrada para productos de uso comercial, hacen de este compuesto un candidato aceptable para el desarrollo de nuevos herbicidas. Sin embargo, las implicaciones de sus propiedades ionofóricas indudablemente podrían limitar su posible comercialización.

Ante la demostración de los efectos fitotóxicos de la maduramicina es altamente probable que la eliminación *via excreta* de este producto por los animales de granja tratados con el antibiótico podrían tener efectos no deseables sobre el crecimiento vegetal de especies silvestres y cultivables.

El estudio químico biodirigido de *Streptomyes* MIV2B(9) permitió el aislamiento y caracterización del antibiótico X-206, el ácido fenilacético, la *S* (+) 2-metilbutanamida, la 2-metilpropanamida, la fenilacetamida y los ácidos *S* (+) 12-metiltetradecanoico y 14 metilpentadecanoico. De estos productos sólo el antibiótico X-206 y el ácido fenilacético demostraron propiedades fitotóxicas de tipo premergentes.

La esterificación del grupo carboxilo del ácido fenilacético condujo a la obtención de un producto 17 veces más activo que el producto natural. Además se demostró que este último afecta el proceso de la respiración durante la germinación, posiblemente a través de una alteración del proceso de fosforilación oxidativa. La sencillez de la estructura química de este producto así como la magnitud de su efecto hacen de este producto un candidato ideal para el desarrollo de nuevos agentes pesticidas.

El estudio del actinomiceto MIV2B(13) condujo al aislamiento de las actinomicinas C1 y C2, antibióticos con una potente actividad anticancerígena y de gran importancia como herramienta de investigación. La obtención de estos productos a partir del microorganismo

MIV2B(13) apoyaría su clasificación en el género *Streptomyces* o en el género *Actinomyces* ya que estos productos se han aislados de especies pertenecientes a ambos géneros.

Por último, es importante destacar que los microorganismos MIV2B(9) y MIV2B(31) biosintetizan metabolitos secundarios característicos de los géneros en que fueron clasificados.

6. PERSPECTIVAS

1. Continuar con la caracterización taxonómica a nivel de especie de *Actinomadura* MIV2B(31) con la finalidad de comprobar de manera inequívoca que éste constituye una nueva especie productora del antibiótico maduramicina. Para la realización de esta actividad se propone emplear técnicas de hibridización ADN-ADN y realizar la comparación de la secuencia de un mayor fragmento del gen ARNr 16S.
2. Debido al interés comercial de la maduramicina, se abre el horizonte en la investigación biotecnológica de este microorganismo para la búsqueda de mecanismos que aumenten los rendimientos del producto. En este sentido, se propone determinar el efecto de diferentes nutrientes en la producción de maduramicina e iniciar un programa de mutagénesis del microorganismo para descubrir cepas sobreproductoras de maduramicina o productoras de análogos estructurales con la finalidad de mejorar las propiedades biológicas del antibiótico.

3. Considerando que el éster metílico del ácido fenilacético tiene un efecto significativo sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*, así como en la respiración de semillas durante la germinación, se considera pertinente explorar su efecto sobre la cadena respiratoria mitocondrial.

4. Evaluar el efecto de otros derivados del ácido fenilacético sobre la germinación y el crecimiento radicular de diversas semillas de prueba con la finalidad de establecer una posible relación estructura química-actividad.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abbas, H. K., Boyette, C.D., Hoagland, R.E. y Vesonder, R.F. (1991). Bioherbicial potential of *Fusarium moniliforme* and its phytotoxin, fumonisin. *Weed Sci.* **39**, 673-677.
- Achnine, L., Mata, R. y Lotina-Hennsen, B. (1999). Interference of the natural product 7-Oxo-7-deacetoxygedunin with CF₀ of H⁺-ATPase of spinach chloroplasts. *Pestic. Biochem. Physiol.* **63**, 1-11.
- Achnine, L., Mata, R., Iglesias-Prieto, R. y Lotina-Hennsen, B. (1998). Impairment of photosystem II donor side by the natural product odoratol. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5313-5317.
- Achnine, L., Pereda-Miranda, R., Iglesias-Prieto, R., Moreno-Sánchez R. y Lotina-Hennsen, B. (1999). Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. *Physiol. Plantarum.* **106**, 246-252.
- Alteras, I., Abraham, D., Ideses, C., Segal, R. y Sandbank, M. (1988). Mycetoma of the forearm due to *Actinomadura madurae*. *Mycopathologia.* **103**, 55-57.

- Anaya, A. L. (1996). Plant Info-chemicals: Ecological aspects and potencial in pest control. *Rev. Lat. Quím.* **24**, 170-176.
- Anaya, A. L., Calera, M. R., Mata, R. y Pereda-Miranda R. (1991) Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* CAV (convolvulacece). *J. Chem. Ecol.* **16**, 2145.
- Anaya, A.L., Hernández-Bautista, B.E., Jiménez-Estrada, M. y Velasco-Ibarra, L. (1992). Phenylacetic acid as a phytotoxic compound of corn pollen. *J. Chem. Ecol.* **18**, 897-905.
- Anaya, A.L., Hernández-Bautista, B.E., Pelayo-Benavides, R.H., Calera, M. y Fernández-Luiselli, E. (1995). Allelopathy in Mexican Plants. More recent Studies. En: K. Indrejit, M. Dakshini y F.A. Einhellig (Editores). Allelopathy organisms, process and applications.. ACS Symposium Series, **582**. pp 225-241.
- Anderson, J.W. y Beardall, J. (1991). Molecular activities of plant cell. An introduction to plant biochemistry. Blackwell Scientific Publications. USA.
- Arai, H., Haneishi, T., Kitahara, N., Enokila, R., Kawakuba, K. y Kondo, Y. (1976). Herbicidins A and B, two new antibiotics with herbicidal activity. *J. Antibiot.* **30**, 863-869.
- Arcamone, S.G., Cassinelli, G., Santini, A., Grein, P., Orezzi, C. y Spalla, P.A. (1969). Adriamicyn, 14-hidroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 1101-1110.
- Arntzen, C. J. (1972). Inhibition of photophosphorylation by tentoxin, a cyclic tetrapeptide. *Biochim. Biophys. Acta.* **282**, 539-542.
- Artzen, C.J., Pfister, K. y Steinback, K.E. (1982). En H.M. Lebaron y J. Giessel (Editores). Herbicide resistance in plants. Willey and Sons, New York, p. 185-224.

- Ashton, R.J., Kening, M.D., Luk, K., Planterosa, D.N. y Scott-Wood, G. (1990). MM46115, a new antiviral antibiotic from *Actinomadura pelletieri*. Characteristics of the producing culture, fermentation, isolation, physicochemical and biological properties. *J. Antibiot.* **43**, 1387-1393
- Ashworth, D.M., Duncan, S.H. y Robinson, J.A. (1989). Selection of a specifically blocked mutant of *Streptomyces cinnamonensis*. Isolation and synthesis of 26-deoxymonesin A. *J. Antibiot.* **42**, 1088-1099.
- Asogalem, E.A. y Akintonwa, A. (1997) Embryotoxic effects of oral ametryn exposure in pregnant rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**, 184-189.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., More, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. (1989). Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates-Wiley Interscience, New York.
- Ayer, S. W. Isaac, B.G., Luchsinger, K., Makkar, N. y Tran, M. (1991). Cis 2-amino-1-hydroxycyclobutane-1-acetic acid, a herbicidal antimetabolite produced by *Streptomyces rochei* A13018. *J. Antibiot.* **44**, 1460-62.
- Ayer, S.W. Isaac, B.G., Krupa, D.M, Crosby, K.E., Letendre, L.S. y Stonard, R.J. (1989). Herbicidal compounds from microorganism. *Pestic. Sci.* **27**, 221-223.
- Babczinski, P., Dorgerloh, M. Löbberding, A., Santel, H.J., Schmidt, R.R., Schimitt, P., Wünsche, C. (1991). Herbicidal activity and mode of action of vulgamicin. *Pestic. Sci.* **33**, 439-446.
- Barry, A.L. y Thornberry, C. (1991). Susceptibility Test: Diffusion test Procedures. En. A. Balows (Editor in Chief). Manual of Clinical Microbiology. 5ª Edición. American Society for Microbiology. Washington, D C 1117-1125.

- Bayer, E., Grugel, K.H., Hägele, K., Hasehamier, H., Jessipów, S. Köning, W., Zähnen, H. (1972). Stoffwechsel produkte von mikroorganismen. Phosphinothricin und phosphinothricin-alanyl-alanine. *Helv. Chim. Acta.* **55**, 224-39.
- Becker, B.M.P., Lechevalier, R.E., Gordon y H. A. Lechevalier (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **112**, 421-423.
- Bedi, T.R., Kaur, S. y Kumar, B. (1978). Red grain mycetoma of the scalp (*Actinomadura pelletieri*). A case report from India. *Mycopathologia.* **63**, 127-128.
- Bèrdi, J. (1989). The discovery of the new bioactive microbial metabolites. Screening and identification. En M.E. Bushell y U. Gräfe (editores). Bioactive metabolites from microorganism. Progress in industrial microbiology. Vol. 27. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. Pp 3-25.
- Berge y's Manual of determinative bacteriology (1994) J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath y J. T. Stanley (editores). Zippincott Williams & Wilkings, USA.
- Berger, J. Y Rachiln, A. J., Scott, W. E., Sternbach, L. H., y Goldberg N. W. (1951). The isolation of three new Crystalline antibiotic from *Streptomyces*. *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 5295-5298.
- Bernal-Morales, E., Romo de Vivar, A., Sánchez, B., Aguilar, M. y Lotina-Hennsen, B. (1994). Inhibition of Oxígen Evolution by Ivalin. *Can. J. Bot.* **72**, 177-181.
- Bewley, J.D. y Black, M. (1994). Seeds. Physiology of development and germination. 2ª edition. Plenum Press. N.Y. pp 1-33, 147-198.

- Bickley, J. y Owen, R. J. (1991). Preparation of Bacterial Genomic DNA. En: Howard y D. M Whit Combe (editores). *Methods in molecular biology*. Vol. 46. Humana Press, Inc., Totowa, N. J. Pp. 141-147.
- Blount, J. F y Westley, J. W. (1975). Crystal and molecular structure of the free acid form of antibiotic X-206 hydrate. *J.Chem. Soc. Chem. Comm*, 553.
- Blumauerová, M., Kristu^ofek, V., Jizba, J., Sedmera, P., Beran, M., Prikrylavá, V., Stary, J., Kucera, M., Sajdl, P. y Landa, V. (1989). Research of *Streptomyces* producing pesticides and plant growth regulator. En M.E. Bushell y U. Gräfe (editores) *Bioactive metabolites from microorganism. Progress in industrial microbiology*. Vol. 27. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. Pp 237-252.
- Bordner, J., Watts, P.C. y Whipple, E.B. (1987). Structure of the natural antibiotic ionophore CP-54,883. *J. Antibiot* **40**, 1496-1505
- Botterman, J. y Leemans, J. (1989). Discovery, transfer to crops, expression and biological significance of a bialaphos resistance gene. *Monograph, Brit. Crop. Prot. Cont.* **42**, 63-8.
- Bowes, J., Croffs, A.R. y Arnzten, C.J. (1980). Redox reactions on the reducing side of photosynthem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties. *Arch. Bioch. Biophys.* **200**, 300-308
- Briquet, M., Vilret, D., Gublet, P., Mesa, M. y Eloy, M. (1998). Plant Cell Membranes as biochemical targets of the phytotoxins helminthsporol. *J. Bioenerg. Biomenb.* **30**, 285-295.
- Brown C.M. (1985). Isolation methods for microorganisms. En M. Moo-Young (editor) *Comprehensive biotechnology. The principles, applications and regulations of*

biotechnology in industry, agriculture and medicine. Vol 1. Pergamon Press Ltd. Canada. 21-35.

Brown, M. A. y Rajan, S. (1986). Maduramicin: rat metabolism of highly potent polyether anticoccidial examined by carbon-13 NMR. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 470-472.

Budzikiewicz, H., Djerasi, C. y Williams, D.H. (1964). Interpretation of mass spectra of organic compounds. Holden-day, Inc. San Francisco.

Burkhead, K.D., Slininger, P.J. y Schisler, D.A. (1978). Biological Control bacterium *Enterobacter cloacae* S11:T:07 (NRRL B-21050) produces the antifungal compound phenylacetic acid in sabouraud maltose broth culture. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 665-667.

Calabrese, E.J. (1997). Striking the balance between the role of animal model and human data in hazard assesment. *Hum. Exp. Toxicol.* **16**, 186-187.

Calera M.R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Hernández, B., Anaya, A, L., Lotina-Hennsen B. y Mata, R. (1995a) Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry.* **40**, 419-25.

Calera, M.R., Mata, R., Anaya, A.L. y Lotina-Hennsen, B. (1995b). 5-O- β -D-galactopyranosil-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynth. Res.* **40**, 105-110.

Calera, M.R., Mata, R., Lotina-Hennsen, B. y Anaya, A.L. (1996). Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts: structure-activity relationships. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2966-2969.

- Calera, M.R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Hernández-Bautista, B.E., Anaya, A.L., Lotina-Hennsen, B. y Mata, R (1995c). Uncoupling Behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts. *Phytochemistry*. **40**, 419-425.
- Castañeda, P., Mata, R. y Lotina-Hennsen, B. (1998). Effect of encecalin, euparin and demethylencecalin on thylakoid transport and photophosphorylation in spinach chloroplasts. *J. Sci. Food Agric.* **78**, 102-108.
- Castañon-Olivares, L.R., Manzano-Gayosso, P. Hernández-Hernández, F., Romero-Martínez, R y López-Martínez, R (1992). Isolation of pathogenic actinomycetes from an aerea endemic for mycetoma in Mexico. *Rev. Mex. Micol.* **8**, 111-120.
- Catlin, E.R., Hassall, C.H. y Pratt, B.C (1968). Biosynthesis of phenols XIV. Isolation of some shikimic acid derived metabolites from mutant strain of *Streptomyces rimosus* unable to produce oxytetraciline. *Biochim. Biophys Acta.* **156**, 109-118.
- Cooper, R., Truumees, I., Yarborough, R., Loebenberg, D., Marquez, J., Horan, A., Patel, M., Gullo, V., Puer, M. y Pramanik, B. (1992). Macrolactams: two novel homologous series of compounds produced by *Actinomadura* spp. SC1776 and SCC 1777. *J. Antibiot.* **45**, 633-638.
- Copping, L.G., Hewitt, H.G. (1998). Chemistry and mode of action of crop protection agents. Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.
- Corbett, J.R. (1974). The biochemical mode of action of pesticides, Academic Press, New York, pp 330.
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A.L. y Ramos, L. (1988). Effects of allelopathic compounds of corn pollen on respiration and cell division of watwermelon *J. Chem. Ecol.* **14**, 71-86.

- Cullen, W.P. Celmer, N.D., Chappel, L.R., Huang, L.H., Maeda, H., Nishiyama, S., Shibakawa, R., Tone, J. y Watts, P. (1987). CP-54,883 a novel chloride-containing polyether antibiotic produced by a new species of *Actinomadura*. Taxonomy of the producing culture, fermentation, physico-chemical and biological properties of the antibiotic. *J. Antibiot.* **40**, 1490-95.
- Charizopoulus, E. y Papadopoulou-Moukidou, E. (1999) Occurrence of pesticides in rain of the Axios river Basin, Greece. *Environ. Sci. Tech.* **33**, 2363-2368.
- Chen, P. K. y Leather, G. (1990). Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds *J. Chem Ecol.* **16**, 1867-1876.
- Chen, P. K., Poplatnick, M. y Leather, G. (1991). Comparative study on artemisinin, 2, 4-D and glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 991-994.
- Christensen, S.B., Allaudeen, H.S., Burke, M.R., Carr, S.A., Chung, S.K., DePhillips, P., Dingerdissen, J.J., DiPaolo, M., Giovenella, A.J., Heald, S.L., Killmer, L.B., Mico, B.A., Mueller, L., Shearer, M.C., Sitrin, R.D., Nisbet, L.J. y Jeffs, P.W. (1987). Parvocidin, a novel glycopeptide from a new species *Actinomadura pavosata*. Discovery, taxonomy, activity and structure elucidation. *J. Antibiot.* **40**, 970-990.
- Dairi, T. Hamano, Y., Furumai, T y Oki, T. (1999). Development of a self-cloning system for *Actinomadura verrucosospora* and identification of poliketide synthase genes essential for production of the angucyclic antibiotic pradimicin. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2703-2709.
- Dávila del Real, M. del R., Arenas, R., Salazar, J.J., Torre, R.S. de la., Campos-Macias, P. García-Chavez, S., Padilla, M. del C. y Bonifaz, A. (1996). A mycetoma case in the State of Guanajuato. *Dermatol. Rev. Mex.* **40**, 408-411.
- Deboer, D., Meulamn, P.A., Wnuk, R.J., Peterson, D.H., (1970). *J. Antibiot.* **23**, 442-7.

- DeFrank, J. y Putnam, A.R. (1985). Screening procedures to identify soil-borne actinomycetes that can produce herbicidal compounds. *Weed Sci.*, **33**, 271-274.
- Dilley, R.A. (1972). *Methods in Enzimology*. Anthony San Prieto, Academic Press, pp 68.
- Dillman, R.L. y Cardellina, J.H., (1991). Aromatic secondary metabolites from the sponge *Tedania ignis*. *J. Nat. Prod.* **54**, 1056-1061.
- Dirlam, J. P., Bordner, J., Chang, S, Grizzuti, A., Nelson, T.H., Tynan, E.J. y Whipple, E.B. (1992a). The isolation and structure of CP-120,509, a new polyether antibiotic related to semduramicin and produced by mutants of *Actinomadura roseorufa*. *J. Antibiot.* **45**, 1544-1548.
- Dirlam, J.P., Belton, A.M., Bordner, J., Cullen, W.P., Huang, L.H., Kojima, Y., Maeda, H., Nishida, H., Nishiyama, S., Oscarson, J.R., Ricketts, A.P., Sakakibara, T., Tone, J. Y Yamada, M. (1990a). CP-84-657. A potent polyether anticoccidial related to portimicin and produced by *Actinomadura* sp. *J. Antibiot.* **43**, 668-679.
- Dirlam, J.P., Belton, A.M., Bordner, J., Cullen, W.P., Huang, L.H., Kojima, Y., Maeda, H., Nishida, H., Oscarson, J.R., Ricketts, A.P., Sakakibara, T., Tone, J. y Tsukuda, K. (1990b). A novel diglycoside polyether antibiotic related to monesin and produced by *Actinomadura* sp. *J. Ind. Microbiol.* **6**, 135-142.
- Dirlam, J.P., Belton, A.M., Bordner, J., Cullen, W.P., Huang, L.H., Kojima, Y., Maeda, H., Nishida, H., Nishiyama, S., Oscarson, J.R., Ricketts, A.P., Sakakibara, T., Tone, J. y Yamada, M. (1992). CP-82,009. A potent polyether anticoccidial related to septamycin and produced by *Actinomadura* sp., *J. Antibiot.* **45**, 331-340.
- Dirlam, J.P., Cullen, W.P., Huang, L.H., Nelson, T.H., Oscarson, J.R., Presseau-Linabury, L., Tynan, E.J. y Whipple, E.B. (1991). CP-91,243 and CP-91,244, novel diglycoside

- polyether antibiotic related to UK-58, 858 and produced by mutants of *Actinomadura roseorufa*. *J. Antibiot.* **44**, 1262-1266.
- Ditch, J., Zahm, S.H., Hanberg, A. y Adami, H.O. (1997). Pesticides and Cancer. *Cancer Causes and Control.* **8**, 420-43.
- Dobashi, K., Yang, J., Ogata, R., Takahashi, Y., Matsuda, N., Hamada, M., Naganawa, H., Takita T. y Takeuchi T. (1989). The structure of hidamicin, a polyether antibiotic. *J. Antibiot.* **42**, 629-632.
- Dubouchet, J. y Zouzou, M. (1992). Effect of phenilacetic acid on growth of sunflower hypocotyl and wheat coleoptile segments. Comparison with indolyl-3-acetic acid. *Comptes Rendus de L'academie de Sciences series III Sciences de la vie.* **315**, 63-68.
- Duke, S.O. y Abbas, H. K. Natural Products with potential use as herbicides. (1995). En I., M.M. Dakshini y F.A. Einhellig (editores). *Allelopathy organisms. Processes and applications.* ACS. **582**. Pp 348-362.
- Duke, S.O. y Lydon, J. (1993). Natural pyto toxins as herbicides. En *Pest control with enhanced enviromental safety.* ACS symposium series. Pp110-124
- Einhellig, F.A. (1995). Allelopathy: Current Status and Future Goals. En: K. Indrejit; M. Dakshini y F.A. Einhellig (Editores). *Allelopathy Organisms, Process and Aplications..* ACS Symposium Series, **582**, 1-24.
- Einhellig, F.A. (1995). Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy. En: K. Indrejit; M. Dakshini y F.A. Einhellig (Editores). *Allelopathy Organisms, Process and Aplications..* ACS Symposium Series, **582**, 96-116.

- Einhelling, F.A. (1986). Mechanisms and modes of action of allelochemical. En A R. Putnam y Chunshih, T. (Editores). The science of allelopathy. John Willey and sons. Inc. 171-189.
- Einhelling, F.A., Leather, G.R. y Hobbs, L.L. (1985). Use of *Lemna minor* L. as a bioassay in allelopathy. *J. Chem. Ecol.* **11**, 65-72.
- Einhelling, F.A., Rice, E.L., Risser, P.G. y Wender, S.H. (1970). Effects of scopoletin on growth, CO₂ exchange rates and concentration of scopoletin, scopolin and chlorogenic acids in tobacco, sunflower and pigweed. *Bull. Torrey Bot. Club.* **97**, 22-33.
- Elks y Granellin. (executive editor). (1999). Dictionary of Natural Products. Chapman & Hall. Chemical database.
- Ellestad, G. A., Canfield, N., Leese, R. A, Morton, G. O., James J. C., Siegel, M. M. y McGahren W. J. (1985), Chemistry of Maduramicin. I. Salt formation and normal ketalization. *J. Antibiot.* **39**, 447-456.
- Engler, R. y Levy, R. (1991). Comparyson of conventional risk assesment with cancer risk assesment. En B.G. Twedy, H.J. Dishburger, L.G. Ballantine y McCarthy (Editorer). Pesticides residues and food safety. A harverst of viewpoints. ACS. Washington, D.C. 226-234.
- Erdman, G.R. y Khalil, S.K. (1986). Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screw worm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae): *J. Med. Entomol.* **23**, 208-211.
- Evans, D. A, Bender, S. L. y Morris, J. (1988) Total Synthesis of the polyether antibiotic X-206 *J. Am. Chem. Soc* **110**, 2506-2526.

- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP-phylogeny inference package (versium 3.2). *Cladistics*. 5: 164-166.
- Fleck, W.F., Strauss, D.G., Meyer, J. y Porstendorfer, G. (1978). Fermentation, isolation and biological activity of maduramycin: a new antibiotic from *Actinomadura rubra*. *Z. Allg Mikrobiol.* **18**, 389-398.
- Früh, T., Chemla, P., Ehrler, J. y Farooq, S. (1996). Natural products as pesticides: two examples of stereoselective synthesis. *Pestic. Sci.* **46**, 37-47.
- Fuhremann, T.W. (1991). Food safety assesment for varius classes of carcinogens. En B.G. Twedy, H.J. Dishburger, L.G. Ballantine y McCarthy (Editores). *Pesticides residues and food safety. A harverst of viewpoints.* ACS. Washington, D.C. 221-225.
- Fujii, K., et al., (1970). *Eur. J. Biochem.* **17**, 552.
- Furumai, T., Saitoh, K., Kakushima, M., Yamamoto, S., Susuki, K., Ikeda, C., Kobaru, S., Hatori, M. y Oki, T. (1993). BMS-181184, a new pradimicin derivative. Screening, taxonomy, directed biosynthesis, isolation and characterisation. *J. Antibiot.* **46**, 265-274.
- Fushimi, S., Nishikawa, S., Mito, N., Ikemoto, M., Sasaki, M. y Seto, H. (1989). Studies on a new herbicidal antibiotic, homoalanosine, *J. Antibiot.* **42**, 1370-1378.
- Gauvrit, C. (1992). The mode of action of herbicides used in wheat crops. *Phytoma.* **435**, 38-42.
- Gauvrit, C. (1996). The efficacy and selectivity of herbicides INRA, Paris, France.

- Gauze, G.F., Preobrazhenskaia, T.P., Lavrova, N.V., Ukholina, R.S. y Kochetkova, N.V. (1975). *Actinomadura cremea* var. Rifamycin, a producer of rifamycin O. *Antibiotiki* **20**, 963-966.
- Gerwick, B.C. (1997). Pyridazocidin, a new microbial phytotoxin with activity in the Mehler reaction. *Weed Sci.* **45**, 654-657.
- Glazer, E.A., Cullen, W.P., Frame, G.M., Goudie, A.C., Kross, D.A., Olson, J.A., Ricketts, A.P., Tynan, E.J., Walshe, N.D., Wernau, W.C. y Scahff, T.K. (1990). Semduramicin: Design and preparation of a new anticoccidial ionophore by Semi-synthesis and mutasynthesis. En C. Nash, J. Hunter-Cervera, R. Cooper, D.E. Eveleigh, R. Hamill (Editores). *Development in Industrial Microbiology Series Microbial Metabolites*. Vol. 32. WmC. Brown Communications. Inc.
- González, V.M., Kazimir, J., Nimbai, C.I., Weston, L.A. y Cheniae, G.M. (1997). Inhibition of photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. *J. Agric Food Chem.* **45**, 1415-1421.
- Grover, R. Wolt, J.D., Cessnai, A.J. y Schiefer, H.B. (1997). Envirometal fate of Trifluralin. *Rev. Environ. Contamination. Toxicol.* **153**, 1-64.
- Gullo, V., Gunnarsson, I., Hedge, V., Horan, A., Loebenberg, D., Marquez, J., Patel, M., Puar, M. y Schwartz, J. (1991). A novel antifungal from an Actinomadurae with preferential activity against the mycelial pase of *Candida albicans*. *J. Ind. Microbiol.* **8**, 65-68.
- Hanada, M., Ohkuma, H., Yonemoto, T., Tomita, K., Ohbayashi, M., Kamel, H., Miyaki, T., Konishi, M., Kawaguchi, H y Forenza, S. (1991). Maduropeptin, a complex of new macromolecular antitumor antibiotics. *J. Antibiot.* **44**, 403-414.

- Harbone, J.B. (1980). Introduction to ecological Biochemistry. 3^a. Edicion. Academic Press, London.
- Hardell, L. y Erikson, H. (1999). A case control study of non Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Cancer*. **85**, 1353-1360.
- Harrison, A.G. y Kallury, R.K.M.R. (1984). Chemical ionization mass spectra of α -hydroxycarbonyl derivatives. Formation of stable electron deficient carbocations. *J. Org. Chem.* **49**, 4993-4995.
- Haruryama, H., Ohkuma, Y., Nagaki, H., Ogita, T., Tamaki, K. Y Kinoshita, T. (1994). Matlystatins, new inhibitors of type IV collagenases from *Actinomadura atramentaria* III. Structure elucidation of matlystatins A to F. *J. Antibiot.* **47**, 1473-1480.
- Hassall, K. A. (1990). Biochemistry and uses of pesticides. MacMillan Press -LTD, Basingtoke, U.K.
- Hatsu, M., Sasaki, T., Miyadoh, S., Watanabe, H., Takeuchi, Y., Kodama, Y., Orikasa, Y., Kajii, K., Shomura, T., Yamamoto, H., Sezaki, M., Inouye, S. y Kondo, S. (1990). SF2487, a new polyether antibiotic produced by *Actinomadura*. *J. Antibiot.* **43**, 259-266.
- Hedge, V., Patel, M., Horan, A., Gullo, V., Marquez, J., Gunnarsson, I., Gentile, F., Loebenber, D., King, A., Puer, M. y Pramanik, B. (1992). Macrolactams: a novel class of antifungal antibiotics produced by *Actinomadura* spp. SC1776 and SCC 1777. *J. Antibiot.* **45**, 624-632.
- Hedge, V.R., Patel, M.G., Gullo, V.P., Horan, A.C., King, A.H., Gentile, F., Wagman, G.H., Puar, M.S. y Loebenberg, D. (1993). A novel macrolactam disaccharide

- antifungal antibiotic. Taxonomy, fermentation, isolation, physicochemical properties, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot.* **46**, 1109-1115.
- Hedge, V.R., Patel, M.G., Wittreich, H., Gullo, V.P., Puar, M.S. y Bartner, P. (1989). Isolation and structure of an antifungal SCH 40873. *J. Org. Chem.* **54**, 2402-2404.
- Hedin, P.A., Menn, J.J. y Hollingworth, R.M. (1994). Development of natural products in the 21st Century. En P.A. Hedin, J.J. Menn y R.M. Hollingworth (Editores). Natural and engineered pest management agents. ACS Symposium series **551**. American Chemical Society. Pp 1-10.
- Hegde, V.R., Patel, M.G., Gullo, V.P., Horan, A.C., King, A.H., Gentile, F., Wagman G.H., Puar, M. y Schuwartz, J. (1991). A novel antifungal from an *Actinomadura* with preferential activity against the mycelial phase of *Candida albicans*. *J. Ind. Microbiol.* **8**, 65-68.
- Heijl, A.M., Einhellig, F.A. y Rasmusen, J.A. (1993). Effects of Juglone on growth, photosynthesis and respiration. *J. Chem. Ecol.* **19**, 559-568.
- Heiser, H., Oßwald, W. y Elstner, E. (1998). The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 703-13
- Heydens, W.F., Wilson, A.G., Kier, L.D., Lau, H., Thake, D.C., Martens, M.A. (1999). An evaluation of the carcinogenic potential of the herbicide alachlor to man. *Human Exper. Toxicol.* **18** 363-91.
- Heysey, R. M. y Putnam, A.R. (1986). Herbicidal effects of geldanamycin and nigericin, antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus* *J. Nat. Prod* **49**, 859-865.
- Hill, C.M., Craiger, D.P. Pearson, S.A., Smith, A.J. y Rogers, L.J. (1986). Mode of action of gabaculin, an inhibitor of chlorophyll biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **14**, 36-37

- Hirota, A., Horikawa, T. y Fujiwara (1993). Isolation of phenylacetic acid and indoleacetic acid from a phytopathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 492.
- Hoagland, R. E. (1996). Herbicidal properties of the antibiotic monesin. *J. Sci. Food Agric.* **70**, 373-379.
- Hoagland, R.E. (1990). Microbes and Microbial as Products as herbicides. En Hoagland, R.E (Editor). Microbes and Microbial as Products as herbicides. *ACS Symposium Series 439*.
- Hoescht AG, (1977). DOS 2 717 440.
- Holt, J.S. (1993). Mechanism and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 203-229.
- Hollteit, U., Bretmaier, E. y Jung, G. (1974). ¹³ C Nuclear magnetic resonance study of actinomycin D. *J. Amer. Chem. Soc.* **96**, 8036-8040.
- Horan, A.C. (1994). Aerobic actinomycetes. A continuing source of novel natural products. En V. P. Gullo (editor). The discovery of Natural products with therapeutic potential. Butterworth-Heinemann, USA. Pp 3-30.
- Hunter-Cervera, J.C., Fonda, M.E. y Belt, A. (1986). Isolation of cultures. En D.A.L. and Solomon, N.A. (Editores) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology. USA, 3-23.
- Iacobellis, N.S. y DeVay, J.E. (1987). Studies on pathogenesis of *Rhizoctonia solani* in beans: an evaluation of the possible roles of phenylacetic acid and its hydroxy derivatives as phytotoxins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **30**, 421-432.

- Igarashi, M., Kinoshita, N., Ikeda, T., Kameda, M. Hamada, M. y Takeuchi, T. (1997). Resormycin, a novel herbicidal and antifungal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **50**, 1020-1025.
- Igarashi, M., Nakamura, H., Naganawa, H. y Takeuchi, T. (1997). Resormycin, a novel herbicidal and antifungal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. II. Structure elucidation of Resormycin. *J. Antibiot.* **50**, 1026-1031.
- Isaac, B.G., Ayer, S. W. y Stonard R.J. (1992). Microorganism: a remarkable source of diverse chemical structures for herbicide discovery. En J. Petroski and S.P. McCormick. Secondary Metabolite Biosynthesis and Metabolism. R, Plenum Press, New York.
- Isaac, B.G., Ayer, S.W. Letendre, L.J. y Stonard, R.J. (1991). Herbicidal nucleosides from microbial sources. *J. Antibiot.* **44**, 729-732.
- Isaac, S., Ayer, W. y Stonard, R.J. (1991). The isolation of α -methylene- β -alanine, a herbicidal microbial metabolite. *J. Antibiot.* **44**, 795.
- Ishida-Okawara, A., Kimoto, Y., Watanabe, K., Tokuda, K., Shibata, M., Masuda, K., Takano, Y., Kawaguchi, K.A., Kagawa, H., Nilubul, N., Hotta, K., Yazawa, K., Mizuno, S y Susuki, K., (1991). Purification and Characterization of aseanostatins: actinomycete-derived fatty acid inhibitors to myeloperoxidase release from human polymorphonuclear leukocytes. *J. Antibiot.* **44**, 524-532.
- Isogai, A., Sakuda, S., Shindo, K., Watanabe, S., Suzuki, A., Fujita, J. y Furuya, T. (1986). Structures of cyclocarbamides A and B, new plant growth regulators from *Streptoverticillium* sp. *Tetrahedron Lett.* **27**, 1161-6.

- Isogai, Y., Okamoto, T. y Koizumi, T. (1967). Plant growth regulators. I. Isolation of Indole-3-acetamide, 2-phenylacetamide and Indole-3-carboxaldehyde from etiolated seedling of Phaseolus. *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 151-158.
- Iwai, Y., y Takahashi, Y. (1992) Selection of microbiological sources of bioactive Compounds. E. S. Omura (Editor). The search for bioactive compounds from microorganism Springer-Verlag. New York pp. 281-302.
- Iwata, M., Sasaki, T., Iwamutsu, H., Miyadoh, H., Tachibana, K., Matsumoto, K., Shomura, T., Sezaki, M. y Watanabe, T. (1987). A new herbicidal antibiotic, SF 2494 (5'-O-sulphamoyltubercidin) produced by *Streptomyces mirabilis*. *Scientific Reports of Meij Seika Kaisha*, **26**, 17-22.
- Iyer, P., Gammon, D., Gee, J. y Pfeifer, K. (1999). Characterisation of maternal influence on teratogenicity: an assesment of developmental toxicity studies for the herbicide cyanazine. *Regul Toxicol. Pharmacol.* **29**, 88-95.
- Izawa y Good N.E. (1983). Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Methods in Enzymology* **24**, 355-377.
- Izawa, S. (1977). Inhibition of electron transport. *Enciclopedia of Plant physiology*, New series **5**, 226-282.
- Jaya V. y Dubey, N.K. (1999). Perspectives of botanical and microbial products as pesticides of tomorrow. *Current Sci.* **76**, 172-179.
- Jiménez, A., Mata, R., Lotina-Hennsen, B. y Anaya, A.L. (1998). Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenil)-benzene with photosynthetic electron transport. *Z. Naturforsch.* **53c**, 55-59.

- Johns, S.R. y Lamberton, J.A. (1969). Isolation of simple acids amides from *Allophylus cobbe* (Sapindaceae), *Homalium foetidum* (Flacourtiaceae) and from an aglaia species (Meliaceae). *Aust. J. Chem.* **22**, 1315-15.
- Jukes, T. H., y Cantur, C. R. (1969). Evolution of protein molecules, En H. N. Munro (editor). Mammalian protein metabolism. Academic Press, Inc. New York 21-132.
- Kakinuma, S., Susuki, H., Hatori, M., Saitoh, K., Hasegawa, T., Furumai, T. y Oki, T. (1993). Biosynthesis of the pradimicin family of antibiotics III. Biosynthetic pathway of both pradimicins and benenomycins. *J. Antibiot* **46** 430-440.
- Kamada, Y., Anzai, H., Takano, E, Murakam., T. Hara, O., Itoh, R., Imai, S., Satoh, A, Nagoakaik. (1978) *J. Antibiot.* **16**, 39-45.
- Kamalam, A. y Thambiah, A. S. (1987). A clinicopathological study of actinomycotic mycetomas cused by *Actinomadura madurae* and *Actinomadura pelletierii*. *Mycopathologia.* **97**, 151-163.
- Kan-Fan, C., Das, B.C., Boiteau, P. y Potier, P. (1970). Alcaloïdes de Vepris ampody (Rutaceés). *Phytochemistry.* **9**, 1283-1291.
- Kato, H., Nagayama, K., Abe, H., Kobayashi, R. y Ishihara, E. (1991). Isolation, structure and biological activity of trialaphos. *Agric Biol. Chem.* **55**, 1133-34.
- Kawamura, S., Yoshioka, T., Kato, T., Matsuo, M. y Yasuda, M. (1996). Histological Changes in rat embrionic blood cells as possible mechanism for ventricular septal defects produced by an N-phenylimide herbicide. *Teratology* **54**, 237-44.
- Kawazu, K., Zhang, H., Yamashita, H. y Kanzani, H.(1996). Relationship between the pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* and phenylacetic acid production. *Biosc. Biotech. Biochem* **60**, 1413-1415

- Kenfield, D., Bunkers, G., Strobel, G.A. y Sugawara, F. (1988). Potential new herbicides phytotoxins from plant pathogens. *Weed Tech.* **2**, 519-524.
- Kida, T. y Shibar, H. (1986). Inhibition of De Novo starch synthesis and photosynthesis by Laidlomycin. *Agric. Biol. Chem* **50**, 485-486.
- Kida, T., Ishikawa, T. y Shibai, H. (1985). Isolation of two streptothricin-like antibiotics. Nos 6241-A y B as inhibitors of de novo starch synthesis and their activity. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1839-44.
- Kikuchi, Y., Niwano, M., Yajima, N., Nakamura G. y Miyata, N. (1985). A novel macromolecular antibiotic, SN-07. Taxonomy of producing organism, isolation, Characterisation and biological activities. *J. Antibiot.* **38**, 1670-1676.
- Kimura, T. Nakamura, K. y Takahashi, E. (1995). Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. II. Structure determination. *J. Antibiot.* **48**, 1130-1133.
- Kimura, T., Kakamura, K. y Takahashi, E. (1995). Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. SF-888. II. Structure determination *J. Antibiot.* **48**, 1130-33.
- King, R.R. y Lawrence, H. (1996). Characterisation of new Thaxtomin A. Analogues generated in vitro by *Streptomyces scabies*. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1108-1110.
- Kirkwood, R.C. (1987). Herbicides and plant growth regulator. En D.H. Hutson y T.R. Roberts (editores) Herbicides. Progress in pesticide biochemistry and toxicology. John wiley & Sons. Great Britain.
- Kitahara, T., Aono, S. y Mori, K. (1995). Synthesis of both the enantiomers of aseonostatin P5 (sarcinic acid), an inhibitor of myeloperoxidase release and four diastereomers of aggregeridine A, a platelet aggregation inhibitor. *Biosc. Biotech. Biochem.* **59**, 78-82.

- Kobinata, K., Sekido, S., Uramoto, M., Ubukata, M., Osada, H., Yamaguchi, I. e Isono, K. (1991). Isoxazole-4-carboxylic acid as metabolite of *Streptomyces* sp. and its herbicidal activity. *Agric Biol. Chem.* **55**, 1415-16.
- Koguchi, T., Yamada, K., Yamamoto, M., Okachi, R., Nakayama, K. y Kase, H. (1986). K-4, a novel inhibitor of angiotensin I. Converting enzyme produced by *Actinomadura spiculosospora*. *J. Antibiot.* **39**, 364-371.
- Kondo, S., Gomi, S., Uotani, K., Inouye, S. y Takeuchi, T. (1991). Isolation of new minor benanomicins. *J. Antibiot.* **44**, 123-129.
- Kondo, Y., Shomura, T., Ogawa, Y., Suzuki, T., Moriyama, C., Yoshida, J. Ononye, Shi y Niida, T. (1973). *Sci. Rept Meiji Seika Kaisha.* **13**, 34-41.
- Konishi M., Ohkuma, H., Saitoh, K., Kawaguchi, H., Golik, J., Dubay, G., Groenewold, G., Krishnan, B. y Doyle, TW. (1985). Esperamicins, a novel class of potent antitumor antibiotics. I. Physico-chemical data and partial structure. *J. Antibiot.* **38**, 1605-9.
- Kotoda, N., Shin-Ya, K., Furihata, K., Hayakawa, Y. y Seto, H. (1997). Isolation and Structure elucidation of novel neuronal cell protecting substances, carbazomadurins A and B produced by *Actinomadura madurae*. *J. Antibiot.* **50**, 770-772.
- Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. y Goodfellow, M. (1990). Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**, 148-160.
- Kumada, Y., Anzai, H., Takano, E., Murakami, T., Hara, O., Itoh, R., Imai, S., Satoh, A. y Nagaoka, K. (1988). The bialaphos resistance gene (bar) plays a role in both self-defense and bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygrosopicus*. *J. Antibiot.* **41**, 1838-45.

- Kunert, K.J. y Dodge, A.D. (1989). Herbicide induced radical damage and antioxidative systems. En: P. Böger y Sandman, G. (editores). Target sites of herbicide action. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 45-83.
- Labeda, D., Martin, J.H. y Goodman, J.J. (American Cyanamid: Process for producing antibiotic X-14858 A). US 4, 407, 946. Oct. 4, 1983.
- Labeda, D.P. y Shearer. (1990). Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. En. D.P. Labeda. Isolation of biotechnological organism from nature. McGrawhill, INC, 21-51.
- Lakpale, N., Kumar, R. y Khare, N. (1996). Studies on toxin produced by *Rhizoctonia solani* causing sheath blight of rice. *Indian J. Mycol. Plant Pathol.* **26**, 263-265.
- Lange, L., Breinholt, J., Ramussen, E.W y Nielsen, R. Y. (1993). Microbial fungicides- The natural choice. *Pestic. Sci.* **39**, 155-160.
- Lea, P.J., Joy, R.K. Ramos, J.L. y Guerrero, M.G. (1984). The action of 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (Phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry.* **23** 1-6.
- Leason, M., Cuniffe, D., Parkin, D., Lea, P.J. y Mifflin, B.J. (1982). Inhibition of pea leaf glutamine synthetase by methionine sulfoximine, phosphinothricin and other glutamine analogs. *Phytochemistry.* **21**, 855-857.
- Lechevalier, H.A. (1977). The actinomycetales. Soil or oxidative Actinomycetes. En A.I. Lasking, H.A. Lechevalier (Editores). Handbook of Microbiology. Vol. I. Bacteria. CRC Press, Inc. USA. 373-380.
- Lechevalier, M.P. (1968). Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance. *J. Lab. Clin. Med.* **71**, 934-944.

- Legendre, F., Maturano, M.D., Etienne, G., Klæbe, A. Tiraby, G. (1995). Synthesis and biological activity of derivatives of herbicidal metabolite CL22T (Phthoxazolin). *J. Antibiot.* **48**, 341-343.
- Lehninger, A. L. (1990) Bioquímica Las bases moleculares de la estructura y función celular, 2ª. Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
- Liebermann, M. (1977). Pesticide Chemistry in the 20th century. En: J.R. Plimmer (Editor) .ACS Symposium series 37 American Chemical Society, Whashington, 280-292.
- Lindeman, L.P. y Adams, J.Q. (1971). Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal. Chem.* **43**, 1245-1252.
- Linscott, D.L. (1981). The nature, mode of action and toxicity of herbicides. En D. Pimentel (editor). Handbook of pest management in agriculture. Vol III., CRC Press, Inc, Boca raton, Florida.
- Liu, C., Hermann, T. E., Downey, A., Prosser, B. La T., Schildknecht, E., Palleroni, N. J., Westley, J. W. y Miller, P: A. (1983) Novel polyether antibiotic X-14868 A, B, C, and D produced by a *Nocardia*. Discovery, fermentation, biological as well as ionophore properties and taxonomy of the producing culture. *J. Antibiot.* **36**, 343-350
- Liu, C.M., Prosser, B. y Westley, J. (Hoffman_La Roche: Antibiotic X-14868 A, B, C and D). US 4, 278, 663. Jul. 14, 1981.
- López-Martínez, R., Méndez-Tovar, L.J., Lavalle, P., Welsh, O., Saúl, A. y Macotela R.E (1992). Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac. Med. Mex.* **128**, 477-481.

- Lotina-Hennsen, B., Bernal-Morales, E. Romo de Vivar, A. Pérez, A.L., Castro, A. y Aguilar-Martínez, M. (1992). Inhibition of Oxygen evolution by Zaluzanin C. *J. Chem. Ecol.* **18**, 1891-1900.
- Lotina-Hennsen, B., Mata, R., Calderon, J S., Céspedes-Acuña, C.L. y Jiménez-Estrada, M. (1998). Secondary metabolites isolated from Mexican plants. Target and mechanism of action on photosynthesis. *Recent Res. Devel. In Agricultural and Food Chem.* **2**, 731-749.
- Lotina-Henssen, B., Roque-Reséndiz, J.L. Jiménez, y Agilar, M. (1991). Inhibition of Oxygen Evolution by Cacalol and its Derivatives. *Z. Naturforsch.* **46c**, 777-780.
- Love, D.N., Johnson, J.C., Jones, R.F. y Calverley, A. (1987). *Bacteroides salivosus* sp. nov., an asaccharolytic black pigmented species from cats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 307-309.
- Macías, M.L., Rojas, I.S., Mata, R. y Lotina-Hennsen, B. (1999). Effect of selected coumarins on spinach chloroplast photosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2137-2140.
- Maidak, B. L., Larsen, N., McCaughey, M. J. Overbeek, R., Olsen, G. J., Foger, K, Blandy, J. Y Woese, C. R. (1994). The ribosomal database project, *Nucleic Acids Res.* **22**, 3485-3487.
- Maier, A., Müllen, J., Schneider, P., Fiedler, H., Groth, I., Tayman, F. S., Teltschik, F., Günther, C. y Bringmann, G. (1999). (2E, 4Z)-Decadienoic acid and (2E, 4Z, 7Z)-decatrienoic acid, two herbicidal metabolites from *Streptomyces viridochromogenes* Tü 6105. *Pestic. Sci.* **55**, 733-739.
- Maiese, W. M., Korshalla, J., Goodman, J., Torrey, M.J., Kantor, S., Labeda, D.P. y Greensteing, M. (1990). Simaomicin (LL-D42067) a novel antibiotic from

- Actinomadura madurae*. I. Taxonomy, fermentation and biological activity. *J. Antibiot.* **43**, 1059-1063.
- Mallik, M.A. (1997). Isolates of soil actinomycetes with potential for phytotoxin production. *J. Chem Ecol.* **23**, 2683-2693.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory*, Cold spring Harbor, N. Y.
- Mapleston, R.A., Stone, M.J. y Williams, D.H. (1992). The evolutionary role of secondary metabolites a review. *Gene.* **115**, 151-157.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.
- Martin, D.G., Peltonen, R.E. y Nielsen, J.W. (1986). Preparative resolution of an actinomycin complex by countercurrent chromatography in the ito coil planet centrifuge. *J. Antibiot.* **39**, 721-23.
- Mata, R., Macías, M.L., Rojas, I.S., Lotina-Hennsen, B., Toscano, R.A., Anaya, A.L. (1998). Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. *Phytochemistry.* **49**, 441-449.
- Mata, R., Pereda-Miranda, R y Lotina-Hennsen, B. (1996). Natural Products from Mexican plants as a source of potential herbicide Agents. En S.G. Pandalai (editor). *Secondary Metabolites from Mexican Plants, Chemistry and Biological Properties*. Research Signpost, India, pp. 59-68.
- Mathis, P. y Rutherford, A.W. (1984). Effect of phenolic herbicides on the oxygen-evolving side of photosynthesis II. Formation of the carotenoid cation. *Bioch. Biophys. Acta* **767**, 217-222.

- Matson, J.A., Claridge, c., Bush, J.A., Titus, J., Bradner, W.T. y Doyle, T.W. (1989). AT 2433-A2, AT 2433-B1 y AT 2433-B2. Novel antitumor antibiotic compounds produced by *Actinomadura mellioura*. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **43**, 1547-1555.
- Mauger, A.B. y Thomas, W.A. (1981). NMR Studies of Actinomycins varying at the proline sites. *Org. Mag. Res.* **17**, 186-190.
- May, T-B., Guikema, J.A. Henry, R.L., Schuleer, M.K. y Wong, P.P. (1987). Gabaculine inhibition of chlorophyl biosynthesis and nodulation in *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiol.* **84**, 1309-13.
- Mayer, A.M. y Pojakoff (1989). The germination of seeds. 4ª edition, Pergamon Press.
- McCarty, R.E. (1977). Energy transfer inhibitors of photophosphorylation in chloroplast. Enciclopedia of plant physiology, 5. New Sciences. Pp 436-447.
- McGahren, W. J., Morton, G. O., Siegel, M M., Bordners. D. B., James, J. C. y Ellestad, G. A. (1986). Chemistry of Maduramicin. II Decarboxylation, abnormal ketalization and dehydration. *J. Antibiot.* **39**, 1541-1150.
- McNeil, M.M., Brown, J.M., Scalise, G. y Piersimoni, C. (1992). Nonmycetomic *Actinomadura madurae* infection in a patient with AIDS. *J. Clin Microbiol.* **30**, 1008-1010.
- Mendoza, J.C., Jiménez, M. y Lotina-Hennsen, B. (1994). Piquerol A and diacetyl piquerol act as energy transfer inhibitors of photosynthesis. *Pestic. Sci.* **40**, 37-40.
- Mets, L. y Thiel, A. (1989). Biochemistry and genetic control of the photosystem II herbicide target site. En: P. Börger y G. Sandman (Editores). Target sites of herbicide action. CRC Press Inc. Boca raton, Florida, 1-24.

- Meyer, J. (1989). *Actinomadura*. En S.T. Williams, M.E. Sharpe y J.G. Holt (editores). Bergey's manual of determinative bacteriology ed. The Williams & Wilkins Co. Vol. 4. P 2511-2526. USA.
- Miller-Wideman, M., Makkar, N., Tran, M., Isaac, B. y Biest, N. (1992). Herboxidiene, a new herbicidal substance from *Streptomyces cromofuscus* A 7847. Taxonomy fermentation, isolation, physicochemical and biological properties. *J. Antibiot.* **45**, 914-21.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type mechanism. *Nature* (London). **191**, 144-148.
- Mitchell, P.A. (1977) A commentary on alternative hypothesis of protonic coupling in the membrane system catalysis oxidative and photosynthetic phosphorylation. *FEBS Lett.* **78**, 1-20.
- Momose, I., Hirose, S., Nakamura, H., Naganawa, H., Inuma, H., Ikeda, D. y Takeuchi, T. (1999). Decatronomicins A and B, new antibiotics produced by *Actinomadura* sp. MK 73-NF4. I. Taxonomy, isolation, physicochemical properties and biological activities. *J. Antibiot.* **52**, 787-796.
- Momose, I., Inuma, H., Kinoshita, W., Momose, Y., Kunimoto, S., Hamada, M. y Takeuchi, T. (1999). Decatronomicins A and B, New antibiotics produced by *Actinomadura* sp. MK 73-NF4. I. Taxonomy, Isolation, physicochemical properties and biological activities *J. Antibiot.* **52**, 781-786.
- Moreland, D. E y Novitzky, W P. (1987) Effect of phenolic acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. En G.R. Waller (editor). Allelochemicals: role in agriculture and forestry. ACS symposium series 330. Washington, D.C., 246-261.

- Moreland, D.E. (1980). Mechanisms of actions of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**, 597-638.
- Morgan, M.K., Scheuerman, D.R., Brishop, C.S. y Dyles, R.A. (1996). Teratogenic Potential of atrazine and 2,4-D using FETAX. *J. Toxicol. Environ. Health.* **48**, 151-68.
- Murakata, K., Yamada, O., Ishida, S., Futatsuya, F., Ito, K. y Yamamoto, H. (1973). *Proc. Asian Pacific Weed Sci. Conf.* **4**, 215-219.
- Murray, R.G.E., Doetch, R.N. y Robinow, C. (1994). Determinative and cytological light microscopy. En P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood y N.R. Krieg (editores). *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington. 21-41.
- Nair, M. y Burke, B. (1988). A new fatty acid methyl ester and other biologically active compound from *Aspergillus niger*. *Phytochemistry.* **27**, 3169-3173.
- Nair, M.G. (1994). Natural products as sources of potential agrochemicals. En P.A. Hedin, J.J. Menn y R.M. Hollingworth (Editores). *Natural and engineered pest management agents*. ACS Symposium series **551**. American Chemical Society. pp 145-161.
- Nakajima, M., Itoi, K., Takamatsu, Y., Kinoshita, T., Okazaki, T., Kawakubo, K., Shindo, M., Honma, T., Tohjigamuri, M. y Haneishi, T. (1991). Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity from *Streptomyces hygrosopicus*. *J. Antibiot.* **44**, 293-300.
- Nakamura, G. e Isono, K. (1983). A new species of *Actinomadura* producing a polyether antibiotic, cationomycin. *J. Antibiot.* **36**, 1468-1472.

- Nakanishi, K. (1994). Natural Products as sources of pest management agents. En P.A. Hedin, J.J. Menn y R.M. Hollingworth (Editores). Natural and engineered pest management agents. ACS Symposium series **551**. American Chemical Society. Pp 11-24.
- Neuberger, J.S. (1996). Atrazine and/or triazine herbicides exposure and cancer: an epidemiologic review. *J. Agromedicine*. **9**, 30.
- Neufeind, T. Reinemer, P. y Bieseler, B. (1997). Plant glutathione S-transferase and herbicide detoxification *Biological Chemistry*. **378**, 199-205.
- Nisbet, L.J. (1992) Useful functions of microbial metabolites. En secondary metabolites: their function and evolution. Ciba Foundation Symposium. **171**. John Wiley and Sons.
- Nishida, Y., Kawaguchi, A., Yamada, M. (1984). Selective inhibition of type II fatty acid synthetase by the antibiotic thiolactomycin. *Plant Cell Physiol*. **25**. 265-8.
- Nishino, T y Murao, S., (1983). Isolation and some properties of an aspartate aminotransferase inhibitor gostatin. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1961-6
- Oettmeier, P., Godde, B., Kunze y Höfle, G. (1985). Stigmatelling. A dual type inhibitor of photosynthetic electron transport. *Biochim Biophys Acta*, **807**, 216.
- Oettmeier, W. (1999). Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cel. Mol. Life Sci.* **55**, 1255-77.
- Oettmeier, W., Masson, K. y Donner, A. (1988). Anthraquinone inhibitors of photosystem II electron transport. *FEBS lett.* **231**, 259.

- Ogawa Y., Mori, H., Yamada, N. y Kon, K. (1984). The absolute structures of rubeomycins A and A1 (carminomycins II and III) and rubeomycins B and B1 (4-hydroxybaumycinols A1 and A2). *J. Antibiot.* **37**, 44-56.
- Ogita, T., Sato, A., Enokita, R., Susuki, K., Ishi, M., Negishi, T., Okazaki, T., Tamaki, K. y Tanzawa, K. (1992). Matlystatins, new inhibitors of type IV collagenases from *Actinomadura atramentaria* III. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties of matlystatins group compounds. *J. Antibiot.* **45**, 1723-1732.
- Oki, T., Kakushima, M., Nishio, M., Kamei, H., hirano, M., Sawada, Y. y Konishi, M. (1990). Water-soluble pradimicin derivatives, synthesis and antifungal evaluation of N, N,-dimethyl pradimicins. *J. Antibiot.* **43**, 1230-1235.
- Oki, T., Konishi, M., Tomatsu, K., Saitoh, K.I., Tsunakawa, M., Nishio, M., Miyaki, T., Kawaguchi, H. (1988). Pradimicin, a novel class of potent antifungal antibiotics. *J. Antibiot.* **41**, 1701-1704.
- Okuda, S. (1992). Herbicides. En S. Omura (Editor). The search for Bioactive Compounds from microorganism Springer-Verlag. New York. pp 224-236.
- Omura, S. (1992a). Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Ind. Microbiol.*, **10**, 135-156.
- Omura, S. (1992b). The expanded horizon for microbial metabolites- a review. *Gene* **115**, 141-149.
- Omura, S., Murata, M., Hanaki, H., Hinotozawa, K., Oriwa, R. y Tanaka, H. (1984a). Phosalacine, a new herbicidal antibiotic containing phosphinotricin. *J. Antibiot.* **37**, 829-30.

- Omura, S., Murata, M., Imamura, N., Iwai, Y. y Tanaka, H. (1984b). Oxetin, a new antimetabolite from actinomycete. Fermentation, isolation, structure and biological activity. *J. Antibiot.* **32**, 1234-1332.
- Omura, S. Iwai, Y. Takahashi, Y. Sadakane, N. Nakagawa, A. Oiwa, H. Hasegawa, Y. Ikai, T. (1979). Herbimycin, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **32**, 255-261.
- Omura, S., Nakagawa, A., Fukamachi, N., Ootoguro, K. y Kobayashi, B. (1986). Agregeride, a new platelet aggregation inhibitor from *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **39**, 1180-1181.
- Omura, S., Tanaka, Y., Kanaya, Y., Shinose, M. y Takashi, Y. (1990). Phthoxazolin. A specific inhibitor of cellulose biosynthesis, produced by a strain of *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **43**, 1034-36.
- Ondo, S., Gomi, S., Uotani, K., Inouye, S. y Takeuchi, T.J. (1991). Isolation of new minor benenomicins. *J. Antibiot.* **44** (2) 123-129.
- Ong, P.K.C., Acree, T.E. y Lavin, E.H. (1998). Characterization of volatiles in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* L.). *J. Agric Food Chem.* **46**, 611-615.
- Oronsky, A.L. (American Cyanamid Co.: Treatment of malaria with antibiotics). US 4, 496, 549. Jan, 1985.
- Parameswaram, P.S., Naik, C.G. y Hedge, V.R. (1997). Secondary metabolites from the sponge *Tedania anhelans*. Isolation and Characterization of two novel pyrazole acids and other metabolites. *J. Nat. Prod.* **60**, 802-803.
- Parry, K.P. (1989). Herbicide use and invention. En A.D. Dodge (editor). Herbicides and plant metabolism. Society for experimental biology. seminar series. 38. Cambridge University Press. Cambridge, G.B.

- Patel, M., Gullo, V.P., Hedge, V.R., Horan, A.C., Gentile, F., Marquez, J.A., Miller, G.H., Puar, M.S. y Waitz, A. (1987). A novel tetracycline from *Actinomadura brunnea*. Fermentation, isolation and structure elucidation. *J. Antibiot.* **40**, 1408-1413.
- Patel, M., Horan, A.G., Gullo, V.P., Lobenberg, D., Marquez, J.A., Miller G.H. y Waitz, J.A. (1984). Oxanthromicin, a novel antibiotic from *Actinomadura*. *J. Antibiot.* **37**, 413-415.
- Pearce, F. y Mackenzie, D. (1999). It's raining pesticides. The water falling from our skies is unfit to drink. *New Scientist*. 3 april. P 23.
- Pefferle, C., Breinholt, J., Gürtler, H. y Fiedler, H. (1997). 1-hidroxy-4-methoxy-2-naphthoic acid a herbicidal compound by *Streptosporangium cinnabarium* ATCC 31213. *J. Antibiot.* **50**, 1067-1068.
- Peng, Y., Yashpe, J. Y Demain, A.L. (1997). Biotransformation of campactin by *Actinomadura* sp. 2966. *J. Antibiot.* **50**, 1032-1035.
- Penrose, A.B., Ruddock, J.C., Shinbakawa, R. y Tone, J. July 1982. Brit. Pat. Appl. 2,090,243.
- Peña-Valdivia, C.B.; Rodríguez-Flores, L., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Lotina-Hennsen, B. (1991). Inhibition of photophosforylation and electron transport by N,N-dimethylformamide. *Biophysical Chemical* **41**, 169-174.
- Percival, M. P. y Baker, N.R. (1991). Herbicides and photosynthesis. En N.R. Baker y M.P. Percival (editores). *Herbicides. Topics in Photosynthesis*. Vol. 10. Elsevier.
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A.L. Wickramaratne, D.B.M. Pezzuto, J.M. y Kinghorn, A.D. (1993). Tricolorin A, major phytogrowth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *J. Nat. Prod.* **56**, 571-582.

- Perez-Blanco, M., Hernández-Valles, R., Fernández-Zeppenfeldt, G. Y Yegres, F. (1996). Mycetoma: report of 3 cases in Falcón State, Venezuela. *Invest. Clin.* **37**, 61-73.
- Picman, A. (1986) Aqueous solubility of isoalantolactone and its effect on germination and biomass production of redroot pigweed and late-flowering goose foot. *Bioch. Syst. Ecol* **14**, 361-364.
- Pine, L. (1977). Parasitic or fermentative actinomycetes. En A.I. Lasking, H.A. Lechevalier (Editores). Handbook of Microbiology. Vol. I. Bacteria. CRC Press, Inc. USA. 363-380.
- Porter, N. y Fox F.M. (1993) Diversity of Microbial Products-Discovery and Application. *Pestic. Sci.* **39**, 161-168.
- Probst, B. y Lorenz, M. (1987). Increased scent marking in male mongolian gerbils by urinary polypeptides of female conspecifics *J. Chem. Ecol.* **13**, 851.
- Prosser, B. y Palleroni, N.J. (1982). Taxonomy of the polyether antibiotics-producing organisms. En J.W. Westley (editor). Polyether antibiotics. Naturally occurring acid ionophores. Vol. 1. Biology. Marcel Dekker, Inc. New York. 21-42.
- Putnam, A.R. (1988). Allelochemical from plants as herbicides. *Weed Tech.* **2**, 510-518.
- Putwain, P.D. y Collin, H.A. (1989). Mechanisms involved in the evolution of herbicide resistance in weeds. En A.D. Dodge (Editor). Herbicides and Plant metabolism. Society for Experimental Biology. Seminar series, 38. Cambridge University Press. Cambridge, G.B.
- Puzza, M., Suchy, J. Cudlin, J., Vondracek, M. y Vanek, Z. (1965). Metabolites of *Streptomyces noursei* II. Formation of amides of branched aliphatic acid in *Streptomyces noursei*. *Folia Microbiol.* **10**. 60-2.

- Rajan, S., Tsou, H., Mowery, P. C., Bullock, M. W. y Stockton, G. W. (1984). Natural abundance two dimensional double quantum ^{13}C NMR spectroscopy of maduramicin, a polyether ionophore antibiotic and coccidiostat. *J. Antibiot.* **37**, 1495-1500.
- Reimer, S. y Elman, S. R. (1978). Tentoxin induced energy dependent adenine nucleotide exchange an ATPase activity with chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.* **253** 7249-7255.
- Renger, C., Hagemann, R. y Vermaas, W.F. (1984). Studies on the functional mechanism of system II herbicides in isolated chloroplasts. *Z. Naturforsch.* **39c**, 362-367.
- Ricci, D., Fraternali, D., Giamperi, L., Manunta, A. (1996). A auxin structure and morphogenic activity. *Rivista Italiana Eppos.* **20**, 5-12.
- Ricci, D., Fraternali, D., Giamperi, L., Manunta, A. (1997). Phenylacetic derivatives: auxin activity and effects in tissue culture systems. *Rivista Italiana Eppos.* **23**, 25-32.
- Robinson, J. A. (1991). Chemical and biochemical aspects of polyether ionophore antibiotics biosynthesis. *Progr. Nat. Prod. Chem.* **58**, 1-79.
- Roland, M. A. (1993). Handbook of microbiological media. L. C. Parks (editor). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Ruddock, J.C., Chappel, L.R., Cullen, W.P., Holdom, K.S., Maeda, H., Tone, J., Whipple, E. y Williams, D.J. (1990). UK-58, 852 a novel ionophore. Fermentation, isolation and biological properties. Program and abstracts of the second S.I.M. Int. Conf. on Biotech. of Microb. Prod. with novel phamacolog. and Agrobiol. Activities N° P-15, p. 31 Sarasota, Oct. 14-17.

- Rudge, R.H. (1991) Maintenance at bacteria by Freeze-Drying En. B.E. Kirsop y A. Doyle (Editores). Maintenance of microorganisms and culture cells. A manual of laboratory Methods. 2ª. Edición. Academic Press. New York. P. 31-43.
- Rupprecht, J.k., HUI, y.-H. y McLaughlin, J.L. (1990). Annonaceus acetogenins: a review. *J. Nat. Prod.* **53**, 237-278.
- Saitoh, K., Sawada, Y., Tomita, K., Tsuno, T., Hatori, M. y Oki, T. (1993a). Pradimicins L and FL: new pradimicin congeners from *Actinomadura verrucosospora* subsp. *neohibisca*. *J. Antibiot.* **46**, 387-397.
- Saitoh, K., Susuki, K., Hirano, M., Furumai, T. y Oki, T. (1993b). Pradimicins FS and FB, new pradimicin analogs: directed production, structures and biological activities. *J. Antibiot.* **46**, 398-405.
- Saitoh, K., Tenmyo, O., Yamamoto, S., Furumai, T. y Oki, T. (1993c). Pradimicin S, a new pradimicin analog. I. Taxonomy, fermentation and biological activities. *J. Antibiot.* **46**, 580-588.
- Sakai, S., Aimi, N., Yamaguchi, K., Hitosuyanagi, Y., Watanabe, C., Yokose, K., Koyama, Y., Shudo, K. e Itai, A. (1984). Elucidation of the structure of olivoretin. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 354-357.
- Sambrook, J., Fritsch, E., F. y Maniatis, T., (1989). Molecular Clonning: a Laboratory Manual, 2ª. Edición. Cold Pring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York.
- Sarwar, M. y Frankenberg, W.T. (1995). Fate of L- phenylalanine in soil and its effect on plant growth. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **59**, 1625-1630.

- Sasaki, T., Otani, T., Yoshida, K., Unemi, N., Hamada, M. y Takeuchi, T. (1997). Discovery of methyl-2-(2'-hydrophenyl)-2-oxazoline-4-carboxilate as a secondary metabolite from *Actinomadura* sp. *J. Antibiot.* **50**, 881-883.
- Sathiakumar, N. y Delzell, E. (1997). A review of Epidemiologic Studies of Triazine Herbicides and Cancer. *Crit Rev. Toxicol.* **27**, 599-612.
- Sawada, Y., Hatori, M., Yamamoto, H., Nishino, M., Miyaki, T. y Oki, T. (1990). New antifungal antibiotics pradimicins FA-1 and FA-2, D-serine analogs of Pradimicins A and C. *J. Antibiot.* **43**, 1223-1229.
- Sawada, Y., Hatori, M., Yamamoto, H., Nishino, M., Miyaki, T. y Oki, T. (1990). New antifungal antibiotics pradimicins FA-1 and FA-2: D-serine analogs of pradimicins A and C. *J. Antibiot.* **43**, 1230-1235.
- Sawada, Y., Tsuno, T., Yamamoto, S., Nishio, M., Konishi, M. y Oki, T. (1993). Pradimicins M, N, O and P, new dihidrobenzo[a]naphthacenequinones produced by blocked mutants of *Actinomadura hibisca* P-157-2. *J. Antibiot.* **43**, 1367-1374.
- Scott, K.N. (1972). NMR parameters of biologically important aromatic acids 2. Phenylacetic acid and derivatives. *J. Mag Reson.* **6**, 55.
- Schmitzer, P.R., Graupner, P.R., Chapin, E.L., Fields, S.C., Gilbert, J.R., Gray, J.A., Peacock, C.L. y Gerwick, B.C.. (2000). Ribofuranosyl triazolone: anatural product herbicide with activity on adenylosuccinate synthetase following phosphorylation. *J. Nat. Prod.* **63**, 777-781.
- Sen, S. y Sharma, V. (1996). Tonoplast ATPase of peanut seedling. Properties and interaction with phytohormones and phenolics. *Plant Physiol. Biochem.* **23**, 1-8.

- Seto, H, Mizoue, K y Otake, N. (1979). The revised structure of alborixin. *J. Antibiot*, **33**, 970-971.
- Seto, H. y Otake, N. (1983). ^{13}C NMR spectra of polyether antibiotics. En J.W. Westley (editor). Polyether antibiotics. Naturally occurring acid ionophores. Vol. 2. Chemistry. Marcel Dekker, New York. Pp 335-399.
- Shavit, N y San Pietro, A. (1967). K^+ - dependent uncoupling of photophosphorylation by nigericin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 277-283.
- Shavit, N., Degani, H., y San Pietro, A. (1970). II Effects on ionophorous antibiotics in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 208-219.
- Sherman, V.B.D (1967). A guide to identification of the genera of Bacteria. Williams & Wilkins Co.
- Shindo, K., Yamagishi, Y. y Kawai, H. (1993). Thiazohalostatin, a new cytoprotective substance produced by *Actinomadura*. II. Physicochemical properties and structure determination. *J. Antibiot.* **46**, 1638-1642.
- Shiomi, K., Arai, N., Shionose, M. Takahashi, Y., Yoshida, H., Iwabuchi, J., Tanaka, Y. y Omura, S. (1995). New antibiotics Phthoxazolins B, C, and D produced by *Streptomyces* sp. KO-7888. *J. Antibiot* **48**, 714-719.
- Shirling, E.B. y Gottlieb. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**:313-340.
- Shridhar, R. y Mahadevan, A. (1979). Physiology and biochemistry of rice plants infected by *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium oryzae*, *Xanthomonas oryzae* and *Xanthomonas translucens* f. *oryzicola* *Acta Phytopat. Acad. Hungaricae.* **14**, 49-82.

- Shu, Y. (1998). Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry Perspective. *J. Nat. Prod.* **61**, 1053-1071.
- Siegel, M. M., McGahren, W. J., Torner, K. B. y Chang, T. T. (1987) Applications of fast atom bombardment mass spectrometry and fast atom bombardment mass spectrometry- mass spectrometry to the maduramicins and other polyether antibiotics *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **14**, 29-38.
- Siehl, D.L., Subramanian, M.V., Walters, E.W., Lee, S., Anderson, R.J. y Toschi, A.G. (1996). Adenylsuccinate synthetase: site of action of hydantocidin, a microbial phytotoxin. *Plant Physiol.* **110**, 753-758.
- Small, D.K. y Morris, D.A. (1990). Promotion of elongation and acid invertase activity in *Phaseolus vulgaris* L. Internode segments by phenylacetic acid. *Plant growth Regul.* **9**, 329-340.
- Smibert, R.M. y Krieg, N.R. (1994). Phenotypic characterization. En P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood y N.R. Krieg (editores). *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington. 607.
- Smith, T. J., Maher, M., Gannon, I y Dawson, M. T. (1991) Development of bacterial species-specific DNA probes based on ribosomal RNA. Genes using PCR. En: Howard y D. M. Whit Combe. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 46. Humana Press, Inc., Totowa, N. J. Pp. 247-256.
- Soper, T. S. y Manning, J.M. (1982). Inactivation of pyridoxal phosphate enzymes by gabaculine. *J. Biol. Chem.* **257**, 13930-6.
- Sreeramulu, A., Patil, S.S. y Nayudu, M.V. (1987). Phytotoxic organic acids produced in vitro and in vivo by isolates of the bacterial leaf blight pathogen of rice. *Indian Phytopathol.* **40**, 320-326.

- Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography. Academic Press Inc, New York.
- Steele, D.B., Stowers, M.D. (1991). Techniques for selection of industrially important microorganism. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 89-106.
- Steele, S.A., Uchytíl, T. F., Durbin, R. D., Bhatnager, P. y Rich, D.H. (1978) Chloroplast coupling factor 1: a species specific receptor for tentoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **73**, 2245
- Stout, S. J., Wilson, L. A, Kleiner, A. I., daCunha, A. R. y Francl, T. J. (1989) Mass spectrometric approaches to the confirmation of maduramicin α in chicken fat. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **18**, 57-63
- Stout, S. J., Wu, J., daCunha, A. R., King, K. G., y Lee, A. (1991). Maduramicin α : Characterization of ^{14}C derived residues in Turkey excreta. *J. Agric Food Chem*, **39**, 386-391.
- Strain, H.H.; Cuppe, B.T. y Suec, W.A. (1971). Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. *Methods in Enzymology*. Vol. 23, Academic, Press, New York, pp. 452-466.
- Strauss, D.G., Baum, M. y Fleck, W.F. (1986). Buylmaduramycin, a new antibiotic from *Actinomadura rubra*. *J. Basic. Microbiol.* **263**, 169-172.
- Streibig, J.C., Dayan, F.E., Rimando, A.M. y Duke, S.O. (1999). Joint action of natural and synthetic photosystem II inhibitors. *Pestic. Sci.* **55**, 137-146.
- Suhadolnik, R., Pornbanluala. P. S., Baker, D.C., Tiwari, K.W. y Hebbler, A.K (1989). Stereospecific 2'-amination and 2-Chlorination of adenosine by *Actinomadura* in the biosynthesis of 2'-amino-2'-deoxyadenosine and 2'-chloro-2'-deoxycoformycin. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 374-382.

- Sumner, J. B. (1979) Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* **100**, 413-415.
- Suzuki, K. y Tohda, K. (1993). Potentiometric ion sensor based on natural carboxylic polyether ionophores and their derivatives. *Trends Anal. Chem.* **12**, 287-296.
- Tachibana, K. y Kaneko, K. (1986). Development of a new herbicide. Bialaphos. *J. Pestic. Sci.* **11**, 297-304.
- Takahashi, E., Kimura, T. Nakamura, K., Arahira, M. e Iida, M. (1995). Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **48**, 1124-1129.
- Takahashi, E., Kimura, T., Nakamura, K., Arahira, M. y Iida, M. (1995). Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. SF-888.I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **48**, 1124-29.
- Takahashi, Y., Nakamura, H., Ogata, R., Matsuda, N., Hamada, M., Naganawa, H., Takita, T., Iitaka, Y., Sato, K. y Takeuchi, T. (1990). Kijimicin, a polyether antibiotic. *J. Antibiot.* **43**, 441-443.
- Takai, M., Miyamoto, S., Hattori, Y. y Tamura, S. (1963). Isolation of 2-phenylacetamide as a plant growth regulator produced by *Actinomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **27**, 876-877.
- Takebe, H., Hirota, O., Saitoh, A., Kataoka, H. y Tanaka, H. (1995). Studies on the industrial production of bialaphos. *J. Ferm. Bioeng.* **80**, 413-424.
- Tanaka, Y., Omura, S. (1993). Agroactive compounds of microbial origin. *Annu Rev Microbiol.* **47**, 57-87.

- Tanaka, Y., Sugoh, M., Yoshida, H., Arai, N., Shiomi, K., Matsumoto, S., Takahashi, Y. y Omura, S. (1995). Hydrantomycin, a new agroactive antibiotic produced by *Streptomyces* sp. K-93-5305. *J. Antibiot.* **48**, 1525-26.
- Taylor, R. W. Kauffman, R. F. y Pfeiffer, D. R. (1982). Cation complexation and transport by carboxylic acid Ionophores En: J. W. Westley (editores). Polyether antibiotics. Naturally Occuring Acid ionophores vol. I: Biology. Marcel Dekker, New York. 103-184.
- Terada, H. (1990). Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* **37**, 213-218.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment throug sequence weighting positions-specific gap penalties and weihht matrix choise. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Tohyama, H., Miyadoh, S., Ito, M., Shomura, T., Ito, T., Ishikawa, T. y Kojima, M. (1984). A new indole N-glycoside antibiotic SF-2140 from an *Actinomadura*. I. Taxonomy and fermentation of producin microorganism. *J. Antibiot.* **37**:10, 1144-1148.
- Tolman, R.L., Robinsons, R.K., y Townsend, L.B. (1968). Pyrrolo [2,3-d] pyrimidine nucleoside antibiotics. Total synthesis and structure of toyocamicin, unamycin, bivengicide, antibiotic. E-212, and sangivamycin (BA-90912). *J. Amer. Chem. Soc.* **90**, 524-6.
- Tomita, K., Hoshino, Y., Sasahira, T. y Kawaguchi, H. (1980). BMM-928, a new antitumor antibiotic complex. II. Taxonomic studies on the producing organism. *J. Antibiot.* **33**, 1098-1102.

- Tomita, K., Hoshino, Y., Sasahira, T. y Kawaguchi, H. (1990). BMM-928, a new antitumor antibiotic complex. II. Taxonomic studies on the producing organism. *J. Antibiot.* **33**, 1098-1102.
- Tone, J. *et al.*, CA, 1980, **93**, 130480n.
- Trebst, A. (1972). Measurement of Hill reactions and photoreduction. *Methods in Enzymology* **24**, 146-165.
- Trujillo, M.E. y Goodfellow, M. (1997). Polyphasic taxonomic study of clinically significant actinomadurae including the description of *Actinomadura latina* sp. nov. *Zentralbl Bakteriologie*, **285**, 212-233.
- Tsoud, H., Rajan, S., Chang, T. T., Fiala, R. R., Stockton, G. W. y Bullock, M. W. (1987). The utilization of molecular oxygen during the biosynthesis of maduramicin. *J. Antibiot.* **40**, 94-99.
- Tsunakawa, M., Nishio, M., Ohkuma, H., Tsuno, T., Konishi, M., Naito, T., Oki, T. y Kawaguchi, H. (1989). The structures of pradimicins A, B and C. A novel family of antifungal antibiotics. *J. Org. Chem.* **54**, 2532-2536.
- Tunac, J.B., Graham, B.D., Mamber, S.W., Dobson, W.E. y Lezini, M.D. (1985). Potent antitumor antibiotic complex: PD 114, 759, PD 115, 020, PD 119, 707 and PD 119, 193. *J. Antibiot.* **38**, 1337-1343.
- Venugopal, P.L. y Venugopal, T.L. (1991). *Actinomadura madurae* causing mycetomas in Madras. *Indian Pathol. Microbiol.* **34**, 119-125.
- Vinning, L.C. (1992). Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity- A review. *Gene* **115**, 135-140.

- Waitz, J.A., Horan, C.C., Kalyanpur, M., Lee, B.K., Loenbenberg, D., Marquez, J.A., Miller, G Y Patel, M.G. (1981). Kijiamicin (Sch 25663), a novel antibiotic produced by *Actinomadura kijiniata* Scc 1256. Fermentation, isolation, characterization and biological properties. *J. Antibiot.* **34**, 1101-1106.
- Walters, E.W., Lee, S., Niderman, T., Bernasconi, P., Subramanian, M.V. y Siehl, D. (1997). Adenylsuccinate synthetase from maize. Purification, properties and mechanism of inhibition by 5'-phosphohydantocidin. *Plant Physiol.* **114**, 549-555.
- Wani MC., Taylor, HL., Wall, ME., McPhail, AT. y Onan, KD (1975). Antitumor agents. XIII. Isolation and absolute configuration of carminomycin I from *Streptosporangium* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 5955-6.
- Watanabe, T. e Iwase, T. (1996). Developmental and dysmorphogenic effects of glufosinate ammonium and mouse embryos in culture. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **16**, 287-99.
- Weisburg, W., Barns, S. M., Pelletier, D. A. y Lare, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.
- Welfringer, A., Parache, R.M. (1978). The role of hystopathology in the diagnosis of mycetomas. Two cases of maduromycosis. *Actinomadura pelletieri* and *Leptosphaeria tompkinsii*. *Arch. Anatom. Cytol. Pathol.* **26**, 50-8.
- Williams, S.T. y Wellington, E.M. (1982). Principles and problems of selective isolation of microbes. En Bu'lock, J.D., Kisbet, L.J. y Winstanley (editores). Academic Press. London. Bioactive microbial products Search and discovery.
- Wood, I.B. (American Cyanamid Co: Controlling nematodes in animals and soils with nematocidal antibiotics) US 4, 510, 134. Apr 1985.

- Wu, W. (1978). Parasitism of the pathogen of the rice sheat bligh. *Plant Prot. Bull. Taiwan*, **20**, 151-160.
- Yabrough, G.G., Taylor, D.P., Rowlands, R.T., Crawford, M.S. y Lasure, L.L. (1993). Screening microbial metabolites for new drugs theoretical and practical issues. *J. Antibiot.* **46**, 535-544.
- Yamada, O., Kaise, Y., Iutatsuya, F., Ishida, S., Ito, K., Yamamoto, H. y Munakata, K. (1972). Studies on plant growth-regulating activities of anisomycin and toyocamicin. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 2013-5.
- Yamagishi, y., Matsuoka, M., Odagawa, A., Kato, S., Shindo, K. y Mochizuki, J. (1993). Thiazohalostatin, a new cytoprotective substance produced by *Actinomadura*. I. Taxonomy, Production and biological activities. *J. Antibiot.* **46**, 1633-1637.
- Yamosa, K., Hiiota, A., Sakai, H. e Isogai, A. (1987) Isolation of harman and norhaiman from *Nocardia* sp. and their inhibitory activity against plant seedlings. *Agric Biol. Chem.* **51**, 921-922.
- Yoshida, N. Arai, N., Sugoh, M., Iwabuchi, J., Shiomi, K., Shinose, M., Tanaka Y. y Omura, S. (1994). 4-chlorothreonine a herbicidal antimetabolite produced by *Streptomyces* sp. OH-5093. *J. Antibiot.* **47**, 1165-1166.
- Zhang, Z., Wang, Y. y Ruan. J. (1998). Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 411-422.

APÉNDICE I

Comparación de la secuencia de los fragmentos del ADNr 16S de los actinomicetos MIV2B(31), MIV2B(9) y MIV2B(13) con las depositadas en la base de datos del GenBank

Fragmento del ADNr 16S del microorganismo MIV2B(31) empleado para su comparación con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank

1
AACGCCAAGC TCTAMTACGA CTCACTATAG GGAAAGCTTG CATGCCTGCA
51
GGTCGACTCT AGAGGATCTA CTAGTCATAT GGATTAGAGT TTGATCCTGG
101
CTCAGGACGA ACGCTGGCGG CGTGCTTAAC ACATGCAAGT CGAGCGGAAA
151
GGCCCCTTCG GGGGTACTCG AGCGGCGAAC GGGTGAGTAA CACGTGAGCA
201
ACCTGCCCTG ACTCTKGGAT AAGCCGGGAA AMWGGGTCTA ATACCGGATA
251
CAATCCCTTA AAGCCGGTCT CAGTTSGGAT CGAAGTCTGC AACTCGACTT
301
CGTGAAGTCG GAGTCGCTAG TAATCGCAGA TCAGCAACGC TCGGTTGAAT
351
ACGTTCCCGG GCCTTG TACA CACCGCCCGT CACGTCACGA AAGTCGGBDA
401
CACCCGAAGC CCGTGGCCCA ACCGCCTTGT GCGGGGGGAG CGGTCGAAGG
451
TGGGGCCGGC GATTGGGACG AAGTCGTAAC AAGGTAACGT ACCGGAAGGT
501 554
GCGGCTGGAT CACCTCCTTA ATCGGATCCC CGGGTACCGA GCTC

ALINEAMIENTO MULTIPLE DE MIV2B(31)

GapWeight: 3
 GapLengthWeight: 0

ABREVIATURAS:

A_madur: Actinomadura madurae
 Pseudonoc: Pseudonocardia Strain PA151
 Ther_for: Thermomonospora formosensis
 Ac_yum: Actinomadura yumaensis
 Ther_curv: Thermomonospora curvata
 ANA_tot: MIV2B(31)

	1				50
A_madur	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
pseudonoc	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Ther_for	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Ac_yum	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Ther_curv	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ANA_tot	AACGCCAAGC	TCTAMTACGA	CTCACTATAG	GGAAAGCTTG	CATGCCTGCA
	51				100
A_madur	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
pseudonoc	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Ther_for	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Ac_yum	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Ther_curv	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ANA_tot	GGTCGACTCT	AGAGGATCTA	CTAGTCATAT	GGATTAGAGT	TTGATCCTGG
	101				150
A_madur	~~~~~	~cgctggcgg	cgtgcttaac	acatgcaagt	cgagcggaaa
pseudonoc	~~~~~gacga	acgctggcgg	cgtgcttaac	acatgcaagt	cgagcggaaa
Ther_for	~~~~~acga	acgctggcgg	cgtgcttaac	acatgcaagt	cgagcggaaa
Ac_yum	~~~~~	~ggcgg	cgtgcttaac	acatgcaagt	cgagcggaaa
Ther_curv	~~~~~acga	acgctggcgg	cgtgcttaac	acatgcaagt	cgagcggaaa
ANA_tot	CTCAGGACGA	ACGCTGGCGG	CGTGCTTAAC	ACATGCAAGT	CGAGCGGAAA
	151				200
A_madur	ggccccttcg	ggggtactcg	agcggcgaac	gggtgagtaa	cacgtgagca
pseudonoc	ggccccttcg	ggggtactcg	agcggcgaac	gggtgagtaa	cacgtgagca
Ther_for	ggccccttcg	ggggtactcg	agcggcgaac	gggtgagtaa	cacgtgagca
Ac_yum	ggccccttcg	ggggtactcg	agcggcgaac	gggtgagtaa	cacgtgagca
Ther_curv	ggccccttcg	ggggtactcg	agcggcgaac	gggtgagtaa	cacgtgagta
ANA_tot	GGCCCCTTCG	GGGGTACTCG	AGCGGCGAAC	GGGTGAGTAA	CACGTGAGCA

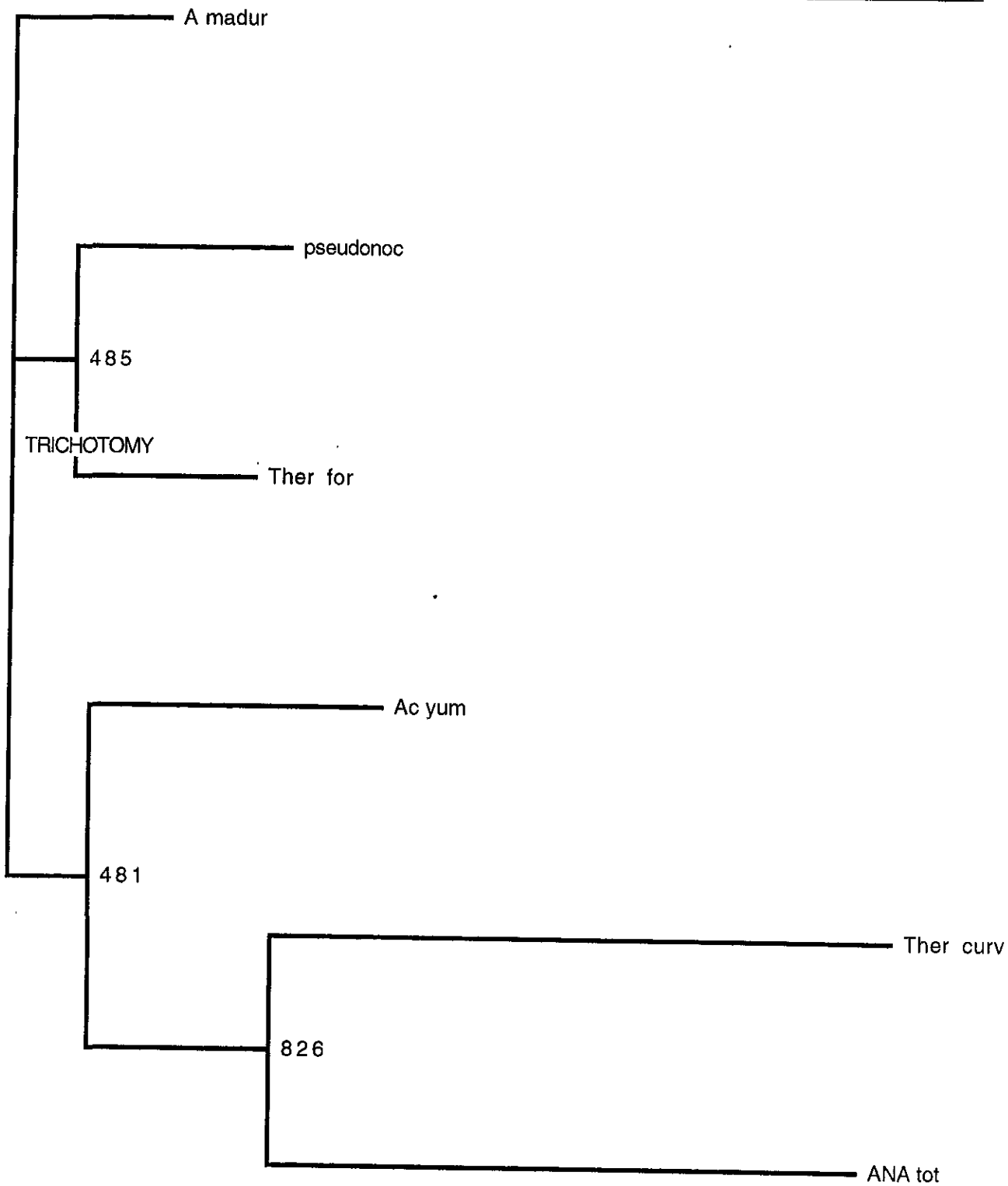
	201					250
A_madur	acctgccct	gactctggga	taagcccggg	aaactgggtc	taataaccgga	
pseudonoc	acctgccct	gactctggga	taagcccggg	aaactgggtc	taataaccgga	
Ther_for	acctgccct	gactctggga	taagcccggg	aaactgggtc	taataaccgga	
Ac_yum	acctgccct	gactctggga	taagcccggg	aaactgggtc	taataaccgga	
Ther_curv	acctgccctc	gactctggga	taagcctggg	aaactgggtc	taataaccgga	
ANA_tot	ACCTGCCC.T	GACTCTKGGG	TAAGCC.GGG	AAAMWGGGTC	TAATACCGGA	
	251					300
A_madur	tg.tgacgca	ctctcgcatg	ggatgtgtgt	ggaaagt..	
pseudonoc	ta.tgaccac	tggtcgcatg	atcgtgtggt	ggaaagt..	
Ther_for	ta.tgaccac	tccgggcatc	tgggtgtggt	ggaaagt..	
Ac_yum	ta.caaccat	tggtcgcatg	gccgggtggt	ggaaagt..	
Ther_curv	tattcacctt	ctgtcgcatg	gt.ggggggt	ggaaagttcc	ctctttttgg	
ANA_tot	TA.....	
	301					350
A_madur	..tttcgggt	ggggatgggc	tgcggccta	tcagcttggt	ggtgggggtga	
pseudonoc	..tttcgggt	ggggatgggc	tgcggccta	tcagcttggt	ggtgggggtga	
Ther_for	..tttcgggt	ggggatgggc	tgcggccta	tcagcttggt	ggtgggggtga	
Ac_yum	..tttcgggt	gggcatgggc	tgcggccta	tcagcttggt	ggtgggggtga	
Ther_curv	gggttcgggtc	ggggatgggc	tgcggccta	tcagcttggt	ggtgggggtga	
ANA_tot	
	351					400
A_madur	tggcctacca	aggcgacgac	gggtaaccgg	cctgagaggg	cgaccgggtca	
pseudonoc	tggcctacca	aggcgacgac	gggtaaccgg	cctgagaggg	cgaccgggtca	
Ther_for	tggcctacca	aggcgacgac	gggtaaccgg	cctgagaggg	cgaccgggtca	
Ac_yum	tggcctacca	aggcgacgac	gggtaaccgg	cctgagaggg	cgaccgggtca	
Ther_curv	cggcctacca	aggcgacgac	gggtagccgg	cctgagaggg	cgaccggcca	
ANA_tot	
	401					450
A_madur	cactgggact	gagacacggc	ccagactcct	acgggaggca	gcagtgggga	
pseudonoc	cactgggact	gagacacggc	ccagactcct	acgggaggca	gcagtgggga	
Ther_for	cactgggact	gagacacggc	ccagactcct	acgggaggca	gcagtgggga	
Ac_yum	cactgggact	gagacacggc	ccagactcct	acgggaggca	gcagtgggga	
Ther_curv	cactgggact	gagacacggc	ccagactcct	acgggtggca	gcagtgggga	
ANA_tot	
	451					500
A_madur	atattgcgca	atgggcgga	gcctgacgca	gcgacgccgc	gtgaggggatg	
pseudonoc	atattgcgca	atgggcgga	gcctgacgca	gcgacgccgc	gtgaggggatg	
Ther_for	atattgcgca	atgggcgga	gcctgacgca	gcgacgccgc	gtgggggatg	
Ac_yum	atattgcgca	atgggcgga	gcctgacgca	gcgacgccgc	gtgggggatg	
Ther_curv	atcttgcgca	atgggcgaaa	gcctgacgca	gcgacgccgc	gtgggggatg	
ANA_tot	

	501				550
A_madur	acggccttcg	ggttgtaa	ctctttcagc	agggacgaag	ctaacgtgac
pseudonoc	acggccttcg	ggttgtaa	ctctttcagc	agggacgaag	ctaacgtgac
Ther_for	acggccttcg	ggttgtaa	ctctttcagc	agggacgaag	ctaacgtgac
Ac_yum	acggccttcg	ggttgtaa	ctctttcagc	acggacgaag	cggaaagtgac
Ther_curv	aaggccttcg	ggttgtaa	ccctttcagc	acggacgaag	tt...tggac
ANA_tot
	551				600
A_madur	ggtacctgca	gaagaagcgc	cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa
pseudonoc	ggtacctgca	gaagaagcgc	cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa
Ther_for	ggtacctgca	gaagaagcgc	cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa
Ac_yum	ggtaggtgca	gaagaagcgc	cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa
Ther_curv	ggtaggtgca	gaagaagcgc	cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa
ANA_tot
	601				650
A_madur	tacgtagggc	gcaagcgctt	tccggaatta	ttgggcgtaa	agagctcgta
pseudonoc	tacgtagggc	gcaagcgctt	tccggaatta	ttgggcgtaa	agagctcgta
Ther_for	tacgtagggc	gcaagcgctt	tccggaatta	ttgggcgtaa	agagctcgta
Ac_yum	tacgtagggc	gcaagcgctt	tccggaatta	ttgggcgtaa	agagctcgta
Ther_curv	tacgtagggc	gcaagcgctt	tccggaatta	ttgggcgtaa	agagctcgta
ANA_tot
	651				700
A_madur	ggcggtttgt	cgcgtctgtc	gtgaaagccc	acggcttaac	cgtgggtctg
pseudonoc	ggcggtttgt	cgcgtctgtc	gtgaaagccc	acggcttaac	cgtgggtctg
Ther_for	ggcggtttgt	tgcgtccgtc	gtgaaagccc	acggcttaac	cgtgggtctg
Ac_yum	ggcggtttgt	cgcgtctgtc	gtgaaagccc	acagcttaac	tgtgggtctg
Ther_curv	ggcggcttgt	cgcgtctgtc	gtgaaagccc	acggcttaac	cgtgggttctg
ANA_tot
	701				750
A_madur	cggtggatac	gggcagacta	gaggcaggta	ggggagaatg	gaattcccgg
pseudonoc	cggtggatac	ggacagacta	gaggcaggta	ggggagaacg	gaattcccgg
Ther_for	cggtggatac	gggcagacta	gaggcaggta	ggggagaacg	gaattcccgg
Ac_yum	cggtggatac	gggcagacta	gaggcaggta	ggggagaatg	gaattcccgg
Ther_curv	cggtggatac	gggcagacta	gaggcaggta	ggggagcatg	gaattcccgg
ANA_tot
	751				800
A_madur	tgtagcggtg	aaatgvcgag	atatcgggag	gaacaccggt	ggcgaaggcg
pseudonoc	tgtagcggtg	aaatgvcgag	atatcgggag	gaacaccggt	ggcgaaggcg
Ther_for	tgtagcggtg	aaatgvcgag	atatcgggag	gaacaccggt	ggcgaaggcg
Ac_yum	tgtagcggtg	aaatgvcgag	atatcgggag	gaacaccggt	ggcgaaggcg
Ther_curv	tgtagcggtg	aaatgvcgag	atatcgggag	gaacaccggt	ggcgaaggcg
ANA_tot

	801				850
A_madur	gctctctggg	cctgtactga	cgctgaggag	cgaaagcgtg	gggagcgaac
pseudonoc	gttctctggg	cctgtactga	cgctgaggag	cgaaagcgtg	gggagcgaac
Ther_for	gttctctggg	cctgtactga	cgctgaggag	cgaaagcgtg	gggagcgaac
Ac_yum	gttctctggg	cctgtactga	cgctgaggag	cgaaagcgtg	gggagcgaac
Ther_curv	gtgctctggg	cctgttctaa	cgctgaggag	cgaaagcgtg	gggagcgaac
ANA_tot
	851				900
A_madur	aggattagat	accctggtag	tccacgccgt	aaacgttggg	cgctaggtgt
pseudonoc	aggattagat	accctggtag	tccacgccgt	aaacgttggg	cgctaggtgt
Ther_for	aggattagat	accctggtag	tccacgccgt	aaacgttggg	cgctaggtgt
Ac_yum	aggattagat	accctggtag	tccacgccgt	aaacgttggg	cgctaggtgt
Ther_curv	aggattagat	accctggtag	tccacgccgt	aaacgttggg	cgctaggtgt
ANA_tot
	901				950
A_madur	ggggttcttc	cacggattcc	gcgccgtagc	taacgcatta	agcgccccgc
pseudonoc	ggjgtccttc	cacggattcc	gcgccgcagc	taacgcatta	agcgccccgc
Ther_for	ggggtccttc	cacggattcc	gcgccgcagc	taacgcatta	agcgccccgc
Ac_yum	ggggttcttc	cacggattcc	gcgccgtagc	taacgcatta	agcgccccgc
Ther_curv	ggggttcttc	cacggattcc	gcgccgtagc	taacgcatta	agcgccccgc
ANA_tot
	951				1000
A_madur	ctggggagta	cggccgcaag	gctaaaactc	aaaggaattg	acggggggccc
pseudonoc	ctggggagta	cggccgcaag	gctaaaactc	aaaggaattg	acggggggccc
Ther_for	ctggggagta	cggccgcaag	gctaaaactc	aaaggaattg	acggggggccc
Ac_yum	ctggggagta	cggccgcaag	gctaaaactc	aaaggaattg	acggggggccc
Ther_curv	ctggggagta	cggccgcaag	gctaaaactc	aaaggaattg	acggggggccc
ANA_tot
	1001				1050
A_madur	gcacaagcgg	cggagcatgt	tgcttaattc	gacgcaacgc	gaagaacctt
pseudonoc	gcacaagcgg	cggagcatgt	tgcttaattc	gacgcaacgc	gaagaacctt
Ther_for	gcacaagcgg	cggagcatgt	tgcttaattc	gacgcaacgc	gaagaacctt
Ac_yum	gcacaagcgg	cggagcatgt	tgcttaattc	gacgcaacgc	gaagaacctt
Ther_curv	gcacaagcgg	cggagcatgt	tgcttaattc	gacgcaacgc	gaagaacctt
ANA_tot
	1051				1100
A_madur	accaaggctt	gacattgccg	gaaaacctgc	agagatgtgg	ggtccttttt
pseudonoc	accaaggctt	gacatcgccg	gaaaaccatc	agagatggtg	ggtccttttg
Ther_for	accaaggctt	gacattgccg	gaaaaccatc	agagatggtg	ggtccttttt
Ac_yum	accaaggctt	gacatcgccg	gaaaaccgcg	agagatgctg	ggtcctttt.
Ther_curv	accaagctt	gacatcacc	gaaaacctgc	agagatgcag	ggtcctttcg
ANA_tot

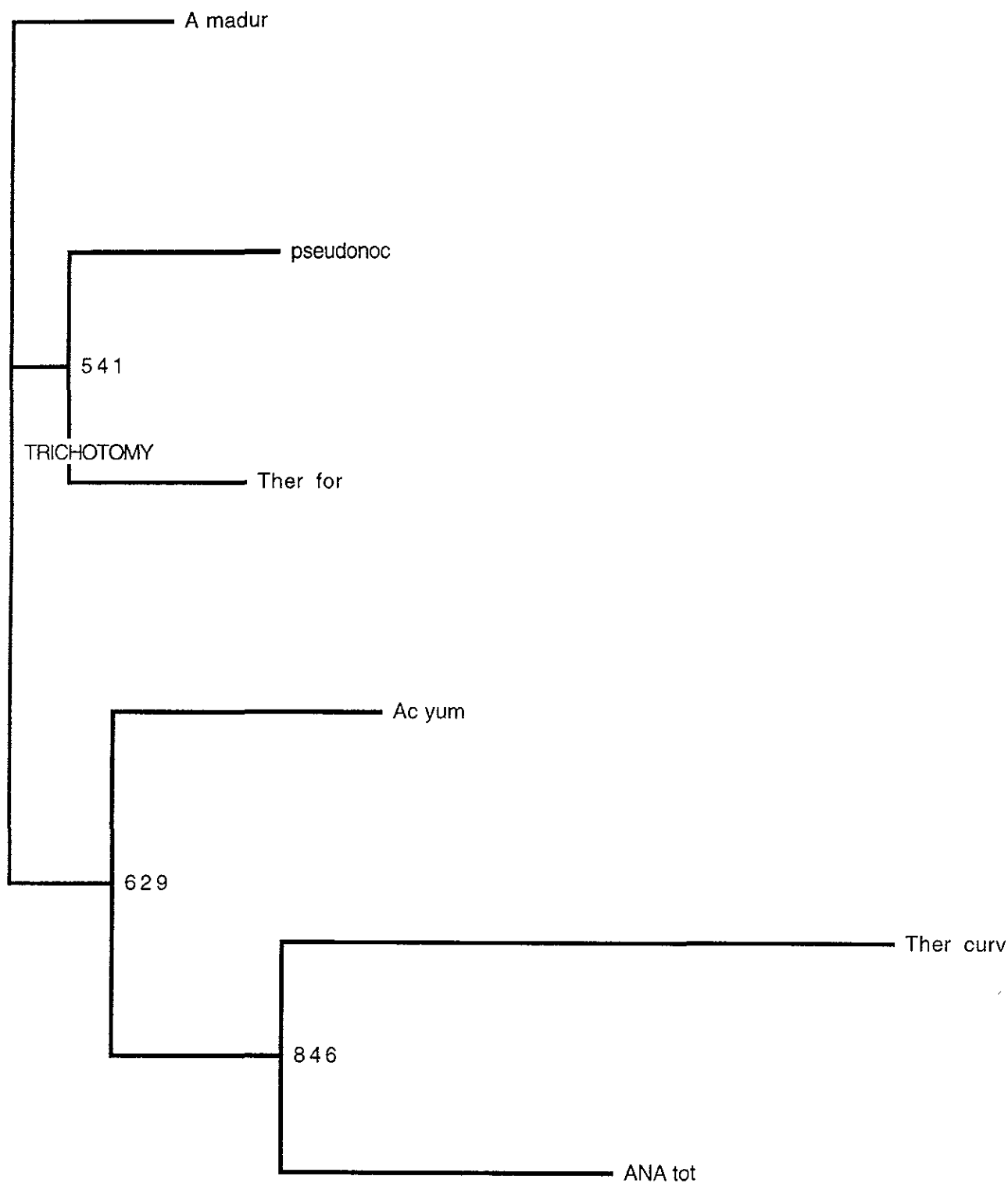
	1101				1150
A_madur	gggccggt.g	acaggtggtg	catggctgtc	gtcagctcgt	gtcgtgagat
pseudonoc	gggccggt.g	acaggtggtg	catggctgtc	gtcagctcgt	gtcgtgagat
Ther_for	gggccggtg	acaggtggtg	catggctgtc	gtcagctcgt	gtcgtgagat
Ac_yum	gggccggt.g	acaggtggtg	catggctgtc	gtcagctcgt	gtcgtgagat
Ther_curv	ggggcggtg	acaggtggtg	catggctgtc	gtcagctcgt	gtcgtgagat
ANA_tot
	1151				1200
A_madur	gttgggtaa	gtcccgaac	gagcgcaacc	ctcgttccat	gttgccagca
pseudonoc	gttgggtaa	gtcccgaac	gagcgcaacc	ctcgttccat	gttgccagca
Ther_for	gttgggtaa	gtcccgaac	gagcgcaacc	ctcgttccat	gttgccagca
Ac_yum	gttgggtaa	gtcccgaac	gagcgcaacc	ctcgttccat	gttgccagca
Ther_curv	gttgggtaa	gtcccgaac	gagcgcaacc	ctcgttccat	gttgccagca
ANA_tot
	1201				1250
A_madur	c.ttcgggtg	gggactcatg	ggagaccgcc	ggggtcaact	cggaggaagg
pseudonoc	c.ttcgggtg	gggactcatg	ggagaccgcc	ggggtcaact	cggaggaagg
Ther_for	cgtaatggtg	gggactcatg	ggagaccgcc	ggggtcaact	cggaggaagg
Ac_yum	c.ttcgggtg	gggactcatg	ggagaccgcc	ggggtcaact	cggaggaagg
Ther_curv	ggttatgccg	gggactcatg	gaagaccgcc	ggggtcaact	cggaggaagg
ANA_tot
	1251				1300
A_madur	tggggatgac	gtcaagtcac	catgcccctt	atgtcttggg	ctgcaaacat
pseudonoc	tggggatgac	gtcaagtcac	catgcccctt	atgtcttggg	ctgcaaacat
Ther_for	tggggatgac	gtcaagtcac	catgcccctt	atgtcttggg	ctgcaaacat
Ac_yum	tggggatgac	gtcaagtcac	catgcccctt	atgtcttggg	ctgcaaacat
Ther_curv	tggggacgac	gtcaagtcac	catgcccctt	atgtcttggg	ctgcaaacat
ANA_tot
	1301				1350
A_madur	gctacaatgg	cgggtacaga	gggctgcatg	accgtgaggt	ggagcgaatc
pseudonoc	gctacaatgg	cgggtacaga	gggctgcatg	accgtgaggt	ggagcgaatc
Ther_for	gctacaatgg	cgggtacaga	gggctgcatg	accgtgaggt	ggagcgaatc
Ac_yum	gctacaatgg	cgggtacaga	gggctgcatg	accgtgaggt	ggagcgaatc
Ther_curv	gctacaatgg	cgggtacaga	gggctgcatg	accgtgaggt	ggagcgaatc
ANA_totCAATC
	1351				1400
A_madur	ccttaaagcc	ggtctcagtt	cggatcgaag	tctgcaacte	gacttcgtga
pseudonoc	ccttaaagcc	ggtctcagtt	cggatcgaag	tctgcaacte	gacttcgtga
Ther_for	ccttaaagcc	ggtctcagtt	cggatcgaag	tctgcaacte	gacttcgtga
Ac_yum	ccttaaagcc	ggtcttagtt	cggatcgaag	tctgcaacte	gacttcgtga
Ther_curv	ccttaaagcc	ggtctcagtt	cggatcgaag	tctgcaacte	gacttcgtga
ANA_tot	CCTTAAAGCC	GGTCTCAGTT	SGGATCGAAG	TCTGCAACTC	GACTTCGTGA

	1401				1450
A_madur	agtcggagtc	gctagtaatc	gcagatcagc	aacgctgcgg	tgaatacgtt
pseudonoc	agtcggagtc	gctagtaatc	gcagatcagc	aacgctgcgg	tgaatacgtt
Ther_for	agtcggagtc	gctagtaatc	gcagatcagc	aacgctgcgg	tgaatacgtt
Ac_yum	agtcggagtc	gctagtaatc	gcagatcagc	aacgctgcgg	tgaatacgtt
Ther_curv	agtcggagtc	gctagtaatc	gcagatcagc	aacgctgcgg	tgaatacgtt
ANA_tot	AGTCGGAGTC	GCTAGTAATC	GCAGATCAGC	AACGCTGCGG	TGAATACGTT
	1451				1500
A_madur	cccgggcctt	gtacacaccg	cccgtcacgt	cacgaaagtc	ggcaacaccc
pseudonoc	cccgggcctt	gtacacaccg	cccgtcacgt	cacgaaagtc	ggcaacaccc
Ther_for	cccgggcctt	gtacacaccg	cccgtcacgt	cacgaaagtc	ggcaacaccc
Ac_yum	cccgggcctt	gtacacaccg	cccgtcacgt	cacgaaagtc	ggcaacaccc
Ther_curv	cccgggcctt	gtacacaccg	cccgtcacgt	cacgaaagtc	ggcaacaccc
ANA_tot	CCCGGGCCTT	GTACACACCG	CCCGTCACGT	CACGAAAGTC	GGBDACACCC
	1501				1550
A_madur	gaagcccgtg	gcccaccc..	..cttg.tgg	ggggagcgg	cgaaggtggg
pseudonoc	gaagcccgtg	gcccaccc..	..cttg.tgg	ggggagcgg	cgaaggtggg
Ther_for	gaagcccgtg	gcccacccac	cttg.tgg	ggggagcgg	cgaaggtggg
Ac_yum	gaagcccgtg	gcccacccg	ctttgccc	ggggagcgg	cgaaggtggg
Ther_curv	gaagcccgtg	gcctaacc..	..cgtaagg	ggggagcgg	cgaaggtggg
ANA_tot	GAAGCCCCTG	GCCCAACCGC	CTTGTG.CGG	GGGGAGCGGT	CGAAGGTGGG
	1551				1600
A_madur	gccggcgatt	gggacgaagt	cgtaaca~	~~~~~	~~~~~
pseudonoc	gccggcgatt	gggacgaagt	cgtaacaagg	tagccgtacc	ggaaggtgc~
Ther_for	gccggcgatt	gggacgaagt	cgtaaca~	~~~~~	~~~~~
Ac_yum	gccggcgatt	gggacgaagt	cgtaacaagg	taaccgt~	~~~~~
Ther_curv	gctggcgatt	gggacgaagt	cgtaaca~	~~~~~	~~~~~
ANA_tot	GCCGGCGATT	GGGACGAAGT	CGTAACAAGG	TAACGTACCG	GAAGGTGCGG
	1601				1640
A_madur	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
pseudonoc	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
Ther_for	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
Ac_yum	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
Ther_curv	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
ANA_tot	CTGGATCACC	TCCTTAATCG	GATCCCCGGG	TACCGAGCTC	



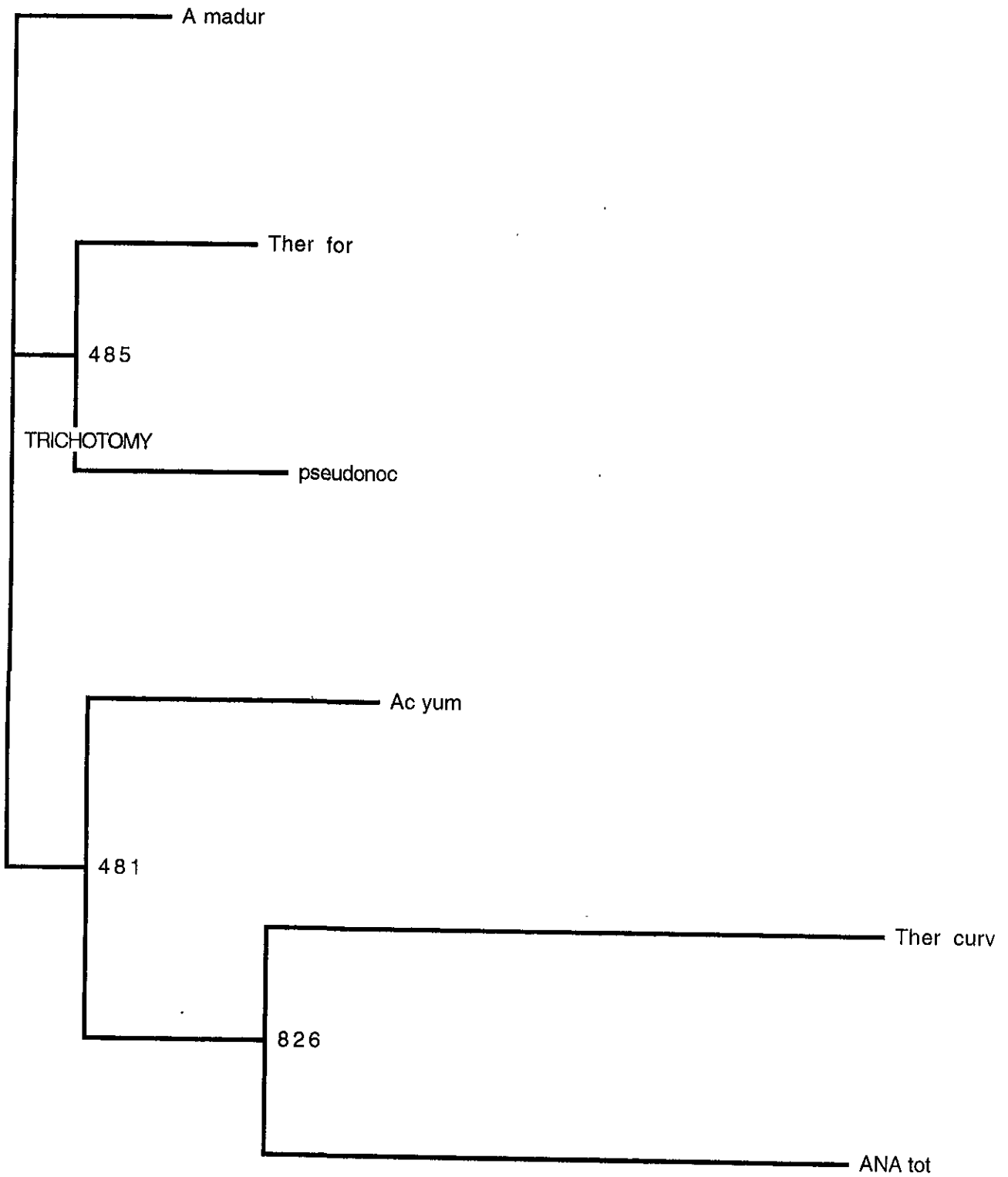
Árbol filogenético de las especies relacionadas con el actinomiceto MIV2B(31).
Abreviaturas: A madur, *Actinomadura madurae*; pseudonoc, *Pseudonocardia* StrPA151;
Ther for, *Thermomonospora formosensis*; Ac yum, *A. yumaensis*; Ther curv, *T. curvata*; ANA
tot, actinomiceto MIV2B(31).

0.01



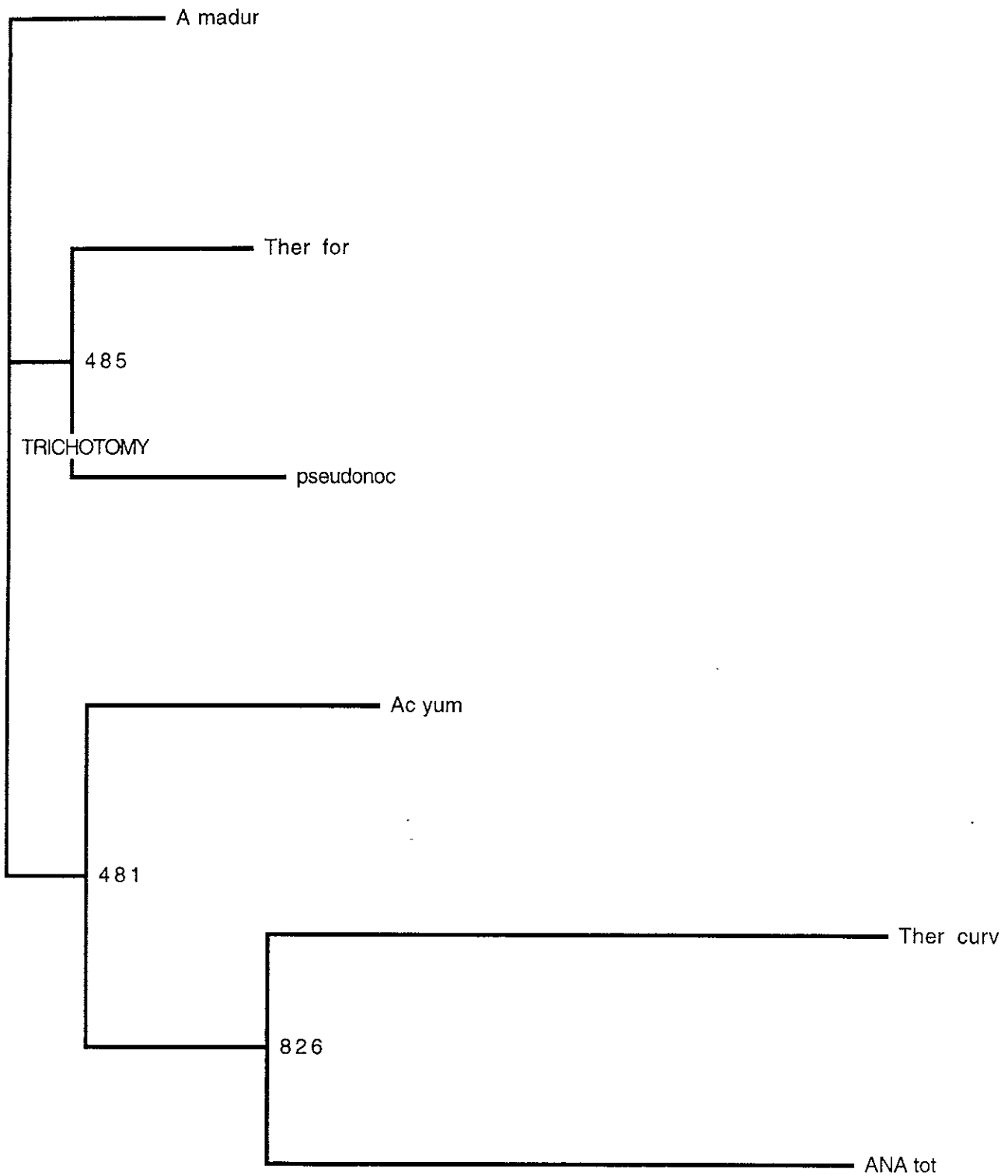
Árbol filogenético de las especies relacionadas con el actinomiceto MIV2B(31)
Abreviaturas: A madur, *Actinomadura madurae*; pseudonoc, *Pseudonocardia* StrPA151,
 Ther for, *Thermomonospora formosensis*; Ac yum, *A. yumaensis*; Ther curv, *T. curvata*; ANA
 tot, actinomiceto MIV2B(31)

0.01



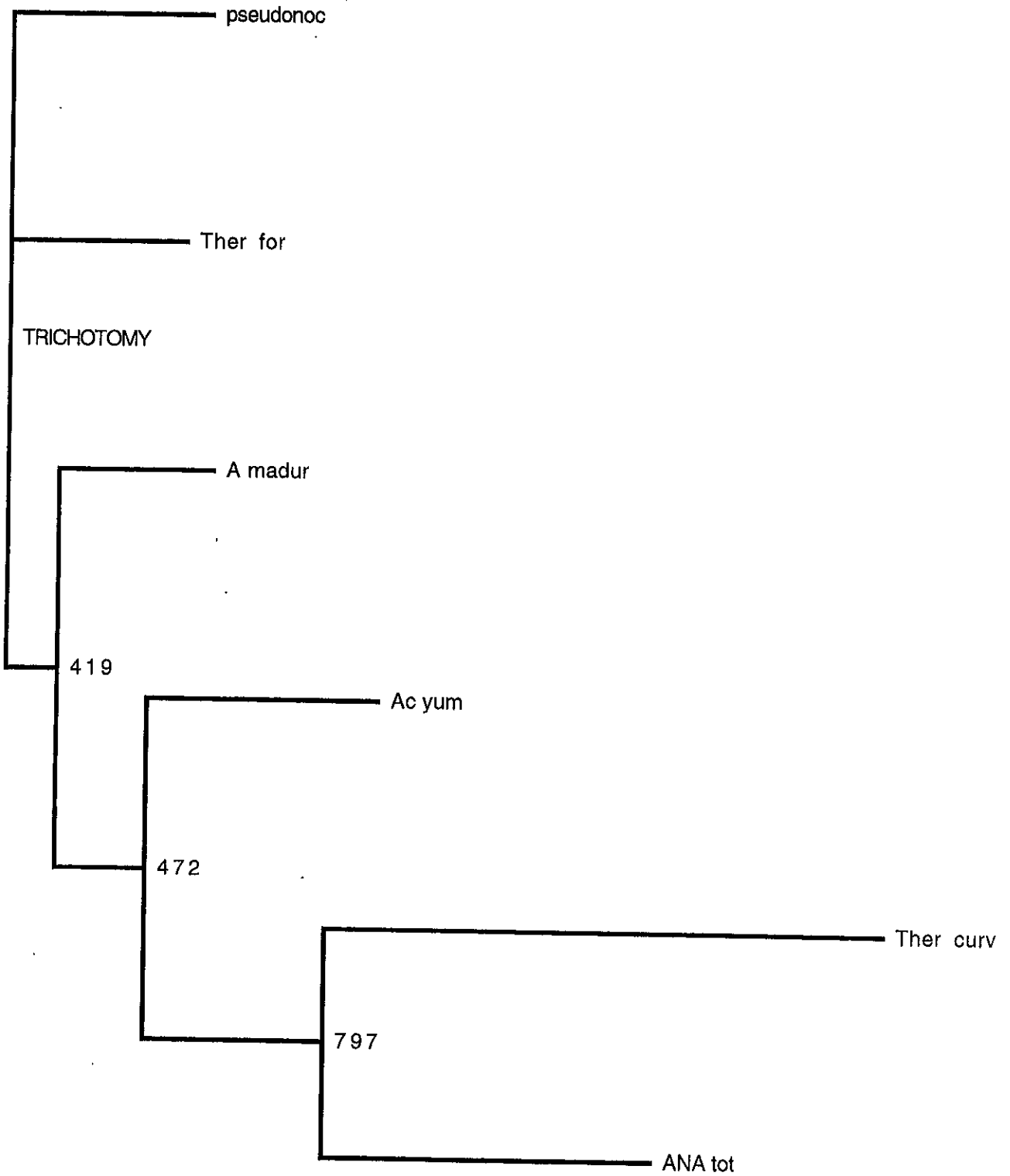
Árbol filogenético de las especies relacionadas con el actinomiceto MIV2B(31).
Abreviaturas: A madur, *Actinomadura madurae*; pseudonoc, *Pseudonocardiaceae* StrPA151;
Ther for, *Thermomonospora formosensis*; Ac yum, *A. yumaensis*; Ther curv, *T. curvata*; ANA
tot, actinomiceto MIV2B(31).

0.01



Árbol filogenético de las especies relacionadas con el actinomiceto MIV2B(31).
Abreviaturas: A madur, *Actinomadura madurae*; pseudonoc, *Pseudonocardia* StrPA151;
 Ther for, *Thermomonospora formosensis*; Ac yum, *A. yumaensis*; Ther curv, *T. curvata*; ANA
 tot. actinomiceto MIV2B(31).

0.01



Árbol filogenético de las especies relacionadas con el actinomiceto MIV2B(31).
Abreviaturas: A madur, *Actinomadura madurae*; pseudonoc, *Pseudonocardiaceae* StrPA151;
Ther for, *Thermomonospora formosensis*; Ac yum, *A. yumaensis*; Ther curv, *T. curvata*; ANA
tot, actinomiceto MIV2B(31).

0.01

Fragmento del ADNr 16S del microorganismo MIV2B(9) empleado para su comparación con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank.

1
AGTGGCGAAC GGGTGAGTAA CACGTGGGCA ATCTGCCCTG CACTCTGGGA
51
CAAGCCCTGG AAACGGGGTC TAATACCGGA TACGAGTTCC ACGGGCATCC
101
GTGGGACTGG AAAGCTCCGG CGGTGCAGGA TGAGCCCGCG GCCTATCAGC
151
TTGTTGGTGA GGTAATGGCT CACCAAGGCG ACGACGGGTA GCCGGCCTGA
201
GAGGGCGACC GGCCACACTG GGA CTGAGAC ACGGCCAGA CTCCTACGGG
251
AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGAAAGCCTG ATGCAGCGAC
301
TGGGCTGCAC ACGTACTACA ATGGCCGGAA CAATGAGCTG CGATGCCGTG
351
AGGTGGAGGC GAATCTCAA AAGCCGGTGT CAGTTGGGAA TGGGGTCTG
401
CAACTAGACC CCATGAAGTC GGAGTCGCTA GTAATCGCAG ATCAGCATTG
451
CTGCGGTGAA TACGTTCCCG GCGTTGTAC GACACCGCCC GTCAGAGTCA
501 515
CGAAAGTCGG TAACA

Fragmento del ADNr 16S del microorganismo MIV2B(13) empleado para su comparación con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank.

1
TAGTGGCGAA CGGGTGAGTA ACACGTGGGC AATCTGCCCT GCACTCTGGG
51
ACAAGCCCTG GAAACGGGGT CTAATACCGG ATACTGACCC TCACGGGCAT
101
CTGTGAGGTT CGAAAGCTCC GGCGGTGCAG GATGAGCCCG CGGCCTATCA
151
GCTTGTTGGT GAGGTAATGG CTCACCAAGG CGACGACGGG TAGCCGGCCT
201
GAGAGGGCGA CCGGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG
251
GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGAAAGCC TGATGCAGCG
301
ACGCCC GCGT GAGGGATGAC GCGCAACCCT TTGTCCCGTG TTGCCAGCA
451
CTGCACACGT GCTACAATGG CCGGTACAAT GAGCTGCGAT ACCGCGAGGT
501
GGAGCGAATC TCAAAAAGCC GGTCTCAGTT CGGATTGGGG TCTGCAACTC
551
GACCCCATGA AGTCGGAGTC GCTAGTAATC GCAGATCAGC ATTGCTGCGG
601
TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACGT CACGAAAGTC
651 688
GGTAACACCC GAAGCCGGTG GCCCAACCCC TTGTGGGA

ALINEAMIENTO MULTIPLE DE MIV2B(9) Y MIV2B(13)

ABREVIATURAS:

Str_mp2: Streptomyces cepa mp2
 Str_mp2b: Streptomyces cepa mp2b
 Str_mar: Streptomyces maritimus
 Str_fum: Streptomyces fumanus
 Str_pal: Streptomyces pallidus
 Noc_ther: Nocardioides thermolilacinus
 Str_11AG8: Streptomyces cepa 11AG8
 Str_mal: Streptomyces malayensis

	80		129
MIV2B.{Str_mp2}	gggatt		
MIV2B.{Str_mp2b}	gggatt		
MIV2B.{Str_mar}	gggatt		
MIV2B.{Str_fum}	gggatt		
MIV2B.{Str_pal}	gggatt		
MIV2B.{Noc_ther}	gggatt		
MIV2B.{Str_11AG8}	tggatt		
MIV2B.{Str_mal}	gggatt		
MIV2B(9)	~~~~~		
MIV2B(13)	~~~~~t		

	130		179
MIV2B.{Str_mp2}	t	g	ct ccctcacg
MIV2B.{Str_mp2b}	t	g	ct ccctcacg
MIV2B.{Str_mar}	t	g	ct tcctcgca
MIV2B.{Str_fum}	t	g	c. Gttccacg
MIV2B.{Str_pal}	t	g	c. Gtttcaca
MIV2B.{Noc_ther}	t	g	ct cccgcttg
MIV2B.{Str_11AG8}	g	t	.t cacacgac
MIV2B.{Str_mal}	t	g	c. Cgcgttcc
MIV2B(9)	t	g	c. Gttccacg
MIV2B(13)	t	g	ct ccctcacg

	180		229
MIV2B.{Str_mp2}	g	.ctgt ga gt c	
MIV2B.{Str_mp2b}	g	.ctgt ga gt c	
MIV2B.{Str_mar}	g	.ctgc ga gt c	
MIV2B.{Str_fum}	g	.ccgt gg ac g	
MIV2B.{Str_pal}	g	.ctgt ga gc g	
MIV2B.{Noc_ther}	g	.ccaa gt gt c	
MIV2B.{Str_11AG8}	c	ggtct gt tg g	
MIV2B.{Str_mal}	c	gggat ac tg g	
MIV2B(9)	g	.ccgt gg ac g	
MIV2B(13)	g	.ctgt ga gt c	

	230					279
MIV2B.{Str_mp2}	t	a	a	t	tc	
MIV2B.{Str_mp2b}	t	a	a	t	tc	
MIV2B.{Str_mar}	a	a	a	c	tc	
MIV2B.{Str_fum}	t	a	a	t	tc	
MIV2B.{Str_pal}	t	a	a	c	tc	
MIV2B.{Noc_ther}	t	a	a	t	tc	
MIV2B.{Str_11AG8}	t	g	a	t	ct	
MIV2B.{Str_mal}	t	g	g	t	ct	
MIV2B(9)	t	a	a	t	tc	
MIV2B(13)	t	a	a	t	tc	

	280					329
MIV2B.{Str_mp2}						
MIV2B.{Str_mp2b}						
MIV2B.{Str_mar}						
MIV2B.{Str_fum}						
MIV2B.{Str_pal}						
MIV2B.{Noc_ther}						
MIV2B.{Str_11AG8}						
MIV2B.{Str_mal}						
MIV2B(9)						
MIV2B(13)						

	330					379
MIV2B.msf{Str_mp2}						a
MIV2B.msf{Str_mp2b}						a
MIV2B.msf{Str_mar}						a
MIV2B.msf{Str_fum}						a
MIV2B.msf{Str_pal}						c
MIV2B.msf{Noc_ther}						a
MIV2B.msf{Str_11AG8}						a
MIV2B.msf{Str_mal}						c
MIV2B(9)						a
MIV2B(13)						a

	380						429
MIV2B.{Str_mp2}	gc cg .g.tg n	ggatgacgg.	cttccg.gtt	gtt~~~~~			
MIV2B.{Str_mp2b}	gc cg .g.tg ~	~~~~~	~~~~~	~~~~~			
MIV2B.{Str_mar}	gc cg .g.tg g	ggatgacggc	cttccg.gtt	gtaaaccctc.			
MIV2B.{Str_fum}	gc cg .g.tg g	ggatgacggc	cttccg.gtt	gtaaaccctc.			
MIV2B.{Str_pal}	gc cg .g.tg g	ggatgacggc	cttccg.gtt	gtaaaccctc.			
MIV2B.{Noc_ther}	gc cg .g.tg g	ggatgacggc	cttccg.gtt	gtaaaccctc.			
MIV2B.{Str_11AG8}	gc cg .g.tg g	ggatgacggc	cttccg.gtt	gtaaaccctc.			
MIV2B.{Str_mal}	gc cg .g.tg g	ggatgacggc	cttccg.gtt	gtaaaccctc.			
MIV2B(9)	tg gg tgcac c	gtactacaat	ggccggaaca	atgagotgcg			
MIV2B(13)	gc c. gcgtg g	ggatgacgcg	caacc.cttt	gt..cccgtg			

	430				479
MIV2B{Str_mp2}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
MIV2B{Str_mp2b}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
MIV2B{Str_mar}	tttcag.cag	g.gaagaag.	c...gaaagt	gacgggtacct	gcagaagaag
MIV2B{Str_fum}	tttcag.cag	g.gaagaag.	c...gaaagt	gacgggtacct	gcagaagaag
MIV2B{Str_pal}	tttcag.cag	g.gaagaag.	c...gaaagt	gacgggtacct	gcagaagaag
MIV2B{Noc_ther}	tttcag.cag	g.gaagaag.	c...gaaagt	gacgggtacct	gcagaagaag
MIV2{Str_11AG8}	tttcag.cag	g.gaagaag.	ct.ttcgggt	gacgggtacct	gcagaagaag
MIV2B.{Str_mal}	tttcag.cag	g.gaagaag.	c...gtgagt	gacgggtacct	gcagaagaag
MIV2B(9)	atgccgtgag	gtggaggcga	atctcaaaaa	gccgggtgtca	gttg.ggaat
MIV2B(13)	ttgcc..cag	caggcccttg	tgggtgctggg	gac..tcac.	G.ggaagacc

	480				529
MIV2B{Str_mp2}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
MIV2B{Str_mp2b}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
MIV2B{Str_mar}	cgccggctaa	ctacgtgcc	gcagccgcgg	taatacgtag	ggcgcaagcg
MIV2B{Str_fum}	cgccggctaa	ctacgtgcc	gcagccgcgg	taatacgtag	ggcgcaagcg
MIV2B{Str_pal}	cgccggctaa	ctacgtgcc	gcagccgcgg	taatacgtag	ggcgcgagcg
MIV2B{Noc_ther}	cgccggctaa	ctacgtgcc	gcagccgcgg	taatacgtag	ggcgcaagcg
MIV2{Str_11AG8}	caccggctaa	ctacgtgcc	gcagccgcgg	taatacgtag	ggtgcgagcg
MIV2B{Str_mal}	cgccggctaa	ctacgtgcc	gcagccgcgg	taatacgtag	ggcgcaagcg
MIV2B(9)	gggggtct.g	caactagacc	cca..tgaag	tcgga.gtcg	ctagtaatcg
MIV2B(13)	cgccgggggt	caactcggag	gaaggtgggg	acggacgtca	agt.c.atca

	530				579
MIV2B.{Str_mp2}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
MIV2B{Str_mp2b}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
MIV2B.{Str_mar}	ttgtccggaa	ttattgggcg	taaaga.gct	cgtaggcggc	ttgtcacgtc
MIV2B.{Str_fum}	ttgtccggaa	ttattgggcg	taaaga.gct	cgtaggcggc	ttgtcgcgtc
MIV2B.{Str_pal}	ttgtccggaa	ttattgggcg	taaaga.gct	cgtaggcggc	ttgtcgcgtc
MIV2B{Noc_ther}	ttgtccggaa	ttattgggcg	taaaga.gct	cgtaggcggc	ttgtcgcgtc
MIV2{Str_11AG8}	ttgtccggaa	ttattgggcg	taaaga.gct	cgtaggcggc	ttgtcacgtc
MIV2B.{Str_mal}	ttgtccggaa	ttattgggcg	taaaga.gct	cgtaggcggc	ttgtcgcgtc
MIV2B(9)	cagatcagca	ttgtctgcg.g	tgaatacgtt	cccgggctt	gtacgacacc
MIV2B(13)	tgcccttat	gtcttgggc.	tgcacacgtg	ctacaatggc	cggtaaatg

	580				629
MIV2B{Str_mp2}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
MIV2B{Str_mp2b}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
MIV2B.{Str_mar}	ggttgtgaaa	g.cccggggc	ttaaccccgg	gtctgcagtc	gatacgggca
MIV2B.{Str_fum}	ggttgtgaaa	g.cccggggc	ttaaccccgg	gtctgcagtc	gatacgggca
MIV2B.{Str_pal}	ggttgtgaaa	g.cccggggc	ttaaccccgg	gtctgcagtc	gatacgggca
MIV2B{Noc_ther}	ggttgtgaaa	g.cccggggc	ttaaccccgg	gtctgcagtc	gatacgggca
MIV2{Str_11AG8}	ggttgtgaaa	g.cccggggc	ttaaccccgg	gtctgcagtc	gatacgggca
MIV2B.{Str_mal}	ggatgtgaaa	g.cccggggc	ttaactccgg	gtctgcattc	gatacgggca
MIV2B(9)	gcccgtcaga	gtcacgaaag	tccgtaaca~	~~~~~	~~~~~
MIV2B(13)	agctgcgata	.ccgcgagg.	tggg..gcga	atctcaaaaa	gccgggtctca

630 679

MIV2B.{Str_mp2} ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B{Str_mp2b} ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B.{Str_mar} ggctagagtt cggtagggga gatcggaatt cctggtgtag cggtgaaatg
MIV2B.{Str_fum} ggctagagtt cggtagggga gatcggaatt cctggtgtag cggtgaaatg
MIV2B.{Str_pal} ggctagagtt cggtagggga gatcggaatt cctggtgtag cggtgaaatg
MIV2B{Noc_ther} ggctagagtt cggtagggga gatcggaatt cctggtgtag cggtgaaatg
MIV2{Str_11AG8} ggctagagtt cggtagggga gatcggaatt cctggtgtag cggtgaaatg
MIV2B.{Str_mal} ggctagagtt cggtagggga gatcggaatt cctggtgtag cggtgaaatg
MIV2B.{MIV2B9} ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B.{MIV2B13} .gttcggatt ggggtctgca actc.gaccc catgaagt.. Cggagtcgct

680 729

MIV2B.{Str_mp2} ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B{Str_mp2b} ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B.{Str_mar} cgcagatatc ag.gaggaac accggtggcg aaggcggatc tctgggccga
MIV2B.{Str_fum} cgcagatatc ag.gaggaac accggtggcg aaggcggatc tctgggccga
MIV2B.{Str_pal} cgcagatatc ag.gaggaac accggtggcg aaggcggatc tctgggccga
MIV2B{Noc_ther} cgcagatatc ag.gaggaac accggtggcg aaggcggatc tctgggccga
MIV2{Str_11AG8} cgcagatatc ag.gaggaac accggtggcg aaggcggatc tctgggccga
MIV2B.{Str_mal} cgcagatatc ag.gaggaac accggtggcg aaggcggatc tctgggccga
MIV2B(9) ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B(13) agta.atcgc agatcagcat tgctgcggtg aatac.gttc cggggccttg

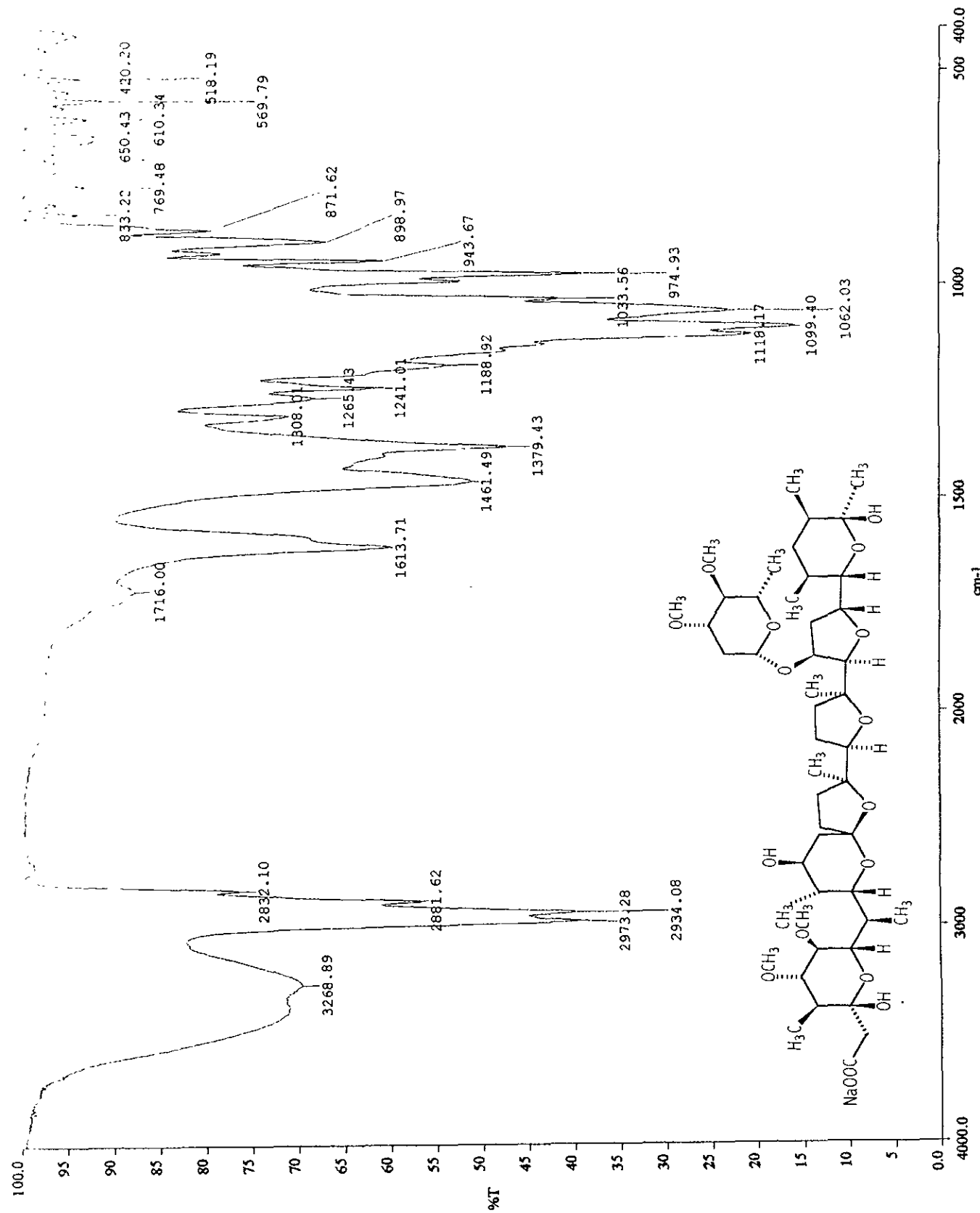
730 779

MIV2B.{Str_mp2} ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B{Str_mp2b} ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B.{Str_mar} tactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gccaacagga ttagataccc
MIV2B.{Str_fum} tactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gccaacagga ttagataccc
MIV2B.{Str_pal} tactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gccaacagga ttagataccc
MIV2B{Noc_ther} tactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gccaacagga ttagataccc
MIV2{Str_11AG8} tactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gccaacagga ttagataccc
MIV2B.{Str_mal} tactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gccaacagga ttagataccc
MIV2B(9) ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B(13) tacacaccgc ccgtcacgctc a.cgaaagtc g.gta.a.ca cccga.agcc

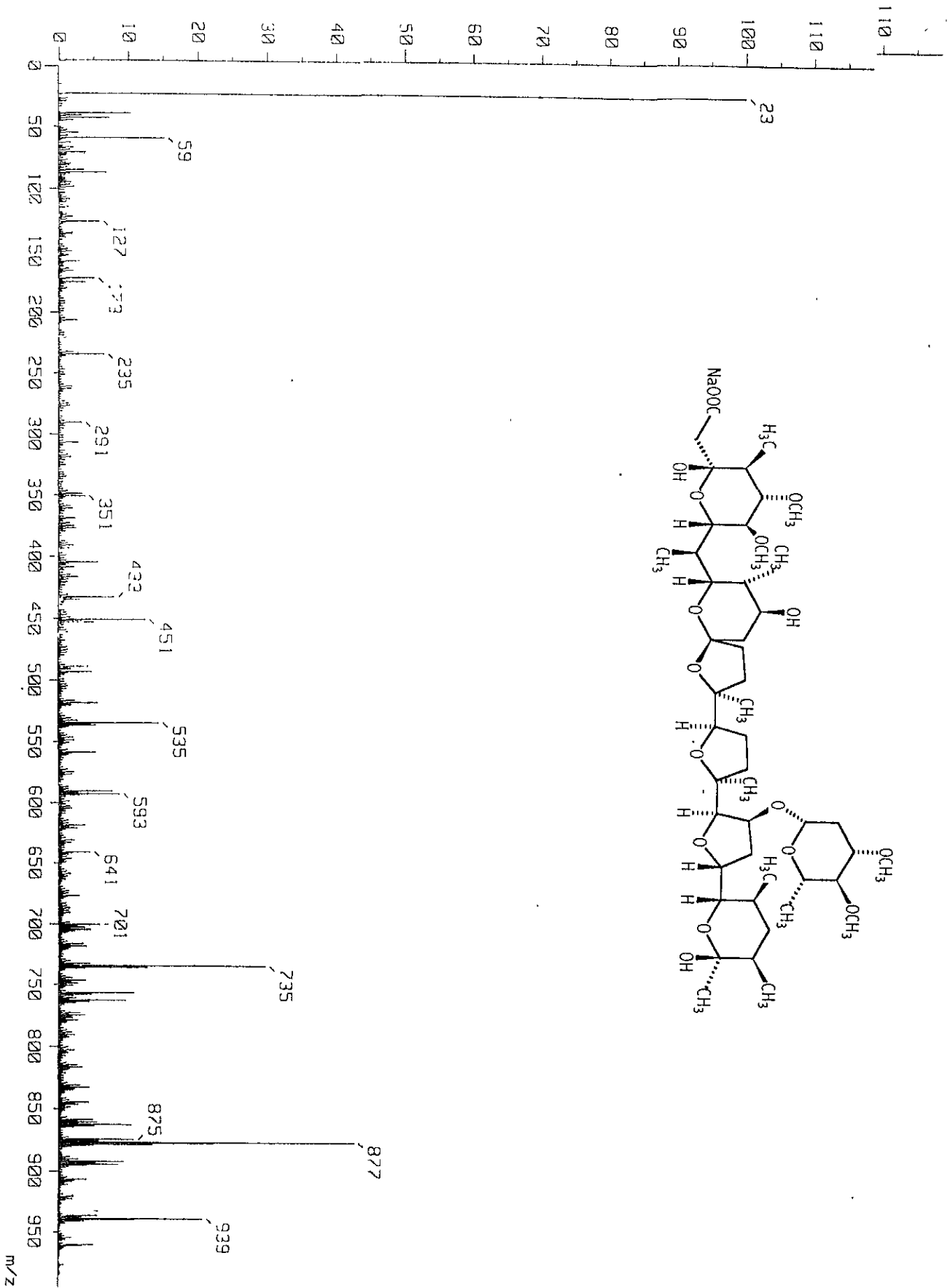
780 810

MIV2B.{Str_mp2} ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B.{Str_mp2b} ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B.{Str_mar} tggtagtcca cgccgtaaac ggtgggcact a
MIV2B.{Str_fum} tggtagtcca cgccgtaaac ggtgggcact a
MIV2B.{Str_pal} tggtagtcca cgccgtaaac ggtgggcact a
MIV2B{Noc_ther} tggtagtcca cgccgtaaac ggtgggcact a
MIV2B.{Str_11AG8} tggtagtcca cgccgtaaac ggtgggcact a
MIV2B.{Str_mal} tggtagtcca cgccgtaaac gttgggaact a
MIV2B(9) ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
MIV2B(13) .ggtggccca accccttgtg gga~~~~~ ~

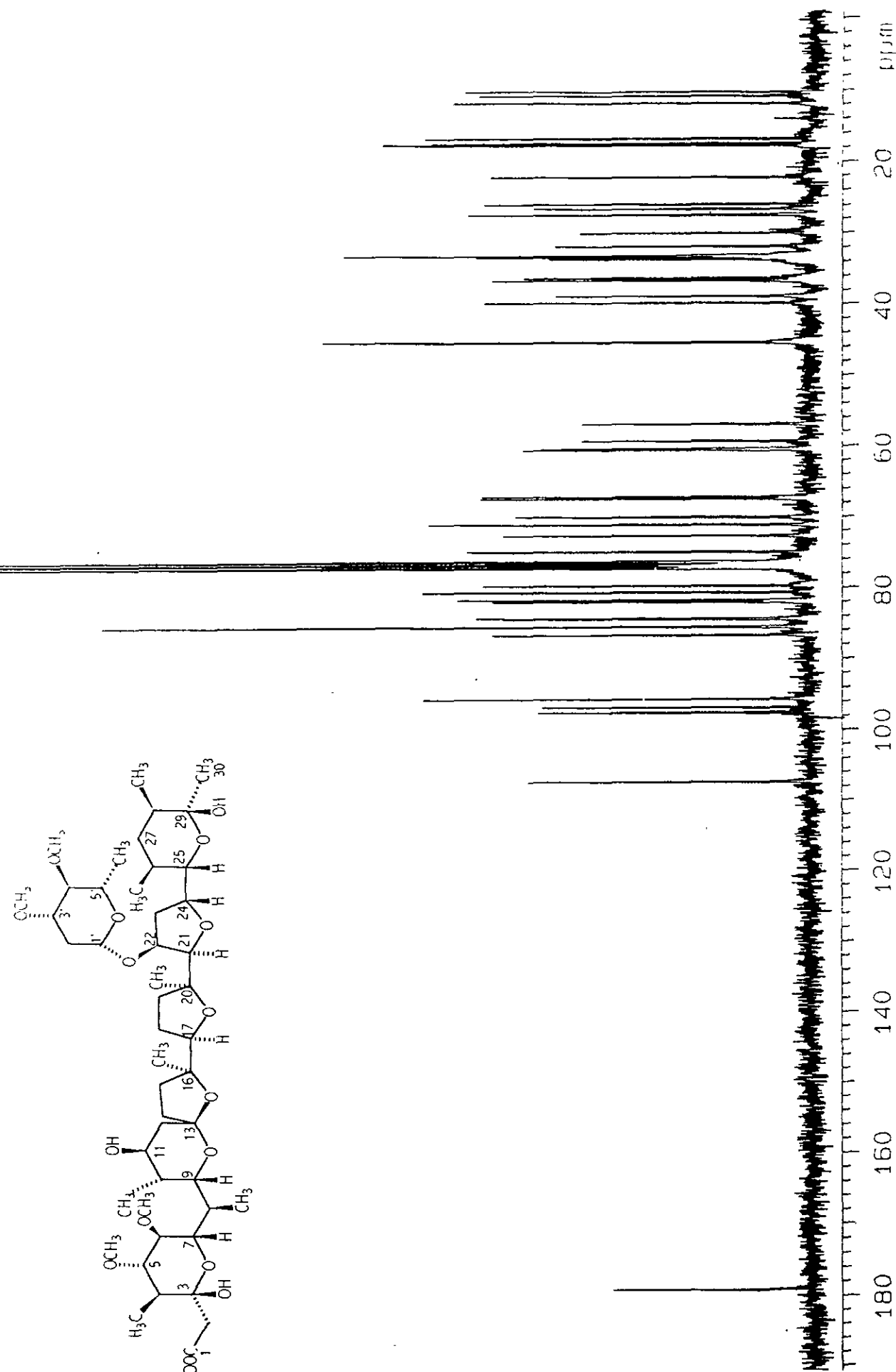
APÉNDICE II.
ESPECTROS



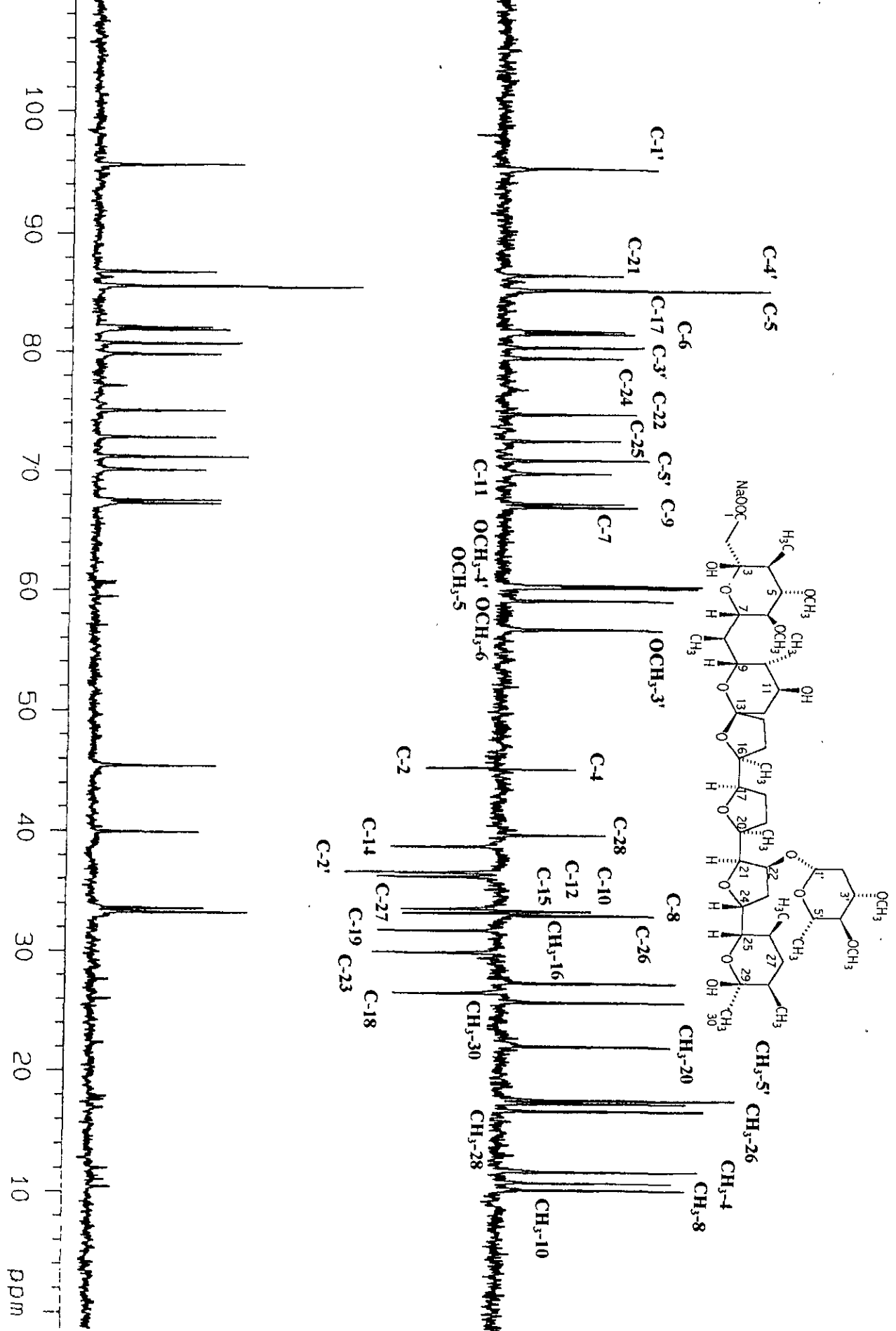
Espectro I. Espectro en el IR de la maduramicina (199)



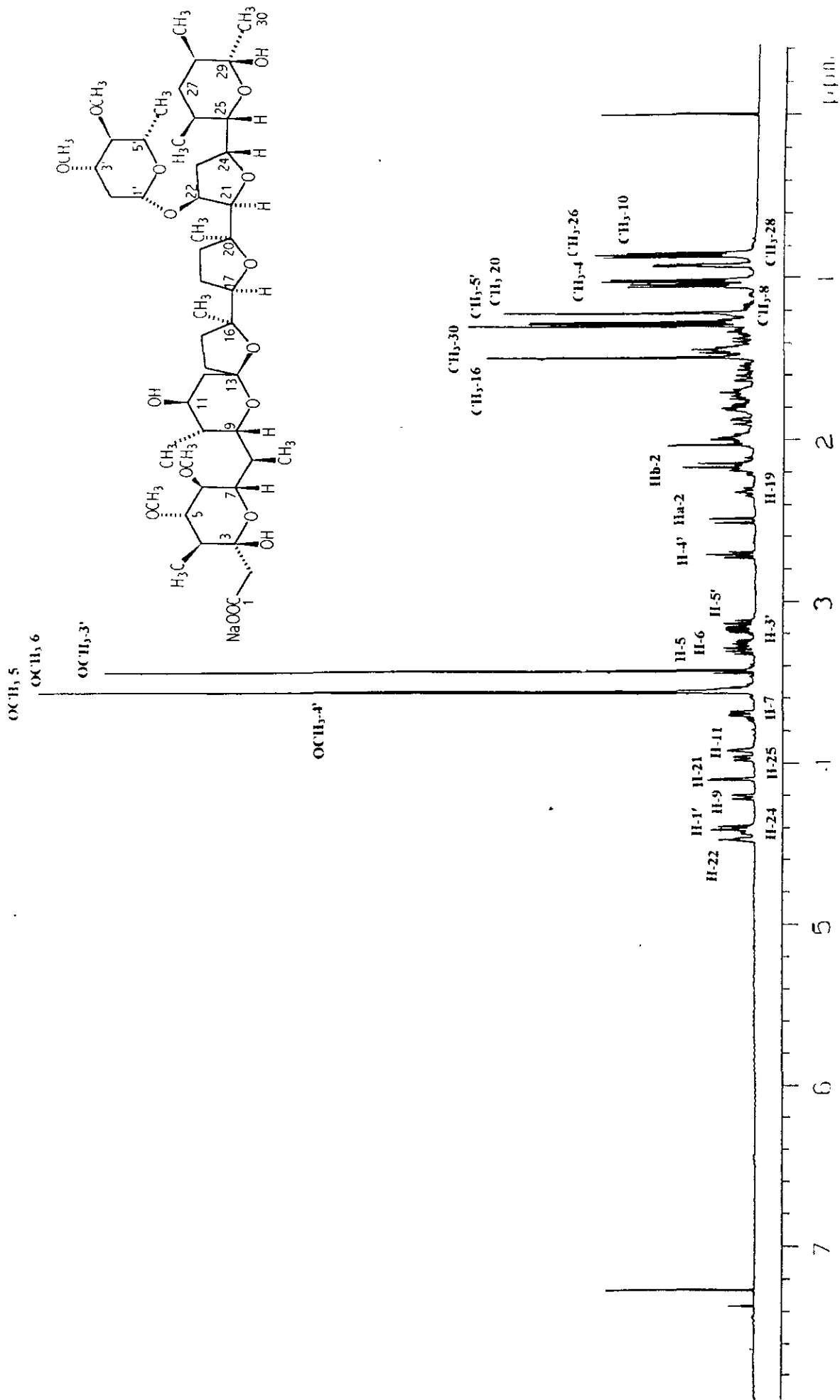
Espectro 2. Espectro de masas modalidad FAB de la maduramicina (199).



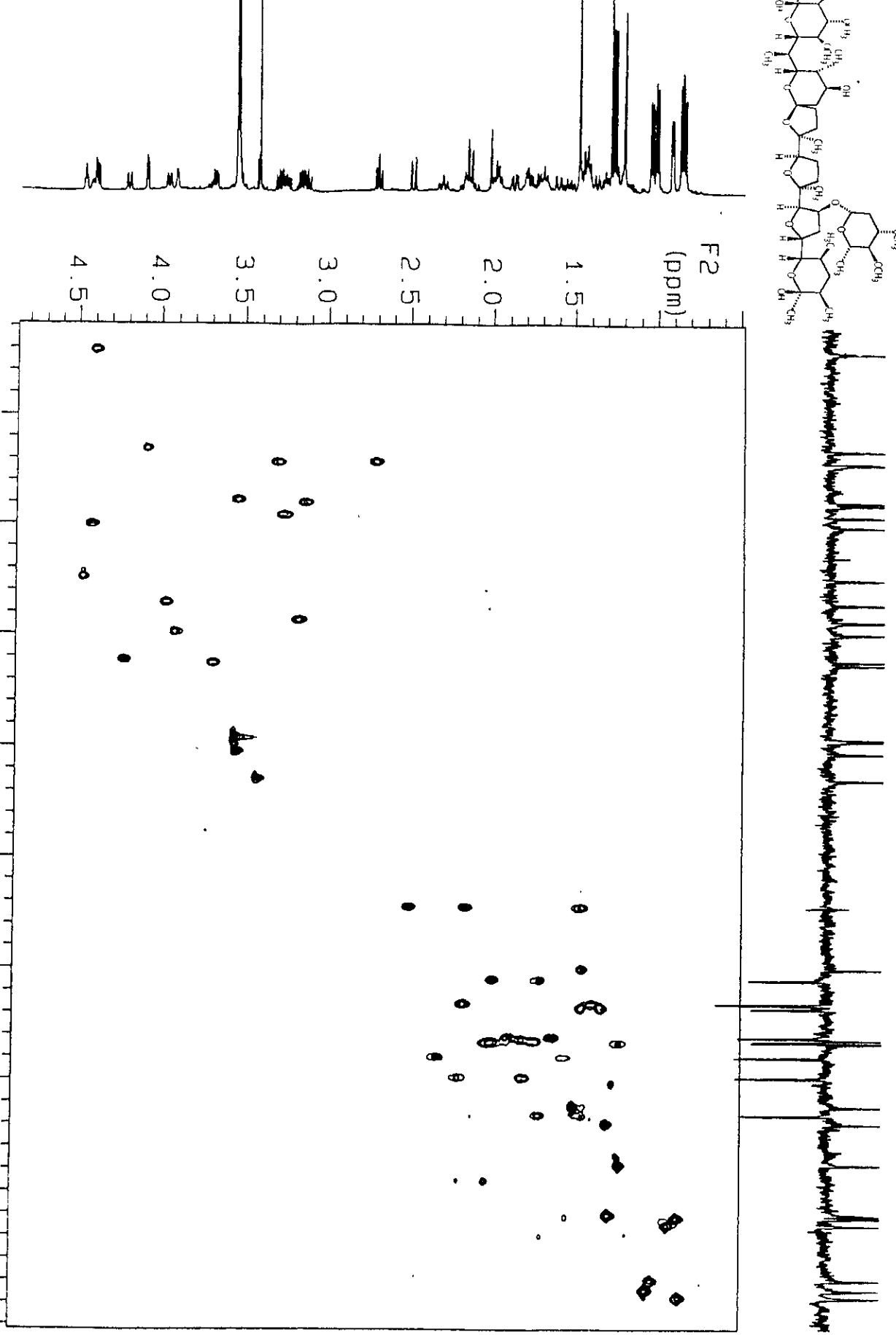
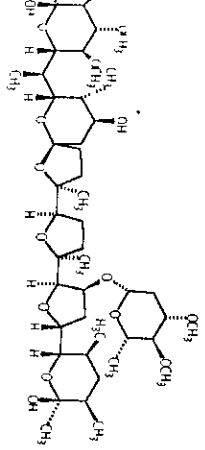
Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C de la maduramicina (199)



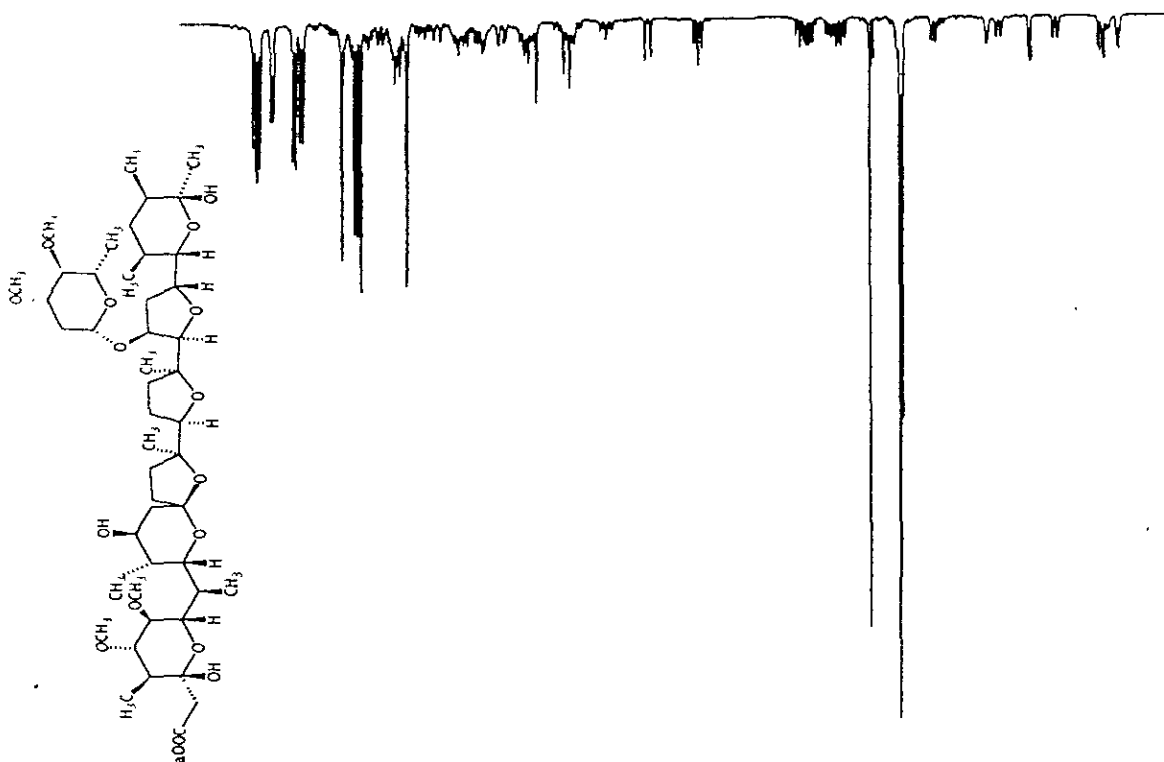
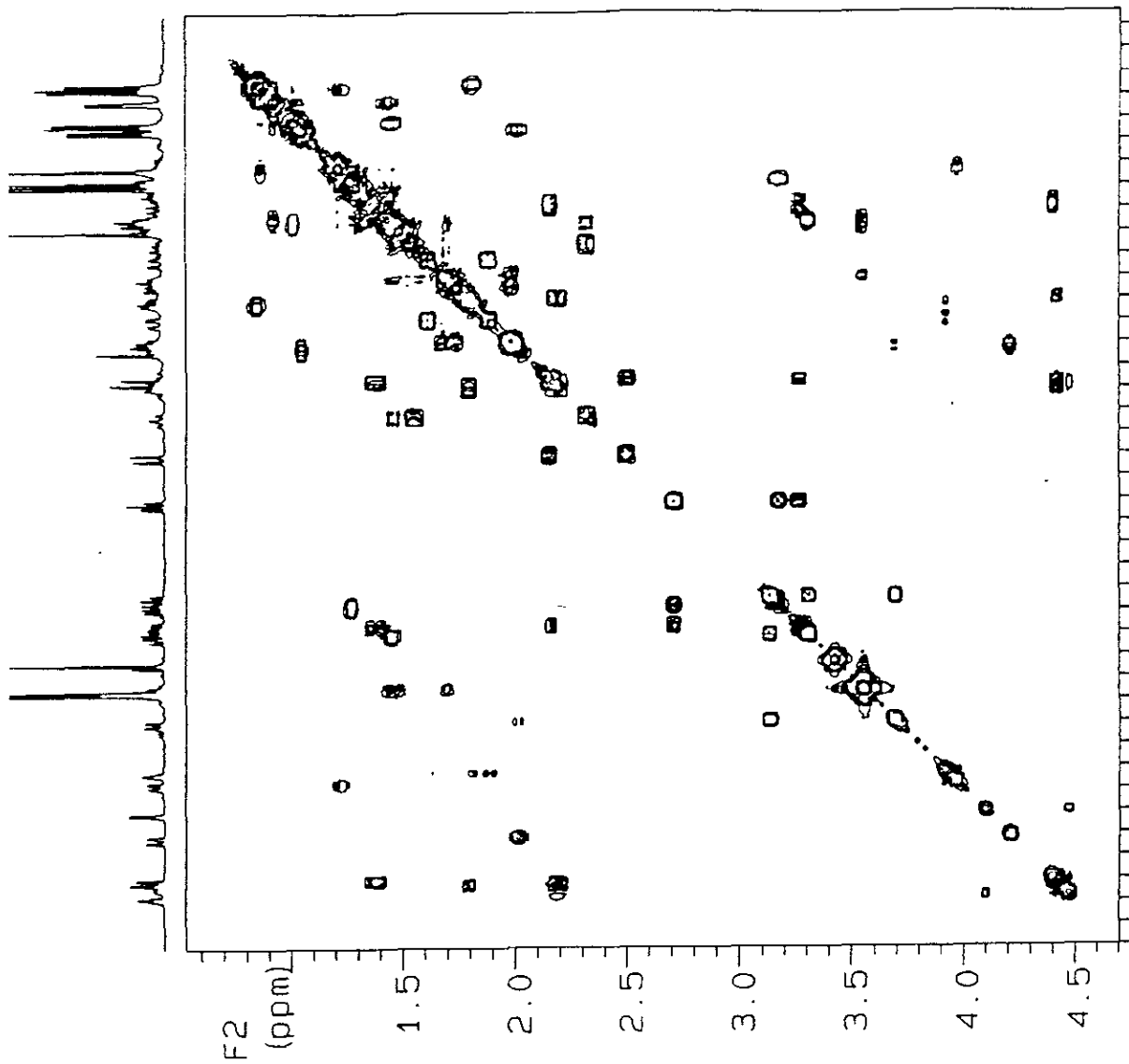
Espectro 4. Espectro de RMN ¹³C-DEPT de la maduramicina (199)



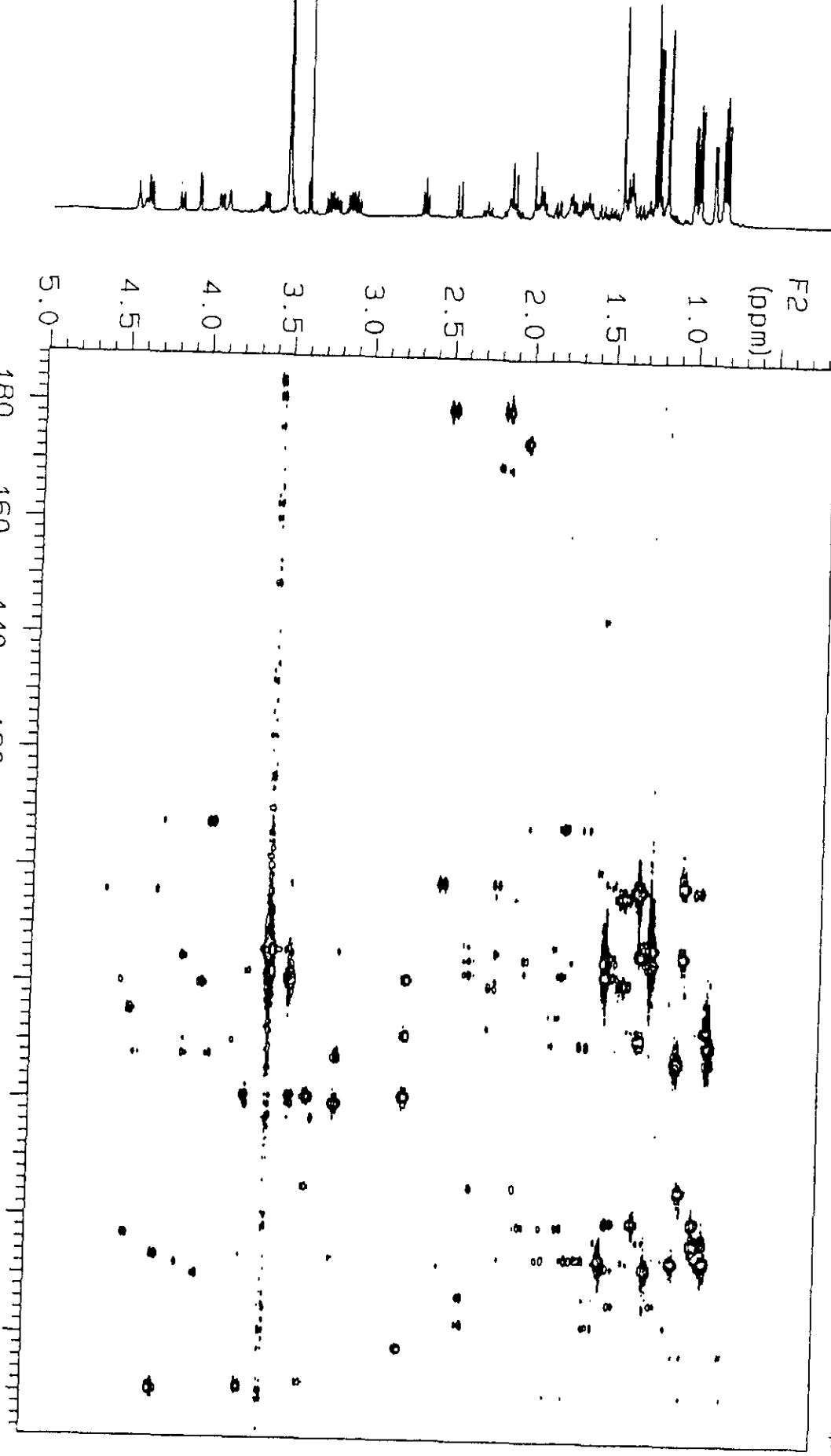
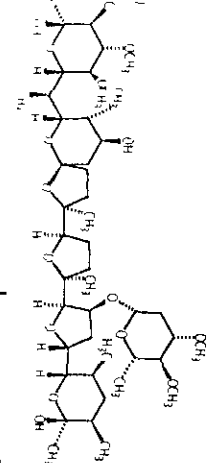
Espectro 5. Espectro de RMN ¹H de la maduramicina (199)



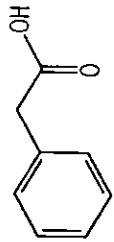
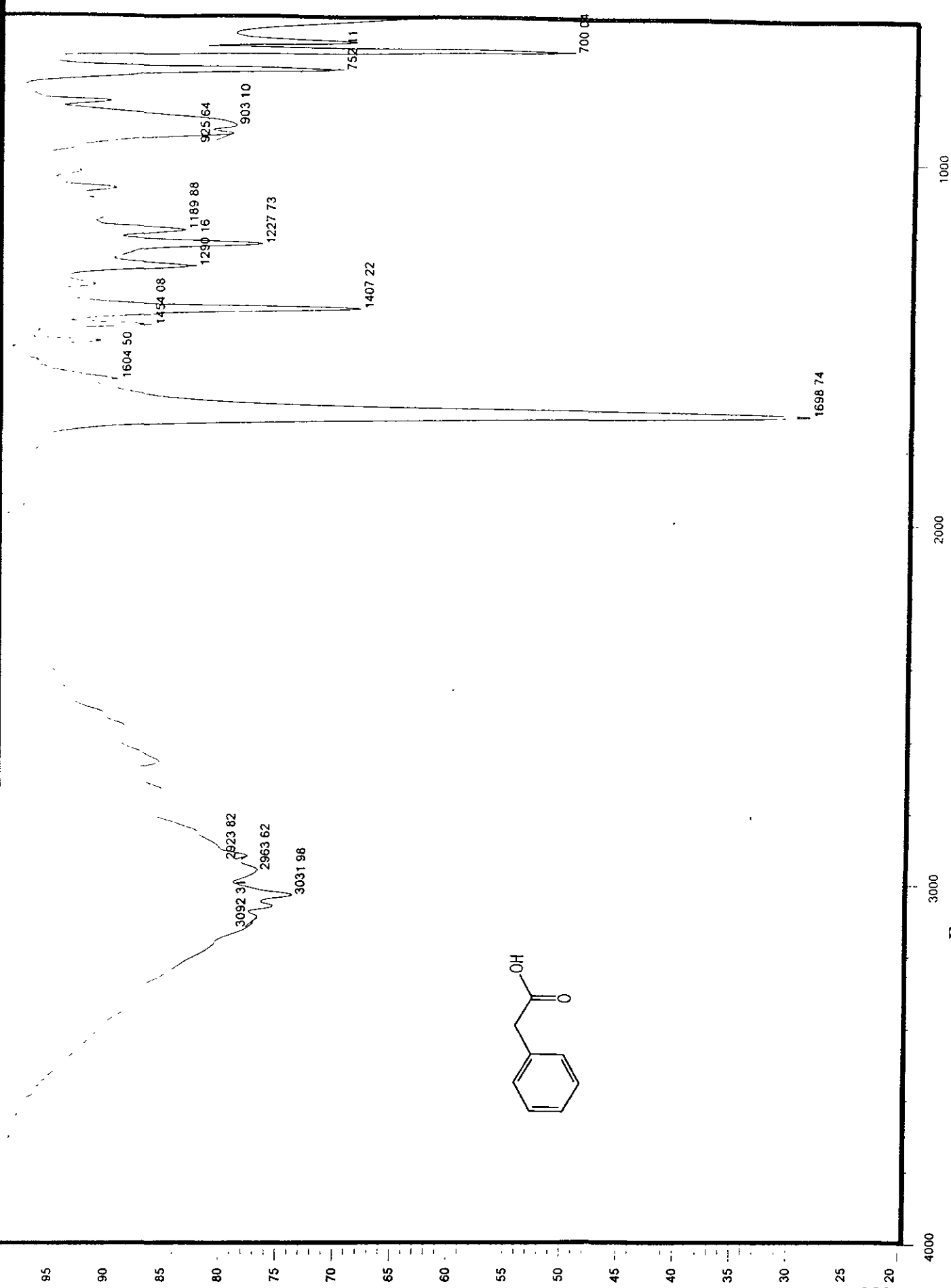
Espectro 6. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMQC de la maduramicina (199).



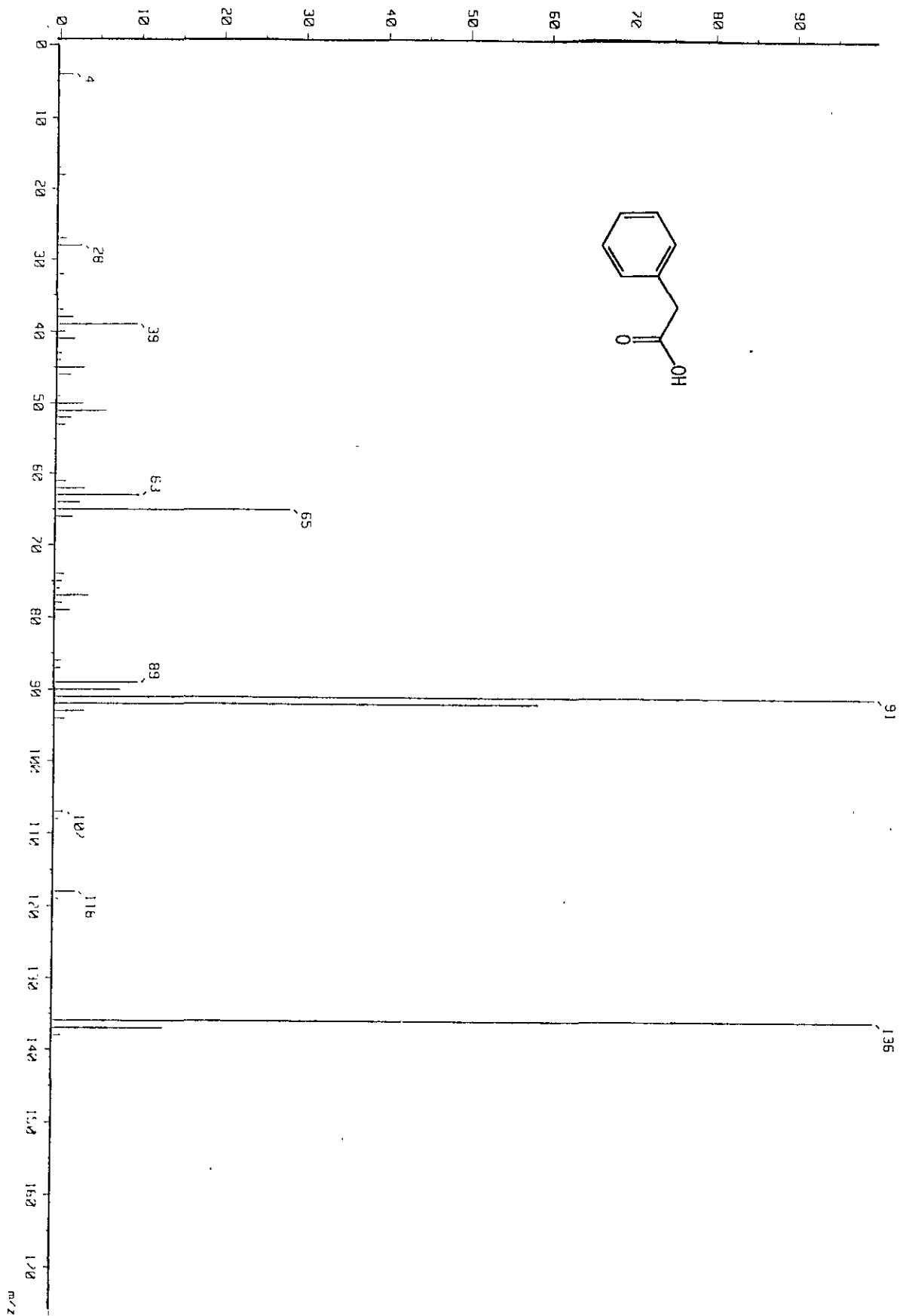
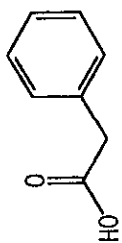
Espectro 7. Espectro de RMN ¹H-COSY de la maduramicina (199)



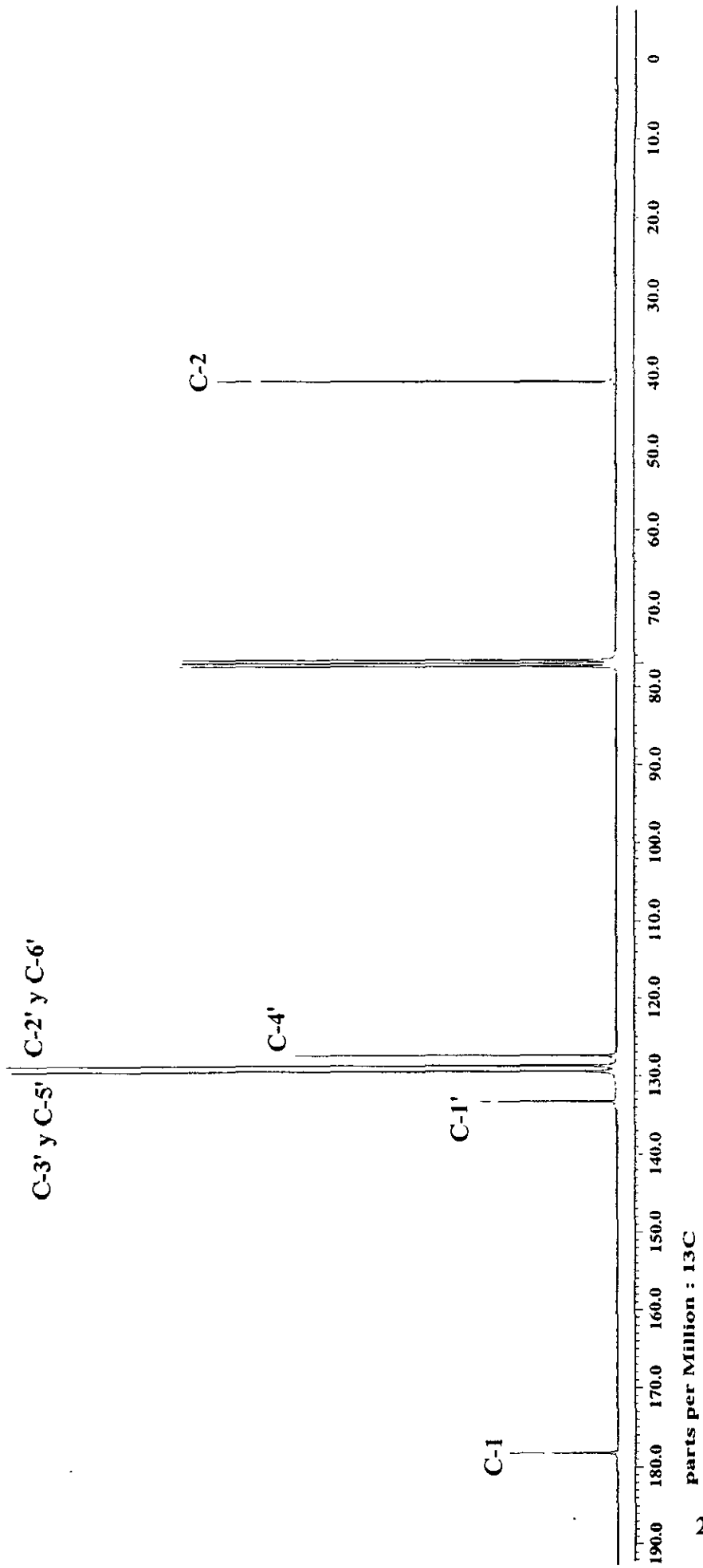
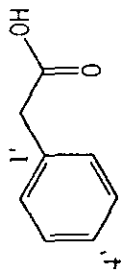
Espectro 8. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBBC de la maduramicina (199)



Espectro 9. Espectro en el IR del ácido fenilacético (220).

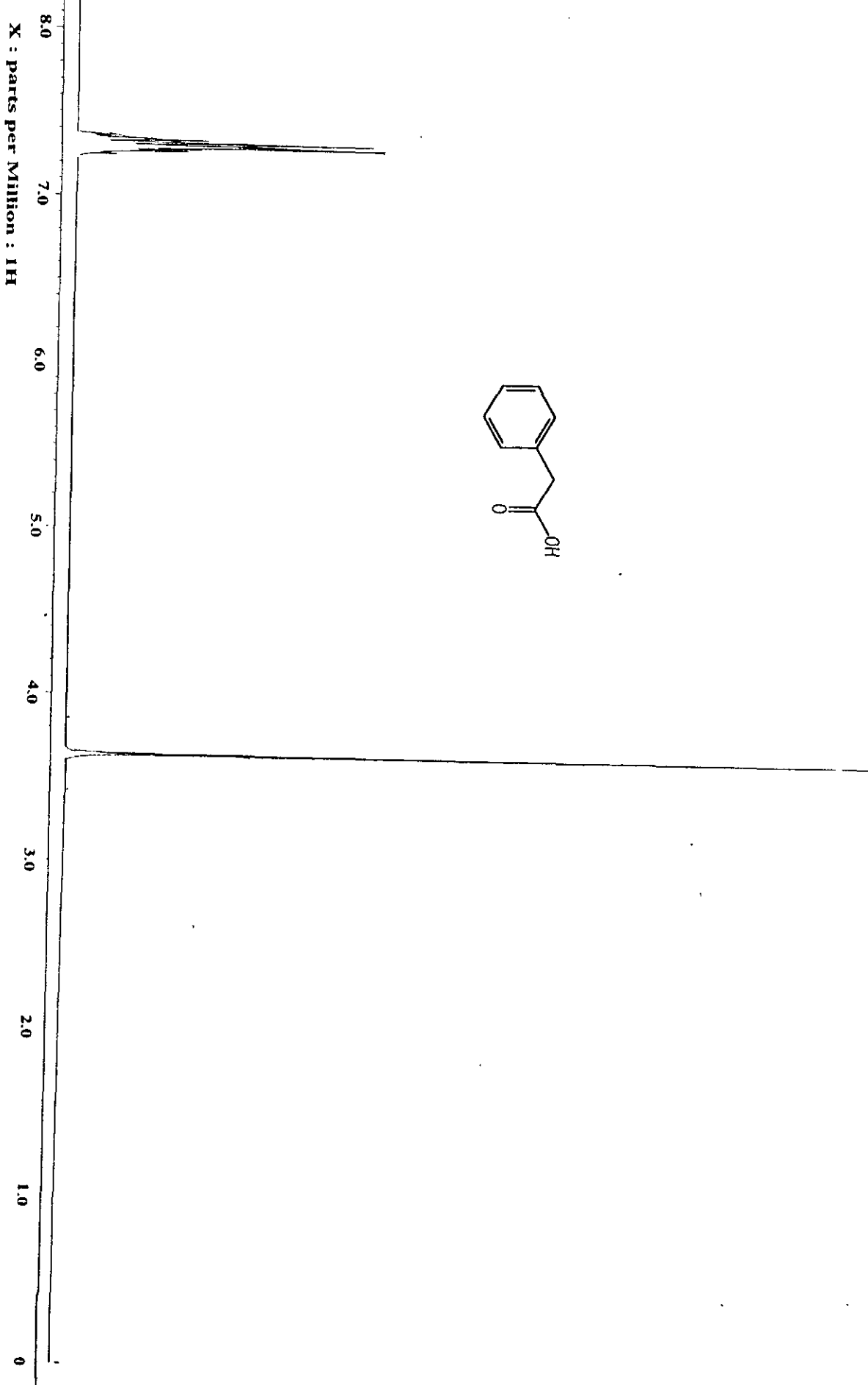
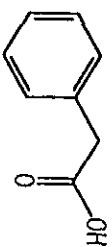


Espectro 10. Espectro de masas por impacto electrónico del ácido fenilacético (220).

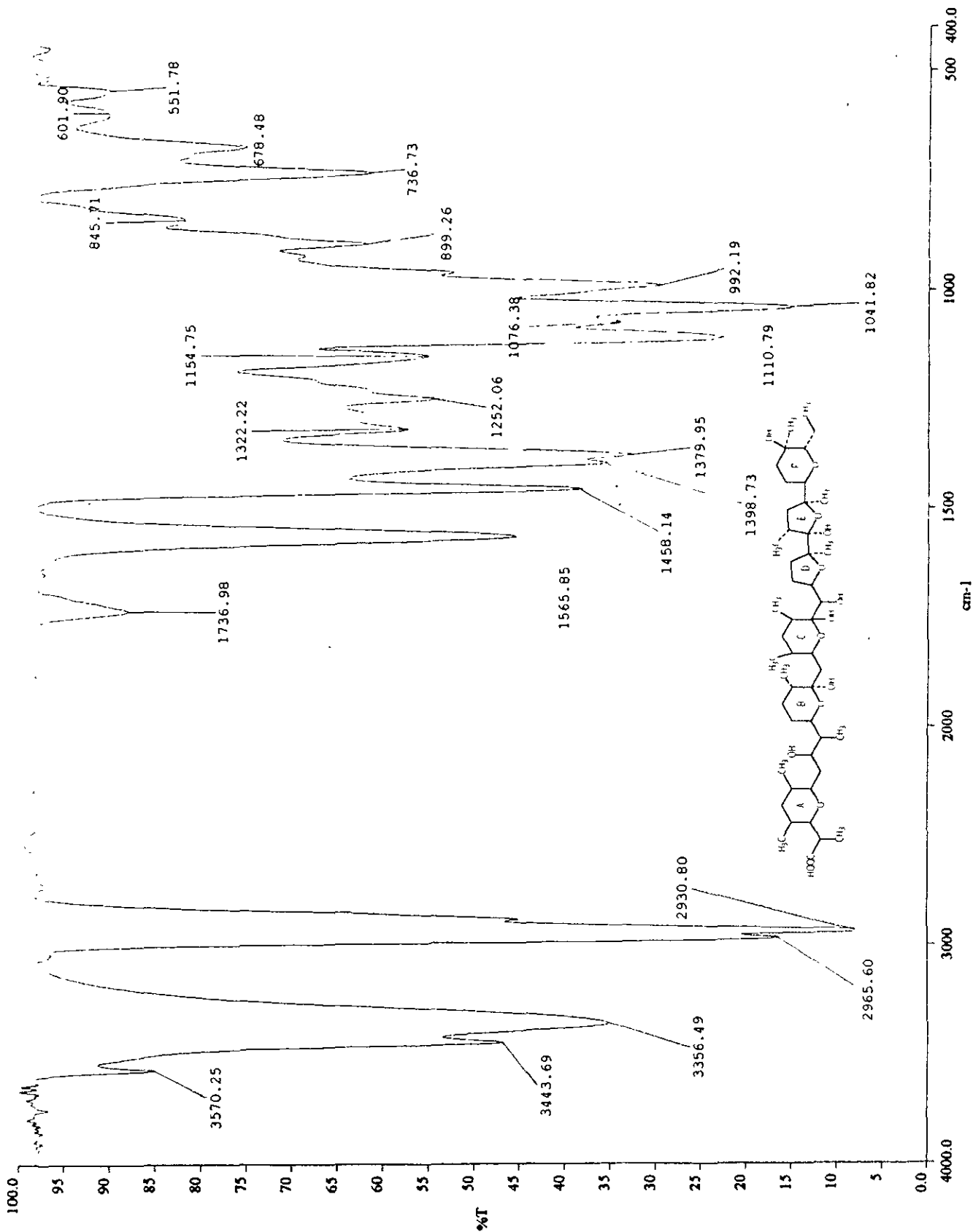


Espectro 11. Espectro de RMN ¹³C del ácido fenilacético (220).

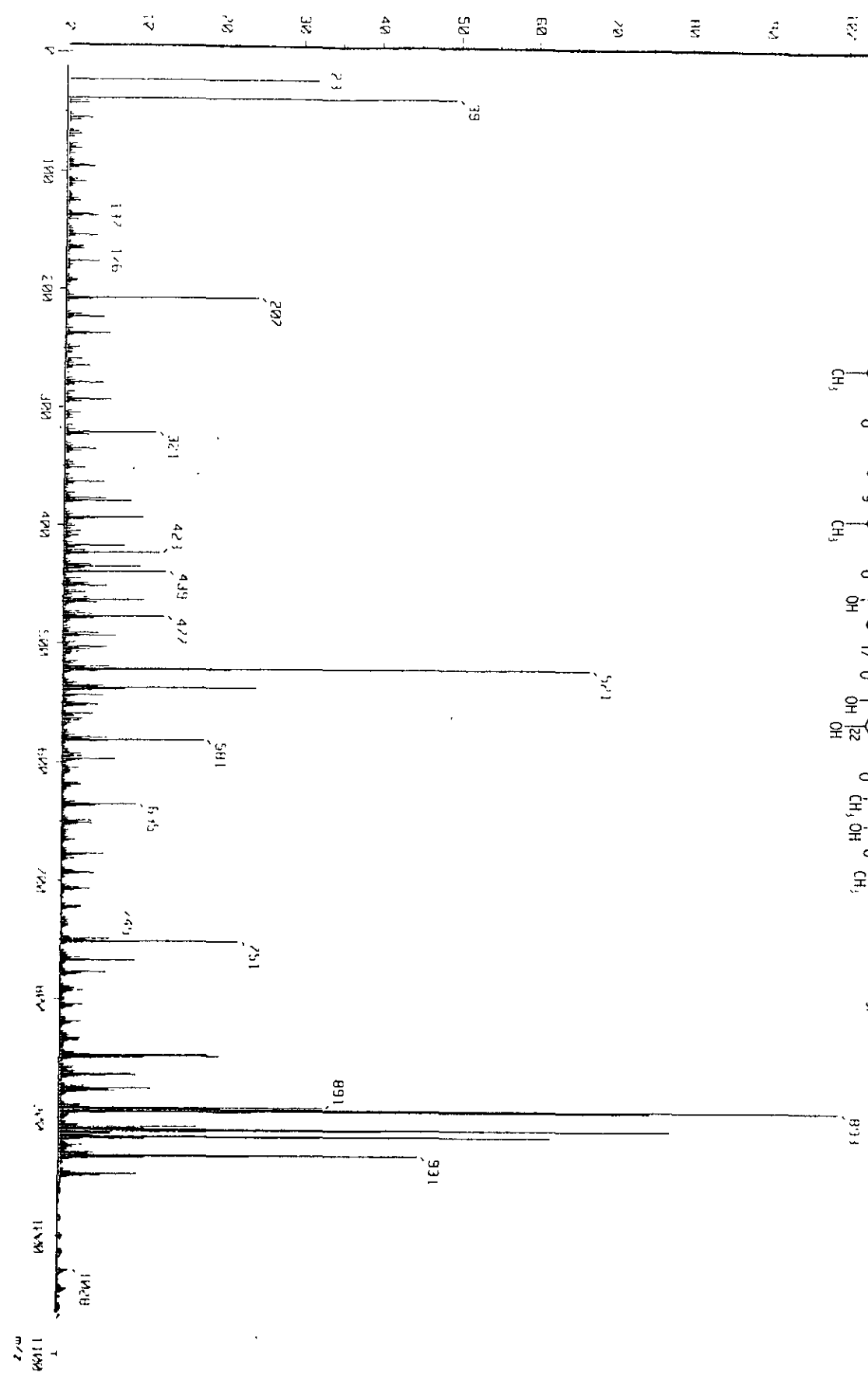
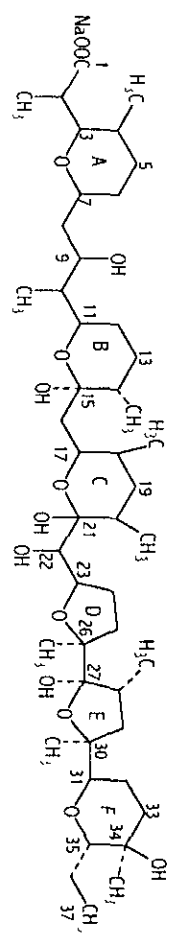
parts per Million : 13C



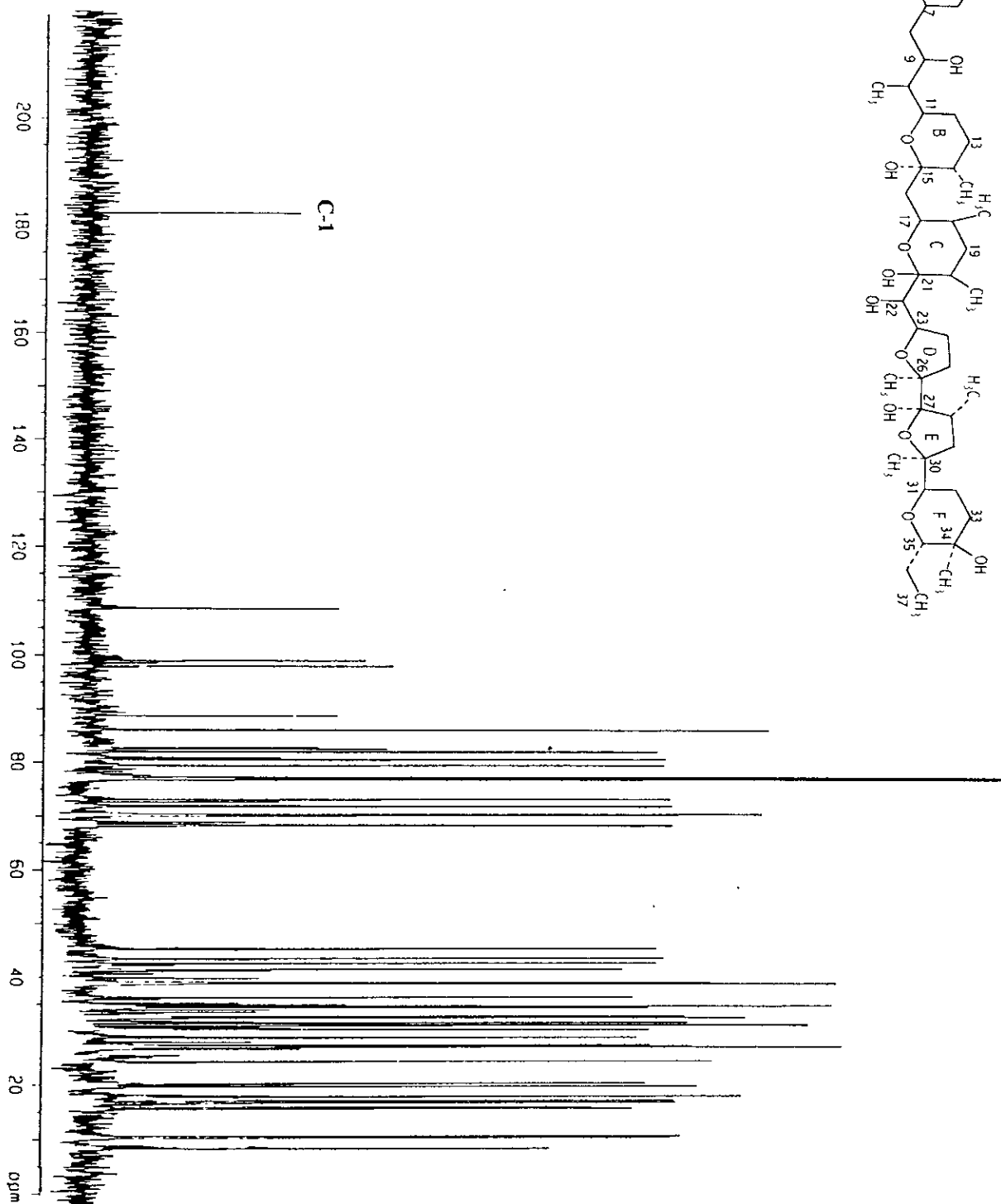
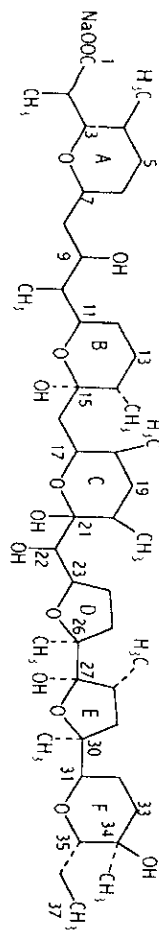
Espectro 12. Espectro de RMN ¹H del ácido fenilacético (220).



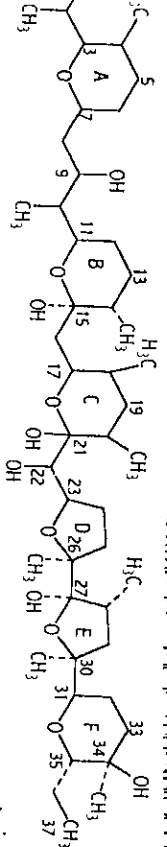
Espectro 13. Espectro en el IR del antibiótico X-206 (218).



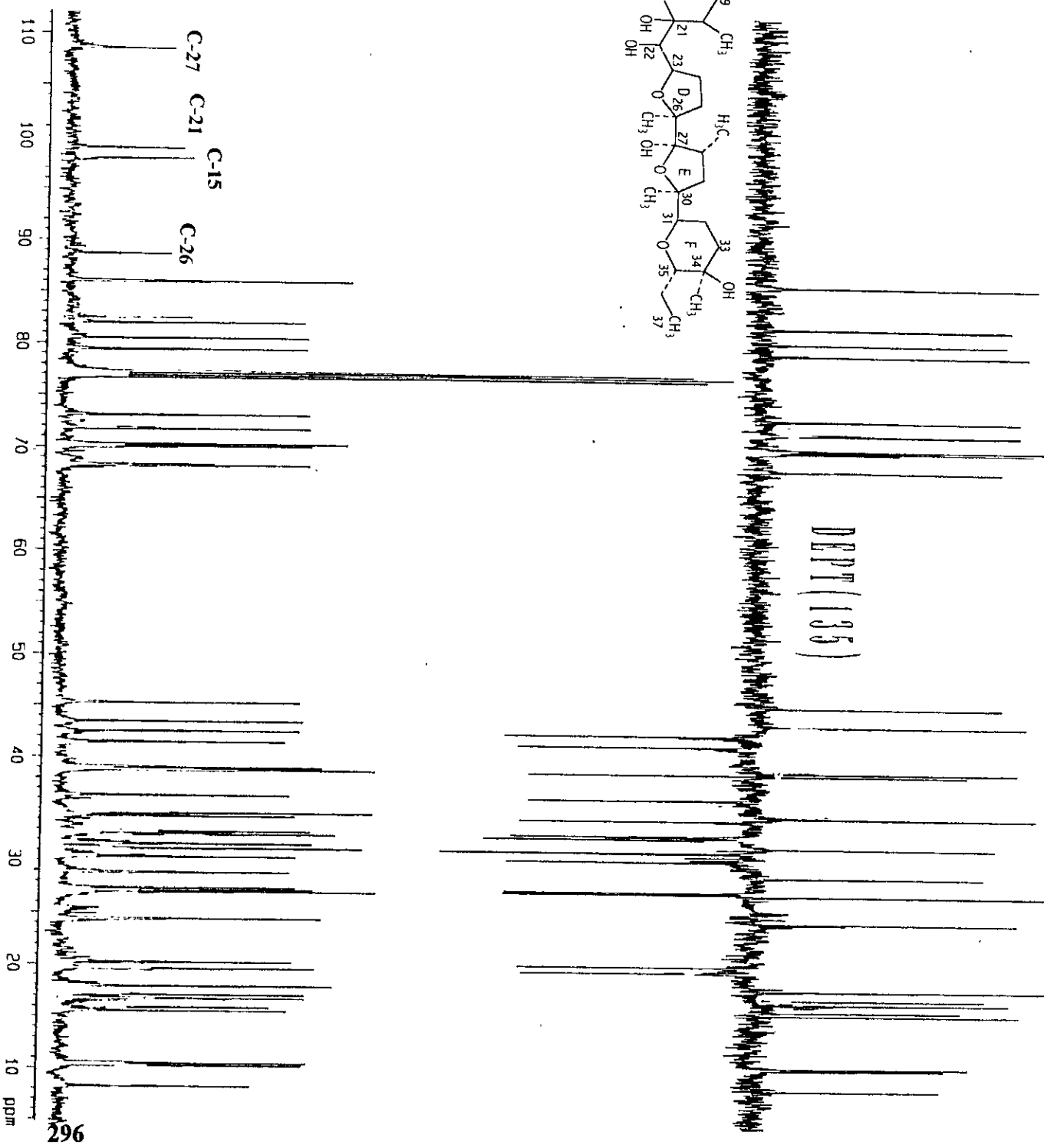
Espectro 14. Espectro de masas modalidad FAB⁺ del antibiótico X-206 (218).



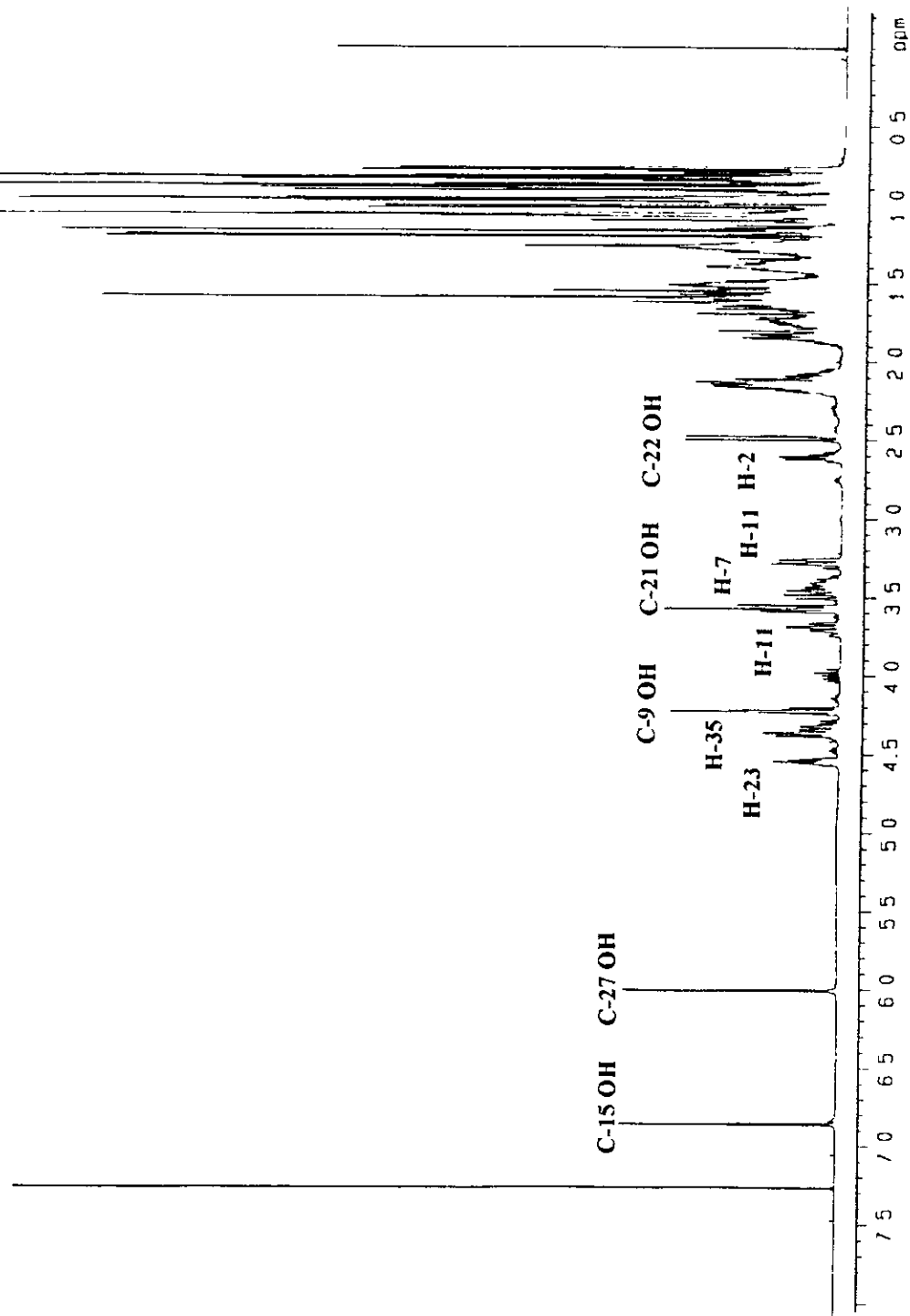
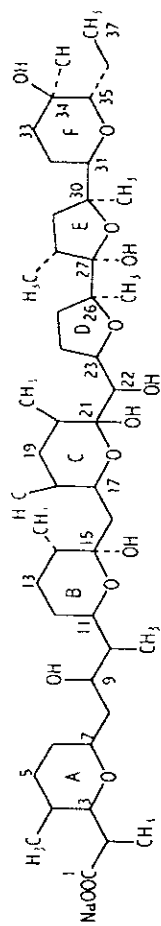
Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C del antibiótico X-206 (218).



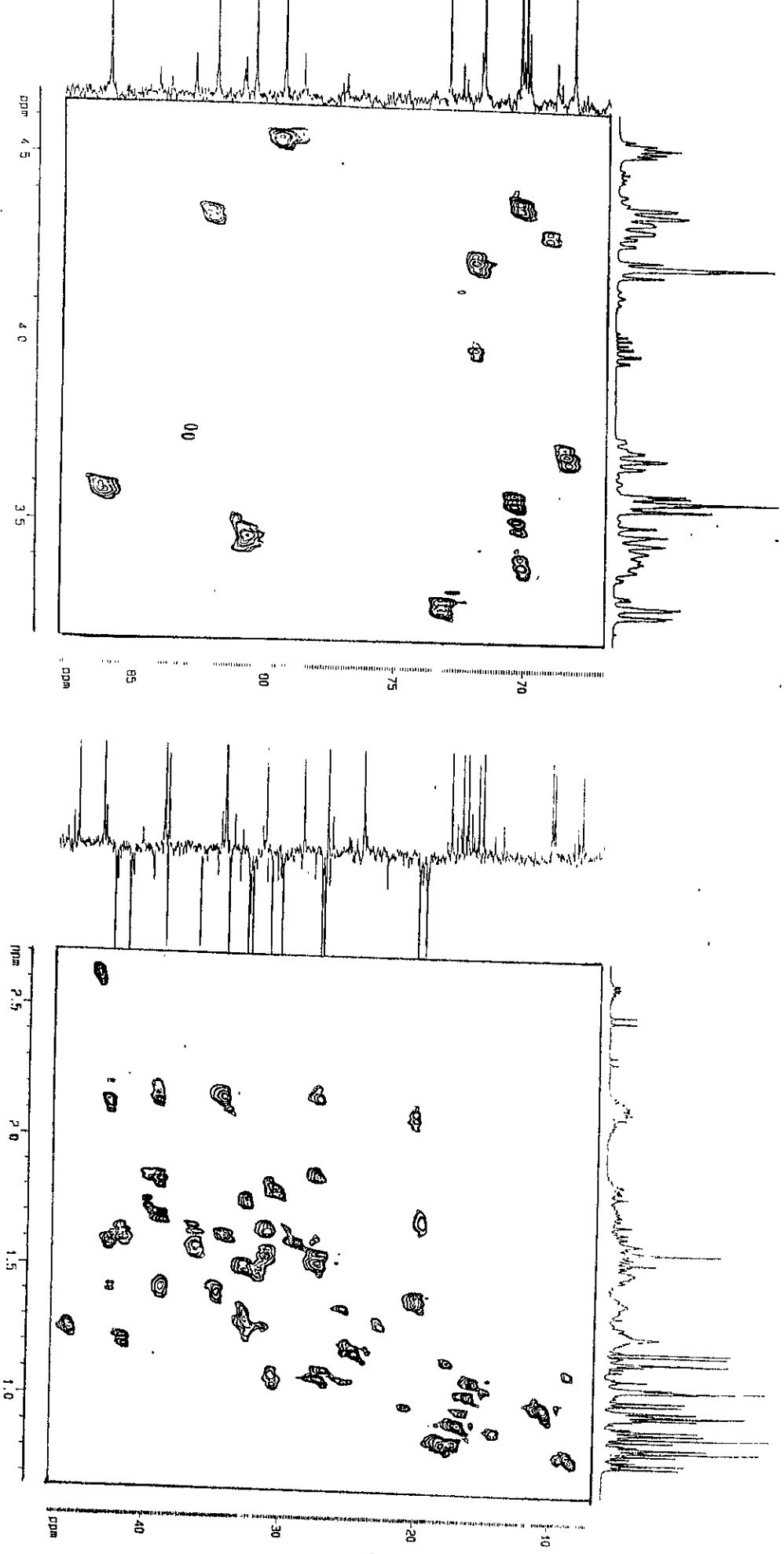
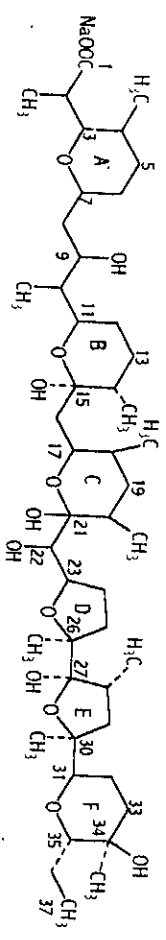
DEPT (135)



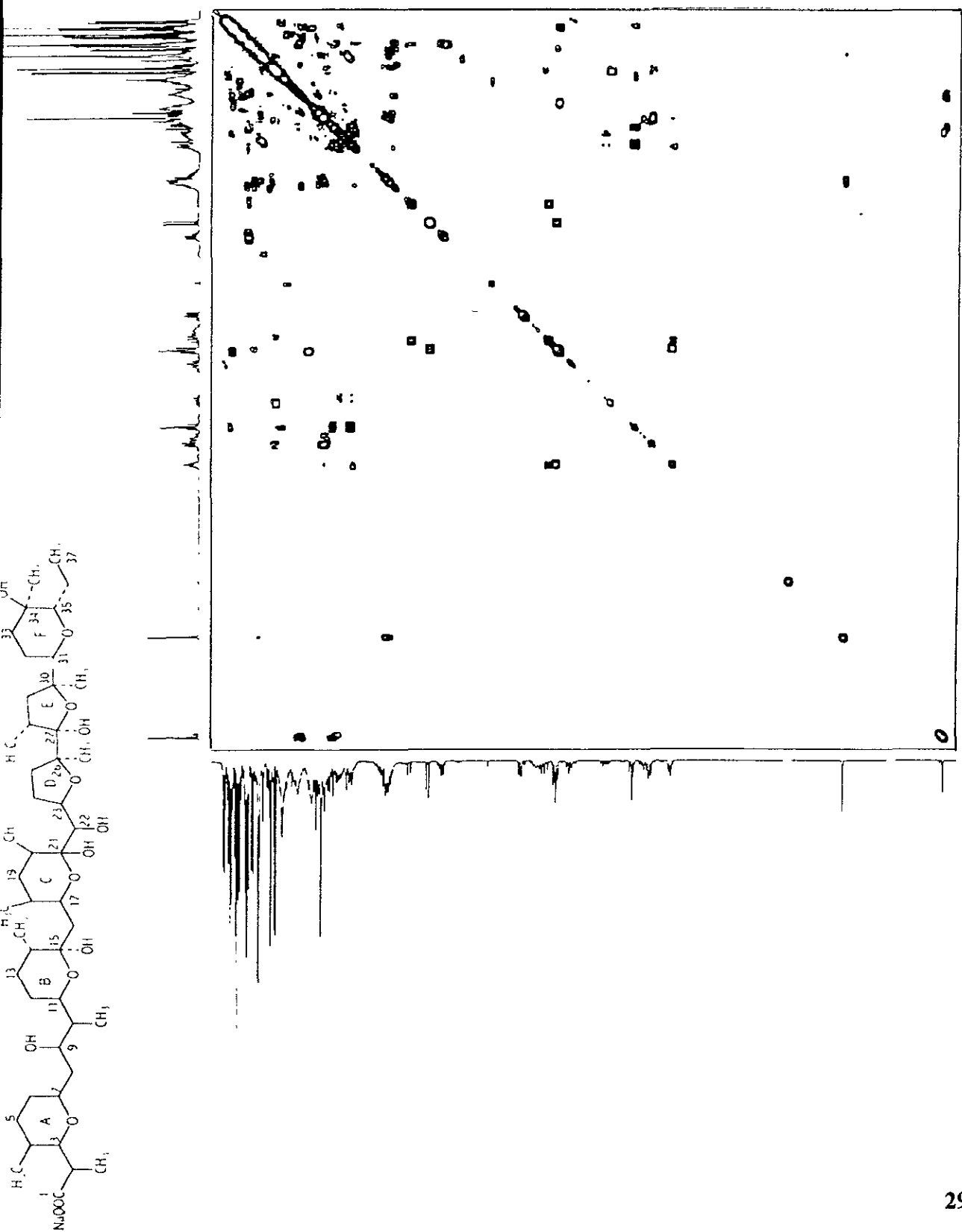
Espectro 16. Espectro de RMN ¹³C-DEPT del antibiótico X-206 (218).



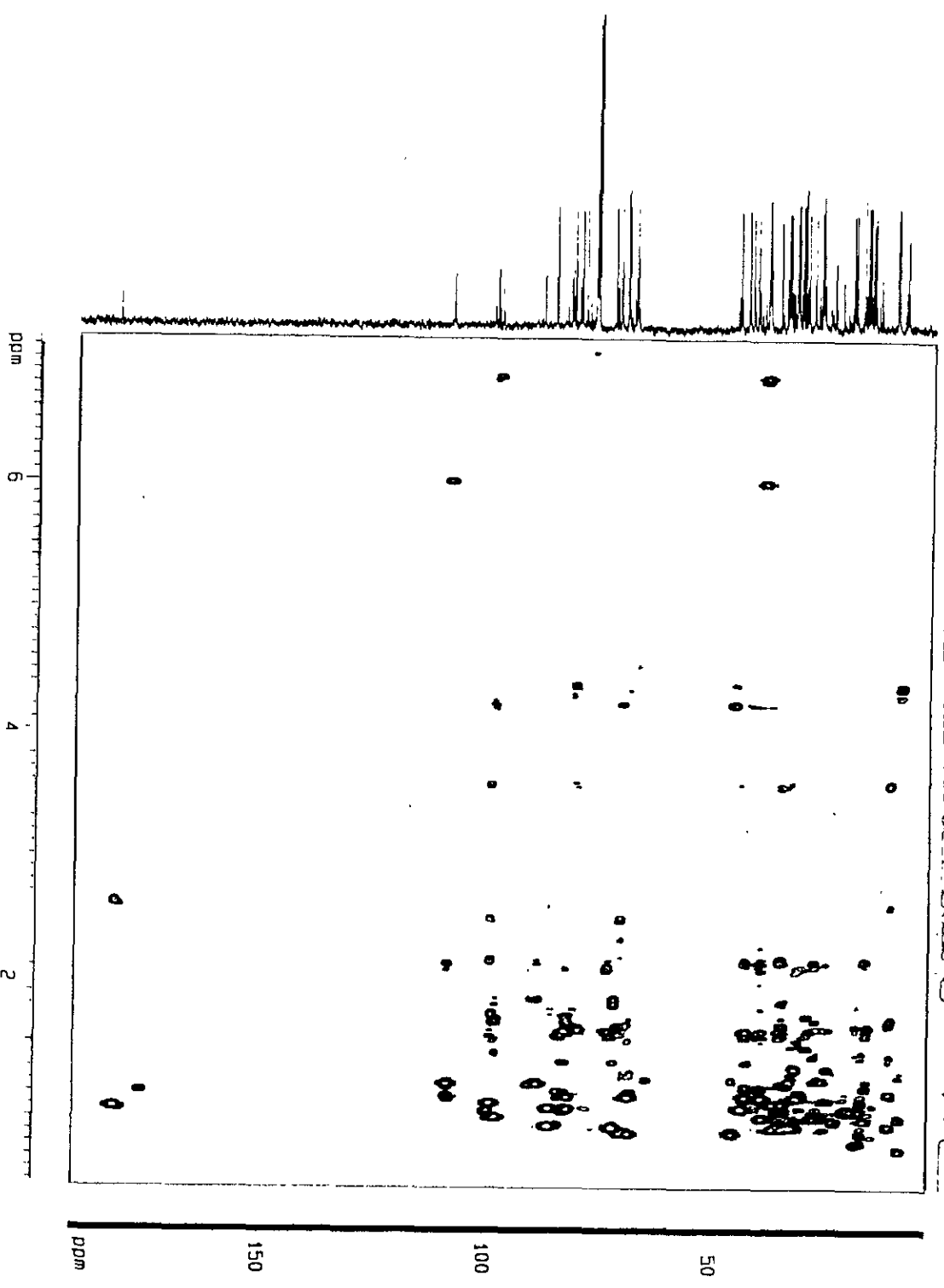
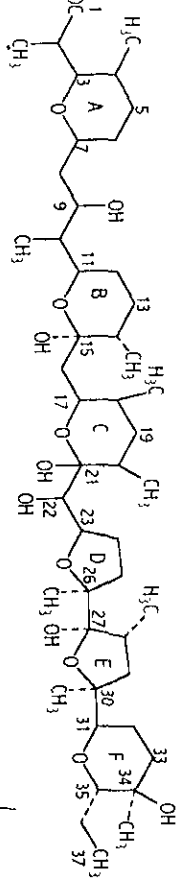
Espectro 17. Espectro de RMN ^1H del antibiótico X-206 (218).



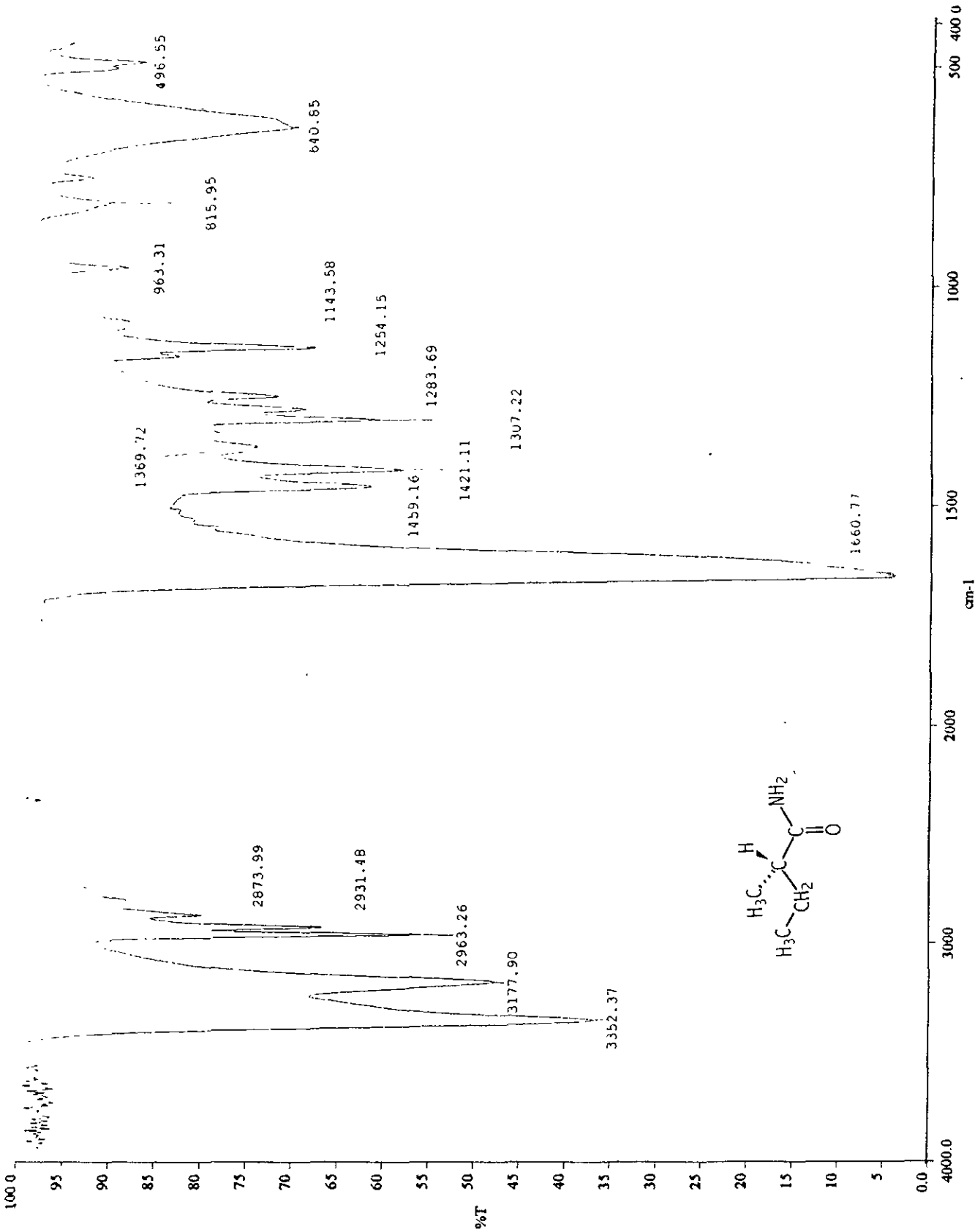
Espectro 18. Espectro de RMN ¹H-¹³C HMQC del antibiótico X-206 (218).



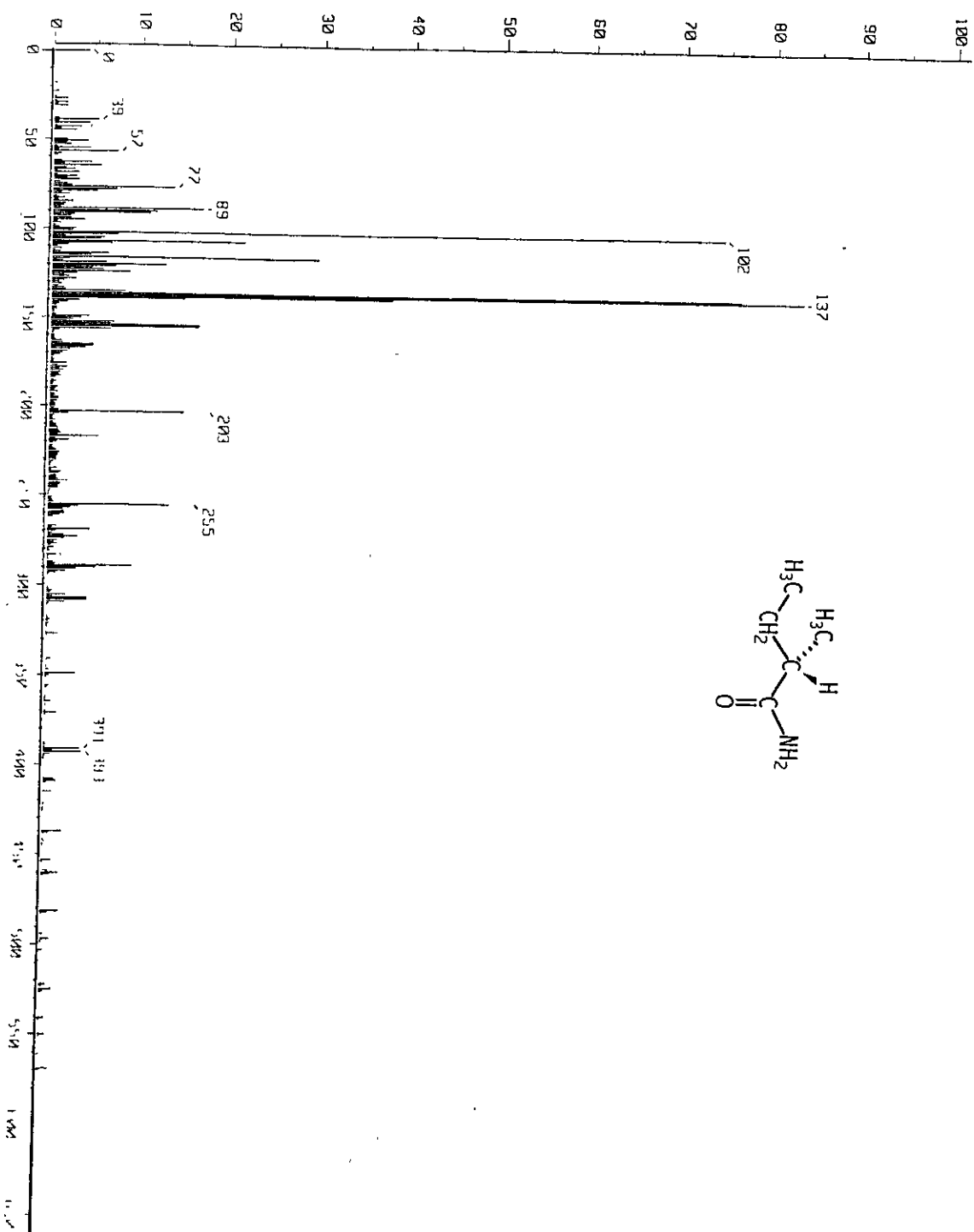
Espectro 19. Espectro de RMN ¹H-COSY del antibiótico X-206 (218).



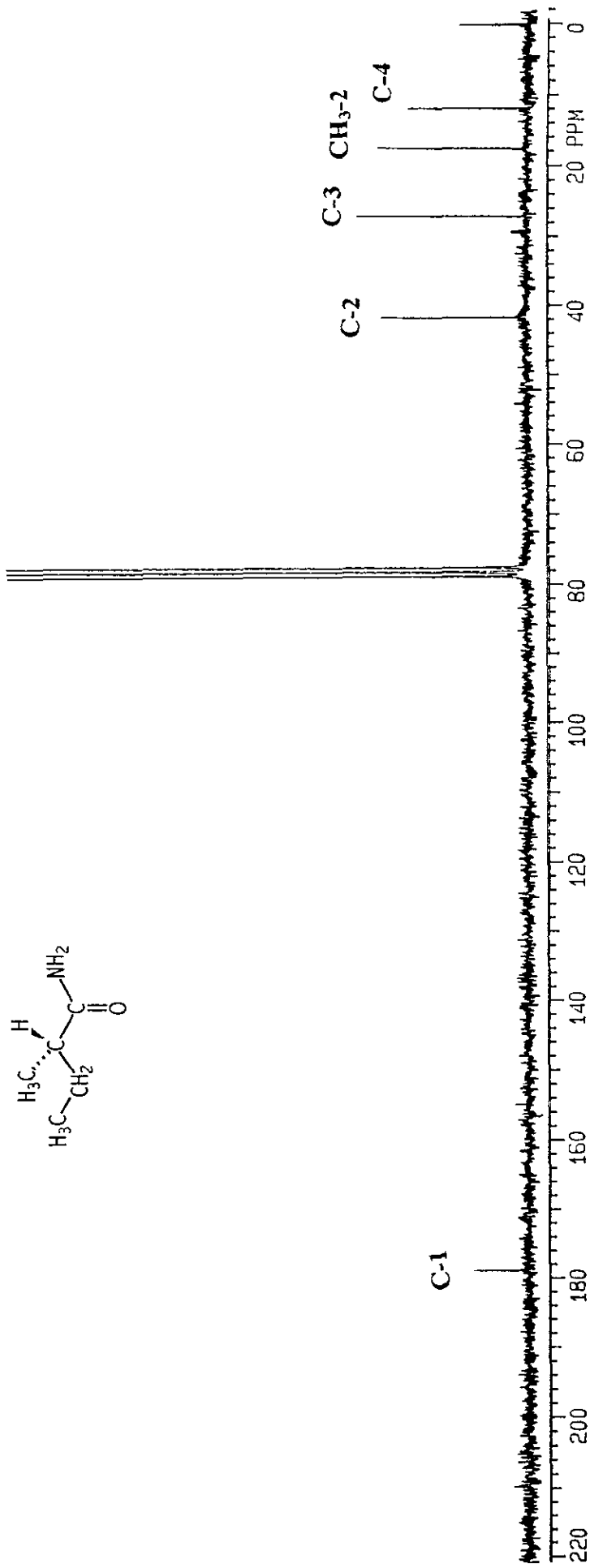
Espectro 20. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC del antibiótico X-206 (218).



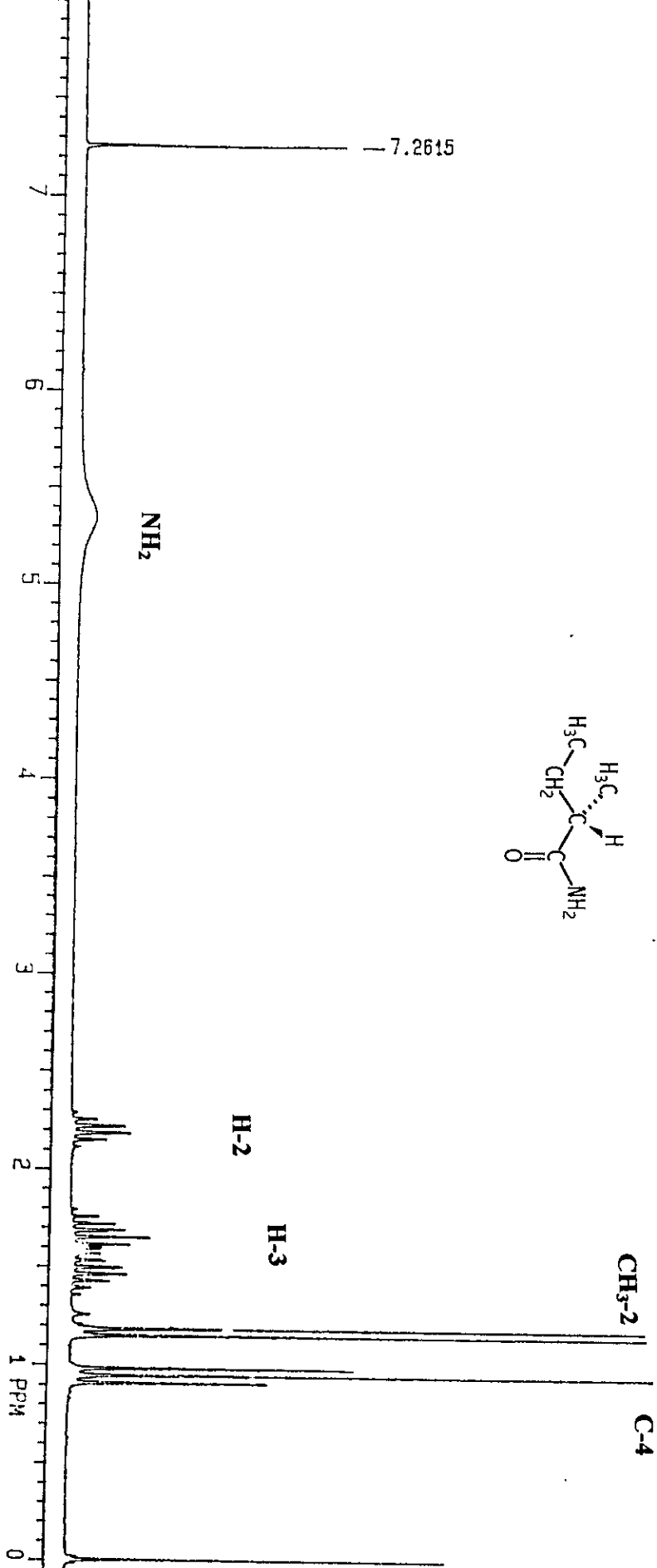
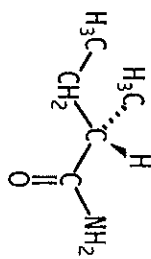
Espectro 21. Espectro en el IR de la S (+) 2-metilbutanamida (222).



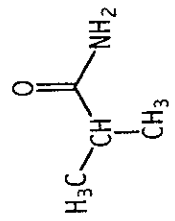
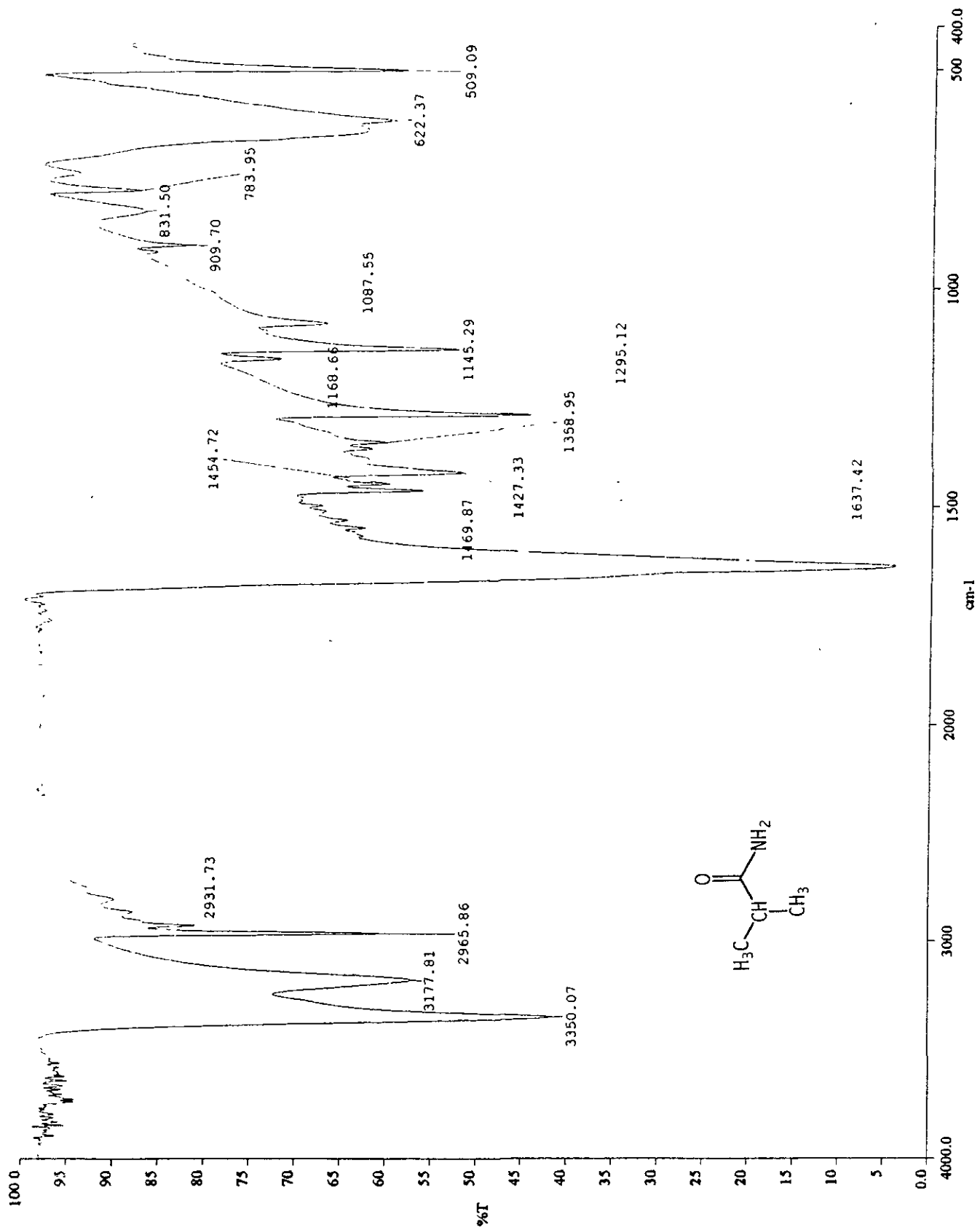
Espectro 22. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la S (+) 2-metilbutanamida (222).



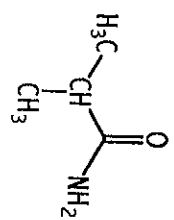
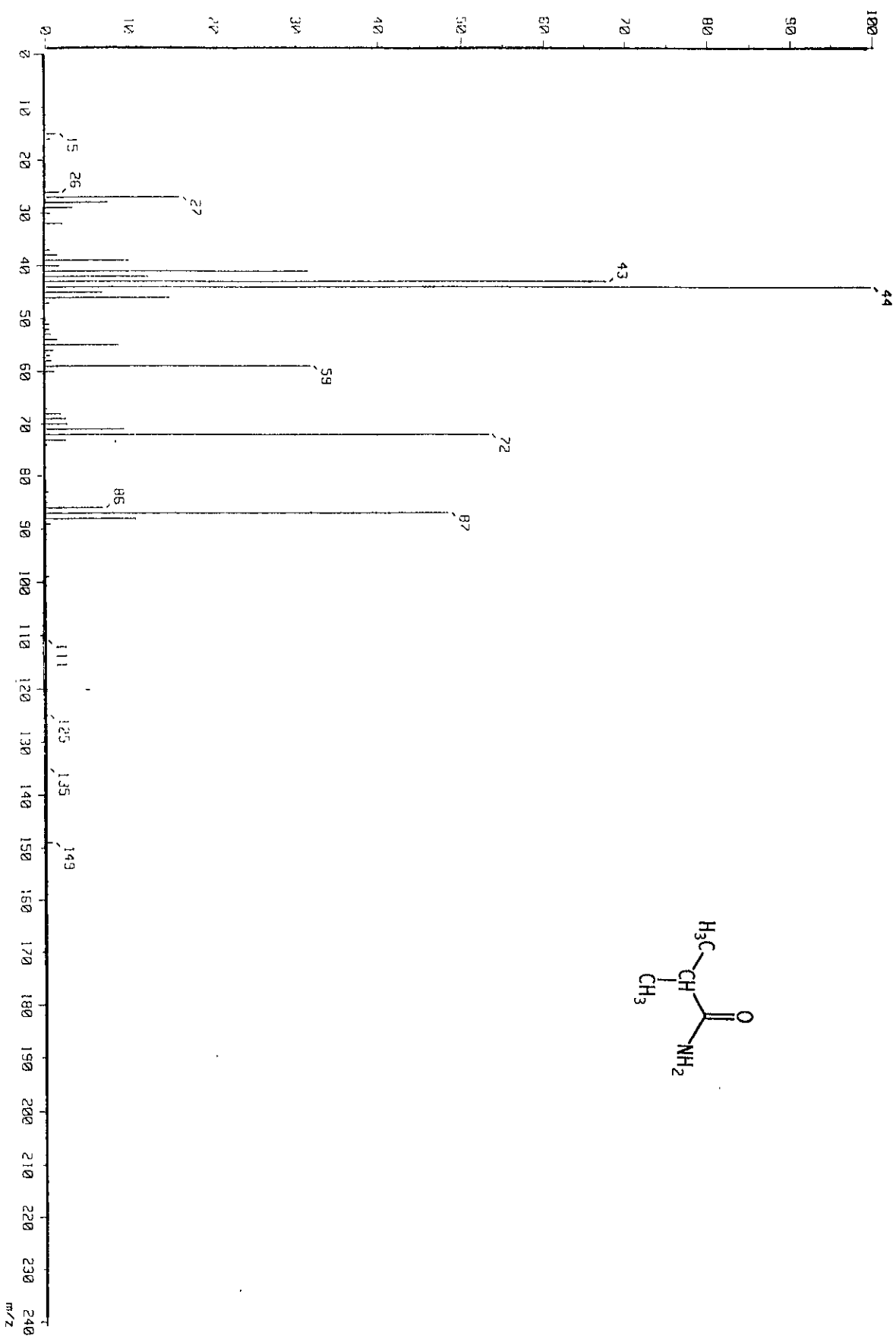
Espectro 23. Espectro de RMN ¹³C de la S (+) 2-metilbutanamida (222).



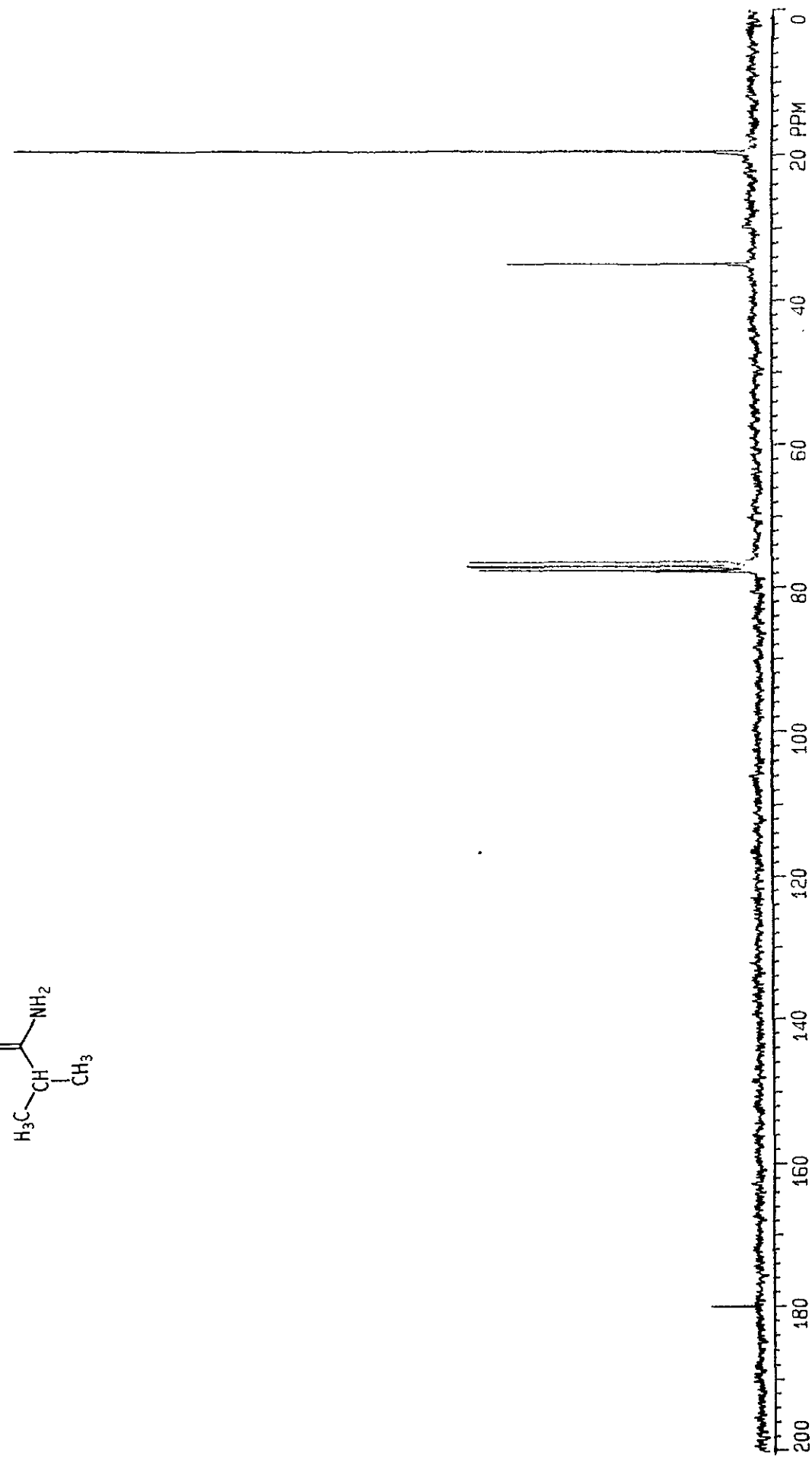
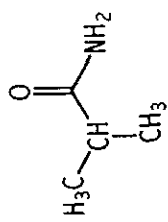
Espectro 24. Espectro de RMN ¹H de la *S* (+) 2-metilbutanamida (222).



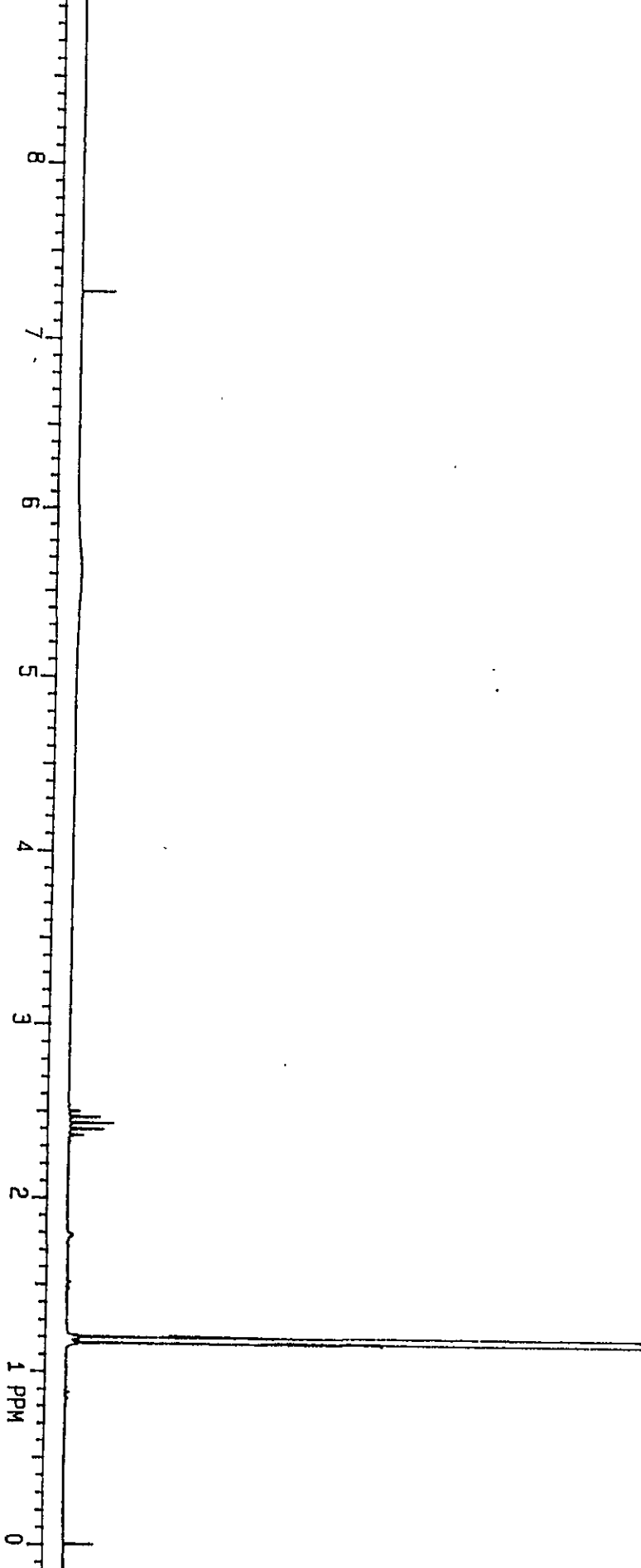
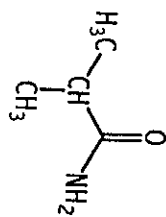
Espectro 25. Espectro en el IR de la 2-metilpropanamida (223).



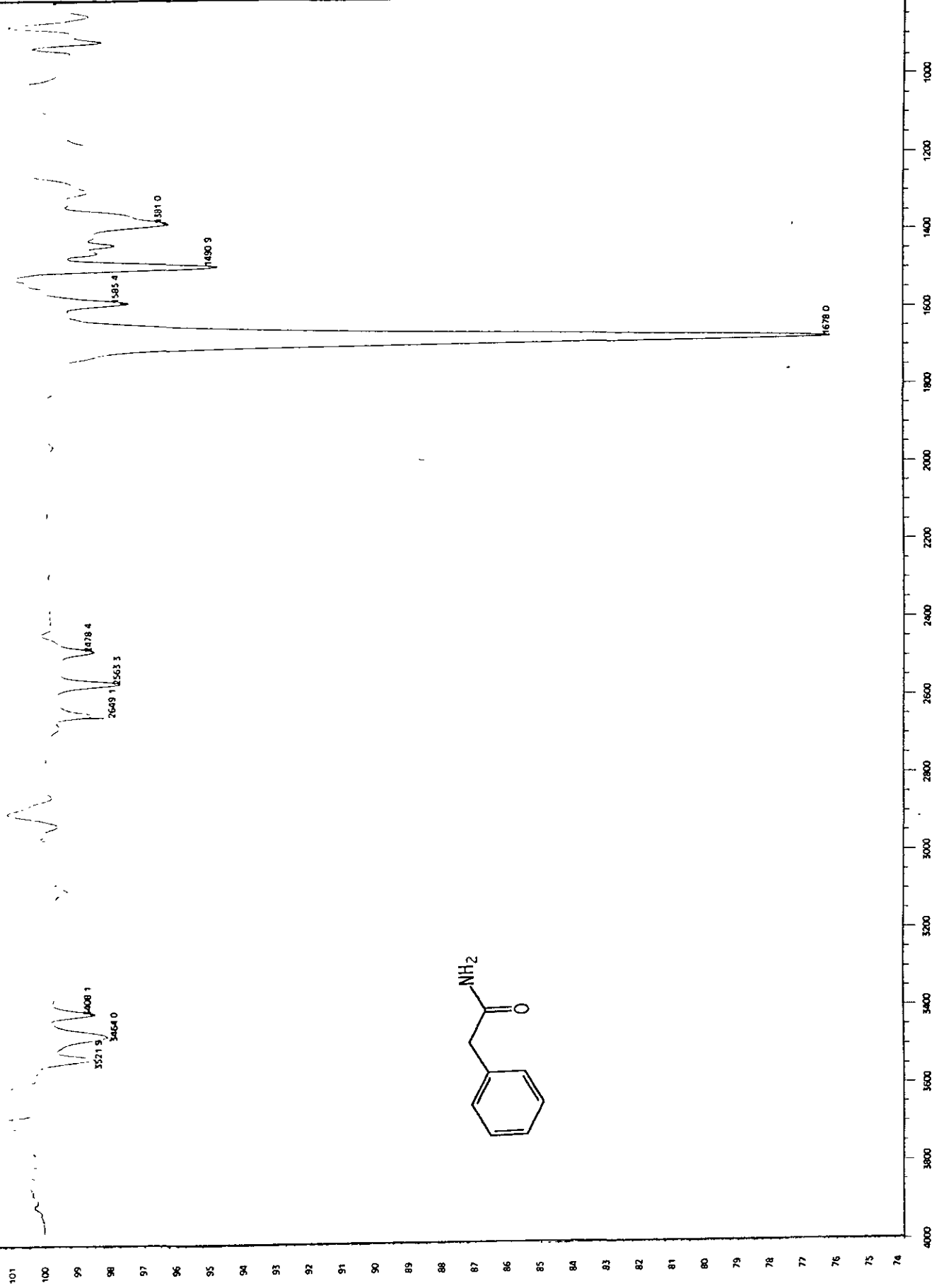
Espectro 26. Espectro de masas por impacto electrónico de la 2-metilpropanamida (223).



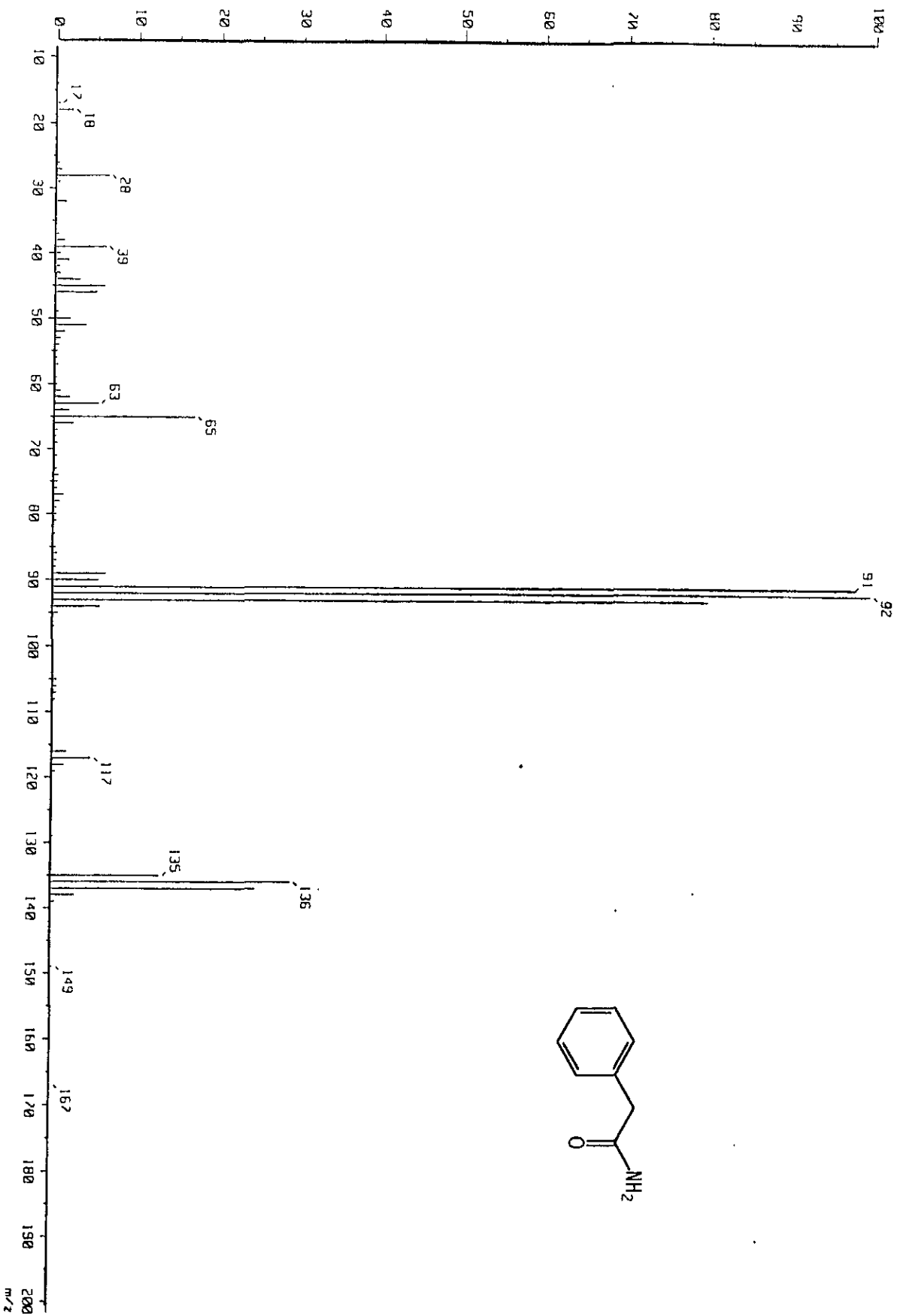
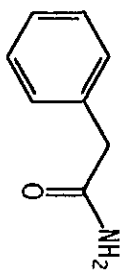
Espectro 27. Espectro de RMN ¹³C de la 2-metilpropanamida (223).



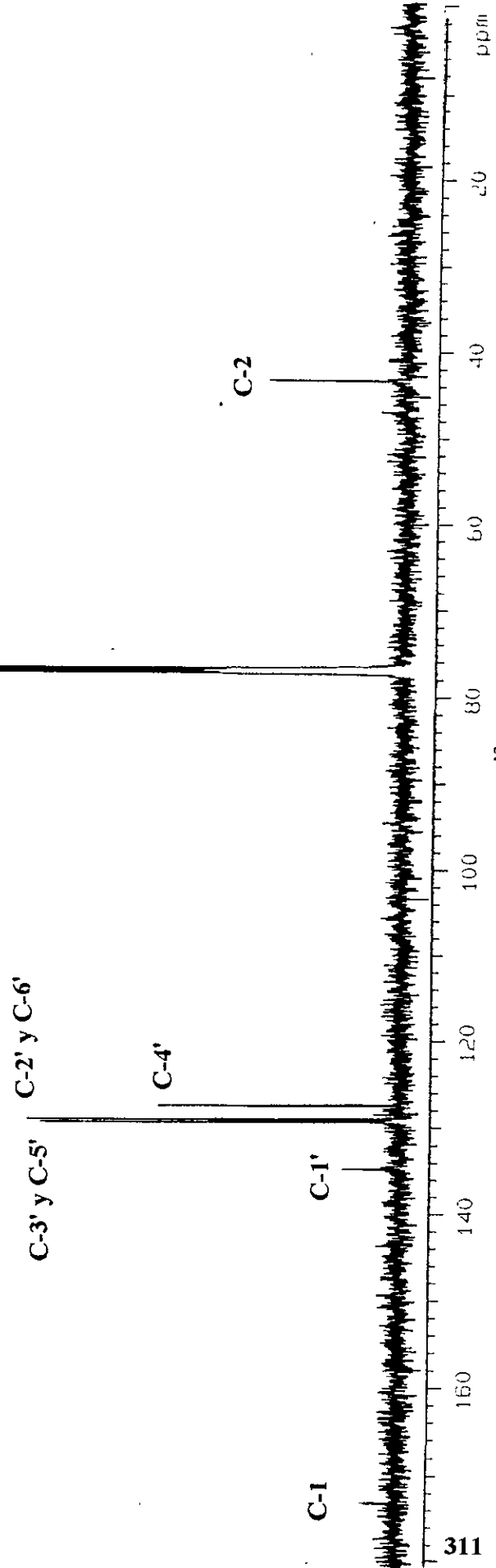
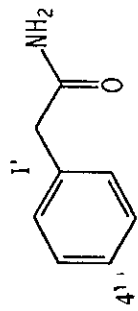
Espectro 28. Espectro de RMN ¹H de la 2-metilpropanamida (223).



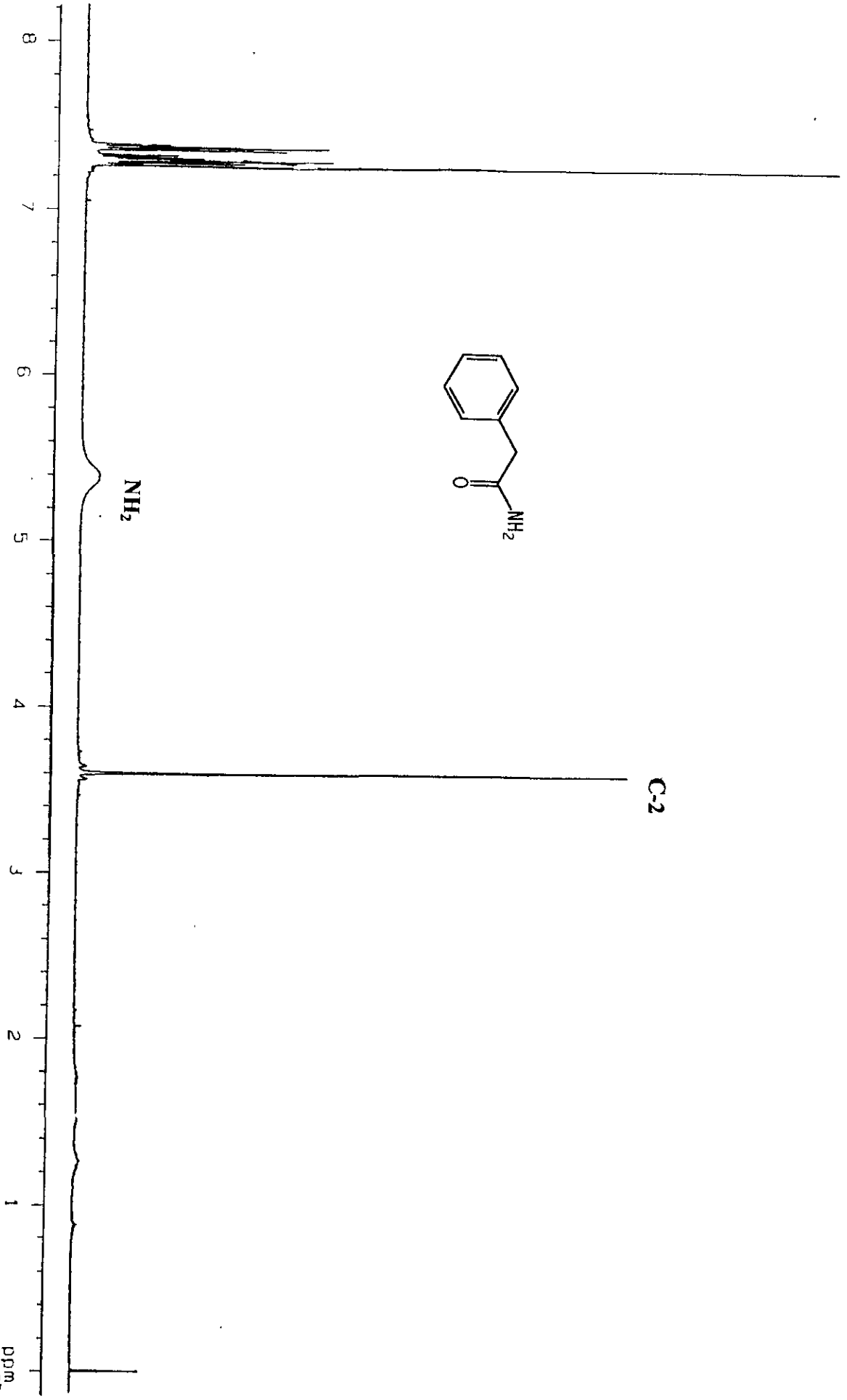
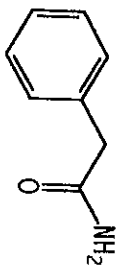
Espectro 29. Espectro en el IR de la fenilacetamida (224).



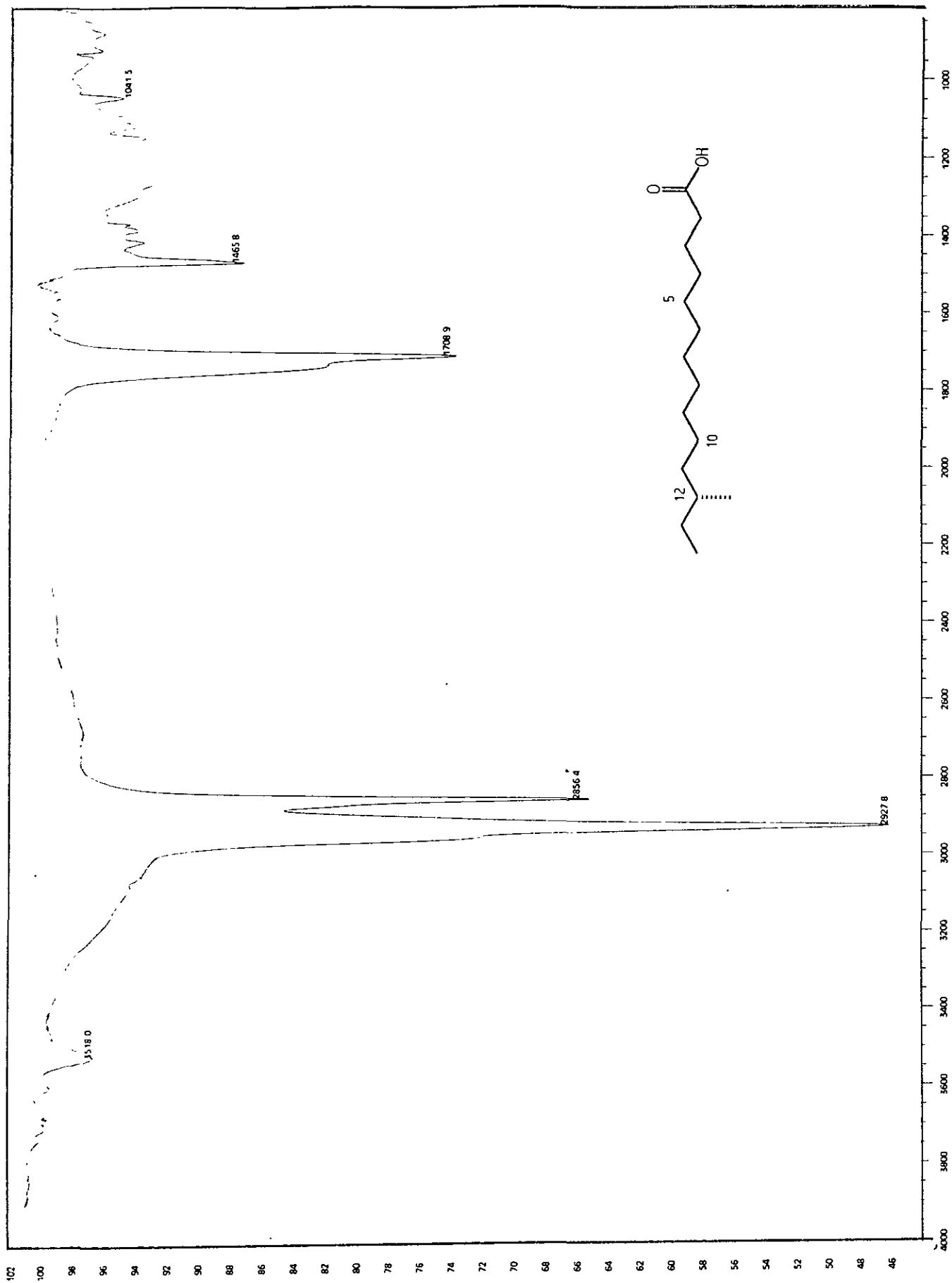
Espectro 30. Espectro de masas por impacto electrónico de la fenilacetamida (224).



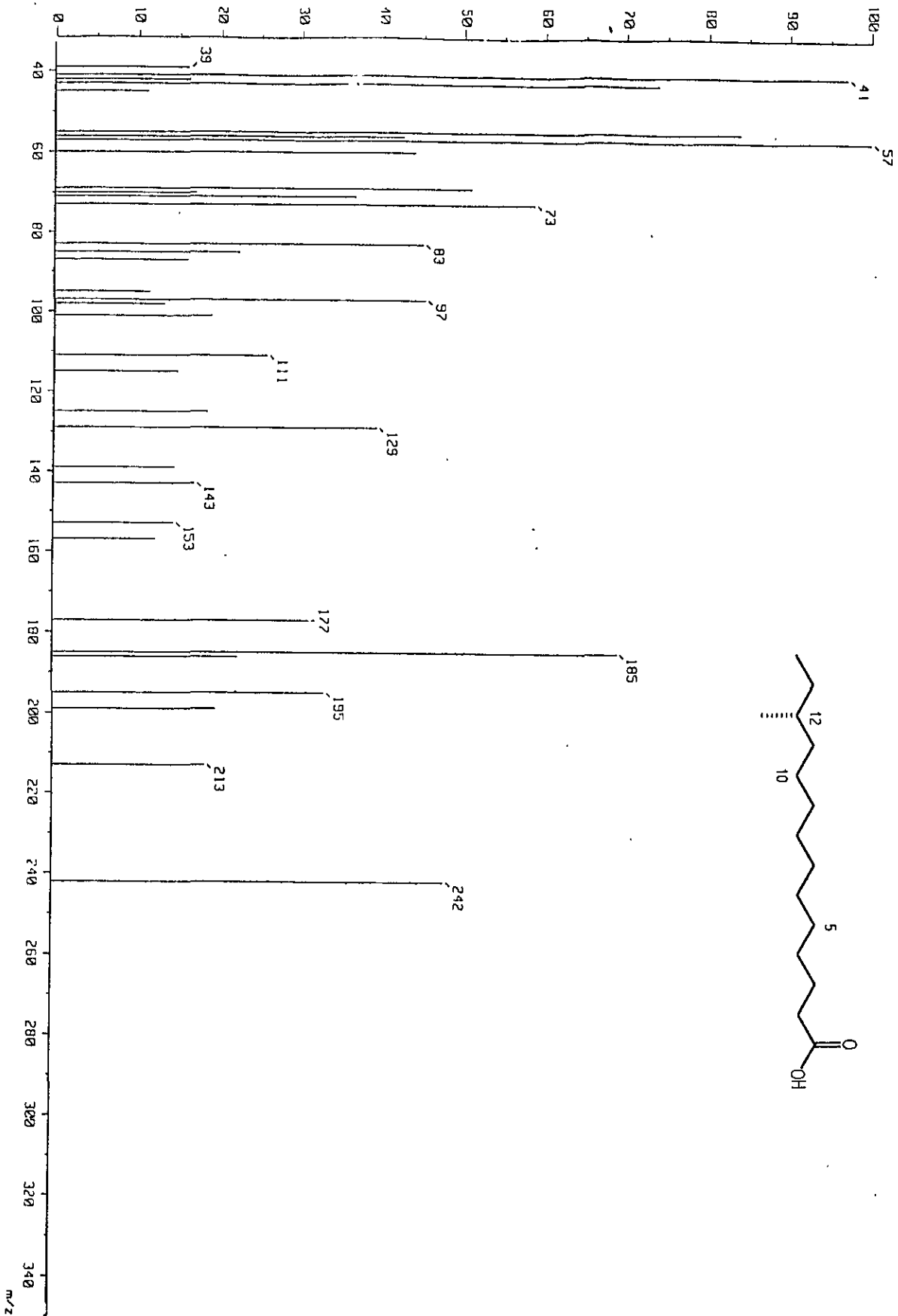
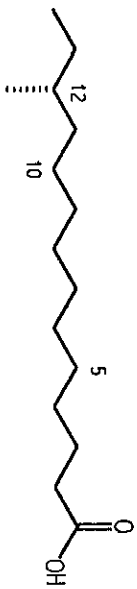
Espectro 31. Espectro de RMN ^{13}C de la fenilacetamida (224).



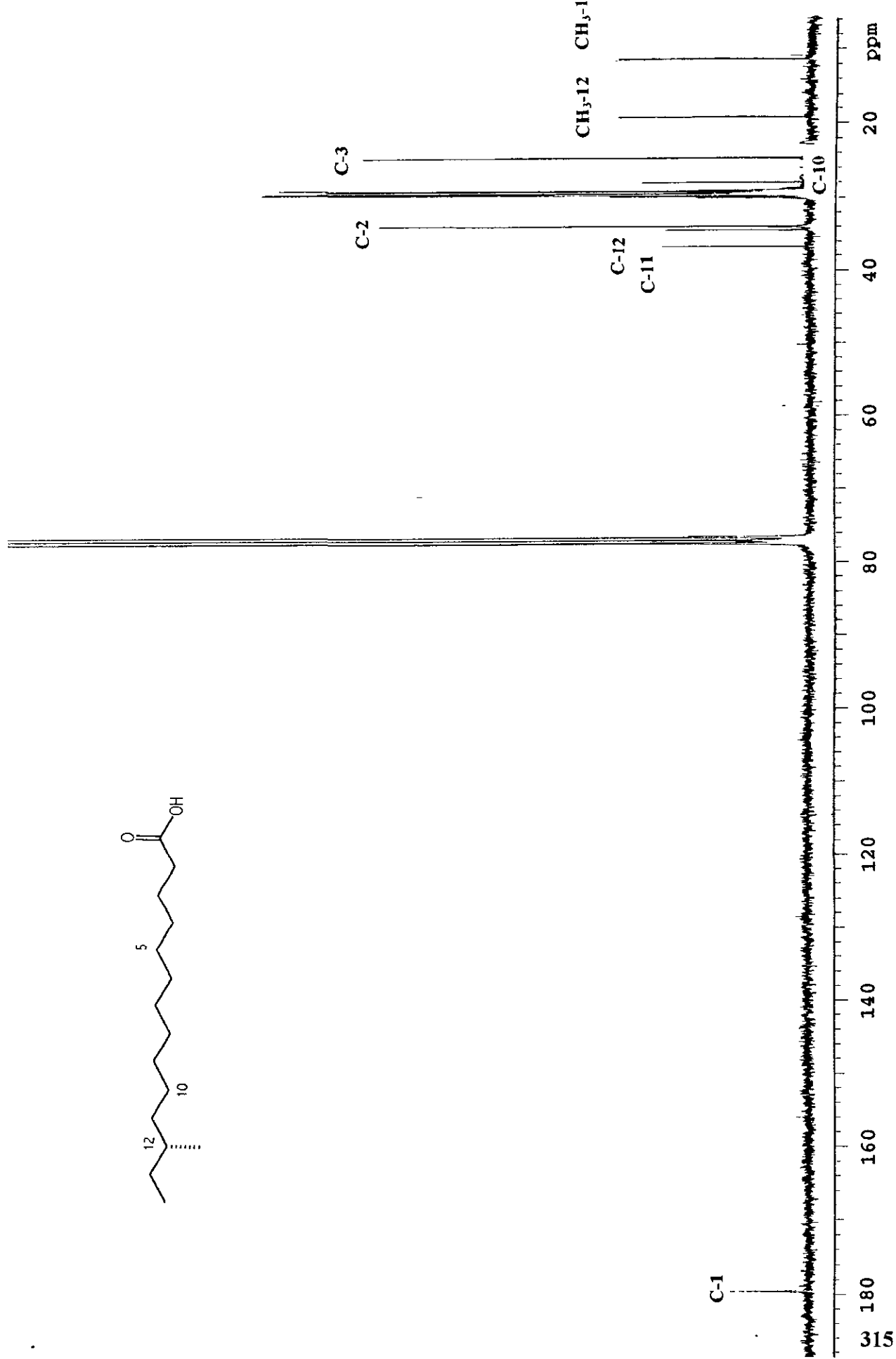
Espectro 32. Espectro de RMN ¹H de la fenilacetamida (224).



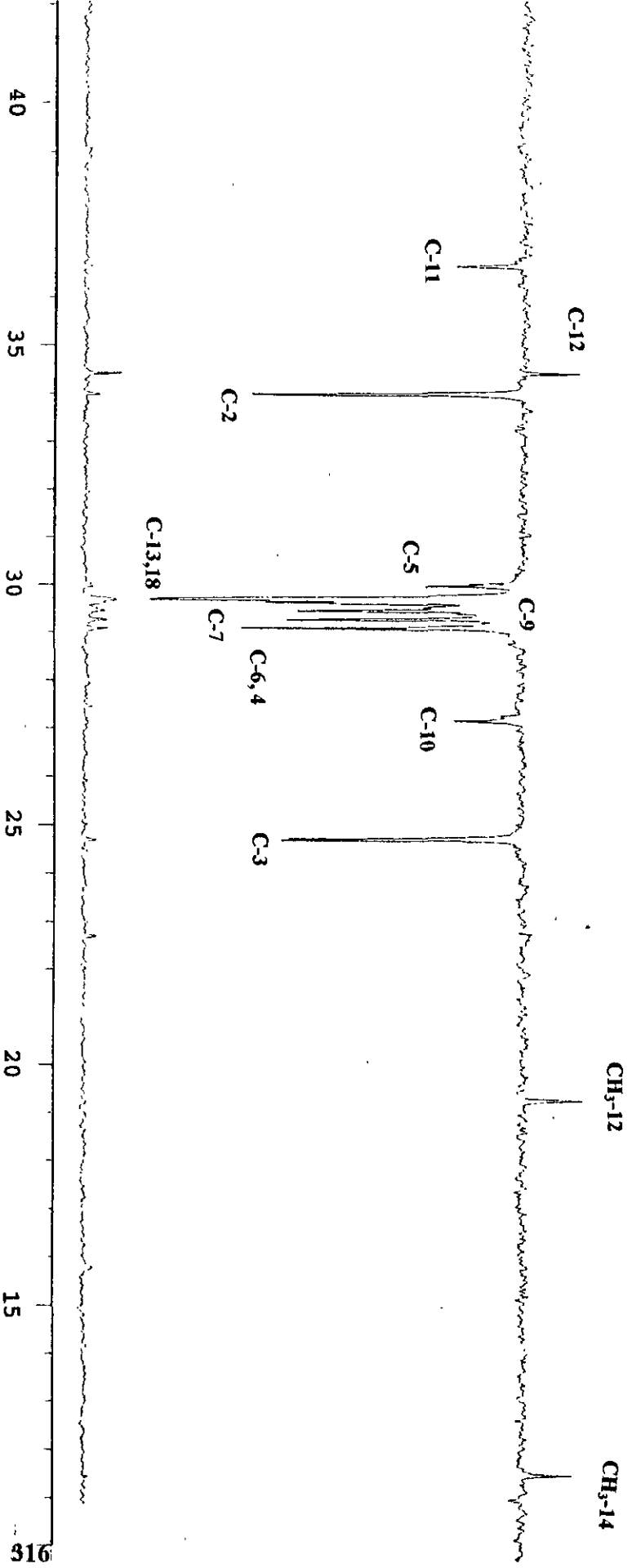
Espectro 33. Espectro en el IR del ácido S (+) 12-metiltetradecanoico (225).



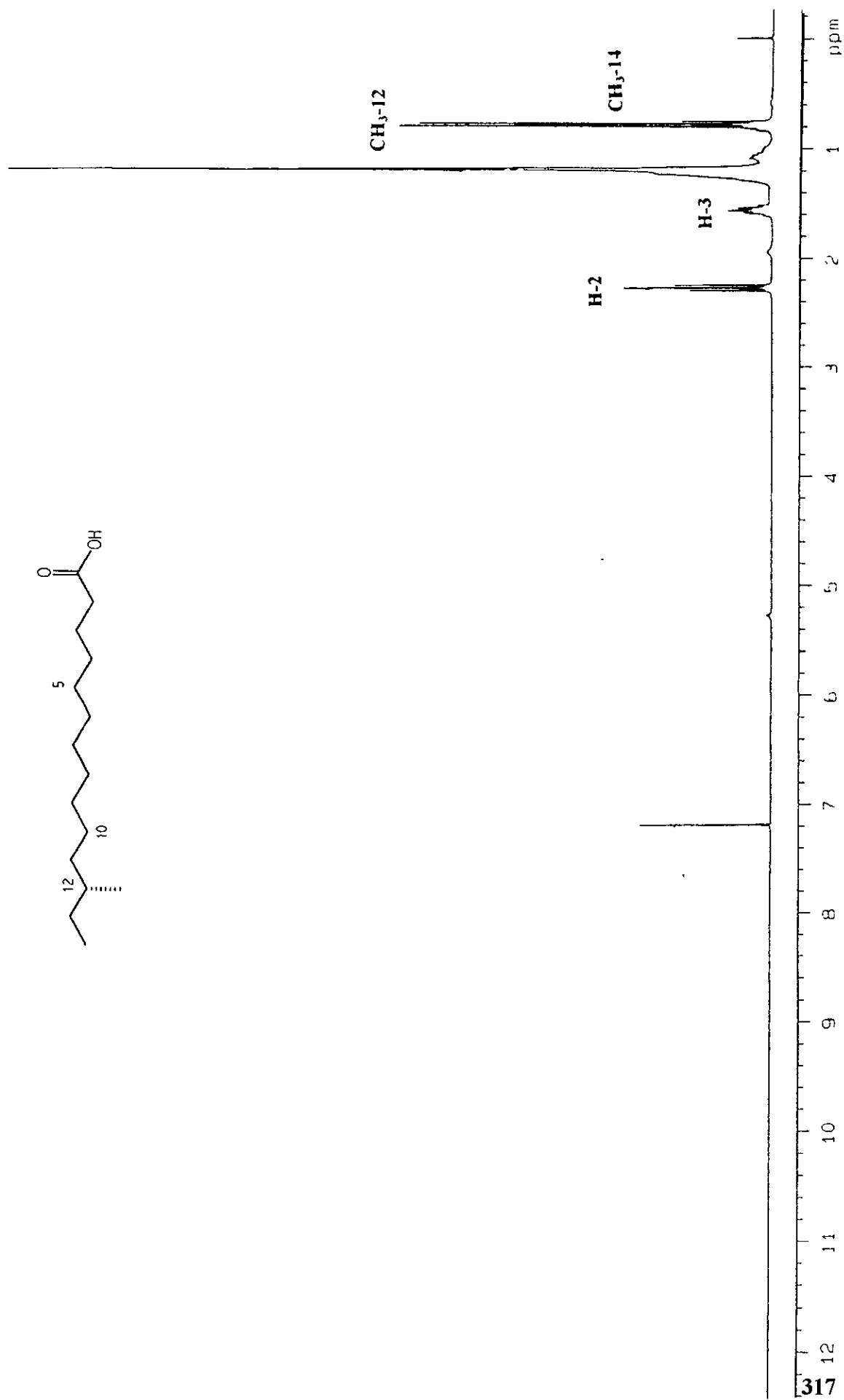
Espectro 34. Espectro de masas del ácido *S*(+) 12-metiltetradecanoico (225).



Espectro 35. Espectro de RMN ^{13}C del ácido *S* (+) 12-metiltetradecanoico (225).

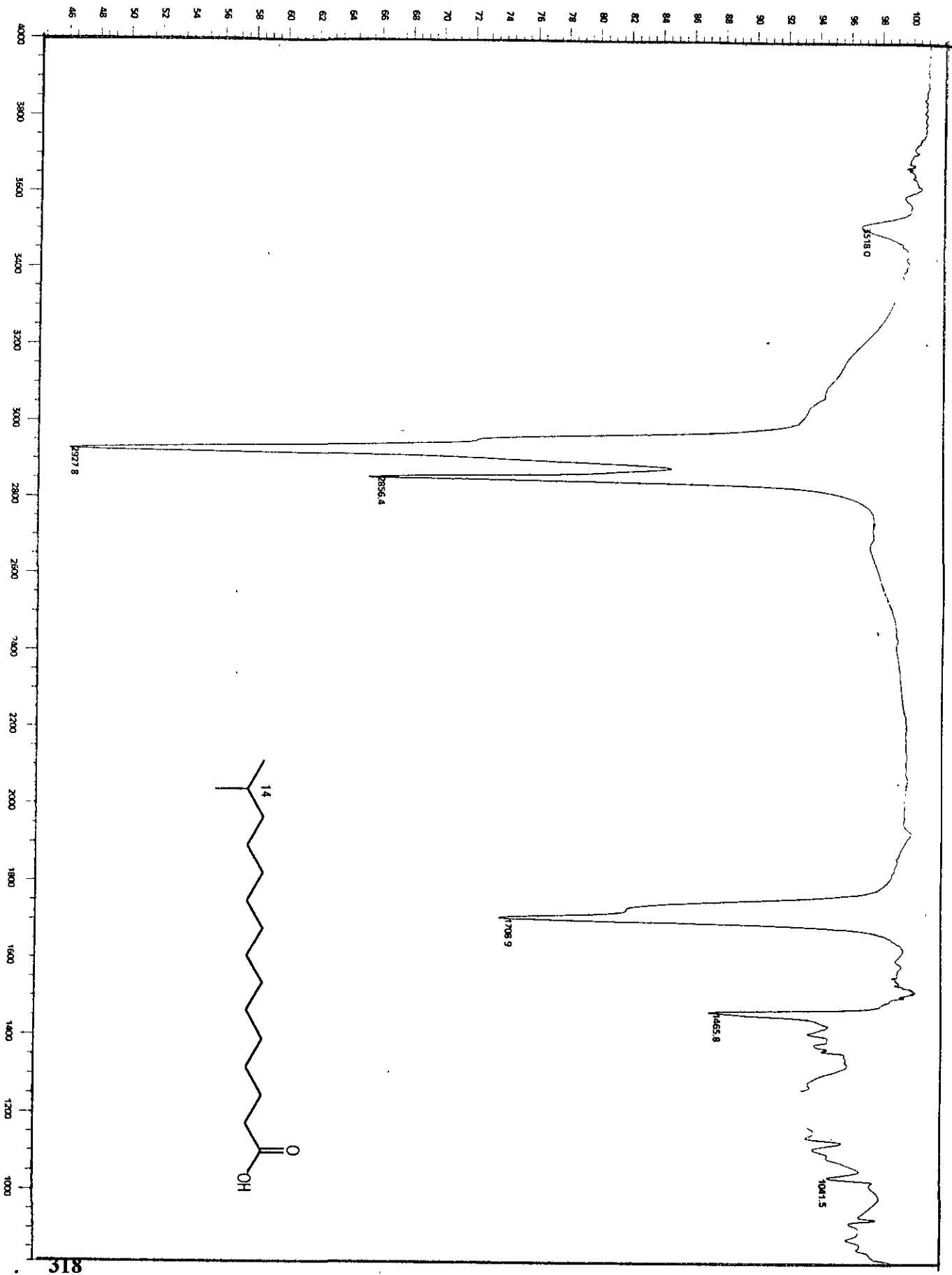


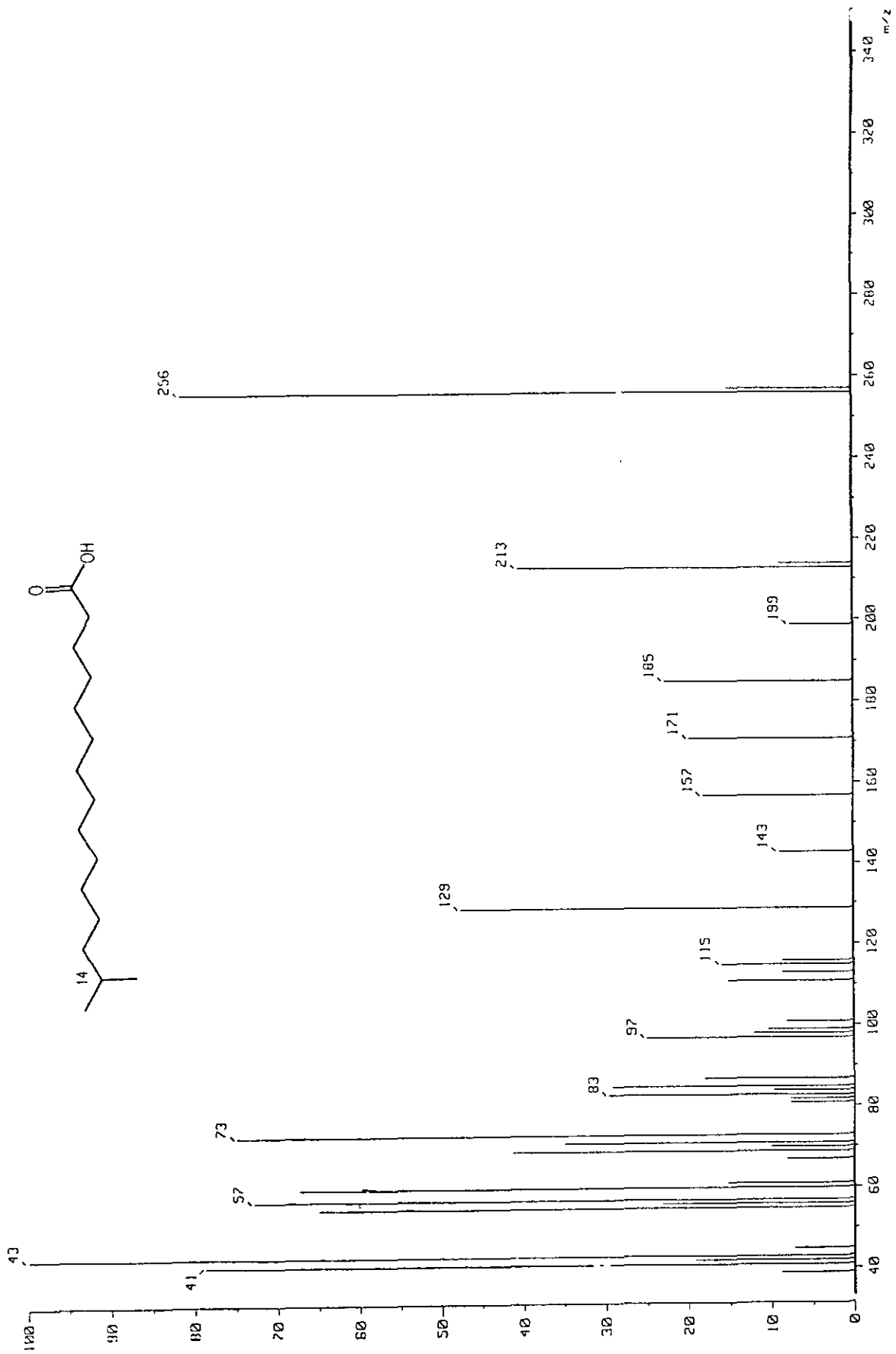
Espectro 36. Espectro de RMN ¹³C-DEPT del ácido S (+) 12-metiltetradecanoico (22S).



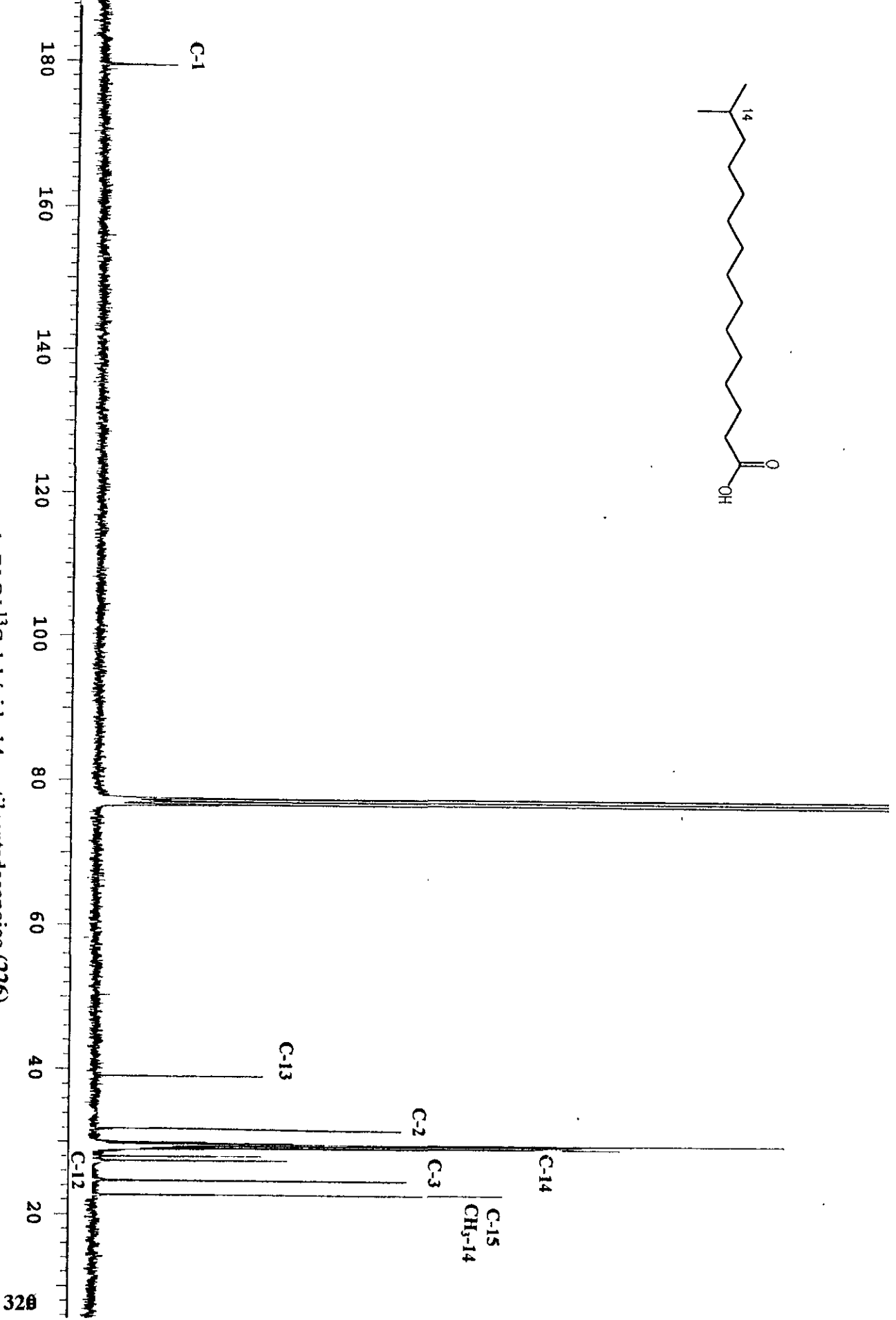
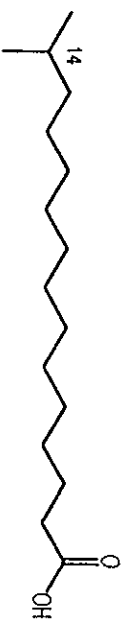
Espectro 37. Espectro de RMN ^1H del ácido *S* (+) 12-metiltetradecanoico (225).

Espectro 38. Espectro en el IR del ácido 14-metilpentadecanoico (226).

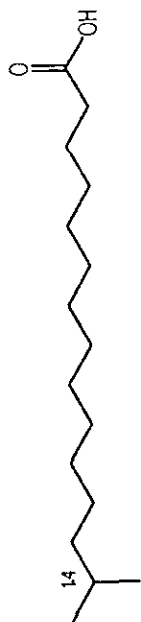




Espectro 39. Espectro de masas del ácido 14-metilpentadecanoico (226).



Espectro 40. Espectro de RMN ^{13}C del ácido 14-metilpentadecanoico (226).



C-16 CH₃-14

C-14

C-2

C-11

C-13

C-12

C-6,4

C-3

C-9

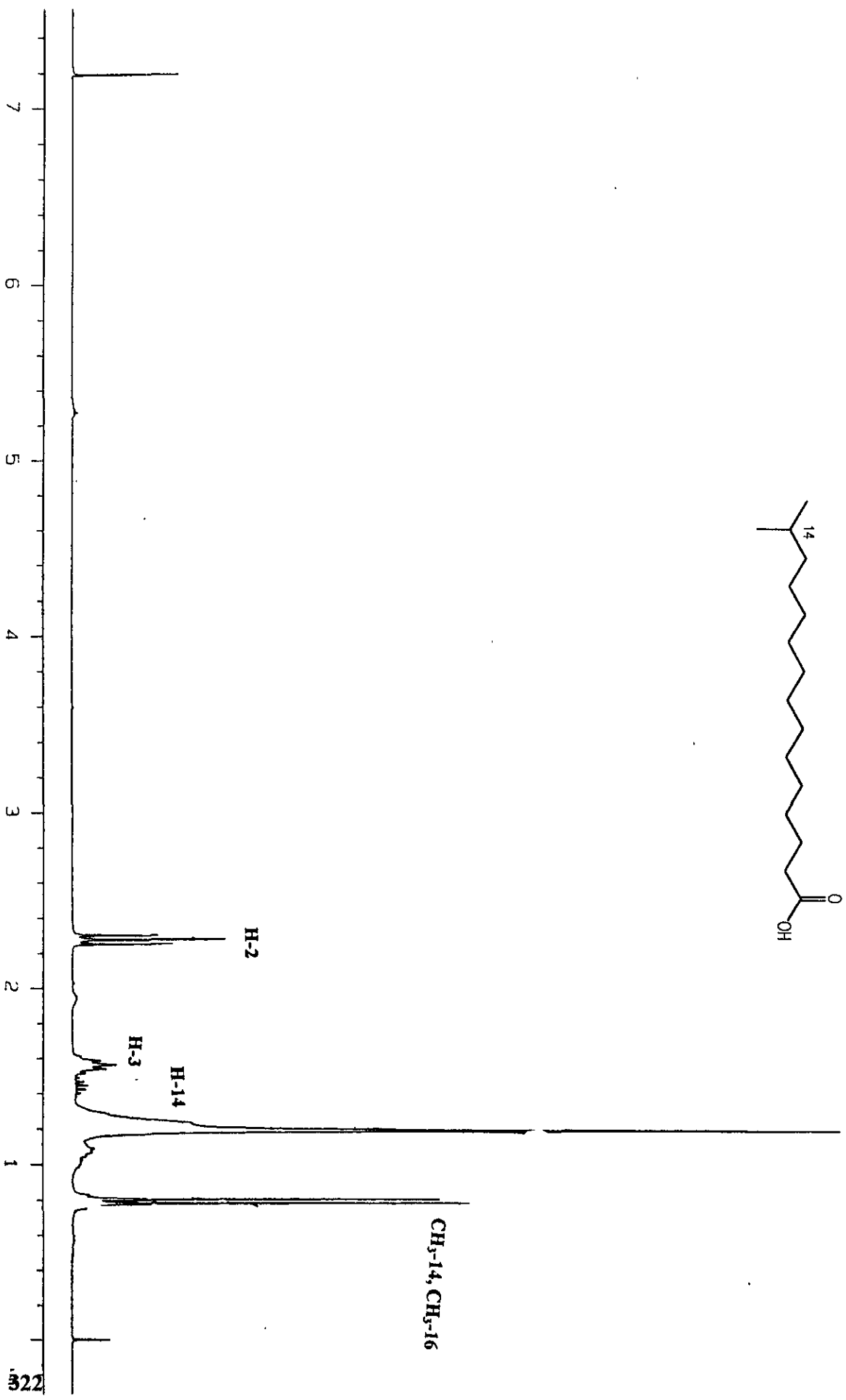
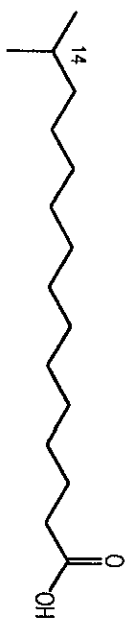
C-7

C-5

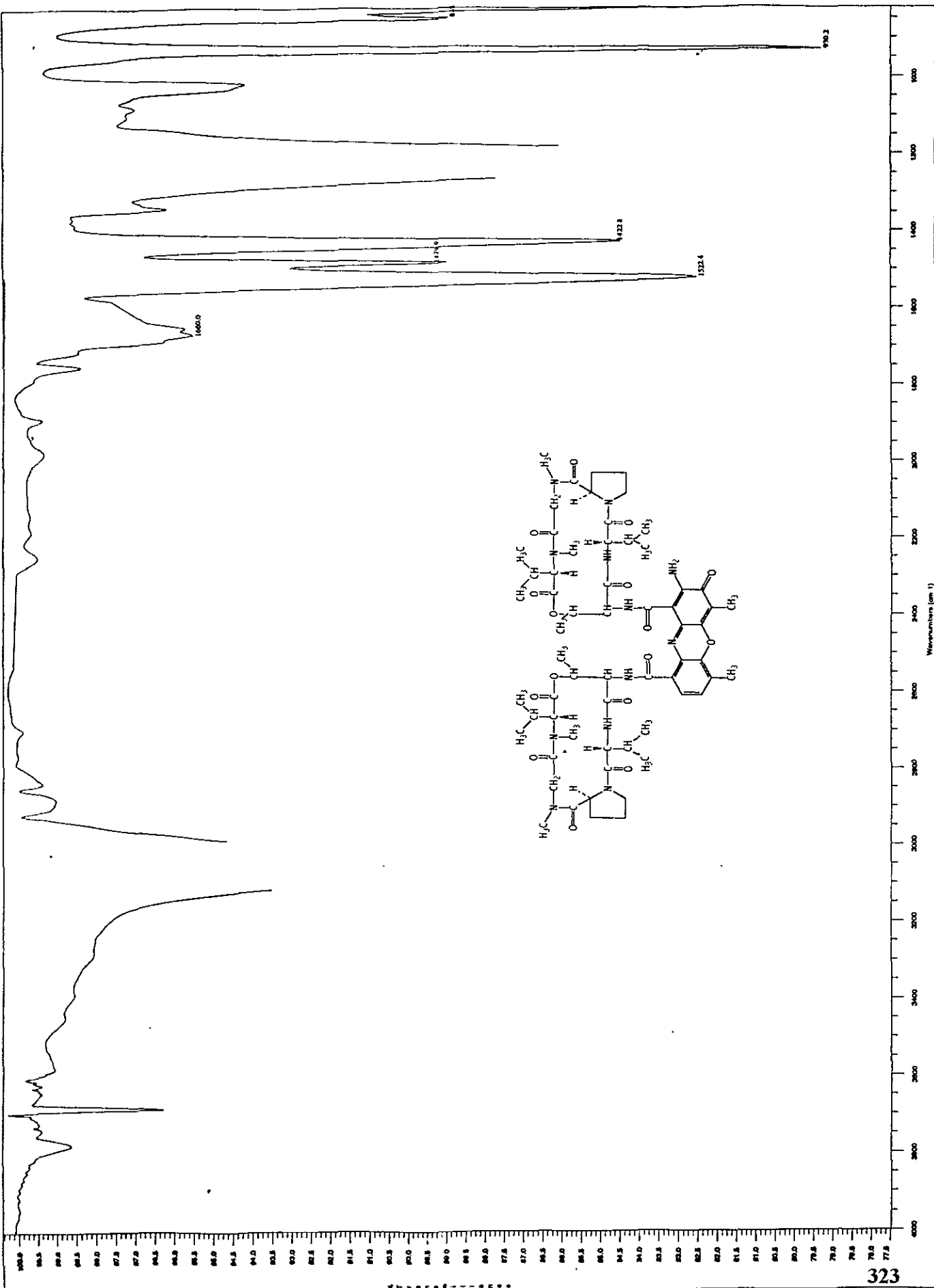
C-10,8



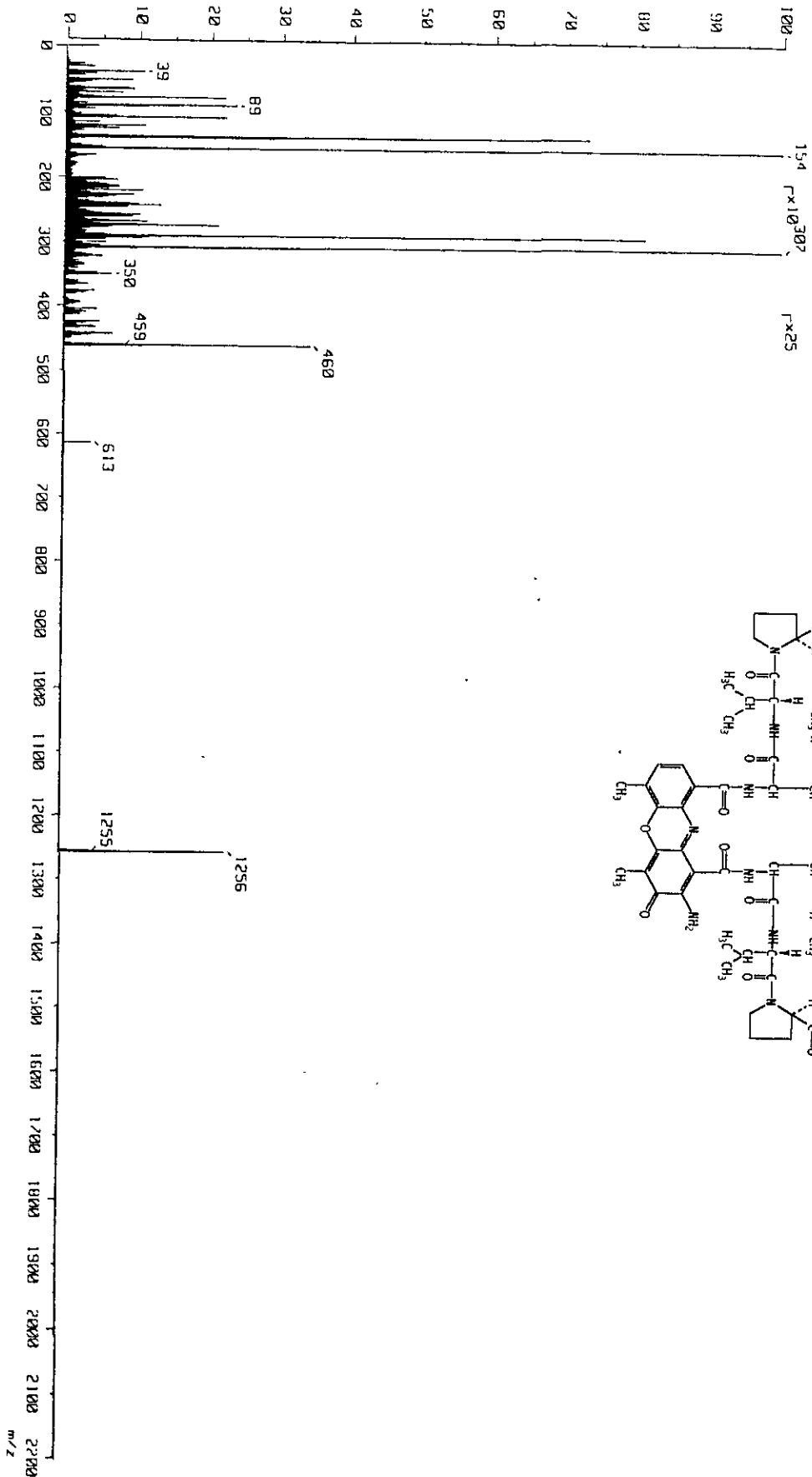
Espectro 41. Espectro de RMN ¹³C-DEPT del ácido 14-metilpentadecanoico (226).



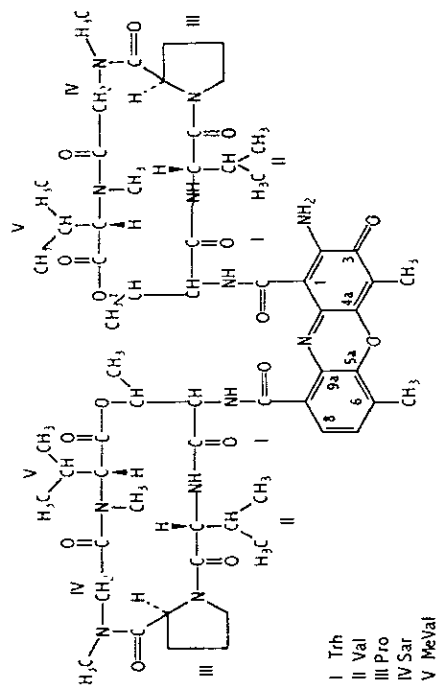
Espectro 42. Espectro de RMN ^1H del ácido 14-metilpentadecanoico (226).



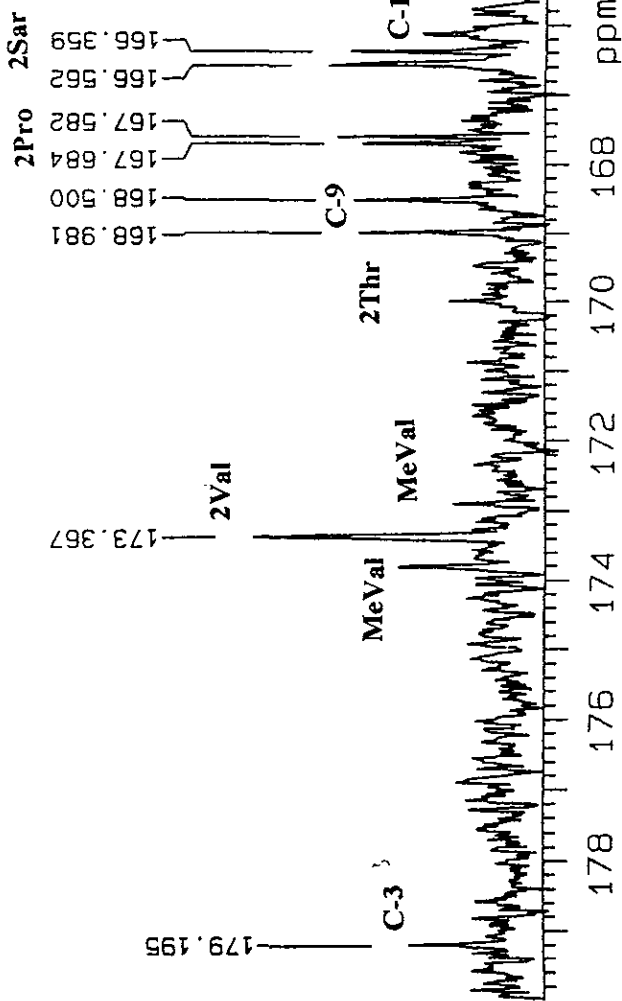
Espectro 43. Espectro en el IR de la actinomicina C1 (228).



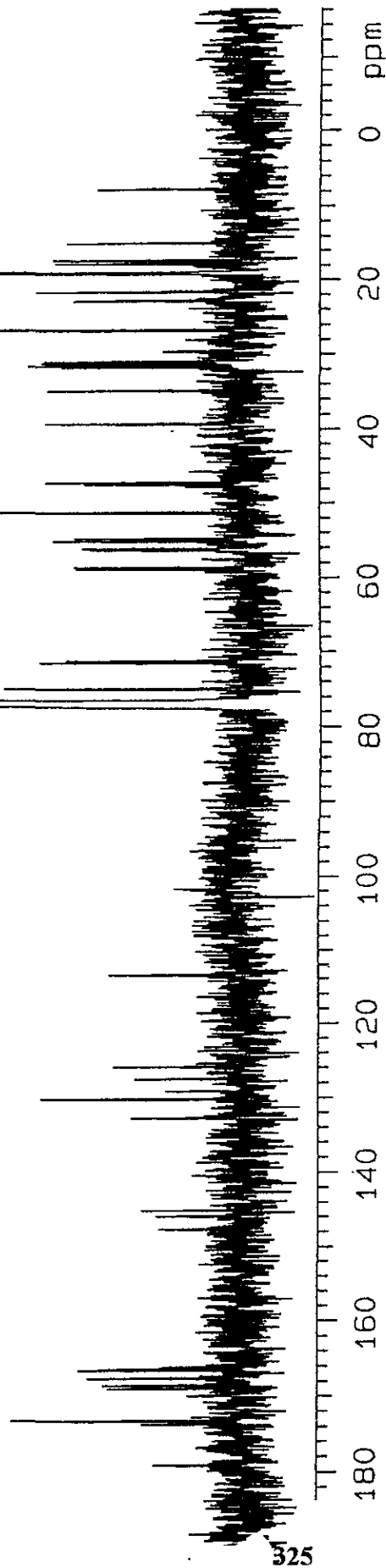
Espectro 44. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la actinomicina C1 (228).



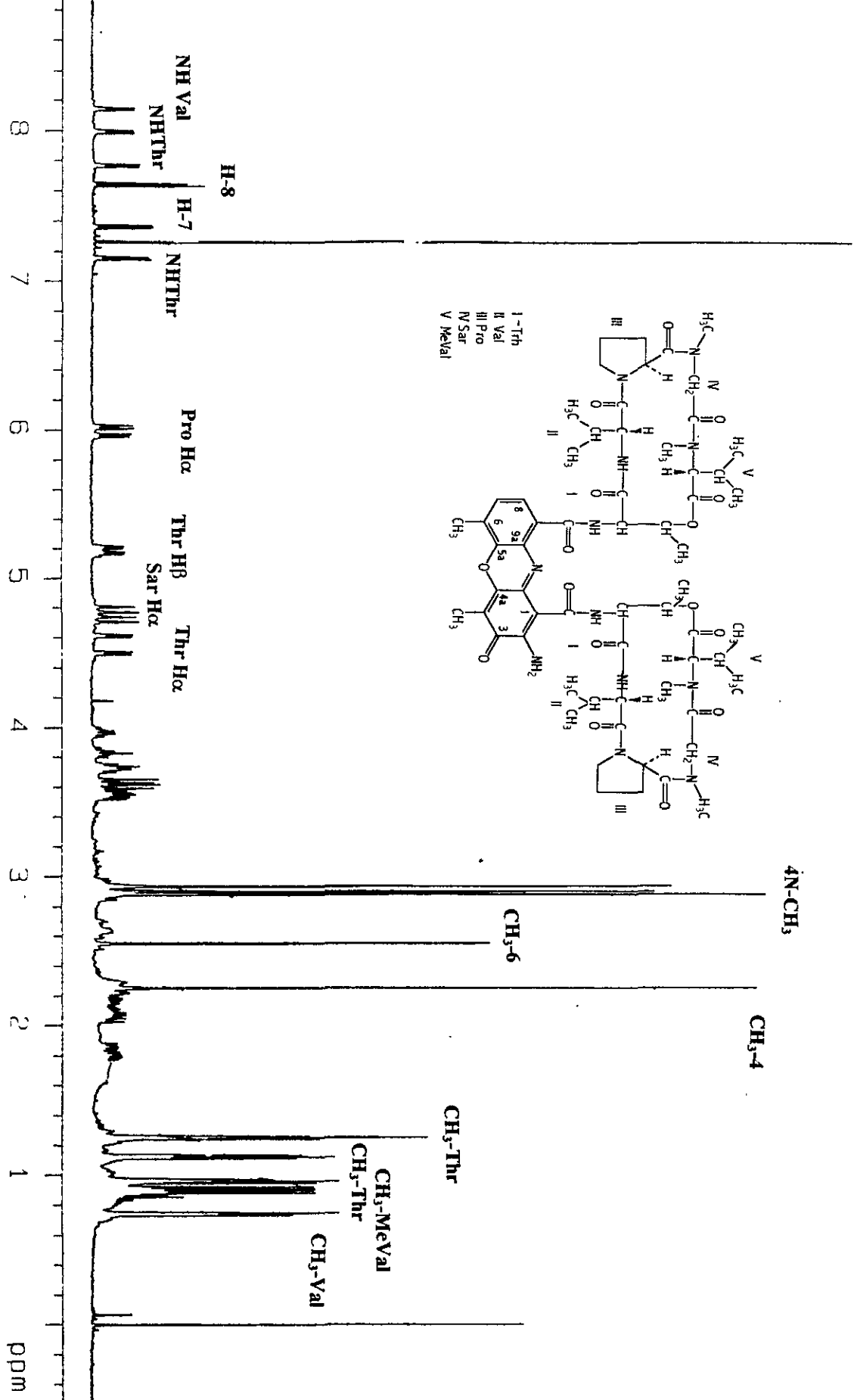
PARTE PEPTIDICA



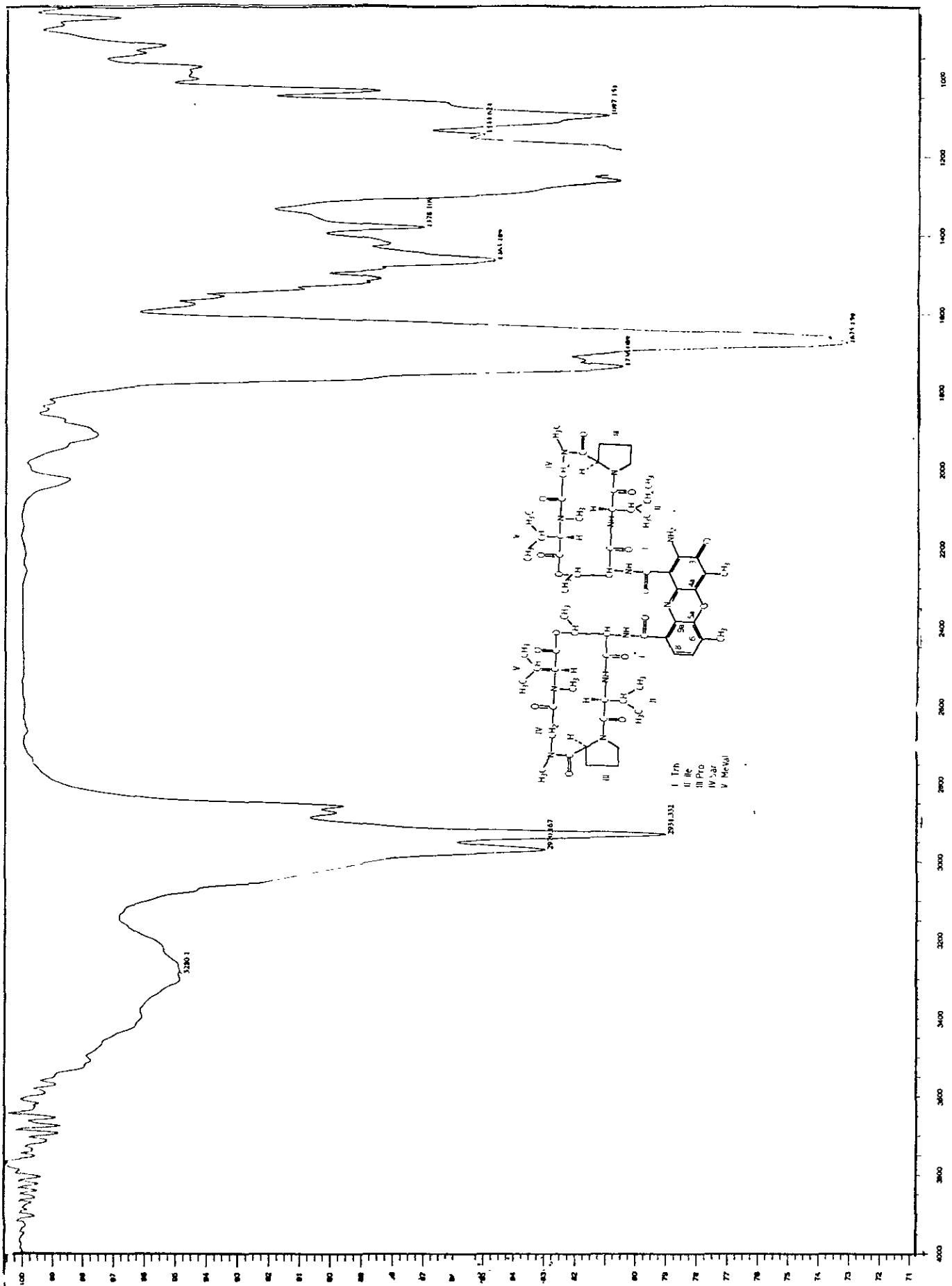
CARBONIOS CROMOFORO



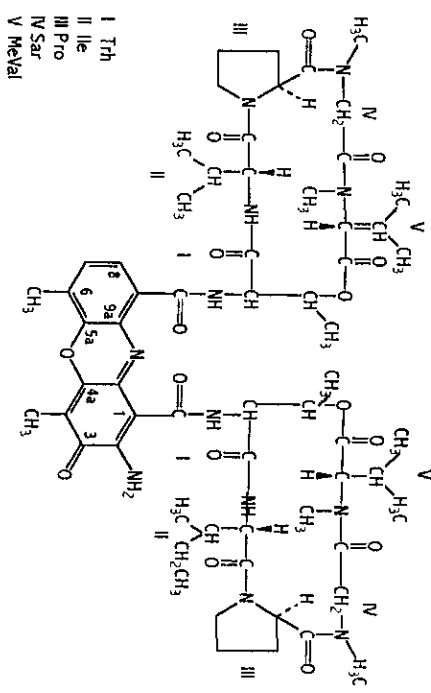
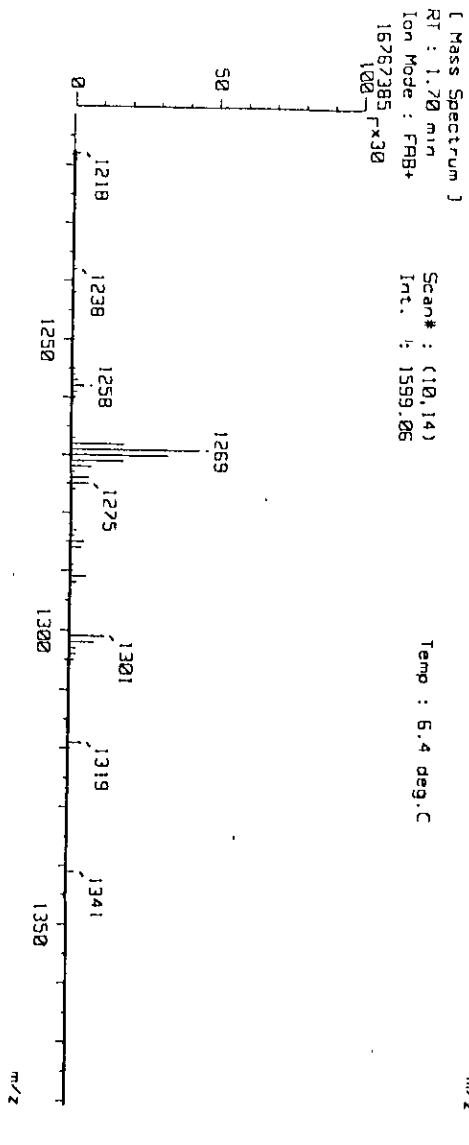
Espectro 45. Espectro de RMN ¹³C de la actinomicina C1 (228).



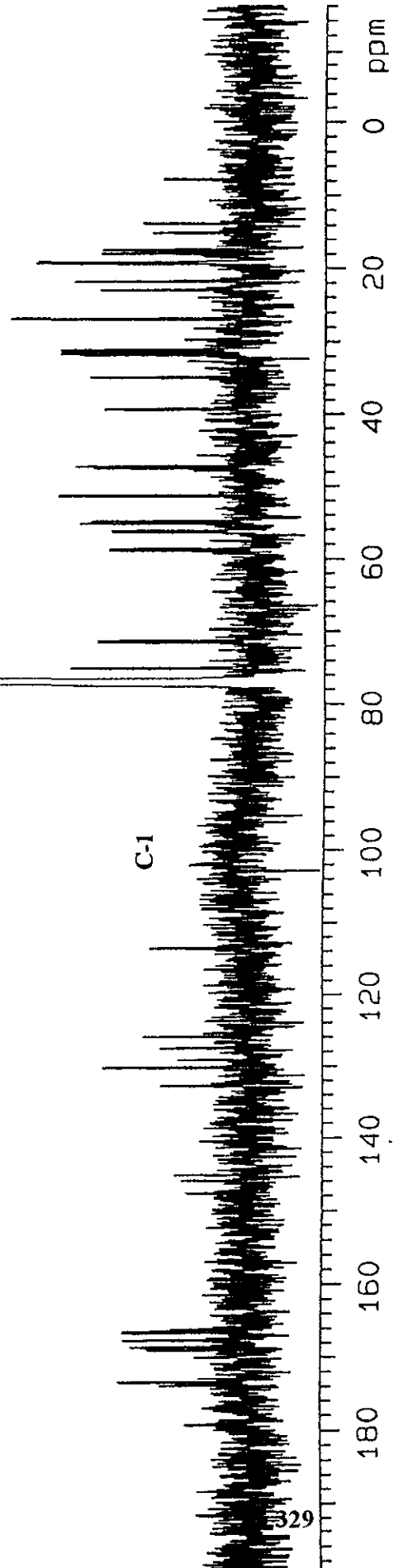
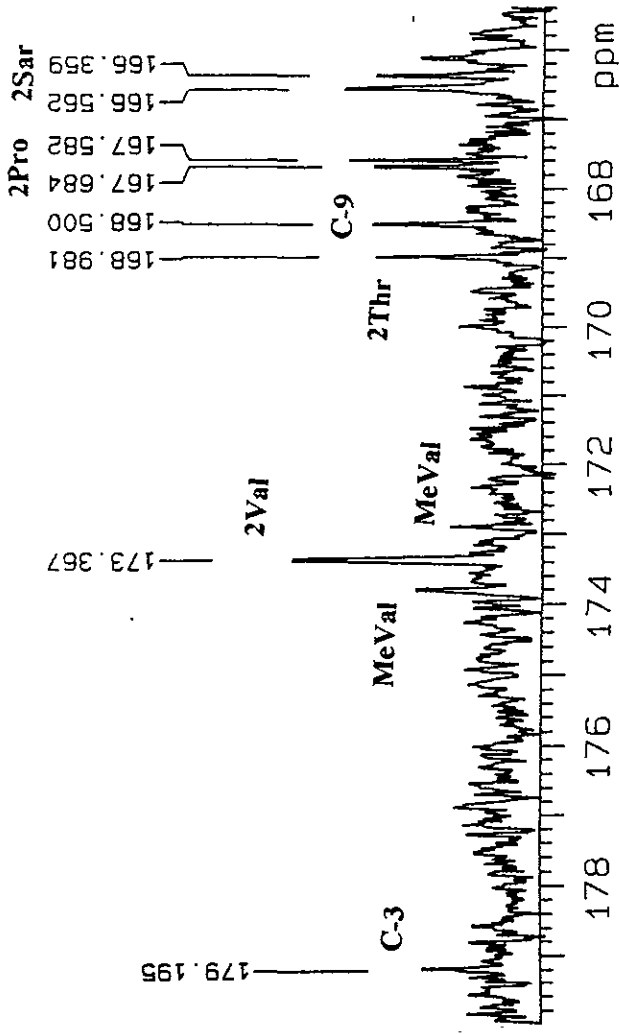
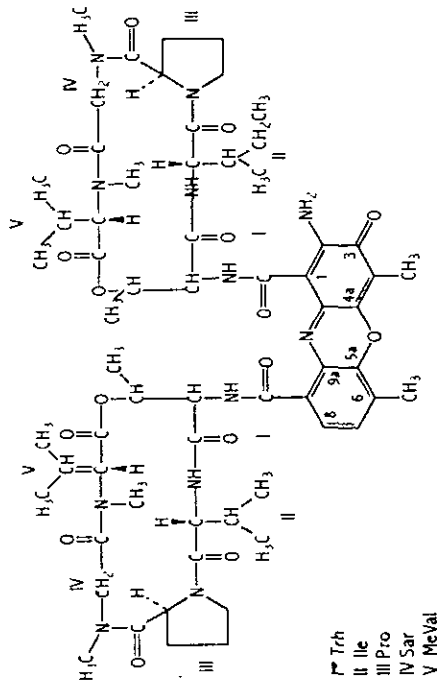
Espectro 46. Espectro de RMN ¹H de la actinomomicina C1 (228).



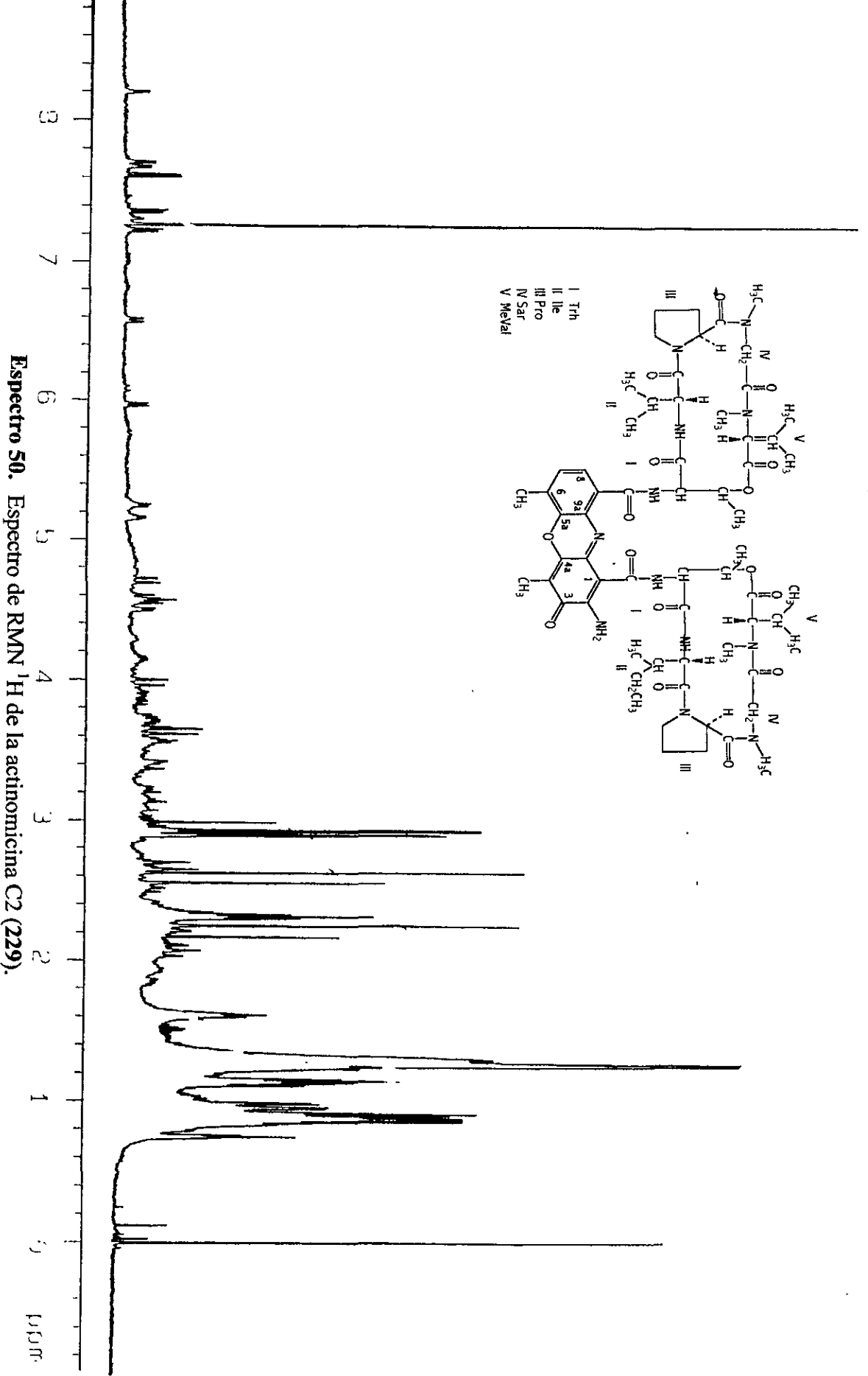
Espectro 47. Espectro en el IR de la actinomicina C2 (229).



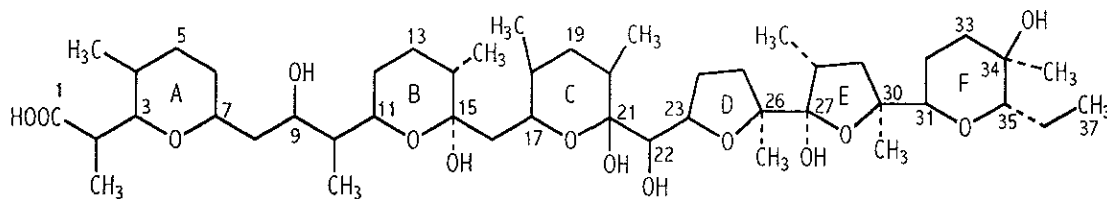
Espectro 48. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la actinomicina C2 (229).



Espectro 49. Espectro de RMN ¹³C de la actinomicina C2 (229).



Cuadro 54. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del antibiótico X-206



p.f. 185-187 °C

$[\alpha]^{20}$

P.M. 871 una EM-FAB⁺ (alcohol nitrobenílico)

FM C₄₇H₈₂O₁₄Na

IR ν max (película, cm⁻¹): 3570, 3444, 3356, 2966, 2931, 1566, 1458, 1399, 1380, 1111, 1042

Espectro 13

RMN ¹H. Cuadro 55

Espectro 17

RMN ¹³C. Cuadro 55

Espectros 15 y 16

EM FAB, m/z (int. rel.): 893 [M+Na]⁺ (100%), 875 [M-H₂O+Na]⁺ (12%), 843 [M-CO₂-H+Na]⁺ (20%), 751 [M-H₂O-C₈H₁₂O+Na]⁺ (25%), 635 [M-H₂O-C₁₄H₂₄O₃+Na]⁺ (10%), 581 [M-H₂O-C₁₈H₃₀O₃+Na]⁺ (18%), 521 [M-C₂₃H₄₀O₂-H+Na]⁺ (70%).

Espectro 14

Cuadro 55. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) y ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del antibiótico X-206.

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	182.3	—
2	43.5	2.614, qd J 7.0, 3.0
3	86.0	3.58 (dd, 1H, J 10.0, 3.0)
4	31.6	1.49, m
5	32.5	1.29, m
6	32.8	1.5, m
7	80.5	3.45, m
8	41.5	1.27, m
9	70.1	4.37, (dd J 10.0, 2.0)
10	46.3	1.26, m
11	68.2	3.68 (td, 1H J 10.0, 2.0)
12	31.2	1.53, m
13	27.2	Ha: 1.84, m Hb: 1.53, m
14	39.0	1.82,
15	98.0	—
16	38.8	2.21, m
17	71.7	3.25, m
18	34.7	2.15, m
19	36.3	1.57, m
20	34.6	1.38, m
21	98.9	—
22	70.3	3.55
23	79.4	4.54
24	27.4	Ha: 2.13, m Hb: 1.53, m
25	34.3	1.6, m
26	88.7	—

Cuadro 55. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) y ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del antibiótico X-206 (continuación).

Posición	δ_c	δ_H (J en Hz)
27	108.6	—
28	37.8	1.4, m
29	42.6	2.13, m
30	82.5	—
31	73.0	4.23 (t, 1H, J 10.0)
32	20.3	Ha: 2.08, m Hb: 1.37, m
33	30.4	Ha: 1.77, m Hb: 1.07, m
34	68.4	—
35	82.0	4 32
36	19.7	1.67, m
2-Me	10.3	0.97, d J 7.0
4-Me	17.1	0.84, d J 7.0
10-Me	8.3	0.77, d J 7.0
14-Me	16.7	0.90, d J 6.5
18-Me	17.9	0.82, d J 6.5
20-Me	15.9	1.02, d J 7.0
26-Me	24.4	1.12, s
28-Me	15.6	1.07, d J 6.5
30-Me	28.8	1 59, s
34-Me	27.1	1 07, s
37-Me	10.5	0.97, t J 6.5
C ₉ -OH		4.23, s
C ₁₅ -OH		6.86, s
C ₂₁ -OH		3.56, d J 9.0
C ₂₂ -OH		2.50, d J 11.5
C ₂₇ -OH		6.01, s
C ₃₄ -OH		

Phytotoxic and Photosynthetic Activities of Maduramicin and Maduramicin Methyl Ester

Maria Teresa Gutiérrez-Lugo^a, Blas Lotina-Hennsen^b, Amelia Farrés^c, Sergio Sánchez^d and Rachel Mata^a

^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México, D. F., México

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México, D. F., México

^c Departamento de Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México, D. F., México

^d Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México, D. F., México

Z. Naturforsch. **54c**, 325–332 (1999); received October 21/December 23, 1998

Maduramicin, Photophosphorylation, Uncoupler, Phytotoxicity, Polyether Antibiotic

The polyether antibiotic maduramicin and its methyl ester derivative inhibited photophosphorylation and proton uptake in isolated spinach chloroplasts. Both compounds also enhanced basal and phosphorylating electron transport and stimulated Mg^{2+} -dependent ATPase activity, therefore, they behave as uncouplers of photophosphorylation being the methyl ester derivative more potent than the parent compound. On the other hand, maduramicin inhibited germination and radicle elongation of several crop and weed species. In addition, the antibiotic caused phytotoxic injury and fresh weight reduction to 4-to-6 week old seedlings of two weed and two crop species when applied at 10^{-4} M by foliar application in the greenhouse.

Introduction

In the course of our search for potential herbicidal agents from natural sources we have isolated maduramicin (**1**) in high yields from the actinomycete MIV2B(31) obtained from a soil sample collected in a volcanic area of the State of Baja California, Mexico.

Maduramicin is a polyether antibiotic that belongs to the lipophilic class of antibiotics known as ionophores. These compounds form electrically neutral complexes with monovalent and divalent cations. The lipophilic character of these antibiotics render them soluble in lipid components and they catalyze electrically silent exchanges of cations for protons or other cations across a variety of biological membranes. The ionophorous nature of these antibiotics results in a wide range of biological activities (Reed, 1982).

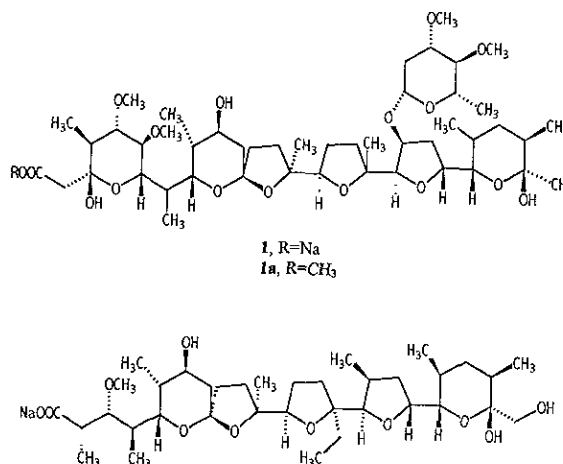


Fig. 1. Chemical structures of maduramicin sodium salt **1**, maduramicin methyl ester **1a** and monesin sodium salt **2**.

Reprint requests to Dr. Lotina-Hennsen or Dr. Rachel Mata

Fax: (525) 622 53 29

E-mail: blas@servidor.unam.mx

rachel@servidor.unam.mx

Maduramicin is an antibiotic of significant commercial importance to the poultry industry for combating coccidiosis; the ammonium salt of the free acid of maduramicin is marketed as Cygro[®], this product has shown to be more active than other

polyether antibiotics currently used to control poultry coccidia (Liu *et al.*, 1981; 1983; Labeda *et al.*, 1983).

Studies related with the herbicidal effects of polyether antibiotics have shown that some of them such as nigericin and monesin possess pre or post-emergent herbicidal activity to several weed and crop species (Heysey and Putnam, 1986; 1990; Hoagland, 1996). It has been also reported that monesin, nigericin (X-464), lasalocid A, antibiotic X-206, dianemycin and laidlomycin inhibit photophosphorylation in isolated chloroplasts by uncoupling synthesis of ATP from electron flow (Shavit *et al.*, 1967; 1970, Kida and Shibai, 1986). It was found that the dissipation of the proton gradient occurs via K^+/H^+ exchange or antiport (Shavit *et al.*, 1970).

Nigericin has been shown to stimulate ATPase activity in microsomal vesicles of tobacco callus (Sze, 1980). The antibiotic also affect the kinetics of ATP synthesis in heart submitochondrial particles (Matsuno-Yagi and Hatefi, 1989) and induce the release of protons from thylakoid lumen (Yamasaki *et al.*, 1991).

As monesin, maduramicin is introduced into environment via animal excreta from extensive use as an antibiotic in broiler chickens and turkeys (McDougald *et al.*, 1990). However, the effect on this ionophore on plant growth has not been investigated. In this context, the objective of this research was to explore the pre and post-emergent phytotoxic properties of maduramicin. The pre-emergent phytotoxic activity was investigated by determining the effect of the antibiotic on germination and radicle growth of five plant species. The post-emergent phytotoxic activity was established by evaluating the effect of foliar application of maduramicin to 4-to-6 week old seedlings of two weed and two crop plant species. In addition, the effect of maduramicin and its methyl ester on several photosynthetic activities associated with the light reaction phase including ATP synthesis, proton uptake, electron transport (basal, phosphorylating and uncoupled conditions) and Mg^{2+} -ATPase activity, was investigated.

Materials and Methods

General

IR spectra were obtained in $CHCl_3$ on a Perkin-Elmer 599B spectrophotometer. 1H and ^{13}C NMR

spectra were recorded on a Varian VXR-500S spectrometer. Melting points were determined in a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. FAB-mass spectra were obtained with a JEOL DX 300, JMA 3500 system mass spectrometer using a NBA matrix. The X ray-analysis was performed on a Nicolet R3m.

Analytical and preparative TLC were performed on pre-coated silica gel 60 F254 plates (Merck). TLC spots were visualized by spraying with a 3% solution of vanillin- H_2SO_4 reagent followed by heating at 110 °C.

A Beckman model DU 650 spectrophotometer was used to carry out the spectrophotometric measurements in the photosynthesis experiments.

HPLC was performed on a Waters HPLC Instrument equipped with a Waters refractive index detector using a microporasil silica gel 125 A column (10 μm 19 id X 300 mm, Waters). Control of the equipment, data acquisition, processing and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2000 software program (Waters).

Producing organism

Actinomycete MIV2B(31) was isolated from a soil sample collected in the volcanic area of Santa Rosalía, State of Baja California, Mexico. The culture has been deposited at Instituto de Investigaciones Biomédicas Culture Collection, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F.

Fermentation extraction and preliminary fractionation

Fermentation of actinomycete MIV2B(31) was carried out at 29 °C in a 14 liter fermentor (Drive assembly, New Brunswick Scientific) with agitation (400 rpm) in Arcamone medium consisting of glucose 2.0%, beer yeast 1.25%, NaCl 0.2%, $CaCO_3$ 0.2%, $MgSO_4$ 0.1%, $ZnSO_4$ 0.001%, $FeSO_4$ 0.001% pH 7 (NaOH 1 M) for six days. The filtrate of the fermentation broth (8 l) was extracted twice with 8 l of ethyl acetate and evaporated *in vacuo* to yield 6.3 g of residue. The resulting extract was evaluated for their ability to inhibit both radicle elongation of *Amarathus hypochondriacus* and ATP synthesis in spinach chloroplasts. The active extract was fractionated by column chromatography on silica gel (Merck 60, 0.63–0.2 mm) and

eluted with a gradient of chloroform-methanol starting with chloroform only. Twenty-six fractions were collected and pooled on the basis of their TLC profiles to yield four major fractions (FI-FIV). According to the bioautographic phyto-growth inhibitory bioassay the phytotoxic activity was concentrated in FII (5.35 g) and FIII (0.429 g).

Isolation of maduramicin

Antibiotic **1** was isolated from fraction FII by HPLC chromatography using as mobile phase hexane:2-propanol:methanol (89:5.5:5.5 v/v) and a flow rate of 8.3 ml min⁻¹. The compound was recrystallised from acetone and spectroscopic and spectrometric constants were determined.

Synthesis of maduramicin methyl ester derivative (**1a**)

A solution of maduramicin free acid (200 mg) in ether was allowed to react with ethereal diazo-methane until nitrogen evolution ceased and the yellow color persisted (Evans *et al.*, 1988). After additional 30 min, the solution was concentrated and the residue was purified by preparative thin layer chromatography. The elution was accomplished with hexane:acetone 7:3 v/v to yield 50 mg (25%) of **1a** as a white solid. **1a**: mp: 112 °C; FAB⁺-EM. *m/z* (relative intensity) 953 (11), 895 (4), 737 (7), 719 (11) and 59 (100); IR ν_{\max} (CHCl₃) 2976, 2935, 1715, 1459, 1377, 1096 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.41 (t, 1H, *J*= 4.0 Hz; H-22), 4.4 (dd, 1H, *J*= 5.0 and 2.0 Hz; H-24), 4.39 (dd, 1H, *J*= 9.75 and 2.0 Hz; H-1'), 4.21 (dd, 1H, *J*= 10.75 and 2.0 Hz; H-9), 4.1 (d, 1H, *J*= 3.5 Hz; H-21), 3.95 (dd, 1H, *J*= 10.75 and 2.0 Hz; H-25), 3.94 (d, 1H, *J*= 2.5 Hz; H-11), 3.7 (dd, 1H, *J*= 9.5 and 3.0 Hz; H-7), 3.58 (s, 3H, OMe-4), 3.55 (s, 6H, OMe-5 OMe-6), 3.54 (s, 3H, OMe-1), 3.41 (s, 3H, OMe-3'), 3.34 (dd, 1H, *J*= 10.25 and 8.5 Hz; H-5'), 3.27 (ddd, 1H, *J*= 11.5, 8.5 and 5.5 Hz; H-3'), 3.18 (m, 1H, H-5'), 3.14 (dd, 1H, *J*= 9.5 and 8.5 Hz; H-6), 2.72 (t, 1H, *J*= 9.0 Hz; H-4'), 2.5 (d, 1H, *J*= 12.5 Hz; Ha-2), 2.16 (d, 1H, *J*= 12.5 Hz; Hb-2), 1.89 (dd, 1H, *J*= 14.5 and 3.5 Hz; Ha-12), 1.62 (dd, 1H, *J*= 14.5 and 2.0 Hz; Hb-12), 1.49 (s, 3H, Me-16), 1.29 (s, 3H, Me-30), 1.27 (d, 3H, *J*= 6.0, Me-5'), 1.21 (s, 3H, Me-20), 1.05 (d, 3H, *J*= 6.5, Me-8), 1.01 (d, 3H, *J*= 6.5, Me-4), 0.92 (d, 3H, *J*= 6.0, Me-28), 0.86 (d, 3H, *J*= 6.5, Me-26), 0.85

(d, 3H, *J*= 6.0, Me-10). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 172.6 (C-1), 107.5 (C-13), 97.74 (C-29), 96.0 (C-3), 95.85 (C-30), 86.2 (C-21), 85.0 (C-5), 84.9 (C-16), 83.0 (C-20), 82.0 (C-17), 81.6 (C-6), 78.0 (C-24), 75.6 (C-22), 73.6 (C-25), 69.46 (C-11), 68.34 (C-9), 68.3 (C-7), 60.76 (OMe-C-4'), 60.75 (OMe-C-5), 60.23 (OMe-C-1), 60.22 (OMe-C-6), 56.81 (OMe-C-3'), 45.6 (C-4), 43.14 (C-2), 39.7 (C-28), 38.7 (C-14), 36.6 (C-27) 34.2 (C-15), 33.6 (C-10), 33.35 (C-12), 33.34 (C-8), 33.34 (C-26), 31.91 (C-19), 31.8 (C-23), 28.49, (Me-C-6), 27.1 (C-18), 23.28 (Me-C-20), 17.96 (Me-C-5'), 17.8 (Me-C-26), 14.6 (Me-C-28), 11.96 (Me-C-4), 10.54 (Me-C-8), 10.54 (Me-C-10).

Seed sources and plant growth

Seeds of three weed and two crop species were used to determine the effect of the antibiotics on germination, radicle elongation and biomass production. Seeds of *Amaranthus hypochondriacus* (amaranthus) and *Triticum vulgare* (wheat) were obtained from commercial sources. The seeds of *Echinochloa crus-galli* (barn-yard grass), *Trifolium alexandrinum* (clover) and *Phaseolus aureus* (mung bean) were purchased from Valley Seed Service, Fresno, CA.

Plant growth for biomass production determination was achieved as previously reported (Chen *et al.*, 1991; Hoagland, 1996). Plants were grown in a 80% RH growth chamber for 4-to-6 weeks (12 h, 28 °C light: dark 300 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation) before treatment.

Determination of the effect of maduramicin on seed germination and radicle growth

The determination of the effect of the extract and antibiotics **1** and **2** on germination and radicle elongation was evaluated using the Petri dish phyto-growth-inhibitory bioassay (Anaya *et al.*, 1991). The antibiotics were tested at different concentrations (5×10^{-4} , 5×10^{-5} and 5×10^{-6} M). The data were analyzed by ANOVA ($P < 0.05$) and IC₅₀ (concentration causing 50% reduction of radicle growth) values were calculated by Probit analysis based on percent inhibition obtained. Monesin and 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) were used as positive controls. In addition, a direct bioautographic bioassay system was employed to con-

tol fractionation and speed up the isolation of active compound (Castañeda *et al.*, 1996).

Determination of the effect of maduramicin on fresh weight and shoot elongation of plant seedlings

The determination of the effect of **1** on fresh weight and shoot elongation of four plant species was performed as described Hoagland (1996). Three trays of each species (4-to-6 week old) consisting of 6–8 seedlings each were treated foliarly with maduramicin solution (4×10^{-4} M) containing Tween 80 ($0.1 \text{ ml litre}^{-1}$) which was used as detergent. Foliar applications were made using a cotton swab and foliage was applied to the point of runoff. In each case Tween 80 ($0.1 \text{ ml litre}^{-1}$) and paraquat (10^{-4} M) were used as controls. Visual damage in the foliage was observed after one month of treatment. All experiments were based on a complete random design with a factorial structure. Data on plant elongation and fresh weight were subjected to ANOVA and mean comparisons performed using Fisher's protected LSD.

Chloroplasts isolation and chlorophyll determination

Chloroplast thylakoids were isolated from market spinach leaves (*Spinacea oleracea* L.) as previously described (Calera *et al.*, 1996) and suspended, unless otherwise indicated, in 3 ml of a medium composed of 400 mM sucrose, 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM KCl and buffered with 0.030 M sodium N-tri-(hydroxymethyl)-methyl glycine (Na^+ tricine) at pH 8.0 (KOH 1M). Chlorophyll concentration was measured spectrophotometrically as described by Strain *et al.* (1971).

Measurement of proton uptake, ATP synthesis and electron transport

Proton uptake was measured as the pH value increased between 8.0 and 8.1 (Dilley, 1972) using a combination microelectrode connected to a Corning Potentiometer with expanded scale. The pH changes were registered using a Gilson recorded. The reaction medium was 100 mM sucrose, 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM Na^+ tricine, pH 8 (KOH, 1M). ATP synthesis and non-cyclic electron transport were determined as previously described (Calera *et al.*, 1995; 1996. Mills *et al.*,

1980; Dilley, 1972). Methylviologen (MV) (0.05 mM) was employed as electron acceptor for the Hill reaction.

Light-induced non-cyclic electron transport in the presence of MV was monitored with a YSI (Yellow Springs Instrument C) model 5300 oxygen monitor using a Clark electrode in a temperature regulated flask at 20 °C. The reaction medium was the same as proton uptake assay except for the Na^+ tricine concentration (15 mM) and the presence or absence of 6 mM NH_4Cl (Calera *et al.*, 1995; 1996). The results are expressed as percent of activity compared to control (chloroplasts without antibiotic addition). Monesin was used as positive control in all determinations.

Mg^{2+} -ATPase isolation and assay

Intact chloroplast isolated from spinach leaves were suspended in 35 mM sorbitol, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) pH 7.6. The membrane bound Mg^{2+} -ATPase activity was determined using the technique reported by Mills *et al.* (1980). Monesin and ammonium chloride were used as positive controls. In each reaction, a blank experiment was performed with the isolated chloroplasts in the reaction medium. All reactions were conducted by triplicate and the data analyzed by ANOVA. The percent of activity of the enzyme was calculated comparing the rate values observed in each experiment with that of the control (100% of activity).

Results and Discussion

Isolation and identification of maduramicin

The organic extract derived from the fermentation broth of the actinomycete MIV2B(31) inhibited both radicle elongation of *A. hypochondriacus* (IC_{50} 58.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and photophosphorylation in spinach chloroplast (IC_{50} 42.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Bioassay guided fractionation of the active extract using the bioautographic phytogrowth inhibitory bioassay (Castañeda *et al.*, 1996) allowed the isolation of maduramicin (Liu *et al.* 1981, 1983; Labeda *et al.*, 1983), as the active compound. This product was identified by comparison of IR, RMN and EM data of its sodium salt with the informa-

tion previously described in the literature and by X-ray analysis (Westley *et al.*, 1982; Liu *et al.*, 1983; Rajan *et al.*, 1984; Ellestad *et al.*, 1986; Siegel *et al.*, 1987).

Effect of maduramicin on seed germination and radicle growth

Compound **1** was evaluated for its ability to inhibit seed germination and radicle growth of *A. hypochondriacus*, *E. crus-galli*, *T. alexandrinum*, *P. aureus* and *T. vulgare*. Table I summarizes the phytotoxic effect of the antibiotic (**1**) which was more potent as growth inhibitor than as germination inhibitor. The weeds *A. hypochondriacus*, *E. crus-galli* and *T. alexandrinum* were more sensitive to the treatment with **1**. It is important to notice that the effect of **1** on *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli* was comparable to that of 2,4-D. On the other hand, the seedlings of *P. aureus* and *T. vulgare* were less sensitive to maduramicin, thus indicating some degree of selectivity among crop and weed species.

Effect of maduramicin on 4-to-6 week old seedling after foliar application

When maduramicin was applied at 4×10^{-4} M and higher concentration produced a wide range of injury on shoot elongation and fresh weight accumulation among the species treated. *T. vulgare* exhibited the highest degree of inhibition of shoot elongation (42.2%) and fresh weight accumulation (54.6%). Shoot elongation and fresh weight of the treated *P. aureus* was also reduced by 21% and 36.8%, respectively. In addition, the antibiotic induced injury in *P. aureus* and *T. alexandrinum*, the injury includes chlorosis, necrosis, desiccation and leaf abscission.

Effect of maduramicin and maduramicin methyl ester on ATP synthesis and proton uptake in chloroplast thylakoids

Maduramicin (**1**), maduramicin methyl ester (**1a**) and monesin (**2**) significantly inhibited photosynthetic phosphorylation from water to methylviologen in spinach chloroplast thylakoids in a concentration-dependent manner (Fig. 2). The synthesis of ATP was totally inhibited by **1**, **1a** and **2** at 500 μ M, 25 μ M and 30 μ M, respectively.

On the other hand, the extent of proton uptake was also diminished by **1**, **1a** and **2** in a concentration-dependent manner (Fig. 2). The calculated IC₅₀ of the antibiotics for these activities are summarized in Table II.

Mitchell transduction theory (Mitchell, 1967) predicts that the inhibition of proton uptake and ATP synthesis must be to the same extent and in a parallel manner when the tested compound behaves as an uncoupler. Figure 2 shows a behavior which is in agreement with Mitchell transduction theory.

The light-dependent synthesis of ATP on thylakoids may be inhibited by blocking the electron transport, uncoupling ATP synthesis from electron transport or blocking the phosphorylation reaction itself (Good *et al.*, 1981).

In order to distinguish between these three possibilities the effect of maduramicin, maduramicin methyl ester and monesin on photosynthetic electron transport and Mg²⁺-ATPase activity was tested.

Effect of maduramicin and maduramicin methyl ester on non-cyclic electron transport and Mg²⁺-dependent ATPase activity on chloroplasts

Figure 3 shows that the non-cyclic electron transport from water to methylviologen in both

Table I. Effect of maduramicin on seed radicle growth expressed by inhibitory concentration values.

Seed	IC ₅₀ [M] Maduramicin	Monesin	2,4-D
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	1.85×10^{-5}	6.70×10^{-6}	1.31×10^{-5}
<i>Echinochloa crus galli</i>	2.02×10^{-5}	9.60×10^{-5}	1.39×10^{-5}
<i>Trifolium alexandrinum</i>	8.40×10^{-5}	4.10×10^{-5}	5.32×10^{-6}
<i>Triticum vulgare</i>	9.71×10^{-4}	4.16×10^{-5}	1.94×10^{-5}
<i>Phaseolus aureus</i>	1.50×10^{-4}	1.79×10^{-5}	1.67×10^{-5}

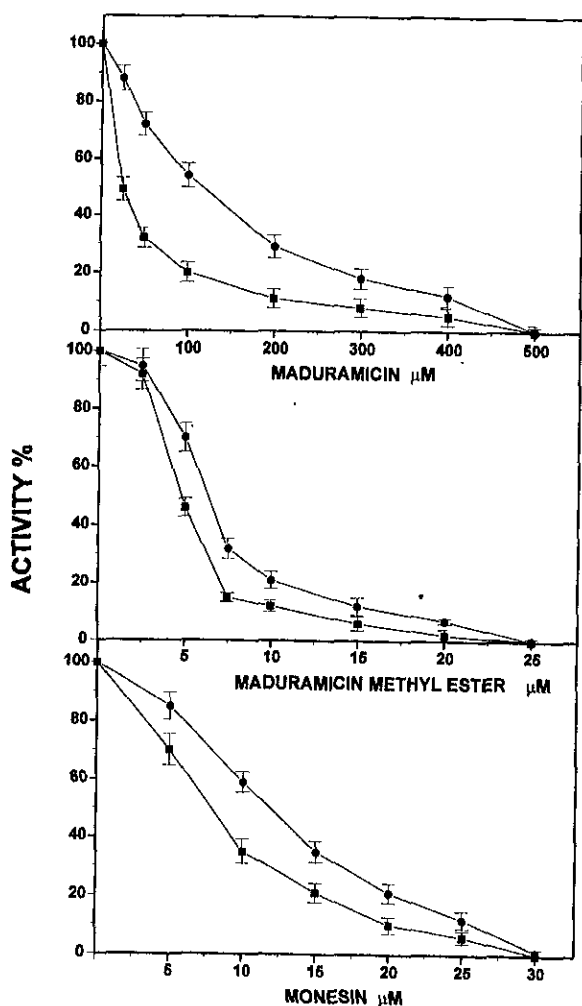


Fig. 2. Inhibitory effect of the antibiotics **1**, **1a** and **2** on photophosphorylation and proton uptake from water to methylviologen in chloroplast thylakoids isolated from spinach leaves. Control value rate for ATP formation (\blacksquare) and proton uptake (\bullet) were $1633 \mu\text{mol of ATP h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ and $430 \mu\text{equiv H}^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectively.

basal and phosphorylating conditions were enhanced by addition of the three compounds. However, uncoupled electron transport was unaffected.

On the other hand, the effect of different concentrations of compound **1**, **1a** and **2** on Mg^{2+} -ATPase bound to thylakoids was tested. Table III shows that the three polyether antibiotics stimulated the light-activated Mg^{2+} -ATPase. The activation values range from 279 to 371%.

Chemicals that increase the proton permeability of thylakoid membranes uncouple phosphoryla-

Table II. Effect of maduramicin, maduramicin methyl ester and monesin on ATP synthesis and H^+ uptake in spinach chloroplasts. Control value rate for ATP formation and proton uptake were $1633 \mu\text{mol of ATP h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$ and $430 \mu\text{equiv H}^+ \times \text{h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$, respectively.

Antibiotic	$\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$	
	ATP synthesis	H^+ uptake
Maduramicin	20.7	96.6
Maduramicin methyl ester	5.0	6.4
Monesin	8.1	12.1

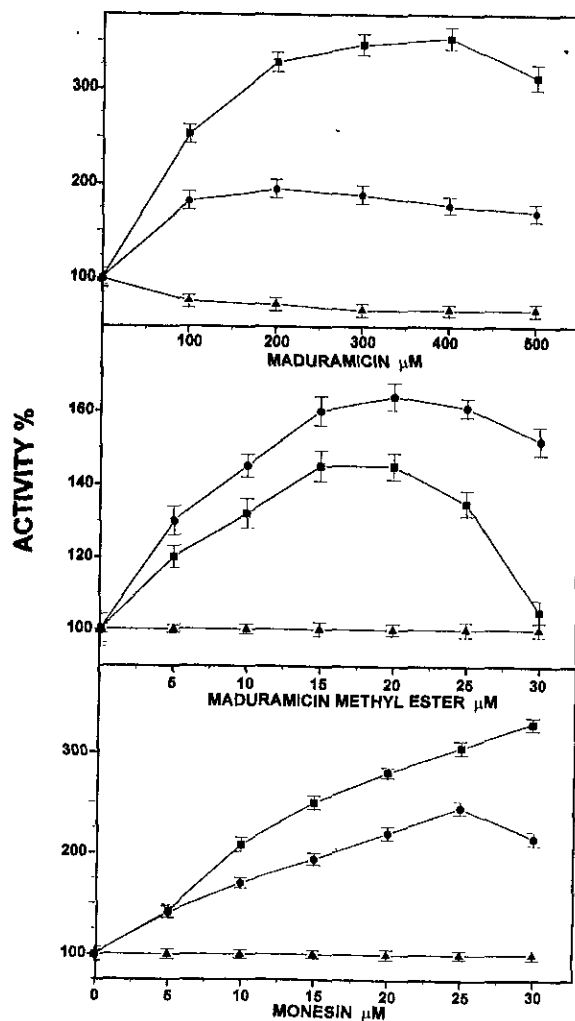


Fig. 3. Noncyclic electron transport (basal \blacksquare , phosphorylating \bullet and uncoupled \blacktriangle) from water to methylviologen as a function of antibiotic **1**, **1a** and **2** concentration. Control value rates for basal, phosphorylating and uncoupled electron transport were 167 , 833 and $1833 \mu\text{equiv of e}^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectively.

Table III. Effect of maduramicin, maduramicin methyl ester and monesin on the Mg^{2+} -dependent ATPase activity of chloroplasts. 100%-control rate value for the Mg^{2+} -ATPase is $389 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg Chl} \cdot \text{h}^{-1}$ and is equivalent to 100% of activity.

Antibiotic	Concentration [μM]	Mg^{2+} -ATPase activity (% of control)
None	None	100 ± 4
Maduramicin	100	346 ± 12
	200	326 ± 11
	300	296 ± 9
Maduramicin methyl ester	10	268 ± 9
	20	316 ± 11
	30	371 ± 10
Monesin	10	279 ± 9
	20	353 ± 12
	30	364 ± 12
Ammonium chloride	1.5×10^{-3}	317 ± 10
	3.0×10^{-3}	487 ± 12

tion from electron flow. Uncoupling agents avoid ATP synthesis by decreasing the proton gradient but allow electron transport to occur at high rates. In addition weakly acidic uncouplers stimulate ATPase when bound to the mitochondrial membrane (F_0F_1 -ATPase) (Terada, 1990). Therefore, the inhibitory activity exerted on ATP synthesis and H^+ uptake, as well as the stimulatory effect on basal and phosphorylating electron transport and ATPase activity, indicate that these compounds have uncoupling properties on chloroplast thylakoids.

The effect of maduramicin on ATP synthesis, H^+ uptake and electron flow rate was similar to that previously reported for nigericin (Shavit *et al.*,

1967, 1970), monesin, lasalocid, dianemycin (Shavit *et al.*, 1970) and laidlomycin (Kida and Shibai, 1986). It has been suggested that these antibiotics increase the permeability of mitochondrial, chloroplasts and artificial membranes to alkali metal cations and protons by inducing a $\text{cation} \leftrightarrow H^+$ exchange (Shavit *et al.*, 1970; Reed, 1979). Therefore, maduramicin is expected to have a similar behavior. On the other hand, maduramicin methyl ester was found to be four times more active as uncoupler than the parent compound. The higher activity could be explained by an increase of lipophilicity of the molecule by the introduction of a methyl group. This fact enhance the diffusion across the thylakoid membrane.

Acknowledgments

This work was supported by grants from DGAPA IN 205197, PADEP-UNAM. (N° 005327 and 207340) and CONACyT (27978 N).

We thank M. en C. Isabel Chavez, M. en C. Beatriz Quiroz, I. Q. Luis Velasco-Ibarra, M. en C. Javier Pérez-Flores, QFB Rocío Patiño and M. en C. Ruben Toscano, Instituto de Química, UNAM for recording the NMR, MS, IR spectra and for the X-ray analysis, Q. Beatriz King-Díaz Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM for her invaluable help in the determination of the effect of the antibiotics on several photosynthetic activities. The technical support of Laura Acevedo Arteaga is also acknowledged. Special thanks are due to Dr. Juan Manuel Espíndola, Instituto de Geofísica, UNAM for collecting the soil sample. M. T. Gutiérrez acknowledges the fellowship awarded by DGAPA-UNAM to carry out her Ph.D. studies.

- Anaya A. L., Calera M. R., Mata R. and Pereda-Miranda R. (1991), Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.* **16**, 2145.
- Calera M. R., Mata R., Lotina-Hennsen B. and Anaya A. L. (1996), Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts: structure-activity relationships. *J. Agric Food Chem.* **44**, 2966–2969.
- Calera M. R., Mata R., Anaya A. L. and Lotina-Hennsen B. (1995), 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynth. Res.* **45**, 105–110.
- Castañeda P., Gómez L., Mata R., Lotina-Hennsen B., Anaya A. and Bye R. (1996), *J. Nat. Prod.* **59**, 323–326.
- Chen P. K., Polatnick M. and Leather G. (1991), Comparative study on artemisin, 2,4 D and glyphosate, *J. Agric. Food Chem.* **39**, 991–994.
- Dilley R. (1972), Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena). *Methods Enzymol.* **24**, 68–74.
- Ellestad G. A., Canfield N., Lees R. A., Morton G. O., James J. C., Siegel M. M. and McGahren W. J. (1986), Chemistry of maduramicin. I. Salt formation and normal ketalization. *J. Antibiot.* **39**, 447–456.
- Evans D. A., Steven L. and Morris J. (1988), Total synthesis of the polyether antibiotic X-206. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 2506–2526.
- Good N. E., Izawa S. and Hind G. (1981), Uncoupling and energy transfer inhibition in photophosphorylation. In: *Current Topics in bioenergetics* (Sanadi D. R., ed). Academic Press, New York. Vol. **1**, pp 75–80.
- Heysey R. M. and Putnam A. R. (1986), Herbicidal effects of geldamycin and nigericin antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Nat. Prod.* **49**, 859–865.
- Heysey R. M. and Putnam A. R. (1990), Herbicidal activity of geldamycin and nigericin antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Plant Growth Regul.* **9**, 19–25.
- Hoagland R. F. (1996), Herbicidal properties of the antibiotic monesin. *J. Sci. Food Agric.* **70**, 373–379.
- Kida T. and Shibai H. (1986), Inhibition of *De novo* starch synthesis and photosynthesis by laidlomycin. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 485–486.
- Labeda D., Martin J. H. and Goodman J. J. (1983), Process for producing antibiotic X-14868a. US Patent 4,407,946.
- Liu C.-M., Prosser B. and Westley J. W. (1981), Antibiotics X-14868A, B, C and D. US Patent 4,278,663.
- Liu C.-M., Hermann T. E., Downey B., Prosser LaT., Schildknecht E., Palleroni N. J.; Westley J. W. and Miller P. A. (1983), Novel polyether antibiotics X-14868A, B, C and D produced by a *Nocardia*. *J. Antibiot.* **36**, 344–350.
- Matsuno-Yagi A. and Hatefi Y. (1989), Uncoupling of oxidative phosphorylation. Different effects of lipophilic weak acids and electrogenic ionophores on the kinetics of ATP synthesis. *Biochemistry* **28**, 4367–4374.
- McDougald L. R., Mathis G. F. and Wang G. T. (1990), Efficacy of maduramicin ammonium against coccidiosis in turkeys under laboratory and floor-pen conditions. *Avian Dis.* **34** 634–638.
- Mills J. D., Mitchel P. and Schurman P. (1980), Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett.* **112**, 173–177.
- Mitchell P. (1967), Proton-translocations, phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: natural fuel cells and solar cells. *Fed. Proc.* **26**, 1370–1379.
- Rajan S., Tsou H., Mowery P. C., Bullock M. W. and Stockton G. W. (1984), Natural abundance two-dimensional double-quantum ^{13}C NMR spectroscopy of maduramicin, a polyether ionophore antibiotic and coccidiostat. *J. Antibiot.* **37**, 1495–1500.
- Reed P. W. (1982), Biochemical and biological effects of carboxylic acid ionophores. In *Natural occurring acid ionophores*. Vol 1. Chemistry. Ed., J. W. Westley, pp 185–302, Marcel Dekker Inc., New York.
- Shavit N., Degani H. and San Pietro A. (1970), II: Effects of ionophorous antibiotics in chloroplasts. *Biochim. Biophys Acta.* **216**, 208–219.
- Shavit N., Dilley R. A. and San Pietro A. (1967), K^+ -dependent uncoupling photophosphorylation by nigericin. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **28** 277–283.
- Siegel M., McGahren W. J., Tomer K. B. and Chang T. T. (1987), Applications of fast atom bombardment mass spectrometry and fast atom bombardment mass spectrometry-mass spectrometry to the maduramicins and other polyether antibiotics. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **14**, 29–38.
- Strain H., Cope B. and Sve M. (1971), Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. *Methods Enzymol.* **23**, 452–466.
- Sze H. (1980), Nigericin-stimulated ATPase activity in microsomal vesicles of tobacco callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 5904–5908.
- Terada H. (1990), Uncoupler of oxidative phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* **87**, 213–218.
- Westley J. W., Liu C.-M., Blount J. F., Evans R. H., Sello L. H., Toupe N. and Miller P. A. (1982), Novel polyether antibiotics X-14868 A, B, C and D. Coccidiostat from *Nocardia*. In *Trends in Antibiotic Research*. E. H. Umezawa, *et al.*, pp. 125–134, Japan Antibiotics Research Association, Tokyo.
- Yamasaki H., Furuya S., Kawamura A., Ito A., Okayama S. and Nishimura M. (1991), Induction of the release from thylakoid membranes by illumination in the presence of protonophores at high concentrations. *Plant Cell Physiol.* **32**, 925–934.