

00581
④



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS

**“ANÁLISIS CONFORMACIONAL Y ESTEREOQUÍMICA
ABSOLUTA DE LAS NONENÓLIDAS FITOTÓXICAS DEL
HONGO *Phoma herbarum*.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
P R E S E N T A
M. en C. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

293056

TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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. Leovigildo Quijano

Segundo vocal: Dra. Rosalinda Contreras Theurel

Tercer vocal: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Secretario: Dr. Mariano Martínez Vázquez

Primer Suplente: Dr. Carlos Cerda García Rojas

Segundo Suplente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents


Tutor: Dra. Rachel Mata Essayag.


Sustentante: José Fausto Rivero Cruz.

Estudio químico, el crecimiento de las especies fúngicas y la determinación del efecto de los compuestos sobre la enzima glutamino sintetasa y la proteína calmodulina se realizó en el Laboratorio 124, Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM.

La actividad de los compuestos sobre la síntesis de ATP y la enzima PEPcarboxilasa se realizaron en los Laboratorios 115 y 102 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

El aislamiento e identificación de los hongos se efectuó en el Laboratorio de Fitopatología "Dr. Teófilo Herrera" del Instituto de Biología, UNAM.

Los cálculos de mecánica molecular se realizaron en el Departamento de Química del CINVESTAV-IPN.

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes instituciones y dependencias: a la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México (PADEP) por el apoyo financiero otorgado a través de los proyectos IN 207300, 27978N, 207397 y 108329, 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. Rosario Muñoz Clares, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM por su valiosa colaboración en la determinación de la actividad de los compuestos aislados sobre la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa. Al Dr. Blas Lotina Henssen, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM y a la M. en C. Beatriz King, por su colaboración en la evaluación de los productos fúngicos sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca. A la Dra. Alicia Gamboa de Buen, del Instituto de Ecología de la UNAM, por su colaboración en la determinación del efecto de los compuestos aislados sobre la actividad de la enzima glutamino sintetasa. A la Dra. Genoveva García Aguirre por proporcionar e identificar las especies de hongos utilizadas en el presente estudio. A los Doctores José Serafín Calderón Pardo y Carlos Céspedes Acuña, investigadores del Instituto de Química de la UNAM, por permitirme realizar parte

del trabajo experimental en su laboratorio durante la época de crisis universitaria. A las maestras Isabel Rivero y Laura Acevedo por su 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), a los QFB Rosa Isela del Villar Morales y Oscar S. Yáñez Muñoz (USAI, Facultad de Química, UNAM) y al M. en C. Atilano Gutiérrez (UAM, Iztapalapa) por el registro de los espectros de RMN. A la QFB Rocío Patiño (Instituto de Química, UNAM) por los registros de los espectros de IR, UV, DC y las determinaciones de rotación óptica. A las QFB Graciela Chávez y la Q. Marisela Gutiérrez (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de algunos espectros de IR y UV. Al IQ. Luis Velasco Ibarra, el M. en C. Javier Pérez Flores (Instituto de Química, UNAM) y a la Q. Georgina Duarte Lisci (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de los espectros de masas.

A los miembros de mi comité tutorial integrado por los doctores Genoveva García Aguirre, Rogelio Pereda Miranda y Leovigildo Quijano por el estímulo y recomendaciones brindados durante la realización de este proyecto de tesis.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones, y en particular al doctor Leovigildo Quijano por sus valiosos comentarios y observaciones, que sin duda enriquecieron la versión final de la tesis.

Agradezco a todos mis profesores y a la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme la oportunidad de acceder al valioso tesoro de la educación.

A los prestadores del Servicio Social del Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia y a mis compañeros del laboratorio, por su ayuda desinteresada.

De manera especial agradezco al Dr. Carlos Cerda García-Rojas, investigador del Departamento de Química del CINVESTAV-IPN, por su interés en el presente proyecto de tesis, por su decidida e importante colaboración en la realización de los cálculos de modelado molecular y sus valiosas enseñanzas y sugerencias a lo largo del desarrollo del presente trabajo de Tesis.

Por último, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Rachel Mata Essayag, creadora del presente proyecto, por su invaluable dirección de la presente investigación. Con admiración y respeto agradezco todas sus enseñanzas, la paciencia, el apoyo y la confianza que me ha otorgado a lo largo de mi estancia en su laboratorio.

CONTENIDO

| | Página |
|--|-----------|
| LISTA DE CUADROS..... | VIII |
| LISTA DE FIGURAS..... | X |
| LISTA DE ESQUEMAS..... | XII |
| LISTA DE ESPECTROS..... | XII |
| RESUMEN..... | XIV |
| ABSTRACT..... | XVI |
| | |
| 1. ANTECEDENTES..... | 1 |
| 1.1 Hongos fitopatógenos como una fuente potencial de agentes herbicidas..... | 1 |
| 1.2 Generalidades del género <i>Phoma</i> | 13 |
| 1.2.1 Taxonomía..... | 13 |
| 1.2.2 Estudios químicos y biológicos..... | 14 |
| 1.3 Antecedentes de <i>Phoma herbarum</i> Westend y de <i>Phoma sorghina</i> (Sacc.) Boerema, Dorenbosh & van Kesteren..... | 30 |
| 1.4 Lactonas naturales con anillos de diez miembros..... | 34 |
| | |
| 2. HIPÓTESIS..... | 42 |
| | |
| 3. OBJETIVOS..... | 42 |
| 3.1 Objetivos particulares..... | 42 |
| | |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL..... | 45 |

| | |
|---|----|
| 4.1 Aislamiento y mantenimiento de los hongos fitopatógenos del género <i>Phoma</i> | 45 |
| 4.1.1 Aislamiento de los hongos del género <i>Phoma</i> | 45 |
| 4.1.2 Conservación de los hongos del género <i>Phoma</i> aislados de semillas de maíz y de sorgo contaminadas..... | 46 |
| 4.2 Evaluaciones biológicas..... | 47 |
| 4.2.1 Evaluación del efecto de los extractos de los hongos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> | 47 |
| 4.2.2 Evaluación del efecto de los extractos fúngicos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> utilizando el método bioautográfico..... | 48 |
| 4.2.3 Evaluación de la actividad de los compuestos puros sobre la síntesis de ATP..... | 49 |
| 4.2.3.1 Aislamiento de los cloroplastos y cuantificación de la clorofila..... | 49 |
| 4.2.3.2 Cuantificación de la velocidad de síntesis de ATP..... | 50 |
| 4.2.4 Efecto de las fitotoxinas sobre la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPcarboxilasa)..... | 51 |
| 4.2.5 Evaluación del efecto de los extractos y los compuestos puros sobre la enzima glutamino sintetasa (GS)..... | 52 |
| 4.2.6 Evaluación del efecto de los extractos y los compuestos puros sobre la proteína calmodulina..... | 53 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.2.6.1 | Determinación de la interacción de los compuestos puros con la proteína calmodulina (espinaca y bovino)..... | 53 |
| 4.2.7 | Evaluación del efecto de los compuestos puros sobre la producción de biomasa de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. y <i>Echinochloa crusgalli</i> (Beauv.) L..... | 54 |
| 4.3 | Cultivo en pequeña escala para determinar las condiciones de crecimiento y realizar la prueba biológica de selección..... | 55 |
| 4.3.1 | Cultivos en pequeña escala de cada una de las cepas de hongos..... | 55 |
| 4.3.1.1 | Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento en medios líquidos para cada cepa..... | 55 |
| 4.3.2 | Preparación de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña escala de las cuatro cepas de hongos..... | 56 |
| 4.4 | Cultivo en mediana escala de las especies seleccionados y preparación de los extractos orgánicos derivados del micelio y del medio de crecimiento de las especies cultivadas..... | 57 |
| 4.4.1 | Cultivo en mediana escala..... | 57 |
| 4.4.2 | Preparación de los extractos orgánicos a partir de los cultivos en mediana escala..... | 58 |
| 4.5 | Obtención de las fitotoxinas de las especies <i>Phoma herbarum</i> y <i>Phoma sorghina</i> | 58 |
| 4.5.1 | Métodos generales de análisis..... | 58 |
| 4.5.1.1 | Métodos cromatográficos..... | 58 |
| 4.5.1.2 | Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas..... | 60 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.5.2 | Estudio químico del extracto derivado de la especie <i>Phoma herbarum</i> | 61 |
| 4.5.2.1 | Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo de <i>P. herbarum</i> | 61 |
| 4.5.2.2 | Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIV..... | 61 |
| 4.5.2.3 | Separación y purificación mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de las herbaruminas I (191) y II (192) a partir de las fracciones activas secundarias FIV-3 y FIV-4..... | 63 |
| 4.5.3 | Reinvestigación química de la especie <i>P. herbarum</i> | 64 |
| 4.5.3.1 | Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado de la especie <i>P. herbarum</i> | 64 |
| 4.5.3.2 | Aislamiento de las herbaruminas I-III (191-193) mediante cromatografía en capa fina (ccf) a partir de la fracción activa FIII-2..... | 66 |
| 4.5.4 | Estudio químico del extracto orgánico derivado de la especie <i>P. sorghina</i> | 67 |
| 4.5.4.1 | Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado de la especie <i>P. sorghina</i> | 67 |
| 4.5.4.1 | Fraccionamiento secundario de la fracción activa F-IV..... | 68 |
| 4.5.4.3 | Aislamiento y purificación mediante CLAR las antraquinonas presentes en la fracción activa FIV-4 derivada del extracto orgánico del hongo <i>Phoma sorghina</i> | 71 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.5.4.4 | Preparación del derivado acetilado de la herbarumina II (192c)..... | 72 |
| 4.5.2.5 | Preparación del acetónido de la herbarumina II (192d)..... | 72 |
| 4.5.2.6 | Preparación de los derivados <i>p</i> -bromobenzoilados de la herbarumina I (191a), la herbarumina II (192e) y la herbarumina III (193a)..... | 73 |
| 4.5.4.7 | Ruptura reductiva del alterporriol D (196) y el alterporriol E (197)..... | 73 |
| 4.5.5 | Cálculos de modelado molecular..... | 75 |
| 5. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 75 |
| 5.1 | Aislamiento y selección de los organismos fúngicos del género <i>Phoma</i> | 76 |
| 5.2 | Fermentación en mediana escala de <i>P. herbarum</i> y <i>P. sorghina</i> | 84 |
| 5.3 | Estudios químicos biodirigidos de las especies <i>P. herbarum</i> y <i>P. sorghina</i> | 84 |
| 5.3.1 | Obtención de las herbaruminas I (191) y II (192) de la primera fermentación de <i>Phoma herbarum</i> Westend..... | 84 |
| 5.3.2 | Obtención de las herbaruminas I–III (191–193) de la segunda fermentación de <i>P. herbarum</i> | 85 |
| 5.3.3 | Obtención de la macrosporina (194), altersolanoles A (137) y D (195) y alterporrioles D (196) y E (197) de <i>P. sorghina</i> | 86 |
| 5.3.4 | Caracterización de la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y los alterporrioles D (196) y E (197)..... | 88 |

| | |
|---|-----|
| 5.4 Elucidación estructural de las herbaruminas I–III (191–193) aisladas del hongo fitopatógeno <i>P. herbarum</i> | 89 |
| 5.5 Evaluación del potencial fitotóxico y exploración de los posibles blancos de acción de los compuestos derivados de los estudios químicos biodirigidos de las especies <i>P. herbarum</i> y <i>P. sorghina</i> | 119 |
| 5.5.1 Determinación del efecto de las herbaruminas I–III (191–193), la 7,8– <i>O,O</i> –isopropilidenherbarumina II (192d), la 2,7,8–triacetilherbarumina II (192c), la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y los alterporrioles D (196) y E (197) sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> | 120 |
| 5.5.2 Determinación del efecto de las herbaruminas I–III (191–193), la 7,8– <i>O,O</i> –isopropilidenherbarumina II (192c), la 2,7,8–triacetilherbarumina II (192d), la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y los alterporrioles D (196) y E (197) sobre la producción de biomasa de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> | 123 |
| 5.5.3 Efecto de las herbaruminas I–III (191–193), los altersolanoles A (137) y D (195) sobre las síntesis de ATP | 125 |
| 5.5.4 Efecto de las herbaruminas I–III (191–193) sobre la enzima glutamino sintetasa (GS)..... | 126 |
| 5.5.5 Efecto de las herbaruminas I–III (191–193) sobre la enzima PEPcarboxilasa (PEPcarboxilasa)..... | 127 |
| 5.5.6 Efecto de las herbaruminas I–III (191–193) sobre la proteína reguladora calmodulina..... | 128 |

| | |
|---|------------|
| 6. CONCLUSIONES | 153 |
| 7. PERSPECTIVAS GENERALES DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN | 156 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 157 |
| ANEXO I. Espectros | 185 |

LISTA DE CUADROS.

| | | Página |
|------------------|--|--------|
| Cuadro 1 | Nonenólidas naturales simples aisladas a la fecha | 35 |
| Cuadro 2 | Nonenólidas naturales con cadenas laterales alquílicas aisladas a la fecha. | 36 |
| Cuadro 3 | Nonenólidas naturales complejas aisladas a la fecha. | 37 |
| Cuadro 4 | Composición de los medios sólidos de cultivo utilizados para el aislamiento, la propagación y la conservación de los hongos del género <i>Phoma</i> . | 47 |
| Cuadro 5 | Composición de los medios líquidos de crecimiento utilizados para los cultivos en pequeña y en gran escala de los hongos del género <i>Phoma</i> . | 55 |
| Cuadro 6 | Rendimiento de los extractos del caldo y del micelio derivados de los cultivos en mediana escala. | 58 |
| Cuadro 7 | Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina de los extractos y de las fracciones obtenidas durante el proceso de fraccionamiento de los extractos de las especies seleccionadas. | 59 |
| Cuadro 8 | Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto obtenido del micelio y del medio de crecimiento del hongo <i>Phoma herbarum</i> . | 62 |
| Cuadro 9 | Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna rápida de la fracción activa FIV obtenida a partir del extracto total del micelio y del medio de crecimiento del hongo <i>Phoma herbarum</i> . | 62 |
| Cuadro 10 | Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto obtenido a partir del micelio y del medio de crecimiento del hongo <i>Phoma herbarum</i> . | 65 |
| Cuadro 11 | Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna rápida de la fracción activa FIII obtenida a partir del extracto total del micelio y del medio de crecimiento del hongo <i>Phoma herbarum</i> . | 66 |
| Cuadro 12 | Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto obtenido del micelio y del medio de crecimiento del hongo <i>Phoma sorghina</i> . | 70 |
| Cuadro 13 | Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna rápida de la fracción activa FIV obtenida a partir del extracto total del micelio y del medio de crecimiento del hongo <i>Phoma sorghina</i> . | 70 |
| Cuadro 14 | Producción de biomasa y rendimiento de los extractos del medio de cultivo y micelio derivados de la fermentación en diferentes condiciones de <i>P. herbarum</i> . | 78 |
| Cuadro 15 | Producción de biomasa y rendimiento de los extractos del medio de cultivo y micelio derivados de la fermentación en diferentes condiciones de <i>P. sorghina</i> . | 78 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Cuadro 16 | Producción de biomasa y rendimiento de los extractos del medio de cultivo y micelio derivados de la fermentación en diferentes condiciones de <i>Phoma</i> sp. TOX-01-020-R4. | 79 |
| Cuadro 17 | Producción de biomasa y rendimiento de los extractos del medio de cultivo y micelio derivados de la fermentación en diferentes condiciones de <i>Phoma</i> sp. TOX 01-018-R2. | 79 |
| Cuadro 18 | Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio generados en las distintas fermentaciones de <i>P. herbarum</i> sobre el crecimiento radicular y la germinación de la especie <i>Amaranthus hypochondriacus</i> . | 80 |
| Cuadro 19 | Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio generados en las distintas fermentaciones de <i>P. sorghina</i> sobre el crecimiento radicular y la germinación de la especie <i>Amaranthus hypochondriacus</i> . | 81 |
| Cuadro 20 | Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio generados en las distintas fermentaciones de <i>Phoma</i> TOX 01-020-R4 sobre el crecimiento radicular y la germinación de la especie <i>Amaranthus hypochondriacus</i> . | 81 |
| Cuadro 21 | Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio generados en las distintas fermentaciones de <i>Phoma</i> TOX-01-018-R2 sobre el crecimiento radicular y la germinación de la especie <i>Amaranthus hypochondriacus</i> . | 81 |
| Cuadro 22 | Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala de <i>P. herbarum</i> y <i>P. sorghina</i> . | 83 |
| Cuadro 23 | Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la herbarumina I (191). | 90 |
| Cuadro 24 | Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la herbarumina II (192). | 91 |
| Cuadro 25 | Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la herbarumina III (193). | 92 |
| Cuadro 26 | Desplazamientos químicos de RMN ¹ H de las herbaruminas I-III (191-193) y de la triacetilherbarumina II (192c). | 94 |
| Cuadro 27 | Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C de las herbaruminas I-III (191-193) y la 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c). | 95 |
| Cuadro 28 | Ángulos diedros selectos (ϕ_{MMX} en grados), constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) y constantes de acoplamiento observadas (J_{obs} en Hz) de la herbarumina III (193) y la 7- <i>p</i> -bromobenzoilherbarumina III (193a). | 100 |
| Cuadro 29 | Ángulos diedros selectos (ϕ_{MMX} en grados), constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) y constantes de acoplamiento observadas (J_{obs} en Hz) de la herbarumina I (191) y la 7,8- <i>bis</i> (<i>p</i> -bromobenzoil)herbarumina I (191a). | 101 |

| | Página |
|------------------|---|
| Cuadro 30 | Ángulos diedros selectos (ϕ_{MMX} en grados), constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) y constantes de acoplamiento observadas (J_{obs} en Hz) de la herbarumina II (192a + 192b), 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c), la 7,8- <i>O,O'</i> -isopropilidenherbarumina II (192d) y la 2,7,8-tris(<i>p</i> -bromobenzoil)herbarumin II (192e). 106 |
| Cuadro 31 | Comparación de los ángulos diedros (ϕ_{MMX} en grados), las constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) para las configuraciones C-9 (<i>R</i>) y C-9 (<i>S</i>) con las constantes de acoplamiento registradas (J_{obs} en Hz) para la herbarumina III (193). 115 |
| Cuadro 32 | Efecto de los extractos y compuestos puros aislados de <i>P. herbarum</i> y <i>P. sorghina</i> sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> . 122 |
| Cuadro 33 | Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la macrosporina (194). 185 |
| Cuadro 34 | Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la altersolanol A (137). 188 |
| Cuadro 35 | Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la altersolanol D (195). 188 |
| Cuadro 36 | Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del altersolanol A (137) y del altersolanol D (195). 189 |
| Cuadro 37 | Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los alterporrioles D (196) y E (197). 194 |
| Cuadro 38 | Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del alterporriol D (196) y alterporriol E (197). 195 |

LISTA DE FIGURAS.

| | Página |
|-----------------|---|
| Figura 1 | Incorporación de ^{13}C -acetato y ^{18}O -acetato en la biosíntesis de las decarestrictininas B (154) y D (157). 39 |
| Figura 2 | Nonenólidas aisladas del hongo <i>P. herbarum</i> . 85 |
| Figura 3 | Antraquinonas aisladas del hongo <i>P. sorghina</i> . 86 |
| Figura 4 | Espectro de RMN bidimensional COSY de la herbarumina I (191) (500 MHz, CDCl_3). Principales correlaciones ^1H - ^1H (3J): 1, H4b-H5; 2, H4a-H5; 3, H8-H9; 4, H8-H7; 5, H9-H10b. 97 |
| Figura 5 | Correlaciones importantes observadas en el espectro HMBC de las herbaruminas I-III (191-193). 98 |
| Figura 6 | Conformación de mayor estabilidad de la herbarumina III (193) ($E_{\text{MMX}} = 13.85$ kcal/mol) y correlaciones más relevantes observadas en el espectro NOESY del producto natural. 100 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 7 | Conformación de mayor estabilidad y efectos NOESY más relevant para la herbarumina I (191) ($E_{MMX} = 9.51$ kcal/mol). | 101 |
| Figura 8 | Confórmeros de mínima energía para la herbarumina II (192a y 192b) | 103 |
| Figura 9 | Espectros de RMN ^1H de la herbarumina II (192) A: MeOH- d_4 y CDCl_3 | 105 |
| Figura 10 | Espectro de RMN ^1H de la herbarumina II (192) registrado a diferentes temperaturas. | 108 |
| Figura 11 | Confórmero de mínima energía para la 7,8- <i>O</i> , isopropilidenherbarumina II (192d) ($E_{MMX} = 24.3$ kcal/mol). | 109 |
| Figura 12 | Confórmero de mínima energía para la 2,7,8-triacetilherbarumina (192c) ($E_{MMX} = 5.97$ kcal/mol). | 109 |
| Figura 13 | Orientación óptima de los cromóforos interactuantes y observación efecto "exciton" en el UV y DC. | 110 |
| Figura 14 | Relación de los ángulos de torsión de los dipolos interactuantes con orden de los signos de los efectos Cotton en el DC. | 111 |
| Figura 15 | Espectro de DC de la 7,8- <i>bis</i> (<i>p</i> -bromobenzoil)herbarumina I (191a). | 112 |
| Figura 16 | Espectro de DC de la 2,7,8- <i>tris</i> (<i>p</i> -bromobenzoil)herbarumina II (192e). | 113 |
| Figura 17 | Espectro de RMN ^1H bidimensional homonuclear NOESY del compuesto 192e . Efecto $n\text{Oe}$: 1, H_2 - H_8 | 114 |
| Figura 18 | Espectro de DC de la 7- <i>p</i> -bromobenzoilherbarumina III (193). | 116 |
| Figura 19 | Conformación de mayor estabilidad de la 7,8- <i>bis</i> (bromobenzoil)herbarumina I (191a). | 117 |
| Figura 20 | Confórmero de mínima energía para la 2,7,8- <i>tris</i> (bromobenzoil)herbarumina II (192e). | 117 |
| Figura 21 | Confórmero de mínima energía para la 7- <i>p</i> -bromobenzoilherbarumina (193a). | 118 |
| Figura 22 | Efecto de la aplicación foliar de los productos 137 y 194-1 (1×10^{-4} M) sobre el peso fresco de la plántula (A) y sobre la longitud las especies vegetales (B). | 124 |
| Figura 23 | Efecto de las herbaruminas I-III (191-193), los altersolanoles A (137), 7,8- <i>O,O</i> -isopropilidenherbarumina II (192d), la 2,7, triacetilherbarumina II (192c) y los alterporrioles D (196) y E (137) en las velocidades de síntesis de ATP ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$). | 126 |
| Figura 24 | Efecto de las herbaruminas I-III (191-193) sobre la enzima PEPcarboxilasa. | 128 |
| Figura 25 | Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) de la calmodulina bovina después del tratamiento con las herbaruminas I-III (191-193). | 130 |
| Figura 26 | Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) de la calmodulina de espinaca después del tratamiento con las herbaruminas I-III (191-193). | 131 |

LISTA DE ESQUEMAS.

| | Página |
|--|--------|
| Esquema 1 Extracción y fraccionamiento del extracto obtenido del micelio y del medio de crecimiento del hongo <i>Phoma herbarum</i> . | 63 |
| Esquema 2 Proceso de extracción y fraccionamiento del extracto orgánico de <i>Phoma herbarum</i> . | 67 |
| Esquema 3 Extracción y fraccionamiento del extracto obtenido del micelio y del medio de crecimiento del hongo <i>Phoma sorghina</i> . | 69 |
| Esquema 4 Estrategia metodológica empleada en el presente estudio | 76 |

LISTA DE ESPECTROS

| | |
|---|-----|
| Espectro 1 RMN ¹ H de la herbarumina I (191) (500 MHz, CDCl ₃). | 132 |
| Espectro 2 RMN ¹ H de la herbarumina II (192) (500 MHz, CDCl ₃). | 133 |
| Espectro 3 RMN ¹ H de la herbarumina III (193) (500 MHz, CDCl ₃). | 134 |
| Espectro 4 RMN ¹³ C de la herbarumina I (191) (125 MHz, CDCl ₃). | 135 |
| Espectro 5 RMN ¹³ C de la herbarumina II (192) (125 MHz, CDCl ₃). | 136 |
| Espectro 6 RMN ¹³ C de la herbarumina III (193) (125 MHz, CDCl ₃). | 137 |
| Espectro 7 RMN ¹ H bidimensional COSY de la herbarumina II (192). | 138 |
| Espectro 8 RMN ¹ H bidimensional COSY de la herbarumina III (193). | 139 |
| Espectro 9 Espectro bidimensional HMBC de la herbarumina I (191). | 140 |
| Espectro 10 Espectro bidimensional HMBC de la herbarumina II (192). | 141 |
| Espectro 11 Espectro bidimensional HMBC de la herbarumina III (193). | 142 |
| Espectro 12 Espectro bidimensional HMQC de la herbarumina I (191). | 143 |
| Espectro 13 Espectro bidimensional HMQC de la herbarumina II (192). | 144 |
| Espectro 14 Espectro bidimensional HMQC de la herbarumina III (193). | 145 |
| Espectro 15 Espectro de RMN ¹ H de la 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c). | 146 |
| Espectro 16 Espectro de RMN ¹ H de la 7,8- <i>O,O</i> -isopropilidenherbarumina II (192d). | 147 |
| Espectro 17 Espectro de RMN ¹ H bidimensional homonuclear NOESY de la herbarumina I (191). | 148 |
| Espectro 18 Espectro de RMN ¹ H bidimensional homonuclear NOESY de la herbarumina II (192). | 148 |
| Espectro 19 Espectro de RMN ¹ H bidimensional homonuclear NOESY de la herbarumina III (193). | 150 |
| Espectro 20 Espectro de RMN ¹ H del compuesto 191a. | 151 |
| Espectro 21 Espectro de RMN ¹ H del compuesto 192e. | 152 |
| Espectro 22 Espectro de RMN ¹ H de la macrosporina (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) (194). | 186 |

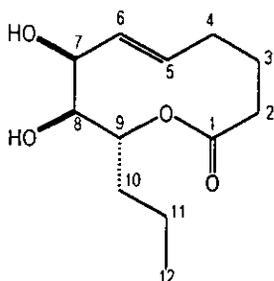
| | | |
|--------------------|---|-----|
| Espectro 23 | Espectro de RMN ^1H de la macrosporina (125 MHz, CDCl_3 -DMSO- d_6) (194). | 186 |
| Espectro 24 | Espectro bidimensional HMBC de la macrosporina (194). | 187 |
| Espectro 25 | Espectro de RMN ^1H bidimensional homonuclear NOESY de la macrosporina (194). | 187 |
| Espectro 26 | Espectro de RMN ^1H del altersolanol A (500 MHz, DMSO- d_6) (137). | 190 |
| Espectro 27 | Espectro de RMN ^{13}C del altersolanol A (125 MHz, DMSO- d_6) (137). | 190 |
| Espectro 28 | Espectro bidimensional de HMBC del altersolanol A (137). | 191 |
| Espectro 29 | Espectro de bidimensional de HMQC del altersolanol A (137). | 191 |
| Espectro 30 | Espectro de RMN ^1H bidimensional homonuclear NOESY del altersolanol A (137). | 192 |
| Espectro 31 | Espectro de RMN ^1H del altersolanol D (500 MHz, DMSO- d_6) (195). | 193 |
| Espectro 32 | Espectro de RMN ^{13}C del altersolanol D (125 MHz, DMSO- d_6) (195). | 193 |
| Espectro 33 | Espectro de RMN ^1H del alterporriol D (500 MHz, DMSO- d_6) (196). | 196 |
| Espectro 34 | Espectro de RMN ^{13}C del alterporriol D (125 MHz, DMSO- d_6) (196). | 196 |
| Espectro 35 | Espectro de RMN ^1H del alterporriol E (500 MHz, DMSO- d_6) (197). | 197 |
| Espectro 36 | Espectro RMN ^{13}C del alterporriol E (125 MHz, DMSO- d_6) (197). | 197 |

RESUMEN

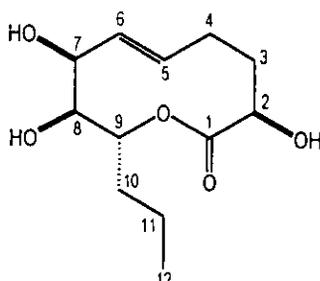
La presente disertación describe la investigación de los productos naturales derivados de hongos del género *Phoma* como una fuente potencial de compuestos herbicidas. Para el desarrollo de este proyecto de investigación se propuso una estrategia metodológica que se inició con el aislamiento y selección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

Se aislaron cuatro cepas de hongos del género *Phoma* a partir de semillas de maíz cacahuacintle, de sorgo, así como de muestras de suelo. Durante el proceso de selección se detectó que los aislamientos de *P. herbarum* y *P. sorghina* contenían sustancias capaces de modificar el crecimiento vegetal.

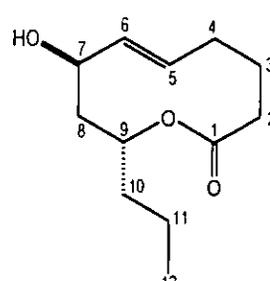
El estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo de *P. herbarum* (80.0 L) condujo el aislamiento y purificación de tres nonenólidas novedosas designadas con los nombres triviales de herbaruminas I–III (191–193).



herbarumina I (191)



herbarumina II (192)



herbarumina III (193)

De manera general, la elucidación estructural de los productos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos químicos, espectroscópicos, espectrométricos, quirópticos y cálculos de mecánica molecular. Los cálculos de mecánica molecular permitieron determinar que los anillos de 10 miembros de las herbaruminas I–III (191–193) adoptan preferentemente una conformación de silla–silla–silla.

La evaluación del potencial fitotóxico de las herbaruminas I–III (191–193) permitió establecer que estos compuestos poseen propiedades inhibitorias del crecimiento vegetal de tipo pre-emergente. Las herbaruminas I–III (191–193) inhiben la germinación y crecimiento radicular ($CI_{50} = 5.43 \times 10^{-5}$, 1.25×10^{-4} y 2.06×10^{-5} M, respectivamente) de *Amaranthus hypochondriacus*. El efecto fue dependiente de la concentración.

La determinación del efecto de las herbaruminas I–III (191–193) [1×10^{-4} M] sobre la producción de biomasa de las especies vegetales *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* indicó que los productos no inducen una disminución del peso fresco y de la longitud de las plántulas.

Con la finalidad de obtener información acerca de los posibles blancos de acción se evaluó el efecto de los compuestos sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca y sobre la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPcarboxilasa) de maíz y la glutamino sintetasa (GS) de amaranto. De manera adicional se investigó la posible interacción de las herbaruminas I–III (191–193) con la proteína reguladora calmodulina (CaM de cerebro de bovino y CaM de espinaca).

Con respecto a la evaluación de las herbaruminas I–III (191–193) sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca, se observó que ninguno de estos metabolitos inhibe este proceso fotosintético. Las evaluaciones del efecto de las herbaruminas I–III (191–193)

sobre la actividad de las enzimas glutamino sintetasa (GS) y fosfonolpiruvato carboxilasa (PEPcarboxilasa) permitieron establecer que ninguno de los metabolitos modifica la actividad de las enzimas GS y la PEPcarboxilasa. Sin embargo, las herbaruminas I–III (191–193) modifican la movilidad electroforética de las calmodulinas de cerebro de bovino y espinaca. Este resultado indicó que las nonenólidas estudiadas interaccionan con las calmodulinas de origen vegetal y animal.

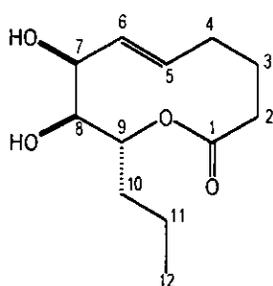
El estudio químico biodirigido del extracto derivado del cultivo de *Phoma sorghina* empleando el bioensayo del crecimiento radicular permitió el aislamiento de la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y de los alterporrioles D (196) y E (197). La evaluación del potencial fitotóxico de estos productos permitió establecer que los altersolanoles A (137) y D (195) son los metabolitos fitotóxicos más importantes de este hongo. Ambos productos inhiben el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* ($CI_{50} = 5.20 \times 10^{-4}$ y 7.80×10^{-3} , respectivamente).

Con respecto a la evaluación de la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y los alterporrioles D (196) y E (197) sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca, se encontró que ninguno estos metabolitos tienen un efecto significativo sobre esta actividad fotosintética. La quinonas tampoco modifican actividad de las enzimas glutamino sintetasa y fosfonolpiruvato carboxilasa.

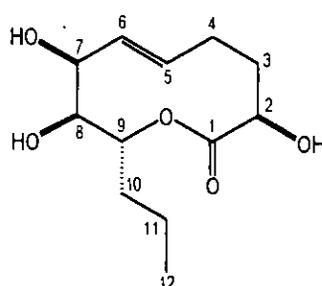
ABSTRACT

As a part of a research program to discover potential herbicidal agents from microorganisms it was found that the organic extracts prepared from the culture broth of *Phoma herbarum* and *P. sorghina* induced significant inhibition of radicle growth of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus*.

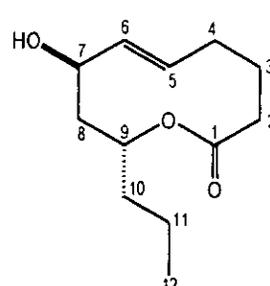
Bioactivity-guided fractionation of the extract from *P. herbarum* led to the isolation of three new nonenolides, which were given the trivial names of herbarumins I (191), II (192) and III (193), respectively. The structures of these compounds were established on the basis of the spectroscopic methods and high resolution NMR techniques (COSY, HMQC and HMBC). The stereochemistry and the solution conformation of the ten-membered ring lactone of herbarumins I-III (191-193) was determined using the CD exciton coupling method of Harada and Nakanishi, molecular mechanics modeling, NOESY data and the comparison of the observed vs. the calculated vicinal proton coupling constants.



herbarumin I (191)



herbarumin II (192)



herbarumin III (193)

The phytotoxic potential of herbarumins I-III (191-193) were investigated by evaluating the pre and post emergent phytotoxic activity. The pre-emergent phytotoxic activity was

investigated by evaluating the effect of herbarumins I–III (191–193) on germination and radicle growth of *Amaranthus hypochondriacus*. Herbarumins I–III (191–193) showed significant inhibition of radicle growth in *A. hypochondriacus*. It is important to notice that the effect of the herbarumins I–III (191–193) was comparable to that of 2,4–D.

The post emergent phytotoxic activity was established by evaluating the effect of foliar application of herbarumins I–III (191–193) [1×10^{-4} M] to 2–to–4 week old seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli*. The experimental results indicated that the herbarumins I–III (191–193) did not show appreciable effect on the shoot elongation and fresh weight accumulation of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli*.

Bioactivity–guided fractionation of an organic extract prepared from the culture of *P. sorghina* led to the isolation of macrosporin (194), altersolanol A (137), altersolanol D (195), alterporriol D (196) and alterporriol E (197). The isolated compounds were characterised by spectral means (IR, NMR and EM). Altersolanol A (137) and altersolanol D (195) inhibited radicle elongation of *A. hypochondriacus*.

None of the isolates modified the activity of the enzymes GS or PEPC neither inhibited the ATP synthesis on isolated chloroplasts. However it was found that herbarumins I–III (191–193) interact with both bovine brain and spinach calmodulins.

1. ANTECEDENTES

1.1 Hongos fitopatógenos como una fuente potencial de agentes herbicidas.

Estudios recientes han permitido establecer la existencia de alrededor de 300,000 especies de plantas superiores en el mundo, de las cuales, aproximadamente el 10% son nocivas. Estas plantas dañinas son las responsables del 42% de las pérdidas anuales en cultivos de importancia económica en los países industrializados. El costo monetario de estas pérdidas se estima en 10^{10} dólares por año (Hoagland, 1990; Evans, 1998; Cramer, 2000). Así mismo, muchas especies nocivas bloquean los canales de riego; ocasionan dermatitis por contacto, inducen fiebres y problemas respiratorios en los seres humanos; crean focos de incendio y son hospederos de hongos y bacterias patógenos de plantas (Hoagland, 1990; Cramer, 2000).

Con la finalidad de combatir las pérdidas que ocasionan los vegetales nocivos se emplean numerosos agentes herbicidas, tanto de origen sintético como bioherbicidas y productos naturales (derivados de microorganismos y plantas) (Hoagland, 1990; Evans, 1998; Cramer, 2000).

Los agentes herbicidas de origen sintético son los agentes plaguicidas más utilizados para la protección de cultivos de importancia económica. Sin embargo, estos productos presentan serias desventajas destacándose los severos daños que ocasionan tanto al medio ambiente como a los animales y seres humanos. Entre los problemas más frecuentes en humanos relacionados con el uso de herbicidas sintéticos podemos destacar la inducción de diversos tipos de cáncer y la esterilidad. En el caso de los animales se han observado efectos

similares, tanto en los silvestres como en los domésticos (Warrior, 2000). Así mismo, es importante mencionar que estos herbicidas ocasionan enormes daños en los ecosistemas, contaminando al suelo, aire y agua (subterránea, ríos y lagos, lluvia y nieve) (Justum, 1997). Estos daños se encuentran estrechamente relacionados con sus altos índices de persistencia, a menudo por un tiempo mucho mayor al que se requiere para ejercer su acción, y a la poca especificidad que presentan algunos de los agentes herbicidas comerciales de mayor uso. Es importante destacar también que estos productos han provocado la aparición de un gran número de especies resistentes (Strobel, 1991). Así el Diclofop® y otros herbicidas que tienen como blanco de acción a la enzima acetil-coenzima A carboxilasa han inducido el fenómeno de resistencia en especies de *Lolium*, *Avena*, *Phalaris* y *Setaria* (Heap, 1997; Warrior, 2000). Por último, recientemente se descubrió la existencia de procesos de resistencia cruzada. Este tipo de resistencia la inducen compuestos que pertenecen a diferentes clases químicas, pero que tienen el mismo mecanismo de acción o rutas similares de degradación. Como ejemplos de este tipo de compuestos se pueden citar a la sulfonilurea, la imidazolidona y la triazolopirimidina, todos ellos inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) (Heap, 1997; Warrior, 2000; Cramer, 2000).

Para evitar las dificultades relativas a la toxicidad y a la persistencia en el medio ambiente de los herbicidas sintéticos se han propuesto otras estrategias para proteger los cultivos de importancia económica, destacándose las siguientes: el empleo de bioherbicidas, la rotación de cultivos, la eliminación manual y mecánica de las plantas no deseadas, la manipulación genética y la utilización de compuestos fitotóxicos alternos (Lax, 1988; Hoagland, 1990; Charudattan, 1990; Strobel, 1991; Trujillo, 1994; Duke y Abbas, 1995; Macías, 1995; Cramer, 2000).

Con la finalidad de descubrir compuestos fitotóxicos alternos en los últimos años se ha intensificado la investigación de los productos naturales de origen vegetal y microbiano como una fuente potencial de nuevos agentes herbicidas. En este contexto, estudios recientes han permitido establecer que las fitotoxinas biosintetizadas por un gran número de hongos fitopatógenos son las responsables de los síntomas que se observan en las plantas parasitadas, y que las mismas constituyen agentes herbicidas potenciales de gran interés (Strobel, 1991; TeBeest, 1993; Rhodes, 1993). Es importante hacer notar que las fitotoxinas de origen natural pueden ser utilizadas como herbicidas *per se* o constituir nuevos prototipos estructurales para el diseño y la síntesis de derivados más potentes y eficaces (Lax, 1988; Hoagland, 1990; Charudattan, 1990; Strobel, 1991; Trujillo, 1994; Duke y Abbas, 1995; Macías, 1995; Cramer, 2000). Las fitotoxinas son compuestos de bajo peso molecular (>1000) que juegan un papel primordial en los procesos infectivos bloqueando las respuestas de defensa de las plantas hospederas. Estos compuestos se caracterizan por poseer una gran diversidad estructural (péptidos, terpenoides, fenoles, macrólidos, glicósidos, glicopéptidos, etc.) y una gran variedad de grupos funcionales; son biosintetizadas por un número restringido de organismos; su producción se realiza en fases específicas del ciclo de crecimiento del organismo y se encuentra altamente influenciada por las condiciones ambientales y nutricionales del hospedero (Lax, 1988; Charudattan, 1990; Hoagland, 1990; Strobel, 1991; Trujillo, 1994; Duke y Abbas, 1995; Macías, 1995). La utilización de las fitotoxinas fúngicas como agentes herbicidas ofrece una serie de ventajas ya que son selectivas, de fácil aplicación y su eficacia no depende de factores ambientales, además, generalmente son compatibles con la formulación desarrollada para su aplicación (Lax, 1988; Hoagland, 1990; Charudattan, 1990; Strobel, 1991; Trujillo, 1994; Duke y Abbas, 1995; Macías, 1995; Cramer, 2000).

Las toxinas de origen fúngico ofrecen también ventajas sobre las fitotoxinas de origen vegetal. Las fitotoxinas vegetales generalmente presentan una menor selectividad y en ocasiones son muy tóxicas para la especie productora. Por otra parte, las fitotoxinas de origen fúngico son generalmente eficaces a bajas concentraciones en tanto que las vegetales no (Lax *et al.*, 1988; Charudattan, 1990; Hoagland, 1990; Strobel *et al.*, 1991; Trujillo, 1994; Duke y Abbas, 1995; Macías, 1995).

Para la obtención de las fitotoxinas a partir de organismos fúngicos se ha aplicado en repetidas ocasiones y con bastante éxito la estrategia metodológica que se resume a continuación:

En primer lugar se realiza la preselección de las especies de hongos de acuerdo a un criterio ecológico, principalmente con base en las interacciones planta-hongo (Boyette y Abbas, 1995). Este criterio se basa en que los hongos fitopatógenos están involucrados en un gran número de enfermedades que se presentan frecuentemente en las plantas, bien sea en los cultivos de importancia económica o en plantas consideradas como nocivas para los cultivos. En muchos casos estas enfermedades están mediadas por la producción de compuestos tóxicos (fitotoxinas). Estos compuestos pueden ser selectivos y solo afectar a su hospedero natural (fitotoxinas hospedero selectivas). A la fecha se conocen diferentes especies de hongos que producen este tipo de toxinas, la gran mayoría de ellos pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Curvularia* y *Phoma*. Sin embargo, en ocasiones los hongos sintetizan compuestos que presentan efectos tóxicos no sólo sobre la especie hospedera sino también sobre otras especies vegetales no relacionadas (fitotoxinas no selectivas) (Graniti, 1991).

Una vez que las especies o aislamientos de hongos han sido preseleccionados se realizan pruebas conducentes a determinar las condiciones óptimas para su cultivo. Estas especies o

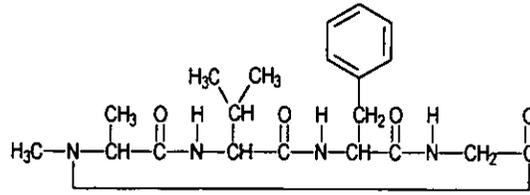
los aislamientos son cultivados en pequeña escala, utilizando diferentes condiciones de cultivo (medios de crecimiento, temperatura y agitación). Posteriormente, se realiza la extracción de los caldos de cultivo y del micelio de cada una de las especies o aislamientos cultivados; una vez que se han obtenido los extractos de los medios de crecimiento y del micelio se realizan las pruebas biológicas de selección. Éstas pueden ser inespecíficas o específicas. Las pruebas inespecíficas consisten en la determinación del efecto fitotóxico de los extractos derivados mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento vegetal de las especies de prueba. En el caso de las pruebas específicas se utilizan bioensayos conducentes a determinar la actividad de los extractos sobre un blanco de acción específico en la fisiología o en el metabolismo vegetal (Duke y Lydon, 1987; Boyette y Abbas, 1995; Evidente *et al.*, 2001). Los extractos que demuestran una actividad significativa en los bioensayos utilizados se consideran candidatos idóneos para realizar estudios químicos biodirigidos con la finalidad de aislar los compuestos fitotóxicos (Duke y Lydon, 1987; Duke *et al.*, 1995; Strobel, 1991; Boyette y Abbas, 1995; Evidente *et al.*, 2001).

Para la realización de los estudios químicos conducentes al aislamiento y la caracterización de los compuestos responsables del efecto fitotóxico es necesario realizar el cultivo de las especies seleccionadas en gran escala, para así posteriormente obtener los extractos orgánicos a partir de los caldos de crecimiento y del micelio. Los extractos resultantes se someten a estudios químicos biodirigidos para obtener los principios activos. Es importante destacar que a lo largo de todo el proceso químico es necesario realizar los mismos ensayos biológicos utilizados durante el proceso de selección (Duke y Lydon, 1987; Duke y Abbas, 1995; Evidente *et al.*, 2001).

Por último, los compuestos naturales bioactivos se identifican y se someten a ensayos biológicos adicionales y a pruebas de invernadero con la finalidad de determinar su efecto sobre especies vegetales tanto nocivas como de interés agrícola (Duke y Lydon, 1987; Strobel, 1991; Duke y Abbas, 1995; Boyette y Abbas, 1995; Evidente *et al.*, 2001).

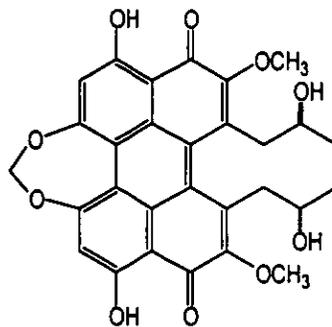
Utilizando la secuencia metodológica descrita anteriormente se han realizado numerosas investigaciones, mismas que han conducido al aislamiento y caracterización química de un gran número de fitotoxinas (~5000) a partir de hongos fitopatógenos. Muchas de estas fitotoxinas constituyen agentes herbicidas potenciales. A continuación se describen algunas de las fitotoxinas fúngicas más relevantes, bien sea por su potencia como agentes fitotóxicos o por su novedoso mecanismo de acción:

a) La tentoxina (1), un tetrapéptido cíclico producido por la especie *Alternaria alternata*, causa una clorosis extrema en una amplia variedad de plantas no relacionadas con su hospedero natural (Boyette y Abbas, 1995); en consecuencia inhibe el crecimiento de una amplia variedad de malezas para las cuales no existen herbicidas efectivos en cultivos combinados. Así la tentoxina controla el crecimiento del “zacatillo” en cultivos de maíz (*Zea mays* L.) y de otras plantas nocivas que crecen en los cultivos de frijol de soya (*Glycine max* (L.) Merr.). Varias industrias agroquímicas han considerado la posibilidad de comercializar esta toxina como un agente herbicida eficaz. Sin embargo, la complejidad de su estructura ha impedido el desarrollo de un proceso de síntesis eficiente. Además los rendimientos del producto en el medio de fermentación son muy bajos (Ballio, 1991; Duke y Lydon, 1992; Boyette y Abbas, 1995).



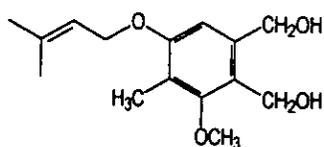
tentoxina (1)

b) La cercosporina (2), una perilenquinona aislada por primera vez del patógeno del frijol de soya *Cercospora kikuchii*, y posteriormente de otras especies del género *Cercospora*, es una toxina no selectiva que afecta a especies de importancia económica como la remolacha azucarera. Los distintos estudios realizados con esta fitotoxina han permitido comprobar que su efecto fitotóxico se debe a sus propiedades fotodinámicas. El compuesto en presencia de luz induce la formación de radicales oxígeno los cuales provocan la peroxidación de los lípidos de las membranas, causando así severos daños en las células vegetales (Ballio, 1991).



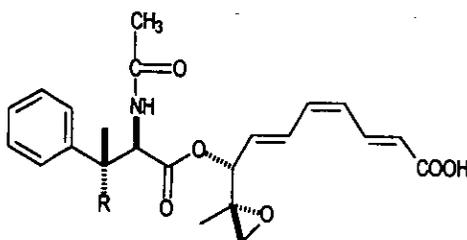
cercosporina (2)

c) El zinniol (3), compuesto aromático aislado de varios cultivos del género *Alternaria* y recientemente de *Phoma macdonaldii* (Ballio, 1991), se une a sitios específicos en los protoplastos ocasionando una estimulación de la entrada de calcio en los mismos. El incremento de la cantidad intracelular de calcio ocasiona a su vez la alteración de varios procesos importantes regulados por el calcio. Este mecanismo puede explicar en gran medida los severos efectos fitotóxicos ocasionados por el zinniol (Ballio, 1991).



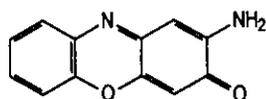
zinniol (3)

d) Las toxinas AK (4–5) son toxinas hospedero selectivas (THS) producidas por la especie *Alternaria alternata*, organismo capaz de inducir necrosis severas en las hojas y en el fruto de la pera japonesa (Strobel *et al.*, 1991). Estas toxinas producen daños drásticos en la membranas de las células vegetales (Strobel *et al.*, 1991; Ueno, 1997).

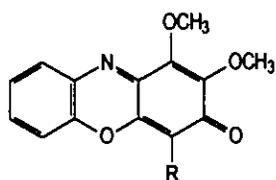


R
 AK-toxina I (4) CH₃
 AK-toxina II (5) H

e) Las toxinas de *Acrospermum viticola*, denominadas trivialmente como toxinas AV C (6), D (7) y E (8), inducen necrosis en las flores y en los frutos de *Morus alba* L. (Strobel *et al.*, 1991).

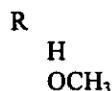


AV-toxina C (6)

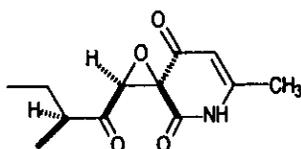


AV-toxina D (7)

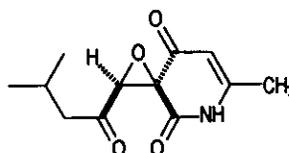
AV-toxina E (8)



f) Las toxinas de la pudrición de la fruta FRTs A (9) y B (10) se aislaron del hongo *Botryosphaeria berengeriana* (estado sexual de *Macrophoma* sp.). Este patógeno causa severos problemas en los frutos del manzano y las toxinas inhiben el crecimiento vegetal de numerosas plantas nocivas.



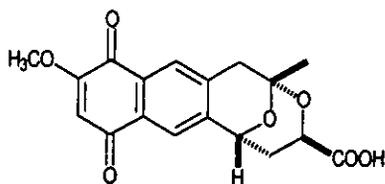
toxina de la pudrición de la fruta A (9)



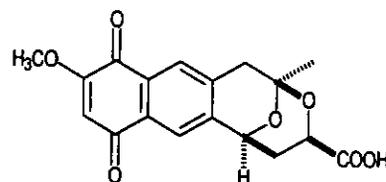
toxina de la pudrición de la fruta B (10)

g) Por último, las fitotoxinas de *Fusarium*, matricina (11) e isomatricina (12), inducen la descarboxilación de los α -cetoácidos e inhiben la enzima glutamino sintetasa, ocasionando

así trastornos en el metabolismo de aminoácidos y, en consecuencia efectos fitotóxicos notables (Cutler, 1991).



matricina (11)



isomatricina (12)

Los hongos fitopatógenos también pueden ser utilizados *per se* para el control biológico de las plantas nocivas. En este caso los hongos se utilizan de acuerdo a dos estrategias, la clásica y la inundativa (TeBeest, 1993; Duke y Abbas, 1995; Charudattan, 1990; Cramer, 2000).

El control biológico clásico involucra la introducción en un determinado ecosistema de enemigos naturales (micoherbicidas) de la especie nociva que se desea combatir (Lax, 1988; Hoagland, 1990; TeBeest, 1993; Duke y Abbas, 1995; Charudattan, 1990; Cramer, 2000). Esta estrategia tiene su origen en las investigaciones realizadas con *Puccinia chondrillina* Bubak. & Syd. en Australia para el control de la especie *Chondrilla juncea* L. (TeBeest, 1993). Otro hongo utilizado exitosamente para el control de especies nocivas es *Cercospora ageratinae*, el cual fue introducido en 1975 desde Hawai a Jamaica para controlar la "hamakua pamakani" *Ageratina riparia* K. & R. (= *Eupatorium riparium* Rigel) (TeBeest, 1993). En ambos casos los resultados fueron ampliamente satisfactorios ya que se obtuvo un porcentaje de erradicación de la planta nociva del 80% durante el primer año de aplicación. Esta estrategia requiere de un mínimo de manipulación y el nivel de la

infección depende de la cantidad del patógeno que se aspersa, del desarrollo de la infección y de las poblaciones del hospedero y del patógeno (TeBeest, 1993; Rhodes, 1993).

La segunda estrategia conocida comúnmente como “inundativa” implica la utilización de hongos fitopatógenos (micoherbicidas), que infectan selectivamente a la especie deseada. A diferencia de la estrategia clásica, los micoherbicidas se aplican antes de la aparición de los daños ocasionados por la especie nociva (Strobel, 1991; TeBeest, 1993; Rhodes, 1993).

Las investigaciones realizadas sobre diversas especies de hongos ha permitido la introducción en el mercado de las especies *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. y E.H. Sm.) posteriormente clasificado como *Phytophthora palmivora* (Butl.) (DeVine®), *Colletotricum gloesporoides* (Penz.) Sacc. F. sp. *aeschyonomene* (CGA) (Collego®) y *Colletotricum gloesporoides* F. sp. *malvae* (BIOMAL®), los cuales han sido comercializados por Abott, Ecogen y Philom Bios, respectivamente (Strobel, 1991; TeBeest, 1993; Rhodes, 1993).

Phytophthora palmivora se utiliza como bioherbicida desde 1981 para controlar el crecimiento de la especie *Morrenia odorata* Lindl. en los huertos de cítricos en el Estado de Florida, Estados Unidos. La formulación comercial consiste en un líquido concentrado conteniendo las esporas del hongo que se conserva en refrigeración. Una de las mayores desventajas de la aplicación de esta formulación es la capacidad que tiene este hongo fitopatógeno de infectar plantas de interés económico como cebolla, melón, chícharo y tomate (Strobel, 1991; TeBeest, 1993; Rhodes, 1993; Cramer, 2000; Warrior, 2000).

C. gloesporoides F. sp. *aeschyonomene* (CGA) se introdujo al mercado en 1982 para el control de la especie *Aeschyonomene virginica* (L.) BSP, planta nociva que afecta los cultivos de soya y arroz en algunas regiones de los Estados Unidos. El preparado comercial de *C. gloesporoides* consta de dos partes: la primera es un polvo a base de las esporas

desechadas del hongo y la segunda, una solución concentrada de glucosa que permite humectar las esporas antes de su aplicación (Strobel, 1991; TeBeest, 1993; Rhodes, 1993). En la última década se han registrado numerosas especies de hongos para su posible utilización como bioherbicidas, pero aún no se ha logrado su comercialización. Entre los principales problemas que han evitado la comercialización de estos micoherbicidas podemos destacar aquellos relacionados con los procesos de descubrimiento, investigación y desarrollo de formulaciones adecuadas; las limitantes económicas para su utilización; el rango de hospederos; la patogenicidad del hongo; la incapacidad para producir proplagas fúngicas infectivas y fallas en el desarrollo de una formulación adecuada para obtener un control apropiado. De manera adicional, el mercado proyectado es en ocasiones muy limitado para justificar los gastos de investigación y desarrollo (Strobel, 1991; TeBeest, 1993; Rhodes, 1993).

En la actualidad las investigaciones de los hongos fitopatógenos con la finalidad de determinar su potencial como bioherbicidas ha continuado y se encuentran en evaluación especies de hongos de diversos géneros entre los que destacan *Alternaria*, *Ascochyta*, *Bipolaris*, *Cercospora*, *Colletorichum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phytophthora*, *Puccinia* y *Sclerotinia* (Strobel, 1991; TeBeest, 1993; Rhodes, 1993).

1.2. Generalidades del Género *Phoma*.

1.2.1 Taxonomía

El género *Phoma* pertenece a la división *Eumycota*; subdivisión *Deuteromycotina*. Esta última, agrupa cerca de 17,000 especies de hongos conocidos también como hongos imperfectos, es decir, hongos cuyo estado sexual perfecto se desconoce y presentan un micelio bien desarrollado, con conidióforos característicos, aunque algunas especies tienen un talo unicelular, carecen de conidios y solo producen esclerocios.

El género *Phoma* pertenece a la clase *Coelomycetes* y al orden *Sphaeropsidales*. Los hongos de este orden se caracterizan por producir sus conidios en picnidios, los cuales pueden variar mucho según las especies. Los picnidios pueden desarrollarse en la superficie del sustrato o estar inmersos en este; ser globosos, alargados o cupuliformes, uniloculares o multiloculares, y de color claro u oscuro. Según estas características los *Sphaeropsidales* se dividen en cuatro familias: *Sphaeropsidaceae*, con picnidios de color oscuro, globosos, de consistencia carbonosa o de piel, estromáticos o no estromáticos, y generalmente provistos de ostíolo; *Zythiaceae*, con picnidios como los de *Sphaeropsidaceae*, pero de color claro y de consistencia suave o cerosa. Las otras dos familias son *Leptostromataceae*, con picnidios en forma de escudo, alargados y aplanados, y *Exipulaceae* (= *Discellaceae*), con picnidios en forma de plato o de copa (Domsch, 1990; Carlile *et al.*, 1998). La familia *Sphaeropsidaceae* incluye numerosas especies saprobias y parásitas de plantas. Entre los géneros más importantes de esta familia se encuentran *Phoma*, *Macrophoma*, *Phyllosticta*, *Dendrophoma* y *Phomopsis*.

El género *Phoma* comprende unas 2,000 especies, las cuales habitan en ramas y tallos de plantas y forman picnidios con conidios pequeños y hialinos (Herrera y Ulloa, 1990; Carlile *et al.*, 1998). Un número importante de especies del género *Phoma* ocasionan daños a

numerosas especies vegetales de importancia agrícola alrededor del mundo (Agrios, 1985; Pedras *et al.*, 1990). En la siguiente sección se abordará con más detalle este aspecto.

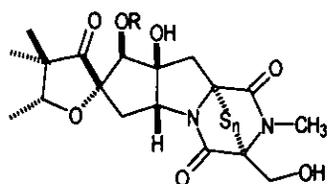
En el caso particular de México muchas especies de este género afectan granos de importancia económica y en particular al sorgo y al maíz (García, comunicación personal).

1.2.2 Estudios químicos y biológicos.

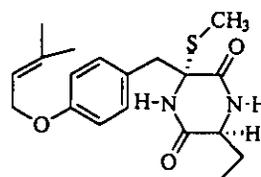
Los estudios químicos realizados sobre varias especies del género *Phoma* han permitido el aislamiento de una gran cantidad de metabolitos secundarios con una amplia diversidad de estructuras y propiedades biológicas. A continuación se presentan los compuestos aislados de las diferentes especies del género *Phoma* que han sido estudiadas a la fecha y sus propiedades biológicas.

Quizás, la especie perteneciente a este género que ha recibido una mayor atención desde el punto de vista químico es *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm., estado asexual de *Leptosphaeria maculans* (Desm) Ces. Et de Not. Este hongo parasita a las especies *Brassica napus* (canola) y *B. campestris* (canola), *B. oleracea* (col) ocasionando una enfermedad conocida como la "pierna negra de las crucíferas". Además, el hongo provoca el manchado de las hojas y cáncer del tallo en otras especies. Los estudios químicos bidirigidos de diferentes aislamientos de este hongo han permitido la obtención y la caracterización de una amplia variedad de compuestos entre los que destacan las sidoresminas PL (13), H (14), J (15), K (16), L (17) y la desacetilsidoresmina (18), que tienen la particularidad de presentar azufre en sus moléculas; la 3-(metiltio)-fomamida (19), la fomalizarina (20), la fomalida (21), la fomamida (22), la fomaligina A (23), la toxina hospedero selectiva fomalairdenona (24), los fomaligoles A y A₁ (25-26) y las fomaligadionas A y B (27-28) (Pedras *et al.*, 1990; Pedras y Abrams, 1989; Ferezou *et al.*,

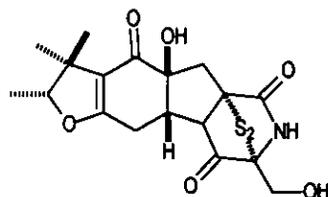
1980; Devis *et al.*, 1984; Pedras *et al.*, 1999; Pedras *et al.*, 1998). Todos los compuestos antes mencionados han demostrado una actividad fitotóxica muy potente. Otros metabolitos aislados de esta especie son el ácido fomenoico (PLM-I) (29) y la fomenolactona (PLM-II) (30), derivados de ácidos grasos que presentan actividad antifúngica y antimicrobiana *in vitro* (Devis *et al.*, 1986).



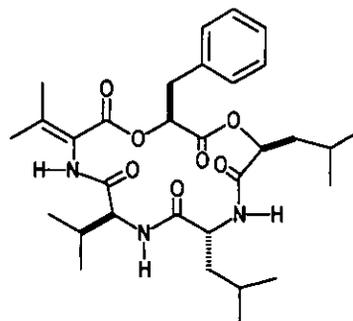
sidoresmina PL (13) R= Ac, n=2
sidoresmina H (14) R= Ac, n=1
sidoresmina J (15) R= Ac, n=4
sidoresmina K (16) R= H, n=4
sidoresmina L (17) R= H, n=6
deacetilsidoresmina PL (18) R= H, n=2



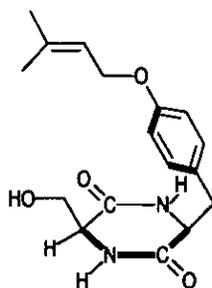
3-(metiltio)-fomamida (19)



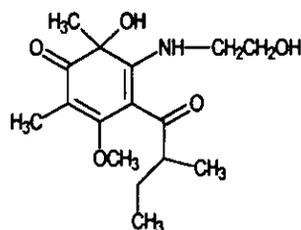
fomalizarina (20)



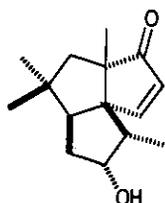
fomalida (21)



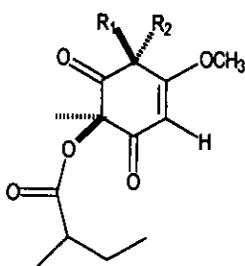
fomamida (22)



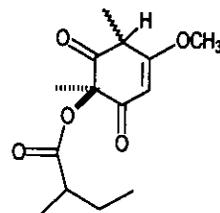
fomaligina A (23)



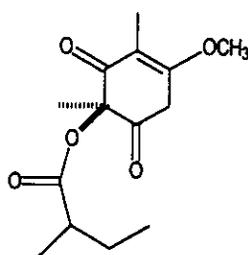
fomalairdenona (24)



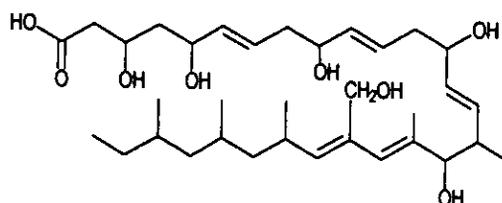
fomaligol A, $R_1=CH_3$, $R_2=OH$ (25)
fomaligol A₁, $R_1=CH_3$, $R_2=OCH_3$ (26)



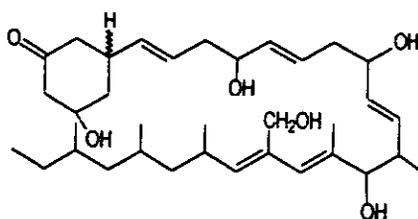
fomalgadiona A (27)



fomalgadiona B (28)



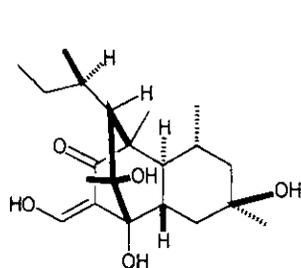
ácido fomenoico (PLM-I) (29)



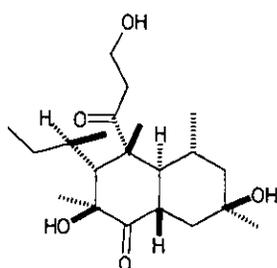
fomenolactona (PLM-II) (30)

De *Phoma betae* Fries (sinonimia: *Phyllosticta betae*), hongo que parasita a la remolacha azucarera, se han aislado una serie de compuestos fitotóxicos derivados de la decalina, los cuales se designaron con los nombres triviales de betaenonas A (31), B (32), C(33), D (34), E (35) y F (36). Estos compuestos presentan una potente actividad inhibidora del crecimiento radicular de la especie hospedera natural y del arroz. De manera adicional, estos compuestos inhiben la síntesis de proteínas y del RNA *in vivo* en la gástrula de la estrella de mar (Ichihara *et al.*, 1983a y 1983b).

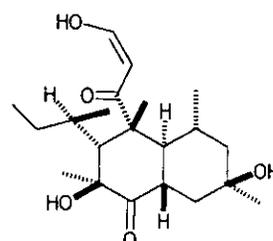
Otro grupo de compuestos aislados y caracterizados de esta especie son la afidicolina (37) y sus análogos 3-desoxiafidicolina (38), la afidicolina-3,18-ortoacetato (39) y la 17-O-acetilafidicolina (40). Estos cuatro metabolitos son potentes inhibidores de la síntesis de DNA. Por último, el tratamiento del micelio del hongo con inhibidores de la enzima citocromo P-450 ha permitido el aislamiento de varios análogos de la afidicolina (41-43) (Sakamura *et al.*, 1988; Oikawa *et al.*, 1997).



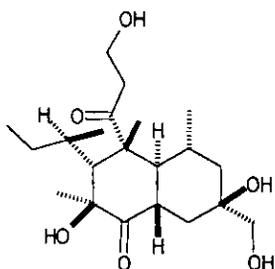
betaenona A (31)



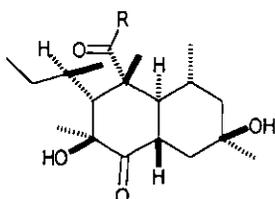
betaenona B (32)



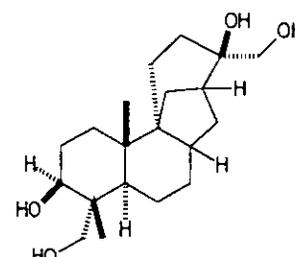
betaenona C (33)



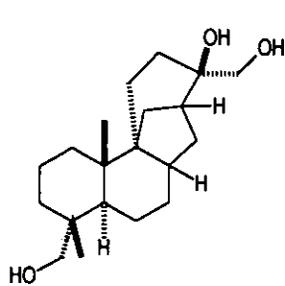
betaenona D (34)



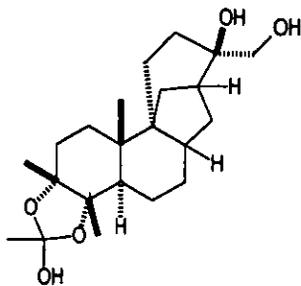
betaenona E. R= CH₃ (35)
betaenona F. R= CH₂CH₂OAc (36)



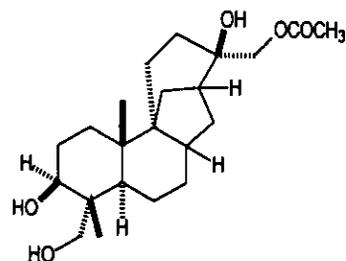
afidicolina (37)



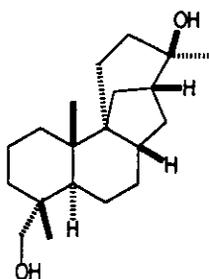
3-desoxiafidicolina (38)



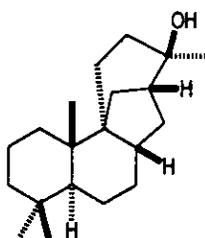
afidicolina-3,18-ortoacetato (39)



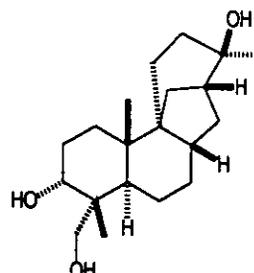
17-O-acetilafidicolina (40)



afidicolan-16β,18-diol (41)



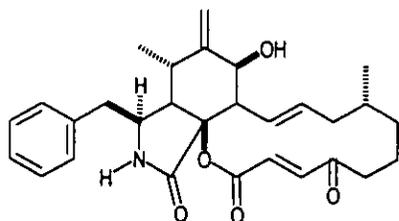
afidicolan-16β-ol (42)



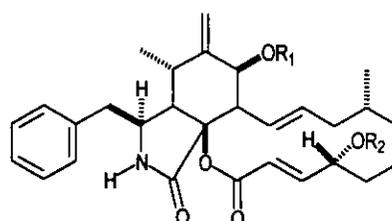
afidicolan-16β,17,18-triol (43)

Los estudios químicos sobre *Phoma exigua* var *heteromorpha* (Schulzer et Sacc.) Noordebos et Bohema (= *Ascochyta heteromorpha* (Schulzer et Sacc) Cursi), agente causal de un padecimiento foliar de *Nerium oleander* L., condujeron al aislamiento de las citochalasinas A (44), B (fomina) (45), F (46), T (47), U (48), V (49), la 7,20-O,O-diacetilcitochalasinina (50), 7-O-acetilcitochalasinina B (51), la deoxofomina (52) y la ascochalasinina (53) (Aldridge et al., 1972; Capasso et al., 1991; Robert y Tamm, 1975; Aldridge et al., 1967; Capasso et al., 1988). Por otra parte, los estudios químicos sobre las especies *P. exigua* var *inoxidabilis* Boerema et Vegh y *P. destructiva* Powr conllevaron al aislamiento de la fomenona (54) (Riche et al., 1974; Capasso, et al., 1986). Los compuestos mencionados anteriormente presentaron una notable actividad fitotóxica y antifúngica y son tóxicos para el crustáceo *Artemia salina*. La citochalasinina F (46) demostró una mayor potencia como agente herbicida, en tanto que la citochalasinina V (49) fue el compuesto más

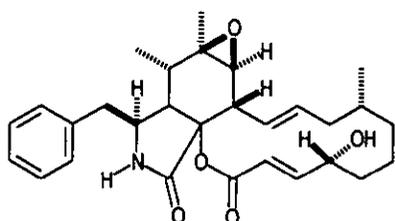
tóxico para *Artemia salina* (Riche *et al.*, 1974; Capasso *et al.*, 1986; Aldridge *et al.*, 1972; Capasso *et al.*, 1991; Robert y Tamm, 1975; Aldridge *et al.*, 1967; Capasso *et al.*, 1988).



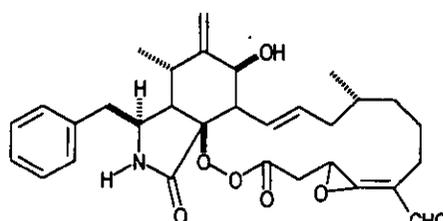
citochalasin A (44)



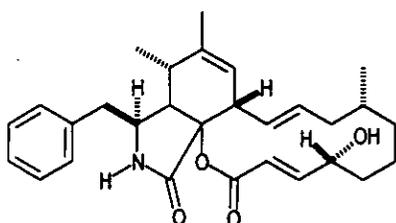
citochalasin B (fomina), $R_1=R_2=H$ (45)
7,20-O,O-diacetilcitochalasin B, $R_1=R_2=Ac$ (50)
7-O-acetilcitochalasin B, $R_1=Ac, R_2=H$ (51)



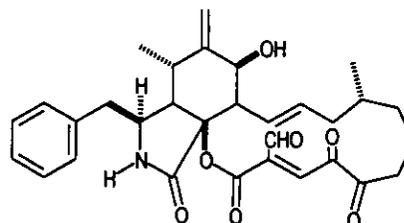
citochalasin F (46)



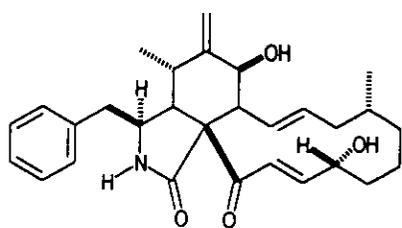
citochalasin U (48)



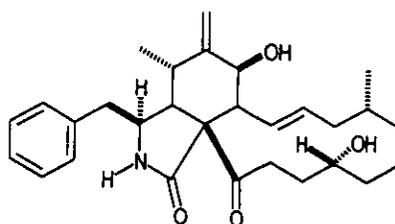
citochalasin T (47)



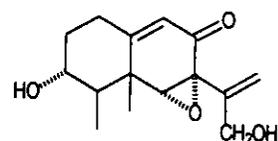
citochalasin V (49)



deoxofomina (52)

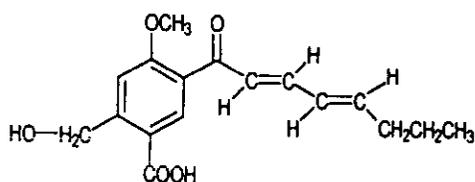


ascochallasina (53)

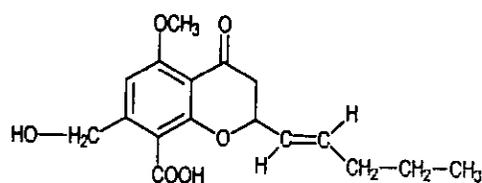


fomenona (54)

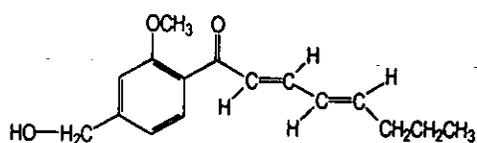
De *Phoma cava* Schulzer, especie que parasita una especie de castaña (*Castanea* sp.), se han aislado una serie de compuestos aromáticos que incluyen a la carvoxina (55), la carvoxona (56), la carvoxinina (57) y la carvoxinona (58). Sin embargo, la potencialidad fitotóxica de estos compuestos no ha sido aún evaluada (Evidente *et al.*, 1985; Evidente, 1987).



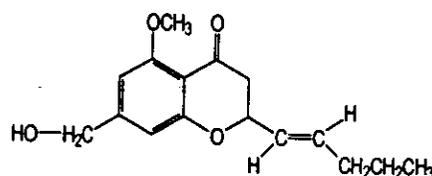
carvoxina (55)



carvoxona (56)

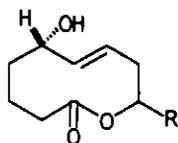


carvoxinina (57)

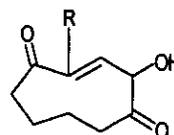


carvoxinona (58)

De *Phoma putaminum*, hongo causal de necrosis en la especie *Erigeron annuus* (L.) Pers, se aislaron las fitotoxinas denominadas putaminoxinas A (59), B (60) y C (61). Estos compuestos demostraron actividad fitotóxica significativa sobre la especie huésped y sobre una serie de especies no relacionadas (Evidente *et al.*, 1995 y 1997).



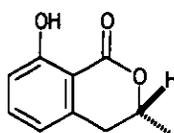
putaminoxina A, R= CH₂CH₂CH₃(59)



putaminoxina B, R= CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃ (60)

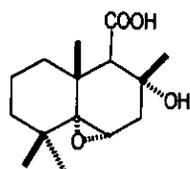
putaminoxina C, R= CH₂CH₂CH₃ (61)

De la especie *Phoma trachephila* (Petri) Kanc et Gik, organismo causal de la enfermedad de los cítricos “mal seco”, se obtuvo la *R*-(–)-meleina (62). Este metabolito se ha obtenido también de *Aspergillus melleus*, *A. oniki*, *A. ochraceus*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Septoria nodorum* y *Botryosphaeria obtusa*. Estudios biológicos preliminares indican que el producto ocasiona una reducción en la asimilación de CO₂ en semillas de trigo germinadas, y además es tóxico para ratones (Parisi *et al.*, 1993). Por último, estudios recientes sobre esta especie condujeron al aislamiento de una glicoproteína extracelular (Pt60) designada con el nombre común de malsequina. Esta proteína presenta una notable actividad fitotóxica contra varias especies de cítricos (Parisi *et al.*, 1993).

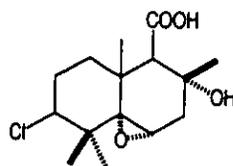


meleina (62)

De la especie *Phoma asparagi* Sacc., hongo que ocasiona el marchitamiento del espárrago, se aislaron los sesquiterpenoides altiltoxinas A (63) y B (64). Estos compuestos presentan una baja actividad fitotóxica sobre semillas de espárrago y lechuga (Ichihara *et al.*, 1984).

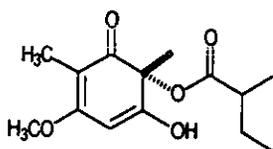


altitoxina A (63)

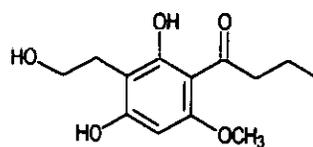


altitoxina B (64)

Otras especies del género que se han estudiado son *Phoma wasabiae* Yokogi y *Phoma etheridgei*, de las cuales se han aislado la wasabiedienona A (65) y la fomalona (66), respectivamente. A la wasabiedienona A no se le ha descrito ninguna actividad biológica (Soga *et al.*, 1987) en tanto que la fomalona (66) presentó un actividad antifúngica contra diversos organismos de prueba, especialmente contra *Phenillus tremulae* y *Ophiostoma crassivaginata* (Ayer *et al.*, 1994).

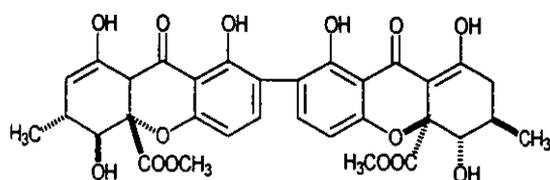


wasabiedienona A (65)

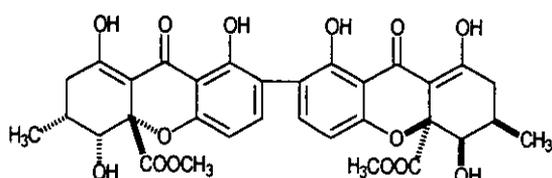


fomalona (66)

Estudios sobre la especie *Phoma terrestris* Hansen han permitido el aislamiento de dos dímeros de xantonas, los cuales también han sido aislados de *Claviceps purpurea* y de *Penicillium oxalicum*. Estos compuestos recibieron los nombres triviales de ácidos secalónicos A (67) y E (68) (Howard *et al.*, 1973a y 1973b).

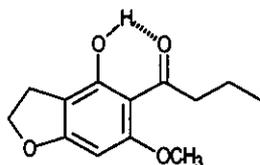


ácido secalónico A (67)

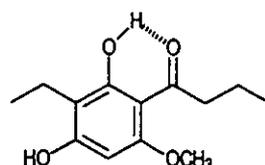


ácido secalónico E (68)

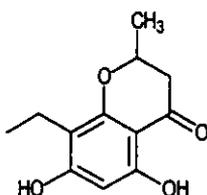
De la especie *Phoma etheridgei* sp. nov., aislada del aspen (*Populus tremuloides* Michx.) se han aislado una serie de metabolitos aromáticos como la fomalona (66), el 4-hidroxi-6-metoxi-5-(1'-oxobutil)benzo[b]dihidrofurano (69), la 3-etil-2,4-dihidroxi-6-metoxibutiropfenona (70), la 8-etil-5,7-dihidroxi-2-metilcroman-4-ona (71) y la (*E*)-2,4-acetoxi-3-(2-acetoxietil)-6-metoxi-2'-en-butiropfenona (72). La fomalona (66) presenta propiedades antifúngicas sobre las especies *Phenillus tremulae* y *Ophiostoma crassivaginata* (Ayer y Jiménez, 1994).



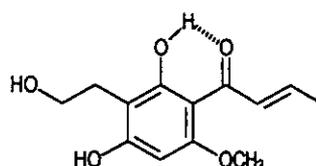
4-hidroxi-6-metoxi-5-(1'-oxobutil)benzo[b]dihidrofurano (69)



3-etil-2,4-dihidroxi-6-metoxi-butiropfenona (70)

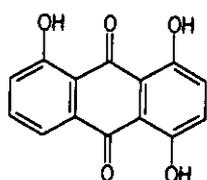


8-etil-5,7-dihidroxi-2-metilcroman-4-ona (71)

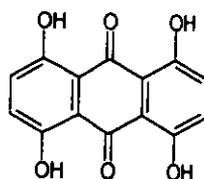


(*E*)-2,4-acetoxi-3-(2-acetoxietil)-6-metoxi-2'-en-butiropfenona (72)

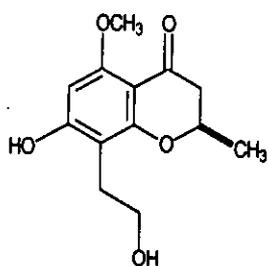
De la especie *Phoma herbarum* Westend se obtuvieron las antraquinonas helmintosporina (73) y cinodontina (1-hidroxihelmintosporina) (74), y tres cromanonas designadas con las claves LL-D253 α (75), LL-D253 β (76) y LL-D253 γ (77) (Domsch, 1982; McGahren *et al.*, 1972; Chandler, *et al.*, 1992a; 1992b).



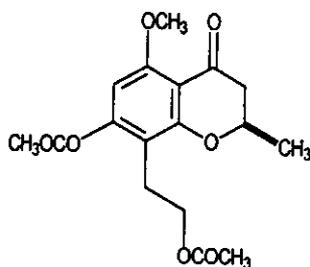
helmintosporina (73)



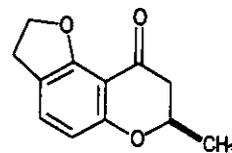
cinodontina (74)



LL-D253 α (75)

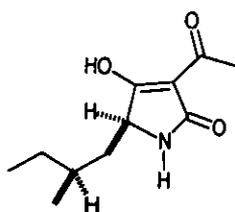


LL-D253 β (76)



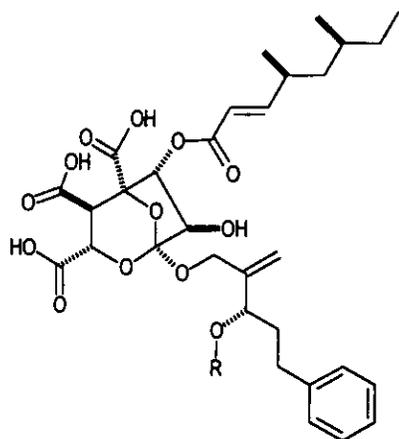
LL-D253 γ (77)

De *Phoma sorghina* se obtuvo el ácido (5*S*,8*S*)-3-acetil-5-*sec*-tetrámico (78), mejor conocido con el nombre trivial de ácido tenuazónico (TA). Este metabolito ha sido descrito previamente en especies del género *Alternaria* y en *Pyricularia oryzae*. Entre las propiedades biológicas que se describen para este ácido destacan su potente efecto inhibidor de la síntesis de proteínas y sus propiedades antitumorales, antivirales y antibióticas (Shephard *et al.*, 1991).

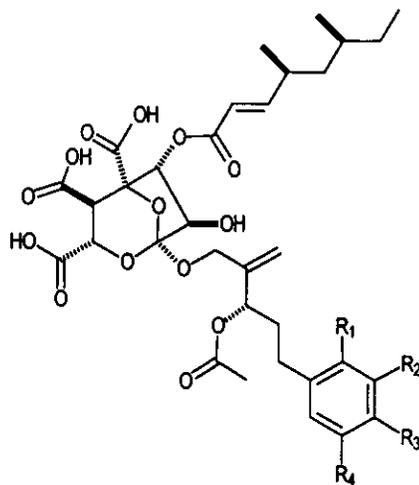


ácido tenuazónico (78)

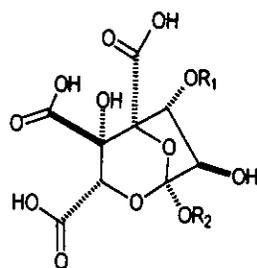
Los estudios sobre varios aislamientos del género que no han sido clasificados a nivel de especie han permitido la obtención de varios productos también con interesantes estructuras y actividades biológicas. Así la investigación del aislamiento C2932 obtenido de un suelo de la región portuguesa de Armacao de Pera condujo a la obtención de una serie de potentes inhibidores de la enzima escualeno sintetasa (SQS), las escualestatinas S1, S2 y H (79–81) (Dawson *et al.*, 1992; Sidebottom *et al.*, 1992). Estudios posteriores sobre el mismo hongo conllevaron al descubrimiento de los derivados fluorados de las escualestatinas S1, S2 y H1 (82–88) y de las escualestatinas minoritarias H1 (89), T1 (90), U1 (91), U2(92), V1 (93), W1 (94), W2 (95), X1 (96), Y1 (97), V2 (98), S3 (99), S4 (100), H5 (101), S5 (102), H6 (103), H7 (104), S8 (105) (Jones *et al.*, 1992; Cannell *et al.*, 1993; Blows *et al.*, 1994).



escualestatina S1 ; R= COOCH₃ (79)
 escualestatina S2; R= H (80)
 escualestatina H1; R= COOCH₃ (81)

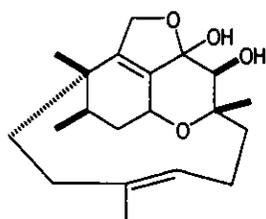


R₁=R₂=R₃=R₄=H (82)
 R₁=R₂= R₄=H, R₃=F (83)
 R₁= R₃=R₄=H, R₂=F (84)
 R₂=R₃=R₄=H, R₁=F (85)
 R₁=R₄=H, R₂=R₄=F (86)
 R₁=R₃=H, R₂=R₄=F (87)
 R₁=R₂=F, R₃=R₄=H (88)

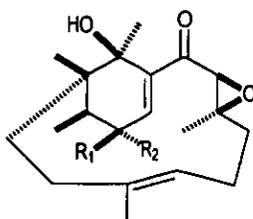


| R_1 H | Letra H | R_2 | Número |
|------------|------------|-------|--------|
| | S | | 1 |
| | T | | 2 |
| | U | | 3 |
| | V | | 4 |
| | W | | 5 |
| | X | | 6 |
| | Y | | 7 |
| | | | 8 |
| | | | 9 |

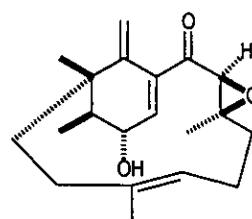
Del aislamiento de SANK 114861 (obtenido de la concha del cangrejo *Chinoecetes opilio* colectada en la costa de Fukui, Japón) se obtuvieron una serie de potentes inhibidores del factor de agregación plaquetario (PAF) denominados fomactinas A, B, B1, B2, C, D, E, F y G (111–119) (Sugano *et al.*, 1991; 1994; 1995).



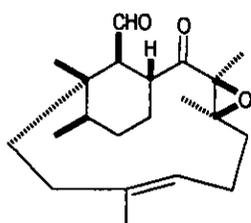
fomactina A (111)



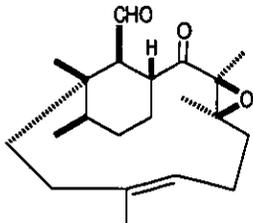
fomactina B, $R_1=H$, $R_2=OH$ (112)
fomactina B₁, $R_1=OH$, $R_2=H$ (113)



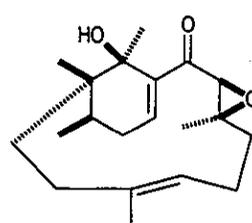
fomactina B₂ (114)



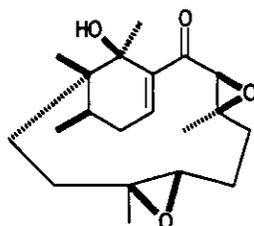
fomactina C (115)



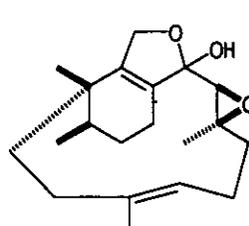
fomactina D (116)



fomactina E (117)

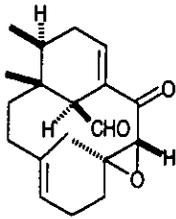


fomactina F (118)

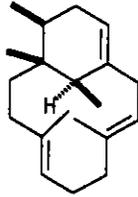


fomactina G (119)

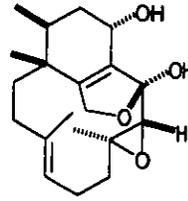
De *Phoma* ATCC 74047 se logró el aislamiento y la caracterización de una serie de compuestos macrocíclicos de 14 miembros conteniendo un segundo ciclo de seis miembros denominados con las claves Sch47918 (120), Sch49026 (121), Sch49027 (122) y Sch49028 (123) (Chu *et al.*, 1993; Sagano *et al.*, 1991; 1994; 1995).



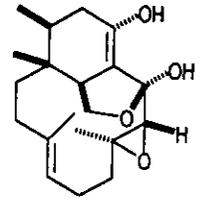
Sch47918 (120)



Sch49026 (121)

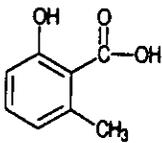


Sch49027 (122)

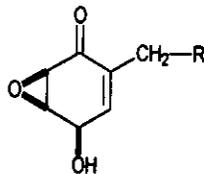


Sch49028 (123)

De un aislamiento de *Phoma* que parasita al ruibarbo, se han aislado cuatro fitotoxinas aromáticas que fueron identificadas como el ácido 6-metilsalicílico (124), el epoxidón (125), el desoxiepoxidón (126) y la 4,5-dihidroxi-6-(6'-metilsaliciloxi)-2-hidroximetil-2-ciclohexen-2-ona (127) (Venkatasubbaian y Chilton, 1992).

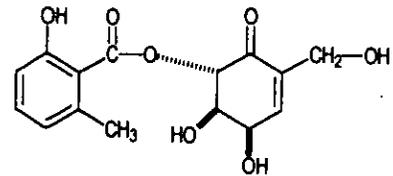


6-metilsalicílico (124)



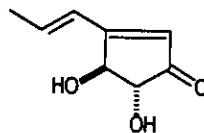
R= OH epoxidón (125)

R= H desoxiepoxidón (126)



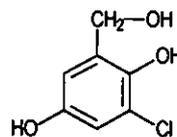
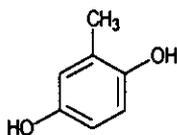
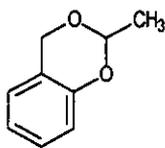
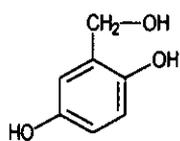
4,5-dihidroxi-6-(6'-metilsaliciloxi)-
2-hidroximetil-2-ciclohexen-2-ona (127)

De *Phoma* NRRL 3188 se obtuvo la terreína (128). Este metabolito también ha sido encontrado en otras especies de hongos entre las que destacan *Aspergillus terreus*, *A. fischeri*, *A. stellatus* y *Penicillium raistrickii*. A la fecha la potencialidad biológica de esta pentenona no ha sido investigada (Dunn, 1975).



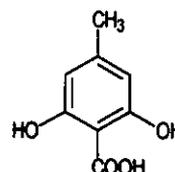
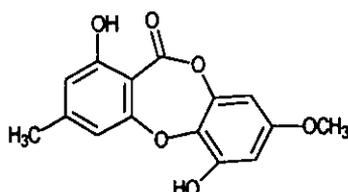
terreína (128)

De *Phoma* S729 se han aislado varios compuestos aromáticos simples derivados del alcohol gentisílico (129) y que incluyen al gentisilacetal (130), la toluhidroquinona (131) y al alcohol clorogentisílico (132) (Sequin-Frey y Tam; 1971).



alcohol gentisílico (129) gentisilacetal (130) toluhidroquinona (131) alcohol clorogentisílico (132)

De otro aislamiento de *Phoma* (s/n) recolectado en Barceloneta, Puerto Rico se aislaron una serie de difenil ésteres denominados ácidos barcelónicos A (133) y B (134), la lactona barcelonéica (135) y el compuesto 4-metil-2,6-dihidroxibenzoico. (136). Estos ácidos presentan un potente efecto inhibidor de la enzima farnesil transferasa (Jayasuriya *et al.*, 1995).



ácido barcelónico A (133)

$R_1=CH_2OH$; $R_2=R_3=R_4=H$

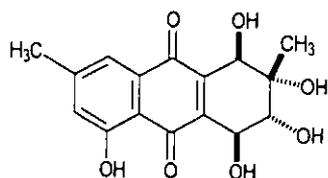
ácido barcelónico B (134)

$R_1=COOH$; $R_2=R_3=R_4=H$

lactona barcelonéica (135)

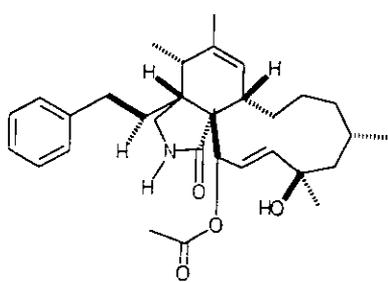
4-metil-2,6-dihidroxi-
benzoico (136)

De un aislamiento de *Phoma* asociado con el árbol *Taxus wallachiana* (yew de Nepal) se aislaron dos antibióticos identificados como el altersolanol A (137) y el ácido 6-metilsalicílico (124). El altersolanol A (137) se ha aislado previamente de especies de *Alternaria* y de *Dactylaria lutea* y es un antibiótico de amplio espectro destacándose su actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus* sp. (Yang *et al.*, 1994).

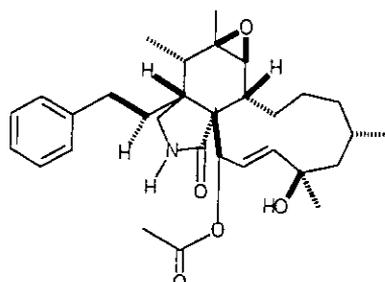


altersolanol A (137)

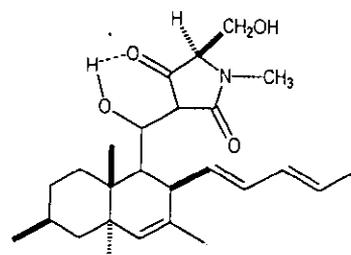
Del aislamiento SNF1778 se obtuvieron el RKS-1778 (138) y la epoxicitochalasinina H (139). Estos compuestos inhiben la mitosis a dosis de 2.1 y 2.0 mM, respectivamente. Por último, del aislamiento MF 6070 (ATCC 74348) se caracterizó un potente inhibidor de la enzima integrasa del HIV-1 que recibió el nombre trivial de fomasetina (140) (Kakeya *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1998).



RKS-1778 (138)



epoxicitochalasinina H (139)



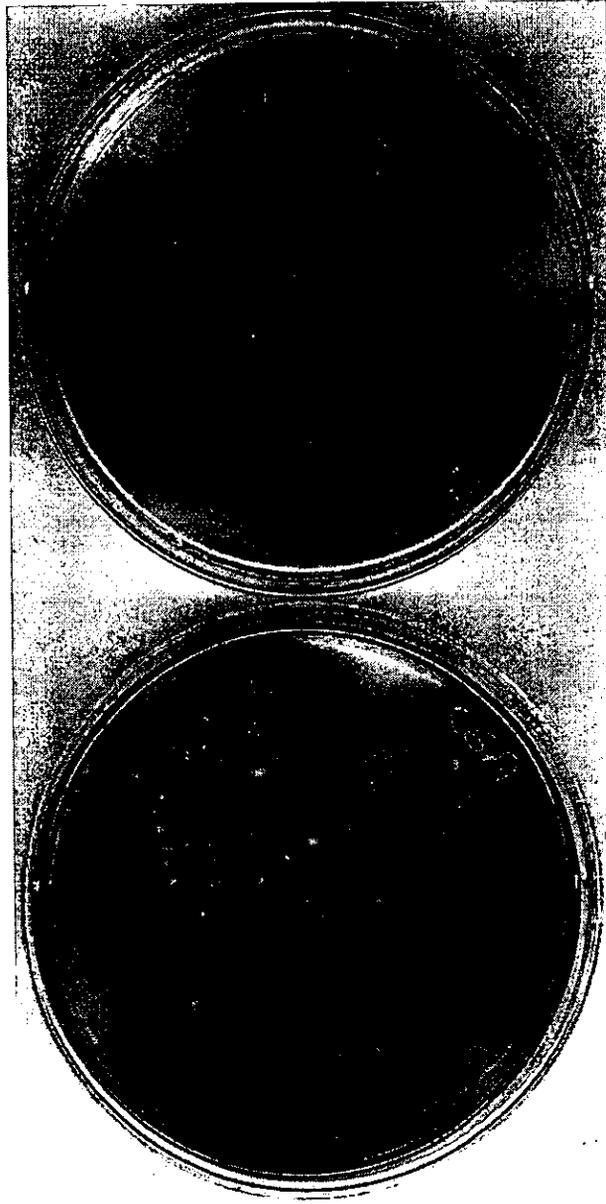
fomasetina (140)

1.3 Antecedentes de *Phoma herbarum* Westend y de *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema, Dorenbosch & van Kesteren.

Phoma herbarum [sinonimias: *Phoma urticae* S. Schulz & Sacc., *Phoma oleraceae* Sacc., *Phoma violaceae* (Bertel) Eveleigh, *Phoma pigmentivora* Masee, *Phoma hibernicola* Grimes, O'Connor & Cummins, y *Phoma lignicola* Rennerfelt] es un hongo con una distribución muy amplia; crece en sustratos tales como la madera de plantas, suelo y agua, principalmente en suelos de las zonas templadas, aunque numerosos reportes describen su presencia en las áreas subtropicales de Irak, Egipto, Israel y la India. Este hongo también ha

ha sido detectado en bosques, suelos cultivados y sin cultivar, pastizales, suelos con vegetación de tundra, dunas de los desiertos, composta de los jardines, aguas frescas y contaminadas y en los sedimentos de los ríos. La especie *P. herbarum* tiene como característica relevante la de resistir la sequía estacional de los suelos. Este hongo ha sido aislado de cultivos de importancia económica como son trigo, papa, pistaches, maíz y madera de los pinos (Domsch, 1982; Darby 1993).

El crecimiento de *P. herbarum* es altamente variable y es afectado por una exposición constante a la luz. Sin embargo, la formación del pigmento violeta que lo caracteriza se estimula por la luz. Este hongo crece en un intervalo de pH que varía desde 3 hasta 8, siendo el rango óptimo entre 4.5 y 7.5. La producción de picnidios se encuentra favorecida a temperaturas que varían entre los 18 y 21°C. El crecimiento vegetativo se ve favorecido a temperaturas que oscilan entre 22 y 25°C. El punto de muerte térmica del hongo determinado en suelo es de 75°C durante 30 minutos. *P. herbarum* presenta un crecimiento muy pobre en atmósferas carentes de O₂, en estas condiciones se requiere de tiamina y biotina para un buen crecimiento. Este hongo ha sido reportado como patógeno de la *Acacia mearnsii* y recientemente como patógeno para el diente de león (*Taraxacum officinale*) y de la *Avena fatua* por inoculación artificial. De manera adicional, se ha reportado que inhibe el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa in vitro* (Olembo, 1972; Domsch, 1982; Brebaum y Borland, 1999). Como se indicó previamente en los antecedentes químicos del género *Phoma*, esta especie biosintetiza helmintosporina (73), cinodontina (74), LL-D253 α (75), LL-D253 β (76) y LL-D253 γ (77) (Domsch, 1982; McGahren *et al.*, 1972; Chandler, *et al.*, 1992a; 1992b).



Phoma herbarum Westend

Phoma sorghina (Sacc.) Boerema, Dorenbosch & van Kesteren [sinónimos: *Phoma indianensis* (Desphande & Mantri) Boerema, Dorenbosch & van Kesteren, *Phoma glumarum* Ell & Tracy y *Phillosticta glumarum*] es un hongo de amplia distribución en el mundo encontrándose en más de 50 países. Este hongo se ha aislado de diversos cultivos de importancia económica como el sorgo, arroz, maíz, ajonjolí, trigo, chícharo, soya, acacia, mango y girasol, entre otros. Se ha encontrado también que esta especie es patógena para *Parthenium hysterophorus*, *Striga hermonthica*, *Sorghum halepense*, *Grevillea pteridifolia* y *Eichhria crassipes* (Kumar *et al.*, 2000; Abbasher *et al.*, 1998; Malavolta y Bedendo, 1999; Gupta *et al.*, 1999; Bonilla, *et al.*, 1999; Nyvall y Ajavi, 1999; Chaluat y Perris, 1994; Abbasher *et al.*, 1995; Dadwal y Jmaluddin, 1991; Fisher y Petrini, 1992; Venkatasubbaiah *et al.*, 1992; Khamees y Schlosser, 1990; Rao y Mallaiiah, 1988; Mohanan y Sharma, 1988; Tarp *et al.*, 1987; Sugha y Singh, 1987; Om y Raoof, 1985; Gbodi *et al.*, 1986; Rahim y Tawfig, 1984; Wallbridge, 1981).

P. sorghina se caracteriza por poseer colonias extremadamente variables, usualmente con un micelio apelmazado y denso, verde-grisáceo, verde olivo u oscuro, pero con áreas características de color blanco o rosa salmón; el medio de crecimiento se colorea de rojo. Sus conidios miden de 4–5 x 2–2.5 μm y son elipsoides y egutulados. Posee clamidiosporas unicelulares o parecidas a las de *Alternaria* (Sutton, 1980). Desde el punto de vista químico los estudios previos permitieron la caracterización del ácido tenuazónico (78) (Shephard *et al.*, 1991).

1.4 Lactonas naturales con anillos de diez miembros.

Las fitotoxinas novedosas obtenidas en el presente estudio son lactonas macrocíclicas de 10 miembros, por tal motivo se consideró pertinente incluir una breve revisión bibliográfica acerca de este grupo de compuestos. Las lactonas macrocíclicas naturales de 10-miembros (nonenólidas) son compuestos de origen policétido. Estos metabolitos naturales se encuentran distribuidos en diversos organismos de los reinos vegetal, animal, protista y fúngico, siendo más abundantes en estos dos últimos. En 1975 el grupo de Wada describe el aislamiento de las primeras nonenólidas a partir del medio de cultivo del hongo fitopatógeno *Diplodia pinea* (IFO 6472) (Dräger *et al.*, 1995). Estas lactonas se designaron con los nombres triviales de diplodialidas A–D (Wada e Ishida, 1975). Desde el descubrimiento de Wada hasta la fecha, se han aislado 50 nonenólidas adicionales, la mayoría a partir de hongos y actinomicetos (Dräger *et al.*, 1995).

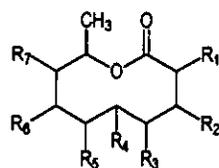
Dräger y colaboradores (1995) clasifican a estos metabolitos secundarios en tres grupos: (i) nonenólidas simples, (ii) nonenólidas con cadenas alquílicas y (iii) nonenólidas complejas.

Las nonenólidas simples son aquellas que presentan grupos metilo, y funciones olefinicas y oxigenadas de diversa naturaleza (hidroxilos, carbonilos, epóxidos, etc.) en diversas posiciones del macrociclo. Las nonenólidas de este grupo son las más abundantes y sus estructuras se resumen en el Cuadro 1. En este grupo llama la atención desde el punto de vista estructural la tiobiscefalosporólida A (169), tioéter de naturaleza dimérica.

El segundo grupo (Cuadro 2) está integrado por aquellos macrociclos que contienen cadenas alquílicas de tamaño variable, generalmente entre 3 y 11 átomos de carbono, ubicados invariablemente en la posición C–9 del núcleo lactónico. Estos compuestos pueden presentar además otros grupos funcionales de diversa naturaleza.

Por último, las nonenólidas complejas son aquellas que presentan anillos fusionados a la porción macrolídica. Estas lactonas han sido aisladas principalmente de cepas de actinomicetos y del aceite de jazmín.

Cuadro 1. Nonenólidas naturales simples aisladas a la fecha.



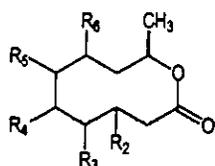
| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | R ₇ |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| poracantólida ^c (141) | H | H | H | H | H | H | H |
| (<i>R,E</i>)-4-dec-10-olida ^c (142) | H | H | H | | = | H | H |
| pirenólida A ^c (143) | | = | =O | | = | | β-epoxi |
| pirenólida B ^c (144) | | = | =O | | = | H | H |
| pirenólida C ^b (145) | | = | =O | | = | -OH | H |
| diploidalida A ^c (146) | H | =O | | = | H | H | H |
| diploidalida B ^c (147) | H | α-OH | | = | H | H | H |
| diploidalida C ^c (148) | H | α-OH | H | H | H | H | H |
| diploidalida D ^b (149) | H | α-OH | H | =O | H | H | H |
| cefalosporólida C ^c (150) | H | α-OH | | H | =O | H | H |
| cefalosporólida G ^c (151) | H | α-OH | α-OH | H | =O | H | H |
| decaestricnina A ₁ ^a (152) | H | β-OH | | = | | β-epoxi | H |
| decaestricnina A ₂ ^a (153) | H | α-OH | | = | | β-epoxi | H |
| decaestricnina B ^c (154) | H | =O | H | α-OH | | β-epoxi | H |
| decaestricnina C ₁ ^c (155) | H | α-OH | | = | β-OH | H | H |
| decaestricnina C ₂ ^c (156) | H | β-OH | | = | β-OH | H | H |
| decaestricnina D (tuckolida) ^a (157) | H | α-OH | β-OH | | = | β-OH | H |
| decaestricnina E ^a (158) | H | =O | H | H | | β-epoxi | H |
| decaestricnina F ^a (159) | H | =O | | = | | β-epoxi | H |
| decaestricnina G ^a (160) | H | =O | H | β-OH | β-OH | H | H |
| decaestricnina H ^b (161) | H | =O | H | | = | -OH | H |
| decaestricnina J ^a (162) | H | =O | H | H | H | β-OH | H |
| decaestricnina K ^b (163) | H | =O | H | -OH | | = | H |
| decaestricnina N ^a (164) | H | β-OH | α-OH | | = | β-OH | H |
| decaestricnina O ^a (165) | H | α-OH | | | α-OH | β-OH | H |
| humicolactona ^a (166) | | α-epoxi | | = | =O | α-OH | H |

^aConfiguración relativa reportada

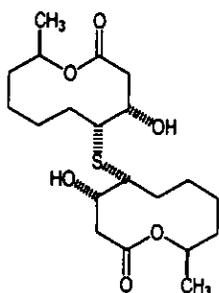
^bNo se reporta la configuración relativa

^cConfiguración absoluta reportada

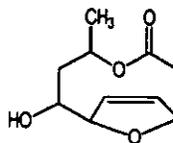
Cuadro 1. Nonenólidas naturales simples aisladas a la fecha (continuación).



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | R ₇ |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| foracantolida J ^c (167) | | H | = | | H | H | |
| cefalosporólida B ^c (168) | | α-OH | β-OH | H | =O | H | |



tiobiscefalosporólida A^c (169)



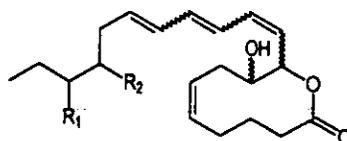
decaestricnina I^b (170)

^aConfiguración relativa reportada

^bNo se reporta la configuración relativa

^cConfiguración absoluta reportada

Cuadro 2. Nonenólidas naturales con cadenas laterales alquílicas aisladas a la fecha.



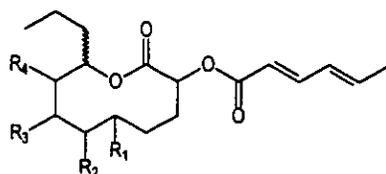
| Compuesto | configuración en: | | | | | | |
|--|-------------------|----------------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | R ₁ | R ₂ | C8-OH | C9/10 | C10/11 | C12/13 | C14/15 |
| didemnilactona A ^c (171) | | = | β | α | cis | trans | trans |
| didemnilactona B ^a (172) | | = | β | α | cis | trans | cis |
| neodidemnilactona A ^a (173) | H | H | β | α | cis | trans | trans |
| ascidiatrienólida A ^a (174) | H | H | α | α | trans | cis | cis |

^aConfiguración relativa reportada

^bNo se reporta la configuración relativa

^cConfiguración absoluta reportada

Cuadro 2. Nonenólidas naturales con cadenas laterales alquílicas aisladas a la fecha (continuación).

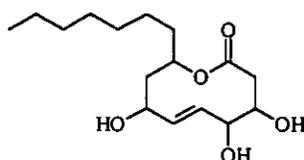


| Compuesto | configuración en: | | | | | |
|--|-------------------|----------------|----------------|----------------|-------|-------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | C2-OH | C9/10 |
| letaloxina ^a (175) | = | = | β-OH | α-OH | α | α |
| pinolidoxina ^b (176) | = | = | -OH | -OH | — | — |
| 7- <i>epi</i> -pinolidoxina ^b (177) | = | = | -OH | -OH | — | — |
| dihidropinolidoxina ^b (178) | H | H | -OH | -OH | — | — |
| epoxipinolidoxina ^b (179) | | | -OH | -OH | — | — |

^aConfiguración relativa reportada

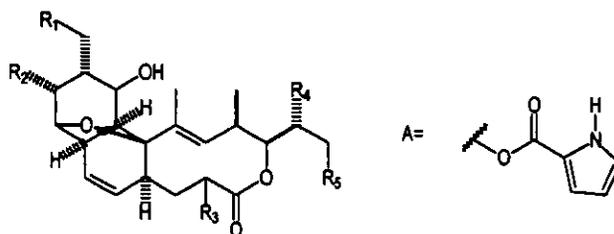
^bNo se reporta la configuración relativa

^cConfiguración absoluta reportada



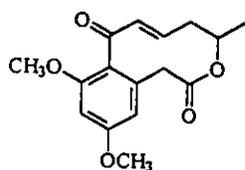
achaeólida A (180)

Cuadro 3. Nonenólidas naturales complejas aisladas a la fecha.

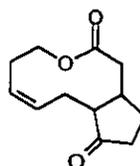


| Compuesto | configuración en: | | | | |
|--|-----------------------------|----------------|--------------------|--------------------|------------------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
| nargericida A ₁ ^a CP-47,444 (181) | H | A | β-OCH ₃ | OH | H |
| 18-deoxinigericida (182) | A ₁ ^a | H | A | β-OCH ₃ | H |
| nigericina B ₁ ^a (183) | OCH ₃ | A | α-OH | OH | OCH ₃ |
| nigericina B ₂ ^a (184) | OCH ₃ | A | α-OH | H | OH |
| nigericina B ₁ ^a (185) | H | A | α-OH | OH | OCH ₃ |
| nigericina C ₁ ^a (186) | OCH ₃ | A | β-OCH ₃ | OH | OCH ₃ |
| U-61732 (187) | H | A | α-OCH ₃ | H | H |
| nodumiscina (188) | H | OH | β-OCH ₃ | OH | H |

Cuadro 3. Nonenólidas naturales complejas aisladas a la fecha (continuación).



M-5032 (189)



cetolactona (190)

Debido a la presencia de un alto número de grupos funcionales y de varios centros estereogénicos en las moléculas, la elucidación estructural de las lactonas de 10 miembros es un proceso complejo que requiere de la aplicación simultánea de métodos químicos (formación de derivados benzoilados, acetilados, acetónidos, etc.) quirópticos, espectrométricos y espectroscópicos, principalmente de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Generalmente es necesario utilizar tanto las técnicas unidimensionales (RMN ^1H y RMN ^{13}C) como las bidimensionales homonucleares (RMN ^1H -COSY, RMN ^1H -NOESY) y bidimensionales heteronucleares (RMN ^1H - ^{13}C -HMQC y RMN ^1H - ^{13}C -HMBC) (Wada e Ishida, 1975; Bodo *et al.*, 1993; Dräger *et al.*, 1995; Mayer y Thiericke, 1993).

En algunos casos, la aplicación de la técnica de rayos X a los productos naturales o a sus derivados ha permitido corroborar de manera inequívoca las estructuras moleculares establecidas mediante otros procedimientos (Dräger *et al.*, 1995; Mayer y Thiericke, 1993). A la fecha solo se han descrito cinco estudios de difracción de rayos X. Los dos primeros se realizaron sobre la decaestricnina D (157) y la tiobiscefalosporólida A (169). Posteriormente se describió la estructura cristalina del derivado *p*-bromobenzoilado de la decaestricnina B (154). Por último, los estudios restantes se realizaron sobre la cefalosporólida B (168) y la nodumiscina (188) (Dräger *et al.*, 1995).

Con relación a la biogénesis de estos productos, los estudios realizados a la fecha han corroborado el origen policétido de algunos de ellos. La primera investigación se realizó sobre

la achaetólida obtenida a partir del hongo *Achaetomium cristalliferum*. Los resultados de la investigación permitieron establecer que este producto se biosintetiza a partir de la malonil y acetyl CoA (Bodo *et al.*, 1983). La administración $^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COONa}$ al medio de cultivo del hongo y el posterior aislamiento de la achaetólida isotópicamente marcada permitió demostrar que el producto incorpora cinco unidades de acetato intactas. Pero quizás los estudios más detallados sobre la biosíntesis de estos compuestos se describen para las decarestricinas B (154) y D (157). Estos estudios se realizaron en *Penicillium simplicissimum*, administrando como precursores $^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COONa}$ y $\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2\text{Na}$. Los resultados indican que ambas moléculas se generan a partir de cinco unidades de acetylCoA y que dos de los oxígenos de la molécula provienen de este precursor.

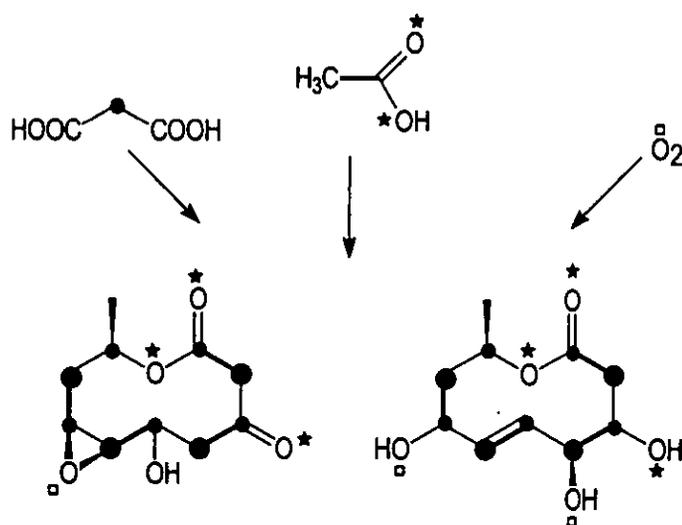


Figura 1. Incorporación de ^{13}C -acetato y ^{18}O -acetato en la biosíntesis de las decarestricinas B (154) y D (157).

Para la síntesis de las lactonas de 10 miembros se utilizan tres estrategias (Dräger *et al.*, 1995). La primera involucra una reacción de fragmentación oxidativa a partir de decalinas. La segunda reacción consiste en la formación del anillo de 10-miembros mediante la formación de enlaces C-C y la última involucra reacciones de macrolactonización. Mediante la aplicación de estas estrategias se ha logrado la síntesis total de las decarestrictininas A₁ (152), decarestrictininas A₂ (153) y D (157) y la (*R*)-foracantólida J (167) (Dräger *et al.*, 1995; Mayer y Thiericke, 1993).

En los últimos años el potencial de las lactonas de 10 miembros como agentes medicinales y pesticidas ha sido moderadamente estudiado. Estas investigaciones han permitido establecer que estos compuestos ofrecen grandes posibilidades para el desarrollo de agentes antifúngicos, antimicrobianos y herbicidas (Wada e Ishida; 1975; Evidente *et al.*, 1993; 1998; Dräger *et al.*, 1995). La nodumiscina (188), las nigericinas (181-186) y el antibiótico U-61732 (187) han demostrado actividad antimicrobiana, especialmente contra bacterias Gram-positivas (Ej. *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*) (Dräger *et al.*, 1995; Mayer y Thiericke, 1993). Las pirenólidas A-C (143-145), han demostrado efecto antifúngico, inhibiendo el crecimiento del micelio del hongo fitopatógeno *Cochliobolus lunata* (Dräger *et al.*, 1995;). La 7-*epi*-pinolidoxina (177) y la dihidropinolidoxina (178) han demostrado un potente efecto fitotóxico ocasionando severas lesiones necróticas en el chícharo y el frijol (Evidente *et al.*, 1993; 1998). La achaetólida A (180) incrementa la transpiración *in vitro* de las hojas de cebada (Bodo *et al.*, 1983). La humicolactona (166) presenta un notable efecto fitotóxico en contra de la línea celular U210 derivada de tumores vegetales (CI₅₀= 2.5 µg/mL) (Dräger *et al.*, 1995; Mayer y Thiericke, 1993). Las didemnilactonas A (171) y B (172) y la neodidemnilactona A (173) presentan actividad contra las enzimas 5-lipooxigenasa y 1,5-lipooxigenasa de los leucocitos polimorfonucleares.

La diploidialida A (146) presenta efecto inhibidor de la enzima 11-hidroxisasa de la progesterona en cultivos celulares de *Rhizopus stolonifer* a 125 ppm (Dräger *et al.*, 1995; Wada e Ishida, 1975). Por último, las decarestricinas (152-165) inhiben la biosíntesis de colesterol en la línea celular de hígado HeP-G2 (Dräger *et al.*, 1995; Wada e Ishida, 1975).

2. HIPÓTESIS.

La hipótesis del presente trabajo considera que los criterios de selección ecológicos basados en las interacciones planta–hongo, en conjunto con los ensayos biológicos de selección, constituyen los indicadores adecuados para la detección de especies fúngicas que proporcionen compuestos fitotóxicos útiles para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas de origen natural biodegradables y de menor toxicidad.

3. OBJETIVO GENERAL.

El objetivo principal del presente proyecto de investigación doctoral consiste en determinar el potencial fitotóxico de extractos y productos obtenidos de varios aislamientos del género *Phoma* mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de la especie *Amaranthus hypochondriacus*, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Obtener varios aislamientos de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Phoma* a partir de suelos y de semillas de sorgo y de maíz contaminadas.

2. HIPÓTESIS.

La hipótesis del presente trabajo considera que los criterios de selección ecológicos basados en las interacciones planta-hongo, en conjunto con los ensayos biológicos de selección, constituyen los indicadores adecuados para la detección de especies fúngicas que proporcionen compuestos fitotóxicos útiles para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas de origen natural biodegradables y de menor toxicidad.

3. OBJETIVO GENERAL.

El objetivo principal del presente proyecto de investigación doctoral consiste en determinar el potencial fitotóxico de extractos y productos obtenidos de varios aislamientos del género *Phoma* mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de la especie *Amaranthus hypochondriacus*, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Obtener varios aislamientos de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Phoma* a partir de suelos y de semillas de sorgo y de maíz contaminadas.

2. Determinar las condiciones óptimas de temperatura, medios de cultivo, agitación y tiempo para realizar la fermentación de cada uno de los aislamientos.
3. Preparar los extractos orgánicos a partir del micelio y del medio de crecimiento de cada uno de los aislamientos cultivados, en pequeña escala.
4. Realizar la selección de los microorganismos utilizando como bioensayos la determinación de la actividad de los extractos orgánicos sobre el crecimiento radicular y la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.
5. Cultivar en gran escala dos de los aislamientos de las especies más activas de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos biológicos de selección con la finalidad de generar cantidades suficientes de biomasa para la posterior obtención de los principios activos.
6. Preparar los extractos orgánicos a partir del medio de crecimiento y del micelio en gran escala con la finalidad de obtener la cantidad suficiente de extractos para la realización de los estudios biodirigidos.
7. Realizar el estudio químico biodirigido de los extractos orgánicos obtenidos a partir del micelio y del medio de crecimiento de las especies activas mediante la aplicación de técnicas cromatográficas.
8. Aislar y purificar los constituyentes de las fracciones activas mediante el empleo de técnicas cromatográficas.

9. Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios bioactivos, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas, así como métodos químicos y quiroópticos.
10. Evaluar el efecto de los compuestos aislados sobre la germinación y el crecimiento radicular de la especie *Amaranthus hypochondriacus* y sobre el crecimiento vegetal en pruebas de invernadero.
11. Iniciar el estudio del posible blanco de acción de las fitotoxinas mediante la determinación de sus efectos sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinacas, la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, la enzima glutamino sintetasa y la proteína reguladora calmodulina.

4. EXPERIMENTAL.

4.1 Aislamiento y mantenimiento de los hongos fitopatógenos del género *Phoma*.

4.1.1 Aislamiento de los hongos del género *Phoma*.

El hongo *Phoma herbarum* Westend se aisló de muestras de semillas de maíz de la variedad cacahuacintle recolectadas en el Bajío mexicano y que fueron proporcionadas por la Compañía Nacional de Subsistencias Populares (CONASUPO). *Phoma sorghina* Boerema & van Kesteren se aisló a partir de granos de sorgo proporcionados por la empresa Agricultura en Evolución (Agrevo) de muestras recolectadas en Michoacán, México. Por último, las cepas *Phoma* sp. TOX 01-020-R4 y *Phoma* sp. TOX 01-018-R2 se aislaron a partir de dos muestras de suelo recolectadas en la Facultad de Ciencias de la UNAM, México, D. F.

Para determinar el número y la clase de hongos presentes en los granos de sorgo y de maíz, se desinfectaron los granos superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto; posteriormente 100 granos de cada una de las muestras se sembraron en placas de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Cuadro 4), repartiendo 25 granos de sorgo y 10 para el caso del maíz en cada caja Petri (de cada una de las muestras se realizaron cuatro réplicas). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante seis días. Al cabo de este tiempo se aislaron los hongos presentes en las semillas de sorgo y de maíz. Para el caso de las cepas aisladas a partir de suelo se emplearon los métodos microbiológicos tradicionales. Para ello una muestra de 1 g de suelo se suspendió en 10 mL de agua estéril desionizada y se agitó en

un agitador mecánico Burrell durante 30 minutos; posteriormente alícuotas de diferentes volúmenes de la suspensión se transfirieron a recipientes de vidrio con agua estéril para obtener diluciones de suelo en agua de 1, 10, 100, 1000 y 10000. Un mL de la dilución deseada se vertió y se expandió con ayuda de una varilla de vidrio estéril sobre la superficie de papa dextrosa agar (PDA) (Cuadro 4). El medio de cultivo inoculado se dejó reposar y se incubó a 28°C durante 14 días. Al cabo de este período se analizaron las placas con la finalidad de identificar las cepas de hongos presentes (Ulloa y Hanlin, 1985).

La purificación de cada uno de los hongos se realizó mediante la transferencia de una porción del micelio a cajas de Petri conteniendo el medio de PDA, AEM o AA (Ulloa y Hanlin, 1985). La identificación de los hongos hasta el nivel de género se realizó siguiendo los protocolos descritos por Boerema (Domsch *et al.*, 1980).

4.1.2 Conservación de los hongos del género *Phoma* aislados de semillas de maíz y de sorgo contaminadas.

Cada uno de los aislamientos puros de los hongos se mantuvieron viables en los medios sólidos de papa dextrosa agar, agar avena y agar extracto de malta en tubos de ensayo de 16 × 150 mm con agar inclinado. Cada tubo se inoculó por medio de un piquete en la superficie del agar y se incubó a 28°C durante 14 días. Al finalizar el período de incubación cada tubo se selló y se guardó en un congelador. La resiembra de los hongos se realizó a intervalos de un mes.

Las cepas de los hongos *Phoma herbarum*, *Phoma sorghina*, *Phoma* sp. TOX-01-020-R4 y *Phoma* sp. TOX-01-018-R2 fueron depositadas en la colección de hongos perteneciente al Laboratorio de Fitopatología "Teófilo Herrera" del Instituto de Biología, UNAM.

Cuadro 4. Composición de los medios sólidos de cultivo utilizados para el aislamiento, la propagación y la conservación de los hongos del género *Phoma*.

| MEDIO DE CULTIVO | COMPOSICIÓN | |
|------------------------------|------------------------------|-------|
| Papa dextrosa agar (PDA) | trozos de papa peladas | 200 g |
| | dextrosa | 20 g |
| | agar | 15g |
| | agua destilada | 1L |
| agar extracto de malta (AEM) | extracto de Malta | 20 g |
| | peptona | 1 g |
| | dextrosa | 20 g |
| | agar | 20g |
| | agua destilada | 1L |
| agar avena (AA) | avena | 20 g |
| | dextrosa | 20 g |
| | agar | 15 g |
| | agua destilada | 1L |

4.2 Evaluaciones biológicas.

4.2.1 Evaluación del efecto de los extractos de los hongos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.

Los ensayos de fitotoxicidad de los extractos fúngicos, fracciones y compuestos puros se realizaron valorando el efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de la especie *Amaranthus hypochondriacus*, empleando el método en caja de Petri (Anaya *et al.*, 1991; 1995). Las semillas de *A. hypochondriacus* utilizadas en esta investigación fueron adquiridas en el Mercado de Semillas de Xochimilco, D.F, México.

El bioensayo se realizó en cajas de Petri que contenían un disco de papel filtro de 10 cm de diámetro (Whatman No. 1). Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en diclorometano o en metanol y se prepararon disoluciones con una concentración de 1000, 100 y 10 µg/mL para el caso de los extractos. Para los compuestos puros las disoluciones se

prepararon con una concentración de 100, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, 1.0 mL de cada una de las disoluciones se vertió en las cajas de Petri y se permitió la evaporación completa del disolvente. A continuación, se inició la germinación de 10 semillas de cada una de las especies de prueba, humedeciendo previamente el papel filtro con 2.5 mL de agua destilada. Las cajas de Petri conteniendo las semillas se incubaron a 30 °C durante 24 horas y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas y contando el número de semillas germinadas después de 24 hrs. El mismo procedimiento se siguió para los controles negativos que contenían únicamente agua o disolvente (CH_2Cl_2 o CH_3OH). Como control positivo se empleó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Sigma) (Macías *et al.*, 2000). Para esta determinación se realizaron tres réplicas por muestra. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se analizaron mediante la prueba estadística de ANDEVA ($\alpha= 0.05$). Para el cálculo de los valores de CI_{50} se utilizó un análisis Probit a partir de los porcentajes de inhibición obtenidos para la germinación y el crecimiento radicular (Anaya, 1991).

4.2.2 Evaluación del efecto de los extractos fúngicos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* utilizando el método bioautográfico.

El método bioautográfico se utilizó principalmente para monitorear la actividad fitoinhibidora de los extractos orgánicos y de las fracciones cromatográficas.

La bioautografía se realizó en placas recubiertas de gel de sílice de 2.5×10 cm (Silica gel 60 F₂₅₄). La muestra a evaluar (2.0 mg) se disolvió en la cantidad mínima del disolvente apropiado y se aplicó sobre la superficie de la cromatoplaque empleando los métodos

convencionales para la cromatografía en capa fina. Las placas sembradas con las muestras de prueba fueron eluidas de la manera convencional empleando como sistemas de elución mezclas de CH₂Cl₂:MeOH (9:1) y CH₂Cl₂:iPrOH (8:2). Al cabo del proceso de elución, el disolvente se evaporó mediante una corriente de aire y se vertió sobre la placa 5 mL de agar bacteriológico al 1% (DIFCO) a una temperatura de aproximadamente 30 °C. Al solidificar el agar se colocaron las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* de manera uniforme hasta cubrir completamente la superficie de la placa (aproximadamente 130 semillas por placa). Las placas con las semillas se incubaron en una atmósfera húmeda y en total oscuridad a 28 °C durante 24 hrs. El mismo protocolo se utilizó para el control negativo y el control de disolvente. La placa para este último se eluyó de manera convencional sin la administración de la muestra problema. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La determinación de 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.

Para correlacionar las zonas de inhibición observadas con el factor de retención (R_f) para cada uno de los constituyentes de la fracción cromatográfica objeto de evaluación se utilizó un cromatograma obtenido en las mismas condiciones de la placa cubierta con agar.

4.2.3 Evaluación de la actividad de los compuestos puros sobre la síntesis de ATP.

4.2.3.1 Aislamiento de los cloroplastos y cuantificación de la clorofila.

Los cloroplastos se obtuvieron de hojas frescas de espinacas (*Spinacea oleraceae* L.) lavadas y cortadas en trozos pequeños (eliminando la nervadura central y el ápice). El proceso de aislamiento de cloroplastos se realizó por homogeneización durante cinco

segundos de las hojas fragmentadas (30 g) en 150 mL de medio de aislamiento de cloroplastos (sacarosa 400 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM y tricina-Na⁺ 30 mM, ajustado a pH 8.0 con KOH, además se adicionó KCN 0.1 mM para inhibir la catalasa). El homogeneizado se filtró a través de ocho capas de gasa y se centrifugó a 4000 rpm por cinco minutos a 4 °C en una centrífuga Beckman J2-21. El sedimento se resuspendió en un mL de medio de aislamiento. El proceso de aislamiento se realizó en frío y en la oscuridad (Peña-Valdivia *et al.*, 1991; Lotina-Hennsen *et al.*, 1991).

La clorofila se cuantificó empleando el método desarrollado por Strain y colaboradores (1971). Este consiste en tomar una alícuota de 50 µL de la suspensión de cloroplastos, y adicionar acetona al 80% hasta obtener 5 mL de la suspensión, que se mantiene en la oscuridad durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifuga a 2000 rpm, durante 5 minutos; transcurrido este tiempo se cuantifica el contenido de clorofila espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 663 y 645 nm. La concentración de la clorofila se calcula empleando la siguiente ecuación: $[\text{clorofila}] = [8.05(A_{663}) + 20.29 (A_{645})] \times 5$. El resultado obtenido es en µg de clorofila por mililitro. Donde A: lectura de la absorbancia de las muestras y 8.05 y 20.29 los coeficientes de extinción molar de la clorofila.

4.2.3.2 Cuantificación de la velocidad de síntesis de ATP.

La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre pH 8.0 y 8.1, utilizando un microelectrodo (Orion) combinado, conectado a un potenciómetro (Corning modelo 12) de escala expandida. El cambio de voltaje generado por los cambios de pH se transdujo a un registrador gráfico Gilson. El medio de reacción contiene: sacarosa 100 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, ADP 1 mM, KH₂PO₄ 3 mM, KCN

0.5 mM, tricina 1 mM, metilviológeno (MV) 0.05 mM, el equivalente a 60 µg de clorofila en 3 mL de medio y diferentes concentraciones de los compuestos puros a evaluar. El cambio de pH se determinó durante un período de iluminación de un minuto, durante este tiempo el medio de reacción se mantuvo en agitación constante. La velocidad de la síntesis de ATP se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$V = \frac{ah}{c}$$

donde,

V = Velocidad de la síntesis de ATP ($\mu\text{moles de ATP} \times \text{mg}^{-1}$ de clorofila $\times \text{h}^{-1}$)

a = $\mu\text{moles de H}^+$ usados en la titulación [mezcla de reacción de 10 µL de KOH (0.01N), en presencia de cloroplastos sin iluminar (Peña-Valdivia *et al.*, 1991)]

h = Altura de la curva obtenida durante el período de iluminación (cm)

c = concentración de la clorofila empleada (60 µg)

4.2.4 Efecto de las fitotoxinas sobre la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPcarboxilasa).

La actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa se determinó monitoreando la reacción catalizada por la enzima málico deshidrogenasa (MDH), dependiente de NADH. El oxaloacetato generado en la reacción de carboxilación se midió siguiendo el descenso de la actividad óptica a 340 nm debido a la conversión de NADH a NAD⁺. El cambio en la densidad óptica por minuto se midió durante los primeros cinco minutos de reacción y se calculó la velocidad inicial. La reacción se realizó a 30 °C, iniciando la reacción con la adición de la enzima a un amortiguador pH 7.3 (TEA-HCl 100 mM, EDTA 1.0 mM, NADH 0.2 mM, MDH 5.0 U/mL, PEP 5.0 mM, MgCl₂ 10 mM, NaHCO₃ 10 mM) y 0.05 mL de una solución (1mg/200 µL) de los compuestos a evaluar en un volumen final de un

mL. La actividad enzimática, medida como actividad específica se calculó con la siguiente fórmula:

$$A = \frac{\text{incremento DO}}{t} \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{1}{V} = \frac{U}{\text{mL}}$$

donde,

A = actividad enzimática

Incremento DO = cambio de la densidad óptica

t = tiempo (min)

V = volumen de la preparación enzimática empleada (mL)

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm ($6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)

4.2.5 Evaluación del efecto de los extractos y los compuestos puros sobre la enzima glutamino sintetasa (GS).

El bioensayo para la determinación del efecto de los extractos orgánicos sobre la actividad de la enzima glutamino sintetasa se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la literatura (Kamamori y Matsumoto, 1972). La enzima se aisló a partir de semillas germinadas de *Amaranthus hypochondriacus* utilizando una solución amortiguadora de extracción (TRIS-HCl 50 mM pH=8.2, CaCl₂ 1mM, mercaptoetanol 5mM). Se preparó una mezcla de reacción utilizando TRIS-HCl 50 mM pH=7.5 (1.5 mL), ATP 90 mM pH=7.0 (0.2 mL), MgSO₄ 1M (0.1 mL), hidroxilamina 200 mM pH= 7.0 (0.3 mL), cisteína 90 mM (0.1 mL), ácido glutámico 1.14 M pH= 7.0 (0.5 mL), diferentes volúmenes del extracto enzimático (0.1 a 0.5 mL) y por último diferentes cantidades de los compuestos puros a evaluar (0.1 a 0.5 mL), para obtener un volumen final de mezcla de 3.0 mL. Posteriormente,

se adicionó el ácido glutámico y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo al añadir un mL de una solución de volúmenes iguales de FeCl₃ al 10% en HCl 0.2 M, ácido tricloroacético al 24% (p/v) y HCl al 50%. Una vez que se detuvo la reacción, se centrifugó la mezcla de reacción de cada uno de los tubos a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C. Por último, se midió la absorción en el UV de cada una de las muestras a 540 nm. Se realizaron los controles positivo y blanco. Como control positivo se empleó un inhibidor comercial de la glutamino sintetasa utilizado como herbicida (Lavrik, 1996).

4.2.6 Evaluación del efecto de los extractos y los compuestos puros sobre la proteína calmodulina.

4.2.6.1 Determinación de la interacción de los compuestos puros con la proteína calmodulina (espinaca y de cerebro de bovino).

Para determinar si existe interacción entre las fitotoxinas y la proteína calmodulina de espinaca y de cerebro de bovino, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes.

La evaluación se llevó a cabo adicionando 10µg del compuesto de prueba (10µL de una disolución de 1µg/µL en DMSO), 2µg de calmodulina de espinaca o de cerebro de bovino (Sigma), 3µL de CaCl₂ o de EGTA 1 mM. La mezcla anterior se llevó a un volumen final de 30µL con agua desionizada. Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó durante 90 minutos a 30 °C. Al término de la incubación las muestras fueron sometidas a ebullición durante 5 minutos. A continuación, las mezclas se enfriaron a temperatura ambiente y a cada una se le adicionó 10 µL de buffer de carga. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE al 12%) para determinar el retardo en la

movilidad de la calmodulina, como resultado de la interacción de esta última con los compuestos de prueba. Se utilizó la (+)-(2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dihidronaftopirona como un control positivo y cada determinación se realizó por triplicado (Macías *et al.*, 2000).

4.2.7 Evaluación del efecto de los compuestos puros sobre la producción de biomasa de *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Echinochloa crusgalli* (Beauv.) L.

Para realizar el bioensayo se utilizaron las especies arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Seis semillas de cada especie se colocaron en recipientes conteniendo tierra. Las plantas se desarrollaron durante tres semanas en una cámara de crecimiento a 28 °C y un ciclo de 12 h de luz-oscuridad (236 mE m⁻² seg⁻¹). Transcurrido este tiempo, se trasladaron a una segunda cámara, para completar así, su crecimiento. Las condiciones de fotoperíodo fueron 17-20°C y 16 × 8 h (5:30 × 21:30), respectivamente.

El tratamiento de las especies vegetales consistió en la aplicación foliar de una solución (4 × 10⁻⁴ M) de los compuesto de prueba y Tween 80 (0.1 mL/L). Las soluciones de los compuestos se aplicaron de la punta a la base de la hoja empleando hisopos de algodón.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado durante 3 semanas 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 metilviológeno (Paraquat®) a una concentración de 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 todos los residuos de tierra; una vez lavadas se procedió a determinar el peso fresco de cada una de las plántulas.

Para determinar el peso seco, cada una de las plántulas se desecó a 30 °C durante 48 h. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición con respecto al control de crecimiento. Todo los experimentos se basaron en un diseño aleatorio con estructura factorial (Picman, 1986; Hoagland, 1996).

4.3 Cultivo en pequeña escala para determinar las condiciones de crecimiento y realizar la prueba biológica de selección.

4.3.1 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento en medios líquidos para cada cepa.

La determinación de las condiciones de cultivo óptimas para el desarrollo y producción de las toxinas por los hongos seleccionados se realizó utilizando diferentes procesos de fermentación. Las condiciones que se variaron en cada fermentación son las siguientes: los medios de cultivo empleados [papa dextrosa (PD), extracto malta dextrosa (EMD), medio MD-I modificado (Cuadro 5)], las condiciones de agitación (estáticos o 120 rpm), la temperatura y el tiempo de incubación. Todas las fermentaciones se realizaron utilizando matraces Fernbach de 1.8 L conteniendo 750 mL de cada uno de los diferentes medios líquidos, las temperaturas empleadas fueron de 28 °C y de 35 °C, y los tiempos de incubación utilizados fueron 7, 14 y 21 días, tanto para los cultivos en agitación a 120 rpm como para los estáticos.

4.3.2 Preparación de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña escala de las cuatro cepas de hongos.

Los extractos orgánicos derivados del cultivo en pequeña escala se prepararon con el objeto de evaluar el crecimiento de cada cepa en las diferentes condiciones de cultivo probadas y de manera adicional, cuantificar su actividad biológica mediante la realización de ensayos de selección.

Cuadro 5. Composición de los medios líquidos de crecimiento utilizados para los cultivos en pequeña y en gran escala de los hongos del género *Phoma*.

| MEDIO DE CULTIVO | COMPOSICIÓN | |
|--------------------------|--|----------|
| papa dextrosa (PD) | trozos de papa pelada | 200 g |
| | dextrosa | 20 g |
| | agua destilada | 1L |
| extracto de malta (EMD) | extracto de malta | 20 g |
| | peptona | 1 g |
| | dextrosa | 20 g |
| | agua destilada | 1L |
| papa dextrosa modificado | trozos de papa pelada..... | 200 g |
| | dextrosa | 20 g |
| | peptona de caseína | 10 g |
| | agua destilada | 1L |
| MD-I modificado | Ca(NO ₃) ₂ | 0.283 g |
| | KNO ₃ | 0.079 g |
| | KCl | 0.064 g |
| | MgSO ₄ | 0.7994 g |
| | NaHPO ₄ | 0.7994 g |
| | sacarosa | 29.98 g |
| | tartrato de amonio | 4.86 g |
| | FeCl ₃ | 1.07 mg |
| | MnSO ₄ ·7H ₂ O | 1.04 mg |
| | ZnSO ₄ | 4.02 mg |
| | H ₃ BO ₃ | 1.35 mg |
| | KI | 0.74 mg |
| | agua destilada | 1 L |
| | ajustar pH a 5.5 | |

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

Una vez finalizado el proceso de fermentación de cada uno de los hongos preseleccionados, el micelio y el caldo de cultivo se separaron mediante filtración simple sobre ocho capas de gasa estéril.

El extracto del caldo se preparó mediante particiones sucesivas con acetato de etilo. Por otro lado, el micelio seco se extrajo mediante un proceso de maceración con acetato de etilo. Los extractos orgánicos resultantes del micelio y del caldo de cultivo se concentraron por separado a presión reducida.

4.4 Cultivo en mediana escala de las especies seleccionadas y preparación de los extractos orgánicos derivados del micelio y del medio de crecimiento de las especies cultivadas.

4.4.1 Cultivo en mediana escala

El cultivo en mediana escala de *P. herbarum* se llevó a cabo en 60 matraces Fernbach de 2.8 L conteniendo 1.4 L del medio MD-I modificado. El proceso de fermentación se efectuó a 28 °C agitando a 120 rpm en un agitador rotatorio durante tres semanas. *P. sorghina* se cultivó en mediana escala en matraces Fernbach de 2.8 L conteniendo cada uno 1 L del medio de cultivo líquido de papa dextrosa (PD). Los matraces se incubaron a 28 °C en condiciones estáticas durante tres semanas. Al cabo del período de incubación se reunió el contenido de 40 matraces para obtener 40 litros del cultivo.

4.4.2 Preparación de los extractos orgánicos a partir de los cultivos en mediana escala.

Los extractos de los caldos de cultivo y del micelio de cada hongo cultivado se prepararon utilizando el mismo procedimiento que se describe para la extracción de los cultivos en pequeña escala. En el Cuadro 6 se presentan los rendimientos de los extractos derivados de los cultivos en mediana escala.

Cuadro 6. Rendimiento de los extractos del caldo y del micelio derivados de los cultivos en mediana escala.

| Hongo | Volumen de cultivo | Extracto del caldo | Extracto del micelio |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| <i>P. herbarum</i> | 80 L | 3.20 g | 0.801 g |
| | 10 L | 0.70 g | 0.372 g |
| <i>P. sorghina</i> | 40 L | 3.60 g | 2.400 g |

4.5 Obtención de las fitotoxinas de las especies *Phoma herbarum* y *Phoma sorghina*.

4.5.1 Métodos generales de análisis.

4.5.1.1 Métodos cromatográficos.

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula, 0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM) o gel de sílice Baker para columnas rápidas (tamaño de partícula 40µm). Los análisis cromatográficos en capa fina (ccf) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60–254, Merck), varios eluyentes y los agentes reveladores que se indican en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina de los extractos y de las fracciones obtenidas durante el proceso de fraccionamiento de los extractos de las especies seleccionadas.

| Agente revelador | Composición | Referencia |
|-----------------------|--------------------------------|------------|
| sulfato cérico* | sulfato cérico amoniacal. | 12.0 g |
| | ácido sulfúrico. | 22.5 mL |
| | hielo. | 350 g |
| ácido fosfomolibdico* | ácido fosfomolibdico. | 5.0 g |
| | ácido sulfúrico. | 1.0 mL |
| | etanol. | 98.0 mL |
| | sulfato cérico. | 2 gotas |
| vainillina sulfúrica* | solución 1: | |
| | vainillina. | 1.0 g |
| | etanol. | 99.0 mL |
| | solución 2: | |
| | ácido sulfúrico. | 5 mL |
| | etanol. | 95 mL |

*Para el desarrollo de color es necesario calentar durante dos minutos a 110°C.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV dual (2487 Dual Absorbance Detector), un detector UV con arreglo de diodos (996) o un detector de índice de refracción (410 Differential Refractometer). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Millennium 32 (Waters). La purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de gel de sílice (Waters, μ porasil 125 Å; tamaño de partícula 10 μ M) de 19 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud o una columna de gel de sílice C₁₈ (fase reversa) (μ Bondapack C₁₈; tamaño de partícula 10 μ M) de 19 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud. La detección se ajustó entre 200 y 400 nm en el detector de arreglo de diodos en el caso de los compuestos derivados del hongo *Phoma sorghina*. En el caso de los compuestos derivados

de la especie *Phoma herbarum* la detección se ajustó entre 200 y 300 nm para el detector de arreglo de diodos y 209 nm para el caso del detector dual.

4.5.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Equipos utilizados:

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns, y no están corregidos.

La rotación óptica se registró en un polarímetro JASCO DIP-360.

Los espectros en el UV se obtuvieron en un espectrómetro Shimadzu 160 en MeOH.

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se determinaron en un espectropolarímetro JASCO 720 a 25 °C en MeOH.

Los espectros en el IR (film) se midieron en un espectrómetro Perkin Elmer 599.

Los espectros de RMN se obtuvieron en un aparato Varian UNITY PLUS 500 utilizando CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia interna. RMN ^1H (500 MHz) y RMN ^{13}C (125 MHz). Los espectros de RMN de las herbaruminas I, II y III se obtuvieron en un aparato Bruker DMX500. RMN ^1H (500 MHz) y RMN ^{13}C (125 MHz), utilizando como disolvente CDCl_3 y como referencia interna TMS.

Los espectros de masas modalidad FAB^+ se registraron en un espectrómetro de masas modelo JEOL DX300 utilizando una matriz de glicerol.

Los espectros de masas de alta resolución modalidad FAB^+ se obtuvieron en un espectrómetro de masas JEOL JX102 utilizando una matriz de alcohol nitrobenílico (NBA).

4.5.2 Estudio químico del extracto derivado de la especie *Phoma herbarum*.

4.5.2.1 Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado del cultivo de *P. herbarum*.

El fraccionamiento del extracto derivado de la especie *P. herbarum* (4.01 g) se realizó mediante una cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice (100 g). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de CH_2Cl_2 -*i*PrOH (1:0→0:1). Se obtuvieron un total de 229 fracciones (250 mL) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica, para así obtener ocho conjuntos de fracciones primarias (FI–FVIII). En esta ocasión la actividad biológica de las fracciones y del extracto se monitoreó utilizando el método bioautográfico. En el Cuadro 8 se sintetiza el fraccionamiento primario del extracto activo de *Phoma herbarum* y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos y las fracciones combinadas.

4.5.2.2 Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIV.

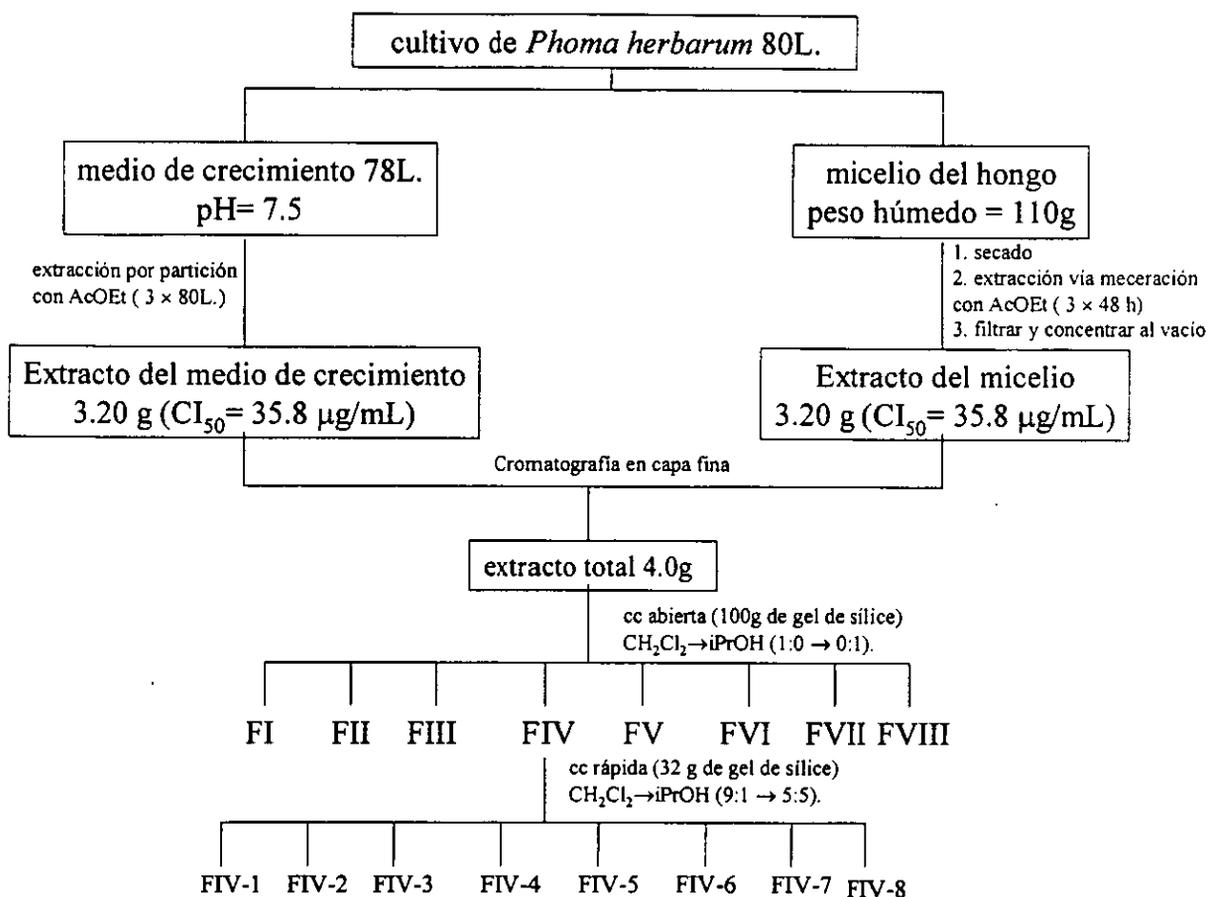
La fracción activa FIV se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía sobre gel de sílice (32 g) en columna rápida. Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de CH_2Cl_2 -*i*PrOH (9:1→1:1). Se recolectaron un total de 104 eluatos, reuniéndose aquellos que resultaron cromatográficamente similares para obtener así ocho conjuntos fracciones secundarias (FIV–1 – FIV–8). En el Esquema 1 se resumen los procesos de extracción, fraccionamiento primario y fraccionamiento secundario. En el Cuadro 9 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción activa FIV–4 y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos y las fracciones combinadas.

Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto obtenido del micelio y del medio de crecimiento del hongo *Phoma herbarum*.

| Eluyente | Proporción % | Número de fracciones | Fracciones combinadas | Clave de la fracción |
|---|--------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| CH ₂ Cl ₂ | 100 | 1-12 | 1-29 | FI |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 95-5 | 13-19 | | |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 90-10 | 20-43 | 30-66 | FII |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 85-15 | 44-49 | 67-75 | FIII |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 80-20 | 50-93 | 76-123 | FIV |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 70-30 | 94-104 | | |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 60-40 | 105-113 | | |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 50-50 | 114-118 | | |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 30-70 | 119-128 | 124-143 | FV |
| <i>i</i> PrOH | 100 | 129-140 | | |
| <i>i</i> PrOH - MeOH | 95-5 | 141-147 | 144-166 | FVI |
| <i>i</i> PrOH - MeOH | 90-10 | 148-154 | | |
| <i>i</i> PrOH - MeOH | 80-20 | 155-161 | | |
| <i>i</i> PrOH - MeOH | 50-50 | 162-190 | 167-220 | FVII |
| MeOH | 100 | 191-229 | 221-229 | FVIII |

Cuadro 9. Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna rápida de la fracción activa FIV obtenida a partir del extracto total del micelio y del medio de crecimiento del hongo *Phoma herbarum*.

| Eluyente | Proporción % | Número de fracciones | Fracciones combinadas | Clave de la fracción |
|---|--------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 90:10 | 1-7 | 1-16 | FIV-1 |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 85:15 | 8-15 | | |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 80:20 | 16-23 | 17-24 | FIV-2 |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 75:25 | 24-31 | 25-32 | FIV-3 |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 70:30 | 32-40 | 33-45 | FIV-4 |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 65:35 | 41-53 | 46-60 | FIV-5 |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 60:40 | 54-63 | 61-70 | FIV-6 |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 55:45 | 64-80 | 71-90 | FIV-7 |
| CH ₂ Cl ₂ - <i>i</i> PrOH | 50:50 | 81-104 | 91-104 | FIV-8 |



Esquema 1. Extracción y fraccionamiento del extracto obtenido del micelio y del medio de crecimiento del hongo *Phoma herbarum*.

4.5.2.3 Separación y purificación mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de las herbaruminas I (191) y II (192) a partir de las fracciones activas secundarias FIV-3 y FIV-4.

La separación de los compuestos de la fracción activa FIV-3 (186.4 mg) mediante CLAR se realizó en una columna de gel de sílice (fase normal) utilizando un flujo de 8.2 mL/min y la mezcla ternaria de disolventes hexano-*i*PrOH-metanol en las proporciones: 82:9:9. La purificación de la fracción activa FIV-4 (97.1 mg) se realizó por CLAR en la misma

columna de fase normal y utilizando las mismas condiciones de separación que en el caso de la fracción FIV-3.

La herbarumina I se obtuvo de las fracciones activas FIV-3 y FIV-4, como un sólido de apariencia cerosa de color blanco (16.0 mg); con un tiempo de retención de 10.2 min, y la herbarumina II como un sólido en forma de agujas de color amarillo claro (97.1 mg) con un tiempo de retención de 20.8 min.

4.5.3 Estudio químico del extracto de la segunda fermentación de la especie *P. herbarum*.

4.5.3.1 Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado de la especie *P. herbarum*.

El proceso de extracción del medio de crecimiento (10 L) y del micelio del hongo *Phoma herbarum* se realizó siguiendo la misma metodología que se utilizó en el estudio químico de la primera fermentación de la especie *P. herbarum*. El extracto resultante (1.072 g) se sometió a un fraccionamiento primario utilizando una columna abierta empacada con Sephadex LH-20 (2.5 × 60 cm). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de CH₂Cl₂:MeOH (1:0→0:1). Se obtuvieron un total de 67 fracciones (250 mL) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica, para así obtener seis conjuntos de fracciones primarias (FI-FVI). En el Cuadro 10 se sintetiza el fraccionamiento primario del extracto activo de *Phoma herbarum* y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos y las fracciones combinadas. La fracción activa FIII (CI₅₀= 39.4 µg/mL) se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando de nueva cuenta una columna de Sephadex LH-20 (2.5 × 32 cm). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de CH₂Cl₂-MeOH

(1:0→0:1). Se recolectaron un total de 54 fracciones reuniéndose aquellas que resultaron cromatográficamente similares, para obtener así, cuatro conjuntos de fracciones secundarias (FIII-1-FIII-4). En el Esquema 2 se resume el proceso de extracción, el fraccionamiento primario y el fraccionamiento secundario del extracto de *P. herbarum*. El efecto fitotóxico de las fracciones primarias FI-FVIII se determinó mediante el ensayo bioautográfico. El efecto inhibitorio se concentró en la fracción primaria FIII. En el Cuadro 11 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos y las fracciones combinadas.

Cuadro 10. Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto obtenido a partir del micelio y del medio de crecimiento del hongo *Phoma herbarum*.

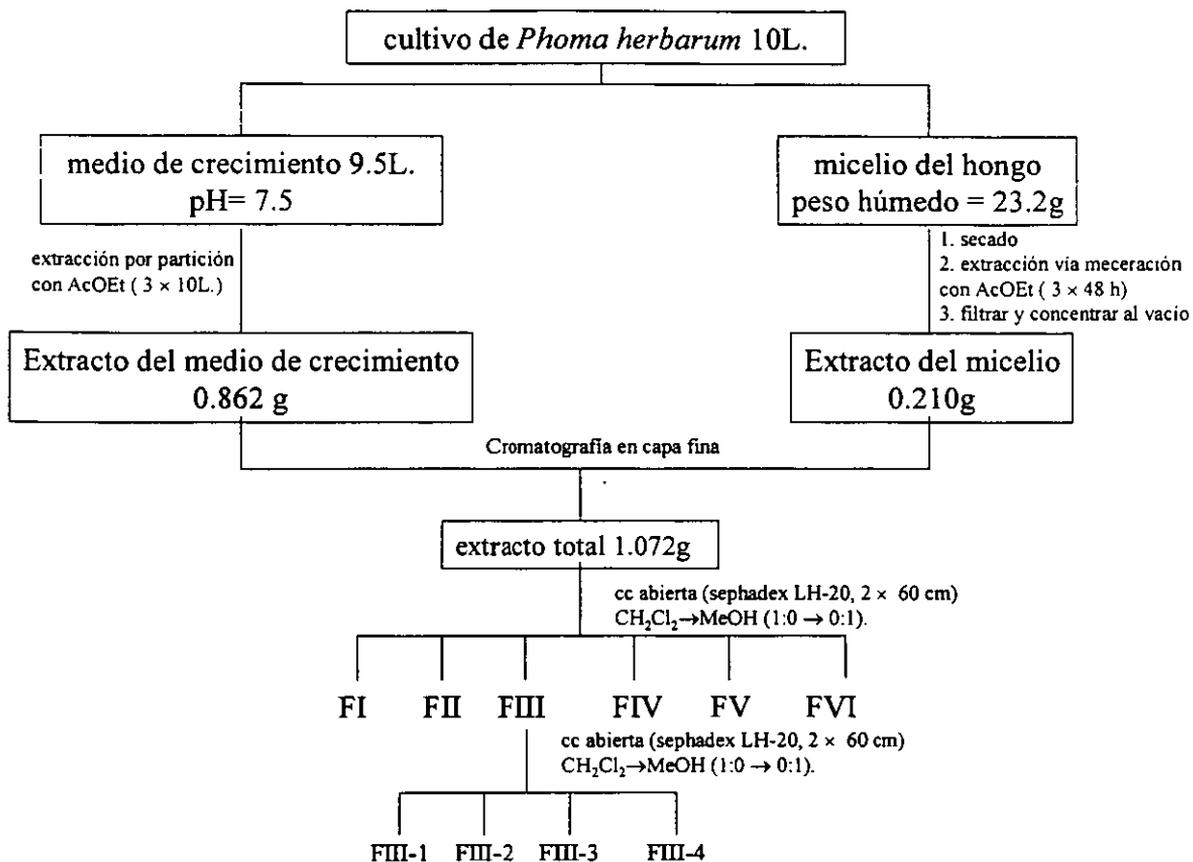
| Eluyente | Proporción % | Número de fracciones | Fracciones combinadas | Clave de las fracciones |
|---------------------------------------|--------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| CH ₂ Cl ₂ | 100 | 1-7 | 1-16 | FI |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 95-5 | 8-16 | 17-20 | FII |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 90-10 | 17-23 | 21-33 | FIII |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 85-15 | 24-35 | | |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 80-20 | 36-40 | 34-41 | FIV |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 70-30 | 44-47 | 42-53 | FV |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 60-40 | 47-51 | | |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 50-50 | 52-57 | 54-57 | FVI |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 30-70 | 58-62 | 58-64 | FVII |
| MeOH | 100 | 63-67 | 65-67 | FVIII |

Cuadro 11. Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna rápida de la fracción activa FIII obtenida a partir del extracto total del micelio y del medio de crecimiento del hongo *Phoma herbarum*.

| Eluyente | Proporción % | Número de fracciones | Fracciones combinadas | Clave de las fracciones |
|---------------------------------------|--------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| CH ₂ Cl ₂ | 100 | 1-5 | 1-5 | FIII-1 |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 95:5 | 6-19 | 6-23 | FIII-2 |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 90:10 | 20-26 | 24-40 | FIII-3 |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 85:15 | 27-33 | | |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 80:20 | 34-42 | 41-54 | FIII-4 |
| CH ₂ Cl ₂ -MeOH | 50:50 | 43-51 | | |
| MeOH | 100 | 52-54 | | |

4.5.3.2 Aislamiento de las herbaruminas I-III (191-193) mediante cromatografía en capa fina (ccf) a partir de la fracción activa FIII-2.

El aislamiento y la purificación de la herbarumina III (193) de la fracción activa FIII-2 (18.4 mg) se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina (ccf) utilizando placas preparativas recubiertas de gel de sílice (Merck, GF₂₅₄) con un grosor de 0.2 mm y como sistema de elución una mezcla binaria de disolventes: CH₂Cl₂-Metanol en proporción de 90:10. La herbarumina III (193) se aisló como un aceite de color amarillo claro con un R_f 0.65.



Esquema 2. Proceso de extracción y fraccionamiento del extracto orgánico de *Phoma herbarum*.

4.5.4 Estudio químico del extracto orgánico derivado de la especie *P. sorghina*.

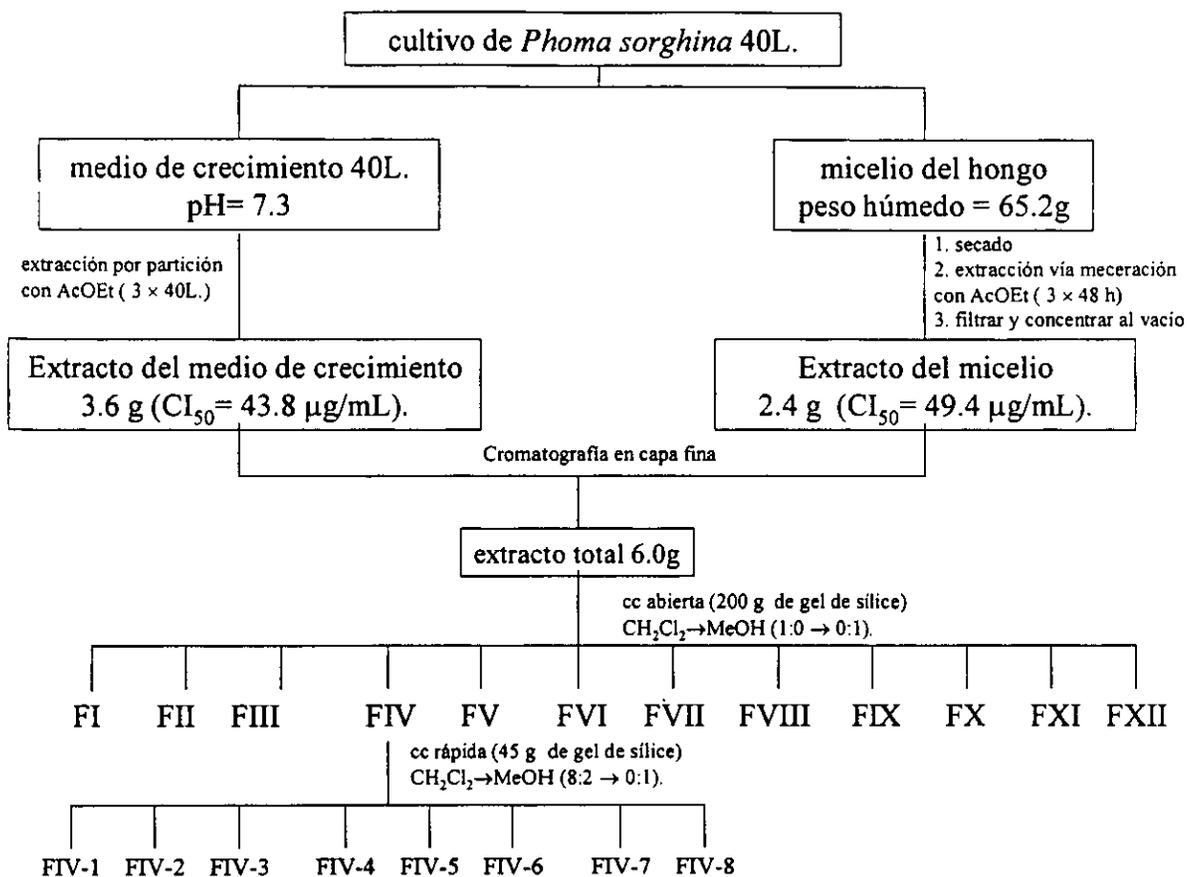
4.5.4.1 Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico derivado de la especie *P. sorghina*.

La resolución del extracto total resultante del cultivo de *P. sorghina* (6.0 g) se efectuó mediante cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice (200 g). Los

eluyentes empleados consistieron en mezclas de CH_2Cl_2 -AcOEt (1:0→0:1) y AcOEt-MeOH (1:0→0:1). Se obtuvieron un total de 257 eluatos (250 mL) reuniéndose aquellos que presentaron similitud cromatográfica, para así obtener 12 conjuntos de fracciones primarias (FI-FXII). Las fracciones se evaluaron de manera independiente mediante el bioensayo del crecimiento radicular. El efecto inhibitorio se concentró en la fracción FIV. En el Cuadro 12 se sintetiza el fraccionamiento primario del extracto activo de *Phoma sorghina* y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos y fracciones combinadas.

4.5.4.2 Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIV.

La fracción activa FIV se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía sobre gel de sílice (45 g) en columna rápida. Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH (8:2→0:1). Como resultado de este proceso se obtuvieron ocho conjuntos de fracciones secundarias. En el Esquema 3 se resumen los procesos de extracción, fraccionamiento primario y fraccionamiento secundario. En el Cuadro 13 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción activa FIV y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos y fracciones combinadas.



Esquema 3. Extracción y fraccionamiento del extracto obtenido del micelio y del medio de crecimiento del hongo *Phoma sorghina*.

Cuadro 12. Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto obtenido del micelio y del medio de crecimiento del hongo *Phoma sorghina*.

| Eluyente | Proporción % | Número de fracciones | Fracciones combinadas | Clave Fracción |
|--|--------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| CH ₂ Cl ₂ | 100 | 1-12 | 1-8 | FI |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 90-10 | 13-25 | 9-21 | FII |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 80-20 | 26-40 | | |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 70-30 | 41-63 | 22-63 | FIII |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 60-40 | 64-90 | | |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 50-50 | 91-100 | 64-113 | FIV |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 30-70 | 101-123 | | |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 10-90 | 124-150 | 114-163 | FV |
| AcOEt | 100 | 151-168 | | |
| AcOEt-MeOH | 90-10 | 169-190 | 164-200 | FVI |
| AcOEt-MeOH | 80-20 | 191-213 | 201-219 | FVII |
| AcOEt-MeOH | 70-30 | 214-226 | 220-231 | FVIII |
| AcOEt-MeOH | 50-50 | 227-231 | | |
| AcOEt-MeOH | 40-60 | 232-240 | 232-238 | FIX |
| AcOEt-MeOH | 30-70 | 241-245 | 241-245 | FX |
| AcOEt-MeOH | 20-80 | 246-250 | 246-250 | FXI |
| AcOEt-MeOH | 100 | 251-254 | 251-254 | FXII |

Cuadro 13. Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna rápida de la fracción activa FIV obtenida a partir del extracto total del micelio y del medio de crecimiento del hongo *Phoma sorghina*.

| Eluyente | Proporción % | Número de fracciones | Fracciones combinadas | Clave fracción |
|--|--------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 90-10 | 1-26 | 1-15 | FIV-1 |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 85-15 | 44-60 | 43-62 | FIV-2 |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 70-30 | 61-77 | 63-80 | FIV-3 |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 50-50 | 78-100 | 81-110 | FIV-4 |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 30-70 | 101-123 | 111-132 | FIV-5 |
| CH ₂ Cl ₂ -AcOEt | 50-50 | 124-146 | 133-152 | FIV-6 |
| AcOEt | 100 | 147-165 | 153-178 | FIV-7 |
| AcOEt-MeOH | 90-10 | 166-178 | 179-196 | FIV-8 |
| AcOEt-MeOH | 80-20 | 179-189 | 197-203 | FIV-9 |
| AcOEt-MeOH | 70-30 | 190-217 | 204-221 | FIV-10 |
| AcOEt-MeOH | 50-50 | 218-248 | 222-248 | FIV-11 |

4.5.4.3 Aislamiento y purificación mediante CLAR de las antraquinonas presentes en la fracción activa FIV-4 derivada del extracto orgánico del hongo *Phoma sorghina*.

La separación de los compuestos mediante CLAR a partir de la fracción activa FIV-4 (380 mg, $CI_{50} = 41.7 \mu\text{g/mL}$) se realizó en una columna de fase reversa empacada con gel de sílice C_{18} , se utilizó un programa de gradiente lineal utilizando una mezcla binaria de disolventes que consistió en acetonitrilo:agua (88:12) por un tiempo de 0 a 5 min que se cambió linealmente a acetonitrilo:agua (90:10) en un tiempo de 5 a 25 min y finalmente acetonitrilo:agua (90:10) por un tiempo de 25 a 30 min. Se utilizó un período de re-equilibración de 10 minutos entre cada una de las corridas. El flujo que se utilizó para las corridas analíticas fue de 0.4 mL/min y para el caso de las corridas preparativas de 8.4 mL/min.

De la fracción activa FIV se aisló la antraquinona macrosporina (194), las tetrahydroantraquinonas altersolanol A (137) y altersolanol D (195) y los dímeros de tetrahydroantraquinonas alterporriol D (196) y alterporriol E (197). La macrosporina (194) se obtuvo como un sólido cristalino de color amarillo (21 mg), con un punto de fusión (pf) de 303–305 °C y con un tiempo de retención (t_R) de 14.72 min; el altersolanol A (137) se obtuvo como un sólido cristalino en forma de agujas de color rojo (31 mg), con un punto de fusión de 218–220 °C y con un tiempo de retención de 11.88 min; el altersolanol D (195) se obtuvo bajo la forma de un sólido cristalino en forma de agujas de color rojo (13 mg), con un punto de fusión de 248 °C y con un tiempo de retención de 12.92 min; el alterporriol D (196) se aisló como un sólido de color naranja (9 mg), con un punto de fusión de 285 °C y con un tiempo de retención de 9.78 min; por último, el alterporriol E (197) se obtuvo como

un sólido de color naranja (7 mg), con un punto de fusión de 285 °C y con un tiempo de retención de 10.62 min.

4.5.4.4 Preparación del derivado acetilado de la herbarumina II (192c).

A una solución de 10 mg de la herbarumina II (192) en 0.1 mL de piridina anhidra se le agregó 0.1 mL de anhídrido acético. La mezcla se dejó reaccionar durante 48 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se procedió a lavar con HCl 1N (3 × 20 mL), posteriormente se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ (3 × 20 mL) y por último, con agua desionizada (3 × 20 mL). Finalmente, el producto de reacción se seco sobre sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente, obteniéndose el derivado triacetilado de la herbarumina II (192c) [12.3 mg].

4.5.4.5 Preparación del acetónido de la herbarumina II (192d).

A una solución de 10 mg de la herbarumina II (192) en 7.0 mL de acetona se agregaron 70.0 mg de sulfato de cobre anhidro. La solución resultante se calentó a reflujo durante 12 horas. El curso de la reacción se monitoreo mediante ccf. Al cabo de la reacción la mezcla se filtró y se eliminó el disolvente, obteniéndose la 7,8-*O,O*-isopropilidenherbarumina II (192d) [9.1 mg]. El acetónido se purificó mediante CLAR en una columna de fase normal empacada con gel de sílice utilizando un flujo de 8.2 mL/min y como fase móvil una mezcla ternaria constituida por hexano-*i*PrOH-metanol, en las proporciones 80:10:10. Como resultado del proceso se obtuvieron 8.0 mg de la 7,8-*O,O*-isopropilidenherbarumina II (192d).

4.5.4.6 Preparación de los derivados *p*-bromobenzoilados de las herbaruminas I (191a), II (192e) y III (193a).

A una solución de la herbarumina I (191) [5.0 mg en 2.5 mL de piridina], de la herbarumina II (192) [5.0 mg en 2.5 mL de piridina anhidra] o de la herbarumina III (193) [2.0 mg en 2.5 mL de piridina anhidra] se les agregó por separado cloruro de *p*-bromobenzoilo (10.0 mg) y 4-(dimetilamino)piridina (~0.5 mg). Las mezclas de reacción se agitaron a temperatura ambiente durante 48 horas, al cabo de este tiempo, el crudo de cada reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (10 mL), se lavaron sucesivamente con HCl 1N (3 × 10 mL), con una solución saturada de NaHCO₃ (3 × 10 mL) y con agua desionizada (3 × 10 mL). Posteriormente, cada una de las mezclas de reacción se secaron utilizando Na₂SO₄ anhidro, y se evaporaron a sequedad. En cada caso, la purificación de los derivados *p*-bromobenzoilados se realizó mediante cromatografía en capa fina (fase normal) utilizando como eluyente CH₂Cl₂ (100%). Como resultado de este proceso se obtuvieron 3.8 mg del derivado *p*-bromobenzoilado de la herbarumina I (191a), 4.0 mg del derivado *p*-bromobenzoilado de la herbarumina II (192e) y 1.8 mg del derivado *p*-bromobenzoilado de la herbarumina III (193a).

4.5.4.7 Ruptura reductiva del alterporriol D (196) y el alterporriol E (197).

Una muestra de 2 mg del compuesto alterporriol D (196) se disolvieron en 5mL de una solución de NaOH 0.1 M y se adicionó gota a gota una solución de Na₂S₂O₄ en H₂O (5mL). La mezcla de reacción se calentó a 80°C durante dos horas. Posteriormente, la mezcla resultante se neutralizó cuidadosamente en baño de hielo utilizando una solución de HCl 0.1 N y se extrajo con acetato de etilo. Por último, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y

se evaporó el disolvente. En el caso del alterporriol E (197), 2 mg del compuesto se sometieron al proceso de ruptura reductiva siguiendo el protocolo que se utilizó en el caso del alterporriol D (196).

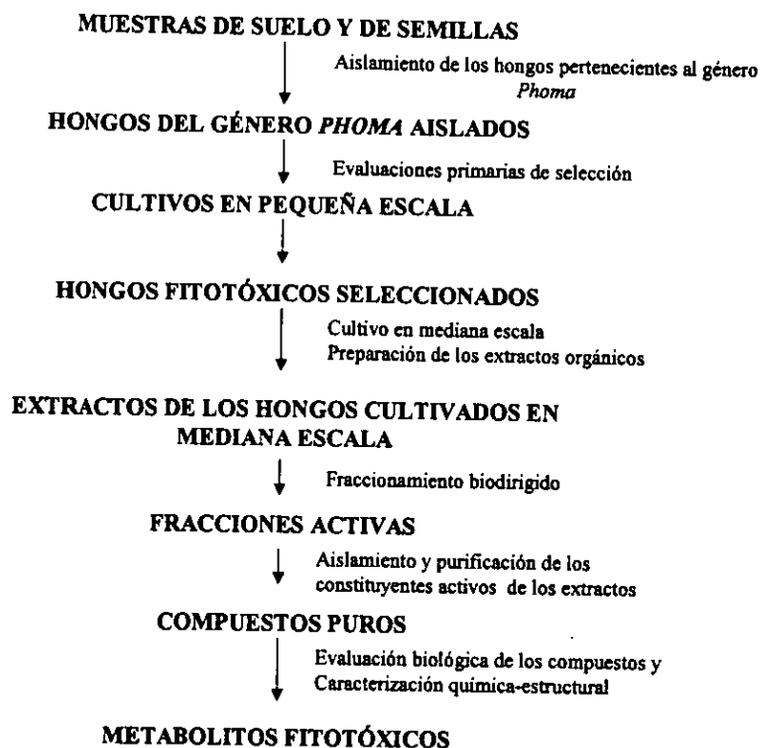
El residuo obtenido de cada una de las reacciones de ruptura reductiva, se analizó por separado utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ (μBondapack 19 × 300, 10 μm; Waters) y una fase móvil binaria consistente de metanol-agua en una proporción de 60:40. La identificación de los compuestos resultantes de la ruptura reductiva del alterporriol D (196) y el alterporriol E (197) se realizó mediante RMN ¹H.

4.5.5 Cálculos de modelado molecular.

Las estructuras de mínima energía se generaron utilizando el método del campo fuerza de MMX, que es una versión derivada del programa MM2 desarrollado por Allinger e implementado en el programa de PCModel V 6.00 (Software de Modelado Molecular, Serena Software, Box 3076, Bloomington, IN 47402-3076). Esta versión utiliza la ecuación de Altona para obtener los valores de las constantes de acoplamiento vicinales de cada uno de los conformeros, además de calcular los valores de ΔH_f (entalpía de formación) y E_{MMX} (Energía). La búsqueda conformacional para el anillo de 10 miembros de las herbaruminas I (191), II (192) y III (193) se realizó tomando en cuenta las restricciones pertinentes de acuerdo con las constantes de acoplamiento vecinales encontradas en el fragmento C(6)-C(7)-C(8)-C(9)-C(10). Para la porción restante del anillo de 10 miembros, las conformaciones se obtuvieron rotando el ángulo de torsión 30° y fueron minimizadas y evaluadas tomando en cuenta el criterio de convergencia de E_{MMX} . La cadena propílica lateral se minimizó considerando todas las conformaciones alternadas posibles.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para la conducción de la presente investigación se utilizó la estrategia metodológica convencional para el descubrimiento de fitotoxinas fúngicas (Lax *et al.*, 1988; Charudattan, 1990; Hoagland, 1990; Strobel *et al.*, 1991; Duke *et al.*, 1995; Cramer, 2000; Evidente, 2001). En primer lugar se procedió al aislamiento de organismos fúngicos del género *Phoma*, utilizando los métodos microbiológicos convencionales (Domsch *et al.*, 1982; Carlile, 1980; Sutton; 1980). Posteriormente, los aislamientos se cultivaron en pequeña escala bajo diferentes condiciones de fermentación. Una vez cultivados los microorganismos se prepararon los extractos orgánicos tanto del micelio como del medio de cultivo con la finalidad de determinar el potencial fitotóxico de los organismos cultivados en diferentes condiciones. Este último proceso permitió la selección de los organismos fúngicos idóneos para la obtención de fitotoxinas. A continuación, los organismos seleccionados se cultivaron en mediana escala para generar la biomasa necesaria para conducir el estudio químico biodirigido que permitió la obtención de las fitotoxinas en cantidades necesarias para su identificación química y realizar los ensayos biológicos apropiados. Por último, los productos fitotóxicos caracterizados fueron objeto de una serie de estudios preliminares conducentes a la determinación de sus posibles blancos de acción a nivel molecular. En el Esquema 4 se resume la estrategia metodológica utilizada a lo largo del presente estudio y para la discusión de resultados se seguirá la misma secuencia.



Esquema 4. Estrategia metodológica empleada en el presente estudio.

5.1 Aislamiento y selección de los organismos fúngicos del género *Phoma*.

Como se indicó en la sección experimental *Phoma herbarum* y *Phoma sorghina* se aislaron a partir de muestras de semillas de maíz y sorgo, respectivamente. En estudios paralelos se comprobó que ambas especies fúngicas son fitopatógenas (García y Martínez, comunicación personal) y por lo tanto podrían constituir fuentes potenciales valiosas de fitotoxinas (Lax *et al.*, 1988; Charudattan, 1990; Hoagland, 1990; Strobel *et al.*, 1991; Duke *et al.*, 1995; Cramer, 2000; Evidente, 2001). Los otros dos organismos fúngicos (*Phoma* sp. TOX-01-020-R4 y *Phoma*.sp. TOX-01-018-R2) analizados de manera preliminar en este estudio se aislaron a partir de muestras de suelo recolectadas al azar en el Campus Universitario.

El aislamiento de los hongos se realizó empleando el medio sólido de papa dextrosa agar (PDA), el cual permite el óptimo desarrollo de los hongos y su identificación (Domsch *et al.*, 1982; Carlile; 1980; Sutton, 1980). Las cuatro especies de hongos aislados se mantuvieron viables resemebrándose a intervalos de un mes en cajas de Petri conteniendo diferentes medios sólidos como el PDA, el AA y el AEM. La identificación de cada uno de los microorganismos se basó en los análisis morfológicos de las estructuras reproductivas y de las colonias de cada uno de ellos (Domsch *et al.*, 1982; Sutton; 1980; Carlile, 1980).

Las cuatro cepas de hongos fitopatógenos aislados se cultivaron en pequeña escala (750 mL) utilizando diferentes condiciones de cultivo (medios de crecimiento, condiciones de agitación y tiempo). Como se desprende de los resultados que se presentan en los Cuadros 14–17, el mejor crecimiento de *P. herbarum* fue en el medio de cultivo MD–I modificado, a una temperatura de 28°C y con una agitación de 120 rpm por un período de tres semanas. *P. sorghina* y *Phoma* TOX–01–020–R4 generaron una mayor cantidad de biomasa con el medio de papa dextrosa (PD) incubado a 28 °C en condiciones estáticas. Por último, las condiciones óptimas de crecimiento de *Phoma* TOX–01–018–R2 incluyeron la utilización del medio MD–I incubando durante 3 semanas a una temperatura de 28 °C y con una agitación de 120 rpm. Al cabo de las fermentaciones se separó el medio de crecimiento del micelio y se prepararon los extractos orgánicos correspondientes con la finalidad de determinar el potencial fitotóxico de cada uno de los aislamientos.

Cuadro 14. Producción de biomasa y rendimiento de los extractos del medio de cultivo y micelio derivados de la fermentación en diferentes condiciones de *P. herbarum*.

| Agitación a 120 rpm y 28°C | | | | |
|----------------------------|------------------|---------------|----------------------------|-------------------------------------|
| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Biomasa (g/L) | Extracto del micelio (g/L) | Extracto del medio de cultivo (g/L) |
| Papa dextrosa | 1 | 0.075 | 0.012 | 0.019 |
| | 2 | 0.160 | 0.065 | 0.046 |
| | 3 | 0.186 | 0.091 | 0.065 |
| Avena | 1 | 0.023 | 0.009 | 0.012 |
| | 2 | 0.035 | 0.017 | 0.013 |
| | 3 | 0.072 | 0.028 | 0.026 |
| Medio MD-1 | 1 | 0.076 | 0.054 | 0.038 |
| | 2 | 0.153 | 0.071 | 0.056 |
| | 3 | 0.269 | 0.165 | 0.167 |
| Estático y 28°C | | | | |
| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Biomasa (g) | Extracto del micelio (g) | Extracto del medio de cultivo (g) |
| Papa dextrosa | 1 | 0.065 | 0.043 | 0.035 |
| | 2 | 0.122 | 0.058 | 0.042 |
| | 3 | 0.189 | 0.096 | 0.088 |
| Avena | 1 | 0.045 | 0.071 | 0.015 |
| | 2 | 0.063 | 0.089 | 0.026 |
| | 3 | 0.136 | 0.127 | 0.076 |
| Medio MD-1 | 1 | 0.051 | 0.016 | 0.029 |
| | 2 | 0.072 | 0.027 | 0.038 |
| | 3 | 0.091 | 0.014 | 0.043 |

Cuadro 15. Producción de biomasa y rendimiento de los extractos del medio de cultivo y micelio derivados de la fermentación en diferentes condiciones de *P. sorghina*.

| Agitación a 120 rpm y 28°C | | | | |
|----------------------------|------------------|---------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Biomasa (g/L) | Extracto del micelio (g) | Extracto del medio de cultivo (g) |
| Papa dextrosa | 1 | 0.023 | 0.009 | 0.007 |
| | 2 | 0.026 | 0.012 | 0.013 |
| | 3 | 0.035 | 0.017 | 0.017 |
| Avena | 1 | 0.016 | 0.008 | 0.011 |
| | 2 | 0.036 | 0.016 | 0.017 |
| | 3 | 0.045 | 0.026 | 0.023 |
| Medio MD-1 | 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 2 | 0.012 | 0.000 | 0.000 |
| | 3 | 0.023 | 0.012 | 0.010 |
| Estático y 28°C | | | | |
| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Biomasa (g) | Extracto del micelio (g) | Extracto del medio de cultivo (g) |
| Papa dextrosa | 1 | 0.032 | 0.123 | 0.184 |
| | 2 | 0.056 | 0.174 | 0.021 |
| | 3 | 0.065 | 0.017 | 0.037 |
| Avena | 1 | 0.053 | 0.021 | 0.016 |
| | 2 | 0.075 | 0.030 | 0.021 |
| | 3 | 0.098 | 0.046 | 0.035 |
| Medio MD-1 | 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 3 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

Cuadro 16. Producción de biomasa y rendimiento de los extractos del medio de cultivo y micelio derivados de la fermentación en diferentes condiciones de *Phoma sp.* TOX-01-020-R4.

| Agitación a 120 rpm y 28°C | | | | |
|----------------------------|------------------|---------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Biomasa (g/L) | Extracto del micelio (g) | Extracto del medio de cultivo (g) |
| Papa dextrosa | 1 | 0.023 | 0.009 | 0.007 |
| | 2 | 0.026 | 0.012 | 0.013 |
| | 3 | 0.035 | 0.017 | 0.01 |
| Avena | 1 | 0.016 | 0.008 | 0.011 |
| | 2 | 0.036 | 0.016 | 0.017 |
| | 3 | 0.045 | 0.026 | 0.023 |
| Medio MD-1 | 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 2 | 0.012 | 0.000 | 0.000 |
| | 3 | 0.023 | 0.012 | 0.010 |
| Estático y 28°C | | | | |
| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Biomasa (g/L) | Extracto del micelio (g) | Extracto del medio de cultivo (g) |
| Papa dextrosa | 1 | 0.032 | 0.123 | 0.184 |
| | 2 | 0.056 | 0.174 | 0.021 |
| | 3 | 0.065 | 0.017 | 0.037 |
| Avena | 1 | 0.053 | 0.021 | 0.016 |
| | 2 | 0.075 | 0.030 | 0.021 |
| | 3 | 0.098 | 0.046 | 0.035 |
| Medio MD-1 | 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 3 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

Cuadro 17. Producción de biomasa y rendimiento de los extractos del medio de cultivo y micelio derivados de la fermentación en diferentes condiciones de *Phoma sp.* TOX-01-018-R2.

| Agitación a 120 rpm y 28°C | | | | |
|----------------------------|------------------|---------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Biomasa (g) | Extracto del micelio (g) | Extracto del medio de cultivo (g) |
| Papa dextrosa | 1 | 0.010 | 0.000 | 0.012 |
| | 2 | 0.022 | 0.000 | 0.019 |
| | 3 | 0.056 | 0.015 | 0.023 |
| Avena | 1 | 0.017 | 0.008 | 0.005 |
| | 2 | 0.023 | 0.013 | 0.012 |
| | 3 | 0.048 | 0.027 | 0.021 |
| Medio MD-1 | 1 | 0.007 | 0.000 | 0.000 |
| | 2 | 0.013 | 0.006 | 0.008 |
| | 3 | 0.021 | 0.014 | 0.010 |
| Estático y 28°C | | | | |
| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Biomasa (g/L) | Extracto del micelio (g) | Extracto del medio de cultivo (g) |
| Papa dextrosa | 1 | 0.012 | 0.006 | 0.000 |
| | 2 | 0.019 | 0.012 | 0.007 |
| | 3 | 0.028 | 0.0015 | 0.01 |
| Avena | 1 | 0.021 | 0.011 | 0.008 |
| | 2 | 0.025 | 0.017 | 0.012 |
| | 3 | 0.028 | 0.010 | 0.019 |
| Medio MD-1 | 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 3 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Para determinar la actividad fitotóxica potencial de los extractos fúngicos se analizó el efecto de estos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. Los resultados de las evaluaciones biológicas de cada extracto se resumen en los Cuadros 18–21. La inhibición de la germinación y del crecimiento radicular se encuentran expresadas en valores de la concentración inhibitoria media (CI₅₀).

Cuadro 18. Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio generados en las distintas fermentaciones de *P. herbarum* sobre el crecimiento radicular y la germinación de la especie *Amaranthus hypochondriacus*.

| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Germinación CI ₅₀ | | Crecimiento radicular CI ₅₀ | |
|-----------------------------|------------------|------------------------------|---------|--|---------|
| | | medio de crecimiento | Micelio | medio de crecimiento | micelio |
| Papa dextrosa con agitación | 1 | 345.3 | 289.7 | 131.4 | 181.1 |
| | 2 | 234.9 | 268.9 | 145.7 | 163.2 |
| | 3 | 212.9 | 198.4 | 196.8 | 218.4 |
| Papa dextrosa sin agitación | 1 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Avena con agitación | 1 | 229.9 | 212.8 | 186.9 | 214.9 |
| | 2 | 213.8 | 184.1 | 144.5 | 124.3 |
| | 3 | 269.5 | 324.2 | 165.2 | 176.1 |
| Avena sin agitación | 1 | 895.2 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 2 | 654.2 | 764.9 | 761.9 | >1000 |
| | 3 | 536.7 | 467.8 | 366.4 | 341.9 |
| Medio MD-1 con agitación | 1 | 123.9 | 91.7 | 78.6 | 101.8 |
| | 2 | 54.6 | 50.8 | 23.9 | 41.7 |
| | 3 | 36.4 | 29.6 | 21.9 | 34.8 |
| Medio MD-1 sin agitación | 1 | 789.4 | >1000 | 654.2 | 864.2 |
| | 2 | 243.6 | 336.0 | 539.7 | 583.1 |
| | 3 | 167.9 | 218.9 | 265.8 | 276.2 |

Cuadro 19. Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio generados en las distintas fermentaciones de *P. sorghina* sobre el crecimiento radicular y la germinación de la especie *Amaranthus hypochondriacus*.

| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Germinación CI ₅₀ | | Crecimiento radicular CI ₅₀ | |
|-----------------------------|------------------|------------------------------|---------|--|---------|
| | | medio de crecimiento | micelio | medio de crecimiento | micelio |
| Papa dextrosa con agitación | 1 | >1000 | >1000 | 558.9 | 764.8 |
| | 2 | >1000 | >1000 | 308.5 | 469.6 |
| | 3 | >1000 | >1000 | 267.2 | 284.8 |
| Papa dextrosa sin agitación | 1 | 231.7 | 194.8 | 558.9 | 740.1 |
| | 2 | 132.0 | 119.4 | 308.5 | 418.9 |
| | 3 | 98.0 | 104.3 | 98.0 | 112.4 |
| Avena con agitación | 1 | >1000 | >1000 | 308.5 | 342.6 |
| | 2 | >1000 | >1000 | 213.9 | 294.8 |
| | 3 | >1000 | >1000 | 198.2 | 214.3 |
| Avena sin agitación | 1 | >1000 | >1000 | 308.5 | 364.2 |
| | 2 | >1000 | >1000 | 213.9 | 218.7 |
| | 3 | 869.5 | >1000 | 256.2 | 289.6 |
| Medio MD-1 con agitación | 1 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Medio MD-1 sin agitación | 1 | ND | ND | ND | ND |
| | 2 | ND | ND | ND | ND |
| | 3 | ND | ND | ND | ND |

Cuadro 20. Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio generados en las distintas fermentaciones de *Phoma TOX-01-020-R4* sobre el crecimiento radicular y la germinación de la especie *Amaranthus hypochondriacus*.

| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Germinación CI ₅₀ | | Crecimiento radicular CI ₅₀ | |
|-----------------------------|------------------|------------------------------|---------|--|---------|
| | | medio de crecimiento | micelio | medio de crecimiento | micelio |
| Papa dextrosa con agitación | 1 | >1000 | >1000 | ND | ND |
| | 2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Papa dextrosa sin agitación | 1 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Avena con agitación | 1 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | 876.0 | >1000 |
| Avena sin agitación | 1 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Medio MD-1 con agitación | 1 | >1000 | >1000 | 786.1 | >1000 |
| | 2 | >1000 | >1000 | 723.9 | >1000 |
| | 3 | ND | ND | 642.1 | 864.3 |
| Medio MD-1 sin agitación | 1 | ND | ND | ND | ND |
| | 2 | ND | ND | ND | ND |
| | 3 | ND | ND | ND | ND |

Cuadro 21. Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio generados en las distintas fermentaciones de *Phoma* TOX-01-018-R2 sobre el crecimiento radicular y la germinación de la especie *Amaranthus hypochondriacus*.

| Medio de cultivo | Tiempo (semanas) | Germinación CI ₅₀ | | Crecimiento radicular CI ₅₀ | |
|-----------------------------|------------------|------------------------------|---------|--|---------|
| | | medio de crecimiento | micelio | medio de crecimiento | micelio |
| Papa dextrosa con agitación | 1 | 452.3 | 542.1 | 245.9 | 212.9 |
| | 2 | 438.9 | 592.6 | 218.9 | 187.4 |
| | 3 | 396.4 | 423.1 | 196.3 | 224.3 |
| Papa dextrosa sin agitación | 1 | >1000 | >1000 | 987.3 | >1000 |
| | 2 | >1000 | >1000 | 874.5 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | 789.5 | >1000 |
| Avena con agitación | 1 | ND | ND | ND | ND |
| | 2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Avena sin agitación | 1 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Medio MD-1 con agitación | 1 | ND | ND | ND | ND |
| | 2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| | 3 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Medio MD-1 sin agitación | 1 | ND | ND | ND | ND |
| | 2 | ND | ND | ND | ND |
| | 3 | ND | ND | ND | ND |

De acuerdo con los resultados resumidos en los Cuadros 18-21 los extractos preparados a partir del micelio y del medio de crecimiento de *P. herbarum* y *P. sorghina* fueron los que presentaron el mayor efecto inhibitorio. En consecuencia los hongos *P. herbarum* y *P. sorghina* se eligieron para realizar los estudios químicos biodirigidos conducentes al aislamiento de fitotoxinas fúngicas de posible utilidad para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

5.2 Fermentación en mediana escala de *P. herbarum* y *P. sorghina*.

Con la finalidad de aislar los metabolitos responsables de la actividad fitotóxica se realizaron los cultivos en mediana escala de cada uno de los hongos seleccionados (*P. herbarum* y *P. sorghina*). El cultivo en mediana escala de *P. sorghina* (40 L) se efectuó en 40 matraces Fernbach de 2.8 L (1L de medio de crecimiento PD, 28 °C, en condiciones estáticas). En el caso de *P. herbarum* se realizaron dos cultivos independientes utilizando el mismo medio de crecimiento (MD-I) y

condiciones de agitación (120 rpm) y temperatura (28°C). La primera fermentación (80 L) tuvo una duración de tres semanas, en tanto que la segunda fermentación (10 L) de 15 días.

Los extractos de los medios de crecimiento de las tres fermentaciones se prepararon mediante sucesivas particiones con acetato de etilo. El micelio se extrajo vía maceración utilizando el mismo disolvente de las particiones.

Para verificar la reproducibilidad del cultivo en pequeña escala con respecto al correspondiente en mediana escala se comparó tanto la actividad fitotóxica como el perfil cromatográfico por ccf y CLAR de cada par de extractos.

Los resultados obtenidos para la actividad fitotóxica (Cuadro 22) y el perfil cromatográfico de los extractos orgánicos derivados del micelio y del medio de crecimiento en mediana escala permitieron determinar que no existen diferencias significativas entre los cultivos en pequeña y mediana escala de *P. herbarum* y *P. sorghina*. Por otro lado, las semejanzas observadas en la actividad biológica y en los perfiles cromatográficos de los extractos obtenidos a partir del medio de crecimiento y del micelio de cada una de las especies cultivadas permitió combinar ambos extractos.

Cuadro 22. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala de *P. herbarum* y *P. sorghina*.

| Extracto | pequeña escala (CI ₅₀) | | mediana escala (CI ₅₀) | |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------|------------------------------------|---------|
| | caldo de cultivo | micelio | caldo de cultivo | micelio |
| <i>P. herbarum</i> (3 semanas) | 21.9 | 34.8 | 26.8 | 40.3 |
| <i>P. herbarum</i> (2 semanas) | 21.9 | 34.8 | 19.7 | 36.2 |
| <i>P. sorghina</i> | 98.0 | 112.4 | 101.3 | 114.9 |

5.3 Estudios químicos biodirigidos de las especies *P. herbarum* y *P. sorghina*.

5.3.1 Obtención de las herbaruminas I (191) y II (192) de la primera fermentación de *Phoma herbarum* Westend.

El extracto combinado (3.2 g) derivado de la primera fermentación de *P. herbarum* se sometió a una cromatografía en columna abierta utilizando como eluyente mezclas de disolventes ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/i\text{-PrOH/MeOH}$) con incrementos de polaridad. Este proceso condujo a la obtención de ocho conjuntos de fracciones primarias (FI–FVIII). La actividad biológica se monitoreo utilizando un método bioautográfico (Anaya *et al.*, 1991) y como semilla de prueba *A. hypochondriacus*, encontrándose que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción FIV. La fracción activa FIV se recromatografió en una columna rápida utilizando como eluyentes mezclas de disolventes con polaridad creciente [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/i\text{-PrOH}$ (9:1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/i\text{-PrOH}$ (5:5)]. Este último proceso permitió la obtención de ocho fracciones secundarias (FIV–1–FIV–8). Los resultados de la determinación de la actividad biológica utilizando el método bioautográfico indicaron que la actividad se concentraba en la fracción secundaria FIV–3, por lo que se procedió a la separación de los constituyentes de esta fracción.

La purificación por CLAR de la fracción activa FIV–3 (186.4 mg) permitió el aislamiento de dos productos naturales novedosos, los cuales se designaron con los nombres triviales de herbaruminas I (191) ($t_R = 10.2$) y II (192) ($t_R = 20.8$), con un rendimiento de 16.0 mg (0.0002 g/L) y 97.1 mg (0.0012 g/L), respectivamente.

5.3.2 Obtención de las herbaruminas I–III (191–193) de la segunda fermentación de *P. herbarum*.

El extracto combinado (1.072 g) derivado de la segunda fermentación de *P. herbarum* se sometió a una cromatografía en columna abierta utilizando Sephadex LH-20 como adsorbente y como eluyentes mezclas de CH_2Cl_2 y MeOH [$\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH}$ (1:0 \rightarrow 0:1)]. Este proceso condujo a la obtención de seis fracciones primarias (FI–FVI). La actividad biológica se monitoreo de nueva cuenta por el método bioautográfico y los resultados indicaron que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción FIII. La fracción activa FIII se recromatografió en una columna rápida utilizando como eluyentes CH_2Cl_2 y MeOH [$\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH}$ (1:0 \rightarrow 0:1)]. Esta última separación cromatográfica generó cuatro fracciones secundarias (FIII-1–FIII-4). Los resultados de la determinación de la actividad biológica indicaron que la actividad se concentraba en la fracción FIII-2; la purificación de los compuestos presentes en la fracción activa FIII-2 se realizó por cromatografía en capa fina preparativa. Este procedimiento permitió el aislamiento de una nonenólida adicional, la herbarumina III (193) (Figura 2), con un rendimiento total de 4.0 mg (0.0004 g/L). De manera adicional, se obtuvieron las herbaruminas I (6 mg) y II (17 mg) aisladas de la primera fermentación de *P. herbarum*.

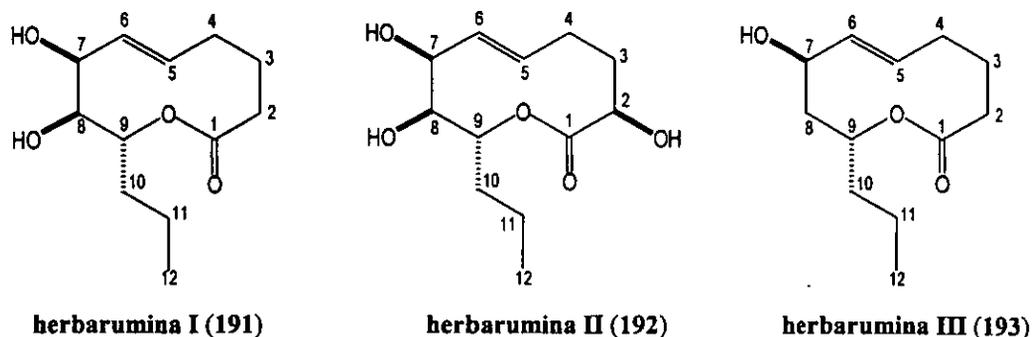
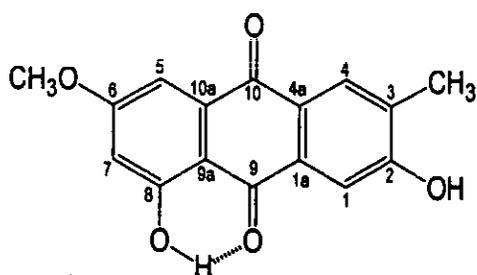


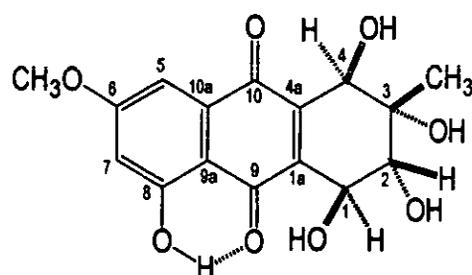
Figura 2. Nonenólidas aisladas del hongo *P. herbarum*.

5.3.3 Obtención de la macrosporina (194), altersolanoles A (137) y D (195) y alterporrioles D (196) y E (197) de *P. sorghina*.

El fraccionamiento preliminar del extracto activo de *P. sorghina* (6.0 g) vía una cromatografía en columna abierta condujo a la obtención de once fracciones primarias (FI–FXI). La actividad biológica se monitoreó utilizando el método bioautográfico, encontrándose que la actividad se concentraba en la fracción FIV. La aplicación de diversos procedimientos cromatográficos (CC y CLAR) a la fracción activa FIV permitió la obtención de cinco compuestos conocidos de naturaleza antraquinoides: la macrosporina (194), el altersolanol A (137), el altersolanol D (195), el alterporriol D (196) y el alterporriol E (197) (Figura 3). Los rendimientos de los compuestos 194, 137, 195, 196 y 197 fueron de 0.21 g (0.0052 g/L), 0.031 g (0.0007 g/L), 0.013 g (0.0003 g/L), 0.009 g (0.0002g/L) y 0.007 g (0.0001 g/L), respectivamente.

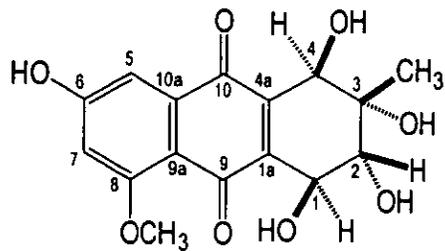


macrosporina (194)

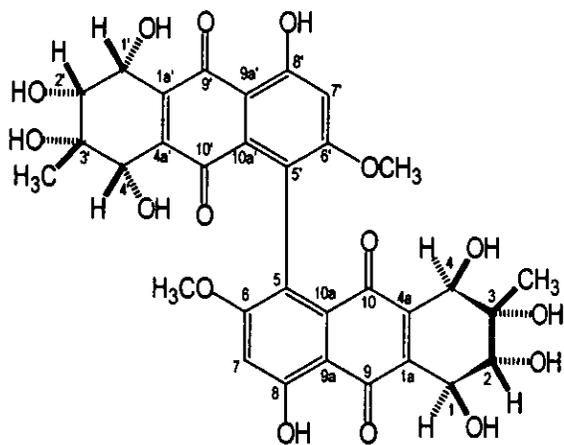


altersolanol A (137)

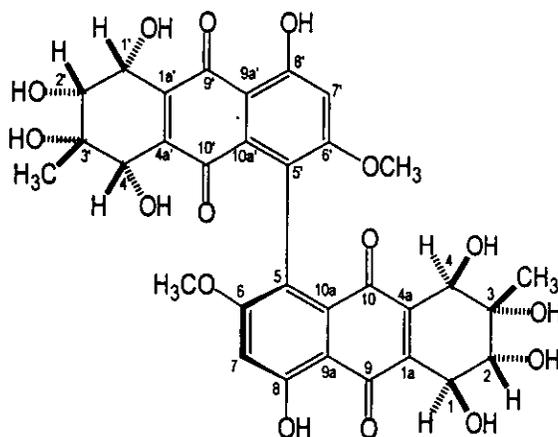
Figura 3. Antraquinonas aisladas del hongo *P. sorghina*.



altersolanol D (195)



alterporriol D (196)



alterporriol E (197)

Figura 3. Antraquinonas aisladas del hongo *P. sorghina* (continuación).

5.3.4 Caracterización de la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y los alterporrioles D (196) y E (197).

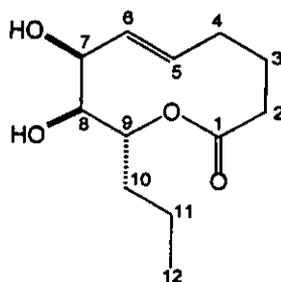
Los productos 194 (Stoessl y Stothers; 1979; Stoessl *et al.*, 1983; Suemitsu *et al.*, 1988; Suemitsu *et al.*, 1990), 137 (Stoessl, 1968a; 1968b; Wheeler *et al.*, 1975; Stoessl y Stothers, 1979; Stoessl y Stothers; 1982; Stoessl *et al.*, 1983; Okamura *et al.*, 1983; Assante y Nissini, 1986; Suemitsu *et al.*, 1987; 1988; Krohn *et al.*, 1988; Suemitsu *et al.*, 1990; Ohnishi *et al.*, 1992; Haraguchi *et al.*, 1992; Okamura *et al.*, 1993a; 1996; Yagi *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994; Hiraguchi *et al.*, 1996), 195 (Stoessl y Stothers, 1988; Okamura *et al.*, 1993 a; 1993b; Haraguchi *et al.*, 1996; Yagi *et al.*, 1993) 196 (Lazarovits *et al.*, 1988; Suemitsu *et al.*, 1989; Suemitsu *et al.*, 1990; Ohnishi *et al.*, 1991) y 197 (Lazarovits *et al.*, 1988; Suemitsu *et al.*, 1989; Suemitsu *et al.*, 1990; Ohnishi *et al.*, 1991) se caracterizaron por comparación de las constantes físicas y espectroscópicas con las descritas previamente en la literatura. En el Apéndice I se proporcionan las constantes físicas y espectroscópicas de estos productos.

5.4 Elucidación estructural de las herbaruminas I–III (191–193) aisladas del hongo fitopatógeno *P. herbarum*.

Las nonenólidas novedosas aisladas de *P. herbarum* pertenecen al grupo II de la clasificación propuesta por Dräger (Dräger *et al.*, 1995). Los tres compuestos poseen una cadena *n*-propílica en la posición C-9, una doble ligadura *trans* disustituida entre C-5 y C-6 y uno, dos o tres grupos hidroxilos en diferentes posiciones del macrociclo. Así, la herbarumina III (193) presenta un hidroxilo en la posición C-7; en tanto que, la herbarumina I (191) posee dos grupos hidroxilos localizados en las posiciones C-7 y C-8; por último, la herbarumina II (192) tiene tres funciones carbinólicas secundarias ubicadas en C-2, C-7 y C-8.

De manera general la elucidación estructural de las tres nonenólidas se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos, químicos y quirópticos y cálculos de mecánica molecular. De tal forma que, los espectros en el IR (Cuadros 23–25) permitieron detectar los principales grupos funcionales presentes en las moléculas y en todos los casos, se observaron bandas asociadas a la presencia de grupos hidroxilos ($\sim 3390\text{ cm}^{-1}$), funciones olefinicas ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$) y carbonilo de lactona ($\sim 1720\text{ cm}^{-1}$) (Silverstein *et al.*, 1991). La fórmula molecular de cada compuesto se estableció mediante espectrometría de masas de alta resolución (Cuadros 23–25). Este análisis permitió determinar que todas las lactonas contienen 12 átomos de carbono.

Cuadro 23. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la herbarumina I (191).

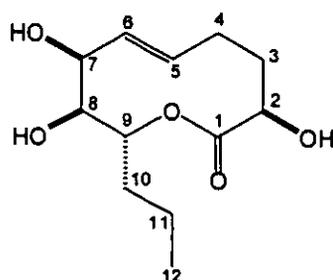


herbarumina I (191)

| | |
|---|--|
| p.f. | 42–44°C |
| $[\alpha]_D$ | +28.0° (c 1.0 mg/mL, EtOH) |
| UV λ_{\max} nm (log ϵ) (EtOH) | 204 (3.58) |
| DC $\Delta\epsilon$ (nm) (EtOH) | 2.70×10^4 (205), -1.85×10^4 (228) |
| IR ν_{\max} cm^{-1} (KBr) | 3390, 2957, 2926, 1721, 1191, 1046 |
| EM-IEAR m/z | 228.1364, calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (228.1361) |
| RMN ^1H y ^{13}C | Cuadros 25 y 26, Espectros 1 y 4 |
| EM-IE m/z (int. rel.) | 228 $[\text{M}]^+$ (3), 210 (12), 200 (10), 157 (10), 143 (30), 125 (85), 95 (100), 79 (90), 57 (37), 41 (26). |

Nota: los espectros correspondientes se encuentran en la sección de espectros.

Cuadro 24. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la herbarumina II (192).

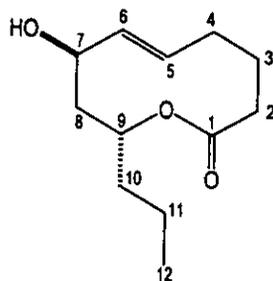


herbarumina II (192)

| | |
|---|---|
| p.f. | 100–101°C |
| $[\alpha]_D$ | +30.8°(c 1.0 mg/mL, MeOH) |
| UV λ_{\max} nm (log ϵ) (MeOH) | 209 (3.14) |
| DC $\Delta\epsilon$ (nm) (MeOH) | 5.31×10^4 (207), -2.37×10^4 (222) |
| IR ν_{\max} (KBr) | 3560, 2962, 2931, 2873, 1720, 1053 cm^{-1} |
| EM–IEAR m/z | 244.1316 calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_5$ (teórico 244.1310) |
| RMN ^1H y ^{13}C | Cuadros 25 y 26, Espectros 2 y 5 |
| EM–IE m/z (int. rel.) | 244 $[\text{M}]^+$ (3), 226 (5), 208 (3), 143 (75), 97 (43), 67 (100), 57 (39), 41 (29). |

Nota: los espectros correspondientes se encuentran en la sección de espectros.

Cuadro 25. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la herbarumina III (193).



herbarumina III (193)

| | |
|---|---|
| p.f. | — |
| $[\alpha]_D$ | +22.0° (c 1.0 mg/mL, EtOH) |
| UV λ_{\max} (log ϵ) nm (MeOH) | 209 (3.14) |
| DC $\Delta\epsilon$ (nm) (MeOH) | 2.31×10^4 (207), -1.37×10^3 (222) |
| EM-IEAR m/z | 212.1416 calculada para $C_{12}H_{20}O_3$ (212.1412) |
| RMN 1H y ^{13}C | Cuadros 25 y 26, Espectros 3 y 6 |
| EM-IE m/z (int. rel.) | 212 $[M]^+$ (5), 194 (35), 169 (20), 151 (73), 143 (30), 125 (100), 113 (47), 97 (70), 63 856, 70 (53), 55 (78), 41 (48). |

Nota: los espectros correspondientes se encuentran en la sección de espectros.

Los espectros de RMN unidimensionales (Espectros 1–6, Cuadros 26 y 27) y bidimensionales [(COSY, Figura 4 y Espectros 7–8) y (HMBC, Espectros 9–11)] permitieron establecer que los productos naturales eran nonenólidas similares a las pinolidoxinas, policétidos aislados por Evidente y colaboradores a partir del hongo

fitopatógeno *Ascochyta pinodes* (Evidente *et al.*, 1993; 1998; 2001). Las características más importantes de los espectros de RMN se resumen a continuación:

a. Las señales diagnósticas para la cadena *n*-propílica aparecen en los espectros de RMN ^1H (Cuadro 25) en δ_{H} ~1.80 (1H, H-10a), ~1.50 (1H, 10b), ~1.40 (1H, 11a), ~1.30 (1H, 11b) y ~0.89 (3H, t, $J= 7.5$ Hz, H-12); en tanto que en los espectros de RMN ^{13}C las señales correspondientes se observaron en δ_{C} 33.7 (C-10), 17.9 (C-11) y 13.8 (C-12) (Cuadro 26).

b. Las absorciones atribuibles a la función olefínica *trans* disustituida aparecen en δ_{H} ~5.60 (1H, H-6) y δ ~5.50 (1H, H-6), las cuales correlacionan en el espectro HMQC con las señales en δ_{C} ~125.0 (C-5) y ~130.7 (C-6), respectivamente. La magnitud de la constante de acoplamiento mayor (~15.5 Hz) en cada conjunto de señales confirmó la estereoquímica *trans* de la doble ligadura.

c. En δ_{H} ~4.90 (1H, H-9) se observa la señal para el protón geminal a la función etérea de la lactona y presenta una correlación en el espectro HMQC (Espectros 12-14) con la señal en δ_{C} ~70.0.

d. Las señales restantes observadas en los espectros de RMN corresponden a los metilenos de la macrolactona y a los hidrógenos geminales de los grupos hidroxilos secundarios. En la herbarumina III (**193**), la señal correspondiente al hidrógeno geminal de la única función carbinólica se observó en δ_{H} 4.42 como un hepteto ($J= 2.5$ Hz) y el carbono correspondiente aparece en δ_{C} 68.0. El análisis detallado de los cuadros de conectividad observados en el espectro de COSY (Espectro 8) permitió comprobar que esta función carbinólica se encuentra adyacente a la doble ligadura.

Cuadro 26. Desplazamientos químicos de RMN¹H de las herbaruminas I-III (191-193) y de la triacetilherbarumina II (192c).

| Posición | herbarumina I ^{ab} | herbarumina II (CDCl ₃) ^{ab} | | (MeOD) | triacetilherbarumina | herbarumina III ^{ab} |
|----------|---------------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | (191) | (192a) | (192b) | (192) | II ^{abde} (192c) | (193) |
| 2a | 2.32 ddd, 14.0, 6.0, 2.0 | 3.99 dd, 8.2, 3.0 | 4.27 t, 3.5 | 3.85 dd, 10.0, 3.2 | 4.75 dd, 10.0, 3.5 | 2.30 dd, 11.8, 5.7 |
| 2b | 2.01 ddd, 14.0, 12.5, 2.0 | | | | | 2.01 m |
| 3a | 1.89 m | 2.05 m | 2.03 m | 1.92 m | 2.00 m | 1.98 m |
| 3b | 1.73 m | 2.10 m | 1.86 m | 1.80 m | 2.00 m | 1.76 m |
| 4a | 2.40 dt, 12.0, 3.0 | 2.34 m | 2.27 m | 2.32 m | 2.37 m | 2.37 m |
| 4b | 1.97 m | 2.15 m | 2.10 m | 2.11 m | 2.18 dtd, 15.0, 10.0, 5.0 | 1.98 m |
| 5 | 5.52 dddd, 15.5, 10.0, 4.0, 2.5 | 5.59 dddd, 16.3, 8.0, 5.5, 2.5 | 5.51 dddd, 16.3, 10.5, 4.0, 1.0 | 5.50 dddd, 16.3, 10.0, 5.5, 2.5 | 5.44 dddd, 15.5, 10.0, 4.5, 2.0 | 5.47 m |
| 6 | 5.62 dd, 15.5, 2.5 | 5.63 dd, 16.3, 2.5 | 4.31 dd, 6.5, 3.0 | 5.60 dd, 16.3, 2.5 | 5.60 dd, 15.0, 2.5 | 5.61 ddd, 15.2, 2.0, 1.2 |
| 7 | 4.43 quinteto, 2.0 | 4.48 br s | 3.71 dd, 4.5, 3.0 | 4.35 quint, 2.5 | 5.68 quint, 2.5 | 4.42 hept, 2.5 |
| 8a | 3.52 dd, 9.8, 2.5 | 3.56 dd, 9.8, 2.5 | 4.27 t, 3.5 | 3.53 dd, 9.8, 2.5 | 4.95 dd, 10.0, 2.5 | 1.86 ddd, 14.6, 5.4, 2.0 |
| 8b | | | | | | 1.79 ddd, 14.6, 11.2, 2.2 |
| 9 | 4.96 td, 9.8, 2.5 | 5.06 td, 9.8, 2.5 | 5.00 dt, 9.0, 4.5 | 5.37 td, 9.8, 2.5 | 5.37 ddd, 10.0, 8.5, 3.0 | 5.29 dddd, 11.0, 8.5, 4.3, 2.2 |
| 10a | 1.87 m | 1.77 m | — | 1.86 m | 1.56 m | 1.54 m |
| 10b | 1.55 m | 1.57 m | — | 1.55 m | 1.46 m | 1.42 m |
| 11a | 1.38 m | 1.47 m | — | 1.37 m | 1.31 m | 1.43 m |
| 11b | 1.30 m | 1.31 m | — | 1.37 m | 1.31 m | 1.31 m |
| 12 | 0.89 t, 7.5 | 0.91 t, 7.5 | 0.93 t, 7.5 | 0.92 t, 7.5 | 0.89 t, 7.5 | 0.90 t, 7.3 |

^aCDCl₃, ¹H (500 MHz)

^bConstantes de acoplamiento en Hz.

^d2-CH₃CO: 2.17; 7-CH₃CO: 2.09; 8-CH₃CO: 2.04 ppm.

^e2-CH₃CO: 20.6, 169.9; 7-CH₃CO: 20.7, 169.9; 8-CH₃CO: 20.8, 169.5 ppm.

Nota: Los espectros correspondientes se encuentran en la sección de espectros.

Cuadro 27. Desplazamientos químicos de RMN ¹³C de las herbaruminas I–III (191–193) y la 2,7,8–triacetilherbarumina II (192c).^a

| Posición | herbarumina I ^b (191) | herbarumina II ^b (192) | 2,7,8–triacetil–herbarumina II ^b (192c) | herbarumina III ^b (193) |
|----------|----------------------------------|-----------------------------------|---|------------------------------------|
| 1 | 176.4 | 177.0 | 171.2 | 176.8 |
| 2 | 34.4 | 72.6 | 73.5 | 34.6 |
| 3 | 24.6 | 33.8 | 30.6 | 25.9 |
| 4 | 33.3 | 25.2 | 27.9 | 33.6 |
| 5 | 124.8 | 122.4 | 123.9 | 124.8 |
| 6 | 130.7 | 131.9 | 127.7 | 134.5 |
| 7 | 73.3 | 68.3 | 70.7 | 68.0 |
| 8 | 73.6 | 71.8 | 71.8 | 40.5 |
| 9 | 70.2 | 70.7 | 70.0 | 67.8 |
| 10 | 33.7 | 33.8 | 33.4 | 38.0 |
| 11 | 17.9 | 17.8 | 17.2 | 17.9 |
| 12 | 13.8 | 13.8 | 13.9 | 13.8 |

^aRMN¹³C (125 MHz)

^bLas asignaciones se confirmaron mediante HMQC y HMBC.

Nota: Los espectros correspondientes se encuentran en la sección de espectros.

En la herbarumina I (191) las dos absorciones de los hidrógenos geminales a los grupos hidroxilos secundarios aparecen en δ_H/δ_C 3.52 (dd, 9.8, 2.5 Hz, H-8)/73.6 (C-8) y δ_H/δ_C 4.43 (quinteto, $J= 2.0$ Hz, H-7)/73.3 (C-7) (Cuadros 26 y 27). Por último, en la herbarumina II (192) las señales correspondientes se observan en δ_H/δ_C 3.99 (dd, $J= 8.2, 3.0$ Hz, H-2)/72.6 (C-2), δ_H/δ_C 3.56 (dd, $J= 9.8, 2.5$ Hz, H-8)/71.8 (C-8) y 4.48 (sa)/68.3 (C-7) (Cuadros 26 y 27). El análisis de los cuadros de conectividad observados en el espectro de COSY de las herbaruminas I (191) y II (192) permitió comprobar la presencia de un diol vecinal en los dos compuestos; uno de los extremos del diol se encuentra adyacente a la doble ligadura, en tanto que el otro se encuentra vecinal al grupo metino geminal a la función etérea de la lactona. En la Figura 4, a manera de ejemplo se ilustran las correlaciones observadas en el espectro COSY de la herbarumina I (191). Los espectros restantes se incluyen en la sección de espectros al final de la sección de discusión.

La obtención de un derivado triacetilado (192c) al tratar la herbarumina II (192) con anhídrido acético y piridina, confirmó químicamente la presencia de los tres grupos hidroxilo en el compuesto. Como era de esperarse las señales de los grupos carbinólicos se desplazan paramagnéticamente en el espectro de RMN 1H del derivado triacetilado (Cuadro 26).

La presencia del diol vecinal en la herbarumina II (192), se comprobó también químicamente mediante la formación del acetónido por tratamiento del producto natural 192 con acetona/ $CuSO_4$ y reflujo. El estudio minucioso del espectro de RMN 1H en $CDCl_3$ (Espectro 16) del acetónido (192d) permitió determinar que los hidroxilos se encuentran *cis*. Los desplazamientos químicos de los metilos (δ_H 1.46 y δ 1.36) y los oximetinos del anillo dioxolano (δ_H 4.78 y 3.89) son consistentes con esta propuesta (Evidente *et al.*, 1993; 1998). Cabe mencionar que cuando un diol vecinal presenta la estereoquímica *trans*, las señales de los metilos y los

oximetinos del anillo dioxolano se observan en δ_H 1.41/1.37 y en δ_H 4.03/3.34, respectivamente (Evidente *et al.*, 1993; 1998).

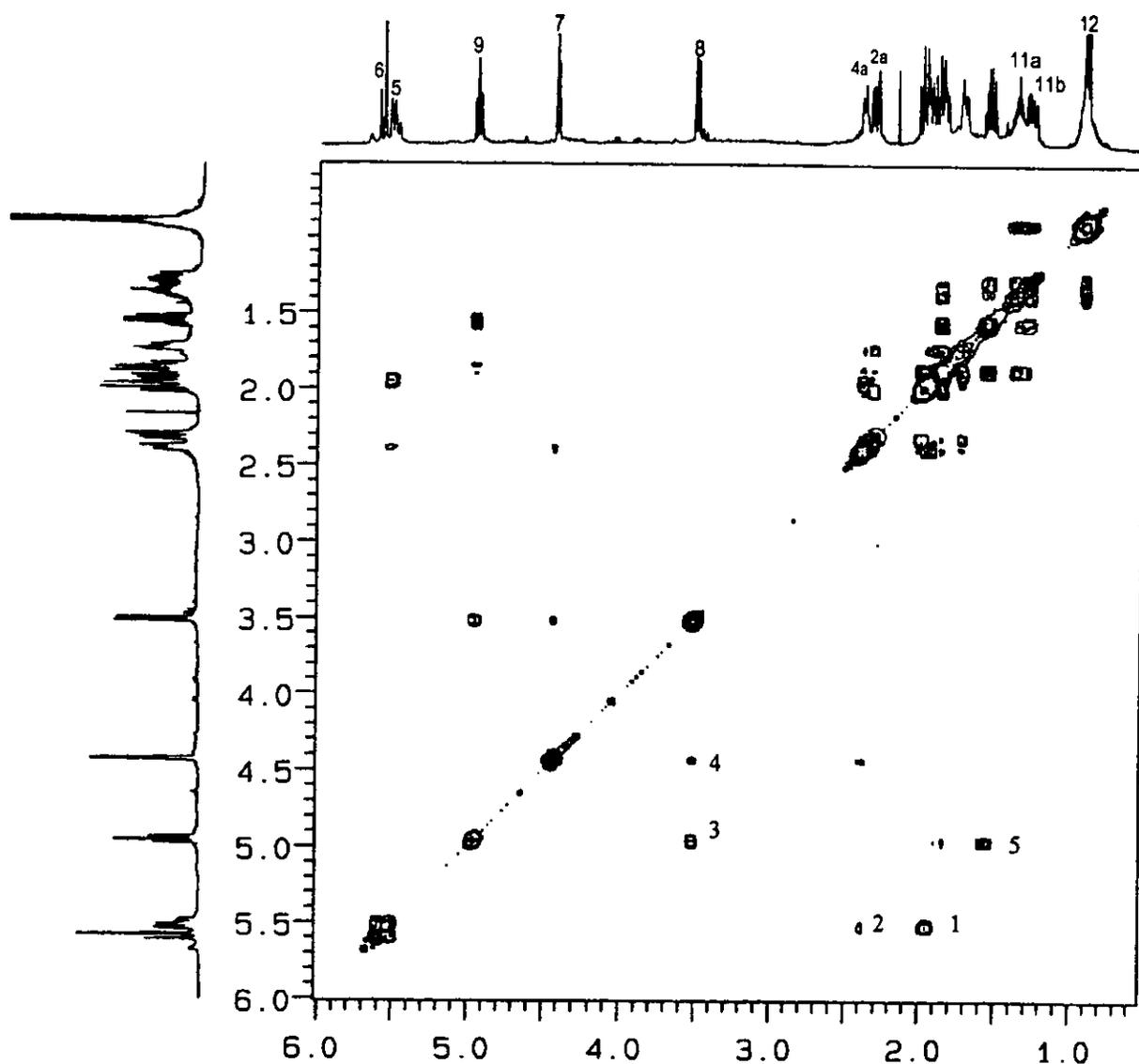


Figura 4. Espectro de RMN bidimensional COSY de la herbarumina I (191) (500 MHz, CDCl₃). Principales correlaciones ¹H-¹H (³J): 1, H4b-H5; 2, H4a-H5; 3, H8-H9; 4, H8-H7; 5, H9-H10b.

La ubicación de la cadena lateral *n*-propílica, las funciones carbinólicas y la doble ligadura en la lactona de 10 miembros se confirmó con base en las correlaciones observadas en los espectros de HMBC (Figura 5). En el caso de la herbarumina III (193) las correlaciones C5/H-7 y H-4b; C7/H-6; C-8/H-6 y H-7; C-9/H-7 y H-8 fueron consistentes con la ubicación de la doble

ligadura y el grupo carbinol en C5/C6 y C7, respectivamente. De manera adicional, las correlaciones de C9/H-10a y H-10b y C1/H-9 indicaron que la cadena *n*-propílica y el cierre de la lactona se encontraban localizados en C-9. Así mismo las correlaciones C5/H-7 y H-4b; C7/H-6; C-8/H-6 y H-7; C-9/H-7 y H-8 encontradas en los espectros de HMBC de las herbaruminas I (191) y II (192) fueron congruentes con la ubicación de la doble ligadura y el diol vecinal en C5/C6 y C7/C8, respectivamente. Por último, las correlaciones C2/H-3a, H-3b, H-4a y H-4b permitieron ubicar al tercer grupo carbinólico de la herbarumina II (192) en C-2 (Figura 5).

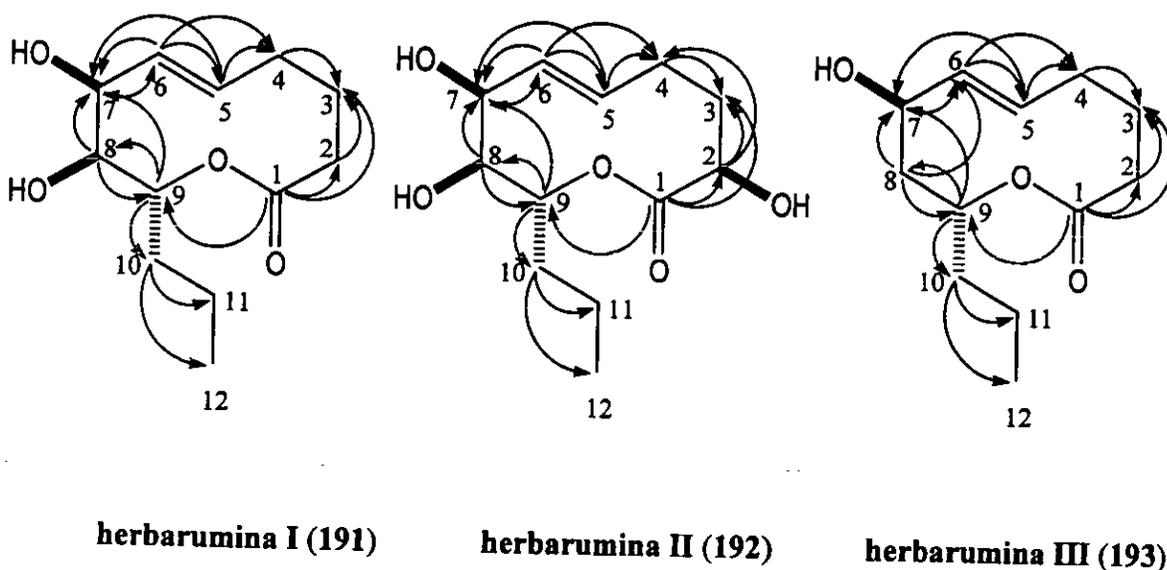


Figura 5. Correlaciones importantes observadas en el espectro HMBC de las herbaruminas I-III (191-193).

Las evidencias presentadas anteriormente permitieron establecer las estructuras de las herbaruminas I-III (191-193) como la 7,8-dihidroxi-9-propil-5-nonen-9-olida (191), 2,7,8-trihidroxi-9-propil-5-nonen-9-olida (192) y la 7-hidroxi-9-propil-5-nonen-9-olida (193), respectivamente.

El siguiente paso en la elucidación estructural de las herbaruminas I-III (191-193), fue la determinación de la estereoquímica y la conformación del anillo lactónico. Para ello se realizaron cálculos de mecánica molecular, se analizaron los espectros NOESY y se compararon las constantes de acoplamiento vecinales experimentales con las calculadas teóricamente. Los cálculos de mecánica molecular permitieron determinar las conformaciones de mínima energía y las constantes de acoplamiento teóricas (Haasnoot *et al.*, 1980). Las estructuras de mínima energía se generaron utilizando el cálculo del campo de fuerza MMX, que es una versión derivada del programa MM2, desarrollado por Allinger e implementado en el programa PCModel v. 6.0 (Serena Software, Bloomington, IN. USA). Esta versión utiliza la ecuación de Altona para obtener los valores de las constantes de acoplamiento vecinales de cada uno de los conformeros. De manera adicional se calcularon las entalpías de formación (ΔH_f) y la energía relativa (E_{MMX}).

En los casos de las herbaruminas I (191) y III (193), la búsqueda conformacional sistemática reveló la existencia de una conformación de mínima energía para el anillo de diez miembros (Figuras 6 y 7). Como se aprecia en las Figuras 6 y 7, el anillo de diez miembros adopta una conformación de tipo silla-silla-silla o [55] muy similar a la descrita para el ciclodecano (Hilderbrandt *et al.*, 1973; Dale, 1973a; 1973b; 1973c).

En las Cuadros 28 y 29 se indican los ángulos diedros y las constantes de acoplamiento vecinales calculadas a partir de estos ángulos para la conformación de mínima energía de los compuestos 193 y 191, respectivamente.

Cuadro 28. Ángulos diedros selectos (ϕ_{MMIX} en grados), constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) y constantes de acoplamiento observadas (J_{obs} en Hz) de la herbarumina III (193) y la 7-(*p*-bromobenzoil)herbarumina III (193a).

| H(x)-C-C-H(y) | 193 | | | 193a | |
|---------------|---------------|------------|-------------|---------------|------------|
| | ϕ_{MMIX} | J_{calc} | J_{obs}^A | ϕ_{MMIX} | J_{calc} |
| 2a.3a | -68 | 1.7 | — | -67 | 1.7 |
| 2a.3b | +48 | 5.3 | 5.7 | +48 | 5.2 |
| 2b.3a | +175 | 13.6 | 11.8 | +175 | 13.6 |
| 2b.3b | -69 | 1.7 | — | -68 | 1.7 |
| 4a.5 | -57 | 2.5 | — | -58 | 3.7 |
| 4b.5 | -174 | 11.5 | — | -175 | 11.5 |
| 6.7 | -54 | 4.0 | 2.0 | -52 | 4.1 |
| 7.8a | -59 | 4.0 | 5.4 | -58 | 4.2 |
| 7.8b | +57 | 2.3 | 2.2 | +58 | 2.2 |
| 8a.9 | -64 | 1.7 | 2.0 | -64 | 1.7 |
| 8b.9 | +180 | 11.5 | 8.5 | +180 | 11.5 |
| 9.10a | +64 | 2.0 | — | +64 | 1.8 |
| 9.10b | -179 | 11.5 | 11.0 | +180 | 11.5 |

¹H 500 MHz en CDCl₃

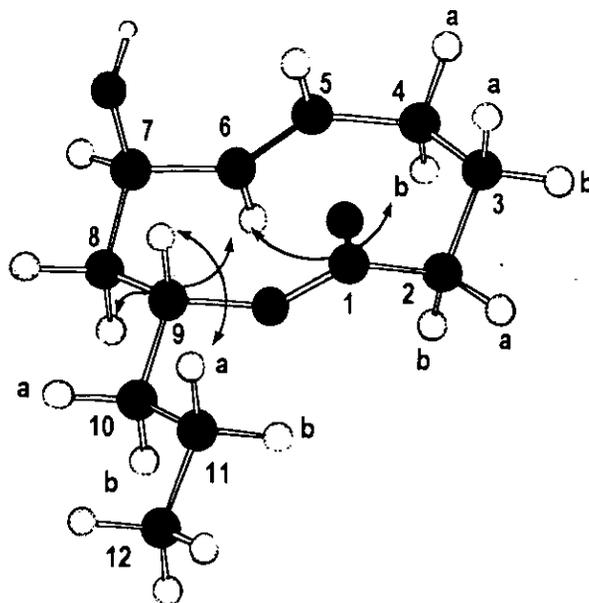


Figura 6. Conformación de mayor estabilidad de la herbarumina III (193) ($E_{MMIX} = 13.85$ kcal/mol) y correlaciones más relevantes observadas en el espectro NOESY del producto natural.

Cuadro 29. Ángulos diedros selectos (ϕ_{MMX} en grados), constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) y constantes de acoplamiento observadas (J_{obs} en Hz) de la herbarumina I (191) y la 7,8-bis(*p*-bromobenzoil)herbarumina I (191a).

| H(x)-C-C-H(y) | 191 | | | 191a | | |
|---------------|--------------|------------|-------------|--------------|------------|-----------|
| | ϕ_{MMX} | J_{calc} | J_{obs}^a | ϕ_{MMX} | J_{calc} | J_{obs} |
| 2a,3a | -68 | 1.7 | 2.0 | -68 | 1.7 | - |
| 2a,3b | +48 | 5.3 | 6.0 | +48 | 5.3 | - |
| 2b,3a | +175 | 13.6 | 12.5 | +175 | 13.6 | - |
| 2b,3b | -69 | 1.7 | 2.0 | -69 | 1.7 | - |
| 4a,5 | -57 | 3.8 | 4.0 | -57 | 3.8 | 4.0 |
| 4b,5 | -175 | 11.5 | 10.0 | -173 | 11.5 | 10.0 |
| 6,7 | -53 | 4.0 | 2.5 | -52 | 4.1 | 2.0 |
| 7,8 | +57 | 2.6 | 2.5 | +55 | 2.9 | 2.0 |
| 8,9 | +179 | 9.3 | 9.8 | -177 | 9.4 | 9.3 |
| 9,10a | +62 | 2.0 | 2.5 | +63 | 1.8 | 2.7 |
| 9,10b | +179 | 11.6 | 9.8 | +180 | 11.5 | 12.0 |

^a500 MHz en CDCl₃

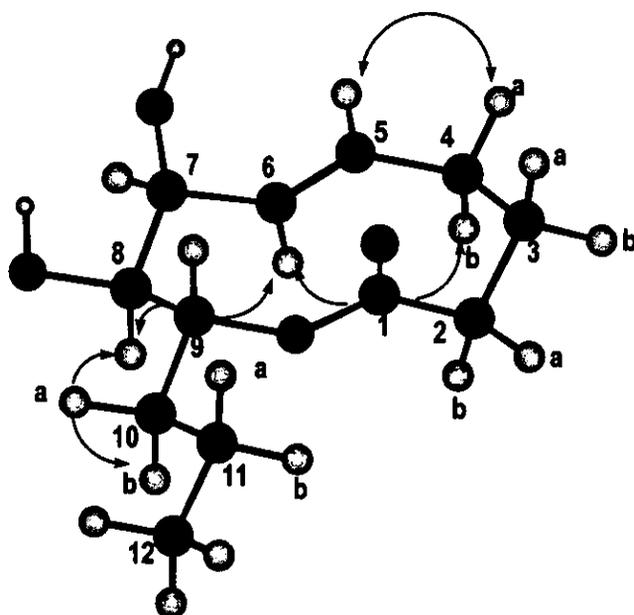


Figura 7. Conformación de mayor estabilidad y efectos NOESY más relevantes para la herbarumina I (191) ($E_{MMX} = 9.51$ kcal/mol).

Como se desprende de los datos resumidos en los Cuadros 28 y 29, los valores de las constantes de acoplamiento calculadas son muy similares a las obtenidas experimentalmente en congruencia con la existencia de una sola conformación de mínima energía para el anillo de 10 miembros. En la herbarumina I (**191**) la constante de acoplamiento ($J_{7,8} = 2.5$ Hz) es consistente con la disposición *cis*-axial-ecuatorial de los hidroxilos. Por otro lado, la constante de acoplamiento ($J_{8,9} = 9.5$ Hz) confirma la relación *trans*-diaxial de estos hidrógenos y la disposición ecuatorial de la cadena lateral de las herbaruminas I (**191**) y III (**193**).

También los resultados indicados en los Cuadros 28 y 29 apoyan la propuesta de que en solución el ángulo de torsión del enlace C(8)-C(9)-C(10)-C(11) es *ca.* a 180° como se aprecia en el confórmero de menor energía.

El análisis de los espectros de NOESY (Espectros 17 y 19) de las herbaruminas I (**191**) y III (**193**) permitió evidenciar las correlaciones que se resumen en las Figuras 6 y 7. Estas correlaciones proporcionan una evidencia adicional de la existencia en solución de la conformación de mínima energía generada a través de los cálculos de mecánica molecular.

En el caso de la herbarumina II (**192**) los resultados de la búsqueda conformacional revelaron que este compuesto existe en dos conformaciones principales: **192a** ($E_{\text{MMX}} = 8.37$ kcal/mol) y **192b** ($E_{\text{MMX}} = 8.74$ kcal/mol) que se ilustran en la Figura 8. En el Cuadro 30 se resumen los ángulos diedros y las constantes de acoplamiento vecinales (calculadas y observadas) para las conformaciones **192a** y **192b**. En la conformación de mínima energía el anillo de 10 miembros adopta una conformación de silla-silla-silla idéntica a la encontrada para las herbaruminas I y III (**191** y **193**). En esta conformación los hidroxilos en C-8 y C-2 y la cadena lateral adoptan una disposición ecuatorial. El hidroxilo en C-7 es axial como en la herbarumina I (**191**). En el confórmero **192b**, en cambio, el macrociclo adopta la conformación de silla-torcida-bote-silla o [2323] del ciclodecano (Hilderbrandt *et al.*, 1973; Dale, 1973a; 1973b; 1973c). En esta

conformación el hidroxilo en C-2 adopta una disposición pseudoaxial y se encuentra formando un puente de hidrógeno intramolecular con el carbonilo de la función lactona. Así mismo los hidroxilos en C-7 y C-8 se encuentran en una disposición pseudoaxial y pseudoecuatorial, respectivamente.

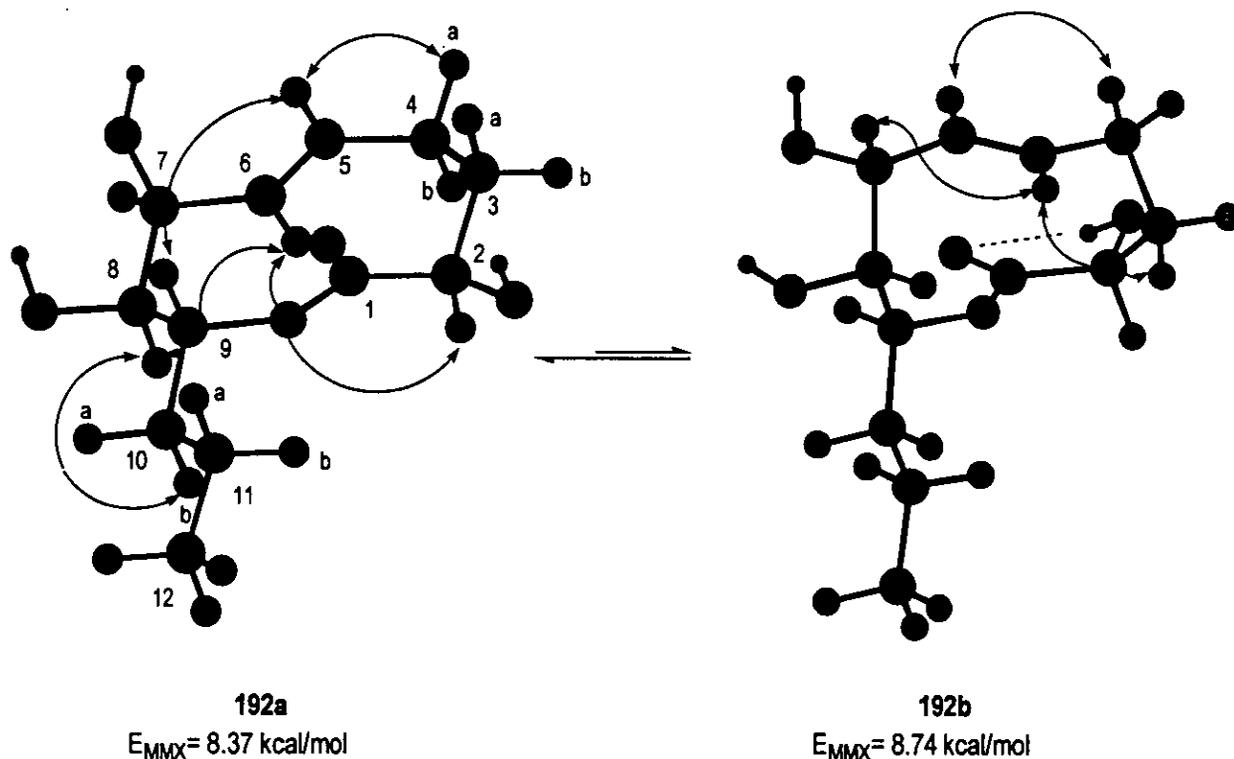


Figura 8. Confórmeros de mínima energía para la herbarumina II (192a y 192b).

Los resultados obtenidos a través de los cálculos de mecánica molecular permitieron explicar la detección de un segundo componente minoritario claramente visible en el espectro de RMN ^1H de la herbarumina II (192). De acuerdo a la integración de las señales de cada componente la proporción relativa es aproximadamente de 86:14. Inicialmente se consideró la posibilidad de que

el componente minoritario fuese un contaminante. Sin embargo, al purificar repetidamente el producto natural por CLAR y registrar posteriormente el espectro de RMN ^1H en CDCl_3 conducía siempre a los mismos resultados. Cuando el espectro de RMN ^1H de la herbarumina II (**192**) (Cuadro 30, Figura 9) se registró en $\text{MeOH}-d_4$ fue posible detectar exclusivamente al conformero de menor energía **192a**. Este resultado permitió inferir que el puente de hidrógeno intramolecular entre 2-OH y el carbonilo de lactona confiere cierta estabilidad al conformero de mayor energía **192b** en CDCl_3 . En MeOH este puente de hidrógeno se pierde como un resultado del intercambio de hidrógenos con el disolvente y en consecuencia el compuesto adopta únicamente la conformación de mínima energía **192a**.

Las principales diferencias entre las señales de los hidrógenos de los conformeros **192a** y **192b** se detectan para H-2, H-3b, H-6, H-7 y H-8. Así, el desplazamiento químico (δ_{H} 4.27) y el patrón de acoplamiento (t, $J= 3.5$ Hz) observado para H-2 en el conformero **192b** son congruentes con su disposición pseudo-ecuatorial. En **192a** este hidrógeno aparece a campos más altos (δ_{H} 3.99) y el patrón de acoplamiento (dd, $J= 8.2, 3.0$ Hz) se encuentra en armonía con su orientación axial. En el conformero **192a**, H-7 aparece como un singulete ancho en δ_{H} 4.48, en tanto que en **192b** este hidrógeno aparece a campos más altos (δ_{H} 3.71) como un doble de dobles ($J= 4.5, 3.0$ Hz) en congruencia con su disposición pseudo-ecuatorial. Por último, en el caso de H-8, el desplazamiento químico (δ_{H} 3.56), la multiplicidad y los valores de la constante de acoplamiento observados para la señal correspondiente (dd, $J= 9.8, 2.5$ Hz) en el conformero **192a** eran congruentes con una disposición axial. En **192b** esta señal se observa como un triplete ($J= 3.5$ Hz) a campos más altos (δ_{H} 4.27) en concordancia con su disposición pseudo-axial.

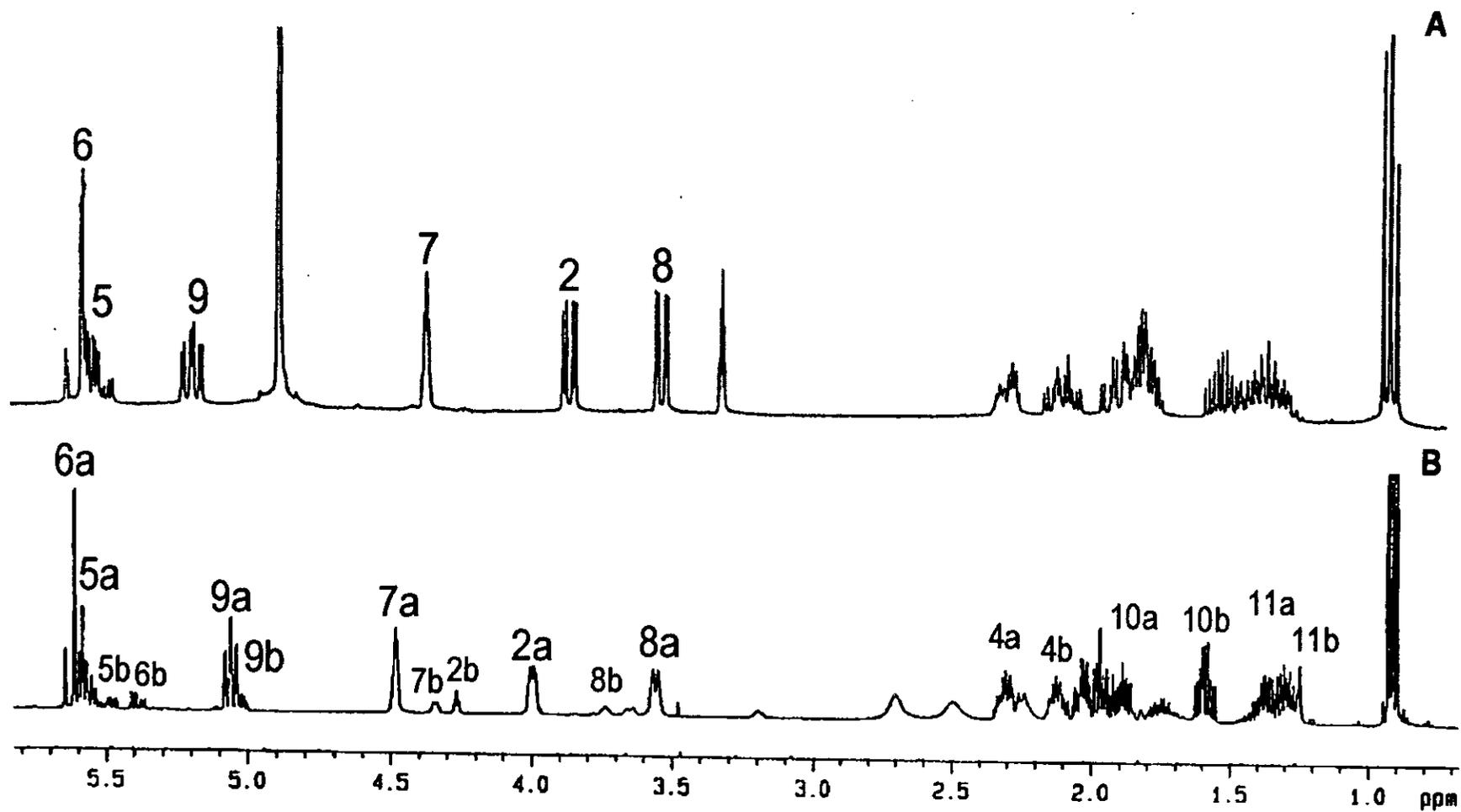


Figura 9. Espectros de RMN ^1H de la herbarumina II (192) A: $\text{MeOH-}d_4$ y B: CDCl_3

Cuadro 30. Ángulos diedros selectos (ϕ_{MMX} en grados), constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) y constantes de acoplamiento observadas (J_{obs} en Hz) de la herbarumina II (192a + 192b), 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c), la 7,8-*O,O'*-isopropilidenherbarumina II (192d) y la 2,7,8-tris(*p*-bromobenzoil)herbarumina II (192e)

| H(x)-C-C-H(y) | 192a | | | | 192b | | | 192c | | | 192d | | | 192e | | |
|---------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|
| | ϕ_{MMX} | J_{calc} | $J_{\text{obs}}^{\text{b}}$ | $J_{\text{obs}}^{\text{a}}$ | ϕ_{MMX} | J_{calc} | $J_{\text{obs}}^{\text{a}}$ | ϕ_{MMX} | J_{calc} | $J_{\text{obs}}^{\text{a}}$ | ϕ_{MMX} | J_{calc} | $J_{\text{obs}}^{\text{c}}$ | ϕ_{MMX} | J_{calc} | $J_{\text{obs}}^{\text{c}}$ |
| 2a,3a | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2a,3b | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2b,3a | +177 | 11.6 | 10.2 | 8.2 | -68 | 2.8 | 3.5 | +176 | 11.6 | 10.0 | -71 | 2.4 | 3.5 | +176 | 11.6 | 9.6 |
| 2b,3b | -68 | 3.1 | 3.2 | 3.0 | +46 | 3.6 | 3.5 | -68 | 2.9 | 3.5 | +43 | 4.2 | 3.5 | -68 | 2.9 | 3.9 |
| 4a,5 | -62 | 3.5 | 5.5 | 5.5 | +169 | 11.3 | 10.5 | -60 | 3.4 | 4.5 | +172 | 11.4 | 9.2 | -61 | 3.5 | 4.0 |
| 4b,5 | -179 | 11.6 | 10.0 | 8.0 | +51 | 4.2 | 4.0 | -178 | 11.6 | 10.0 | +54 | 4.0 | 5.4 | -179 | 11.6 | 10.0 |
| 6,7 | -53 | 4.0 | 2.5 | 2.5 | +114 | 4.1 | 6.5 | -54 | 4.0 | 2.5 | +124 | 5.4 | 7.5 | -49 | 4.3 | 2.0 |
| 7,8 | +57 | 2.7 | 2.5 | 2.5 | +51 | 3.2 | 3.0 | +58 | 2.6 | 2.5 | +38 | 5.0 | 6.0 | +58 | 2.6 | 2.0 |
| 8,9 | -177 | 9.3 | 9.8 | 9.8 | +178 | 9.3 | 9.0 | -179 | 9.4 | 10.0 | -179 | 9.4 | 10.3 | -179 | 9.4 | 10.0 |
| 9,10a | +62 | 2.0 | 2.5 | 2.5 | +60 | 2.2 | 4.5 ^c | +68 | 1.4 | 3.0 ^d | +62 | 2.0 | 2.5 ^d | +70 | 1.3 | 5.4 ^d |
| 9,10b | +179 | 11.6 | 9.8 | 9.8 | +177 | 11.6 | 9.0 ^c | -175 | 11.2 | 8.5 ^d | +180 | 11.5 | 9.3 ^d | -173 | 11.1 | 6.3 ^d |

^a500 MHz en CDCl₃

^b300 MHz en CD₃OD

^c300 MHz en CDCl₃

^dPromedio por contribución de especies rotámicas adicionales en la cadena lateral.

En el espectro de NOESY (Espectro 19) de la herbarumina II (**192**) se observan las interacciones que se ilustran en la Figura 8, las cuales son congruentes con la presencia de ambos conformeros. En especial, la interacción entre los protones H-2 y H-6 es consistente con la presencia de un hidroxilo en una disposición pseudoecuatorial (β) en la posición C-2 en **192b**.

El análisis de la herbarumina II mediante resonancia magnética nuclear dinámica (RMND) a temperaturas bajas aportó una evidencia adicional que apoya la presencia de un equilibrio conformacional en solución. Como se observa en la Figura 10, al disminuir la temperatura, se incrementa la proporción del conformero **192b**. Esta observación apoya la estabilización propuesta para **192b** mediante un puente de hidrógeno intramolecular entre los átomos O(2)H—O(1). Los valores de $\Delta G^{25^\circ\text{C}} = 1.09$ kcal/mol y $\Delta G^{40^\circ\text{C}} = 0.40$ kcal/mol para el equilibrio **192a** \rightleftharpoons **192b** se calcularon utilizando la ecuación de $\Delta G = -RT \ln K$ y los valores de las integrales más relevantes en el espectro de RMN ^1H (Espectro 2). La interconversión de **192a** hacia **192b** puede ocurrir vía dos movimientos conformacionales no sincronizados, que involucran la rotación no sincronizada de los enlaces de las porciones C(1)—C(2)—C(3)—C(4)—C(5) y C(4)—C(5)=C(6)—C(7). Estos movimientos pueden generar dos conformaciones intermedias adicionales. La presencia de estas conformaciones ($E_{\text{MMX}} = 8.90$ kcal/mol y $E_{\text{MMX}} = 9.90$ kcal/mol, respectivamente) puede ser visualizada por la reducción de la magnitud de las constantes de acoplamiento *trans*-diaxiales $J_{2b,3a}$ y $J_{4b,5}$ en **192a**, como se observa al comparar el espectro en CDCl_3 con el espectro registrado en $\text{MeOH-}d_4$ (Figura 9), donde no tiene lugar el proceso de interconversión.

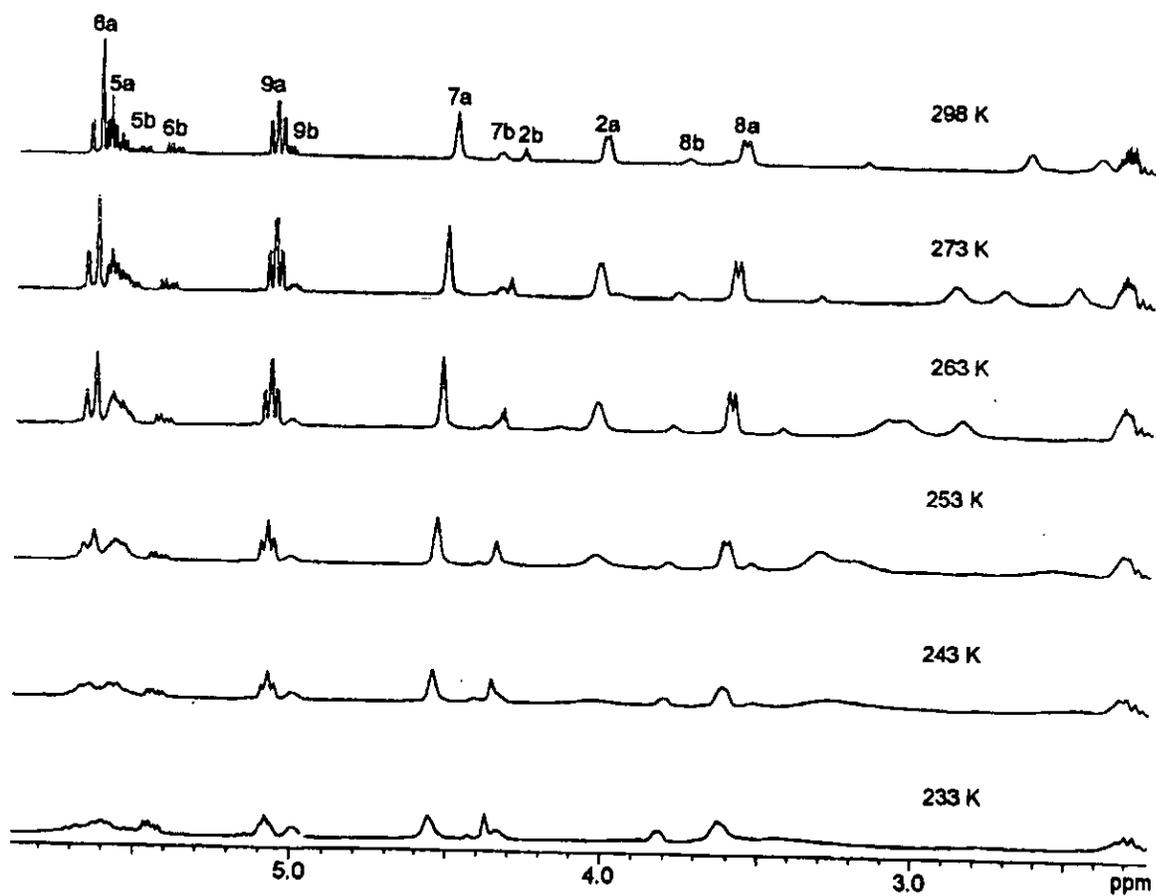


Figura 10. Espectro de RMN ^1H de la herbarumina II (192) registrado a diferentes temperaturas.

Los cálculos de mecánica molecular indican también que en el acetónido de la herbarumina II (192d) el anillo lactónico adopta una conformación similar al conformero de mayor energía 192b (Figura 11), en tanto que en el derivado triacetilado la conformación del macrociclo es similar a la de menor energía 192a (Figura 12).

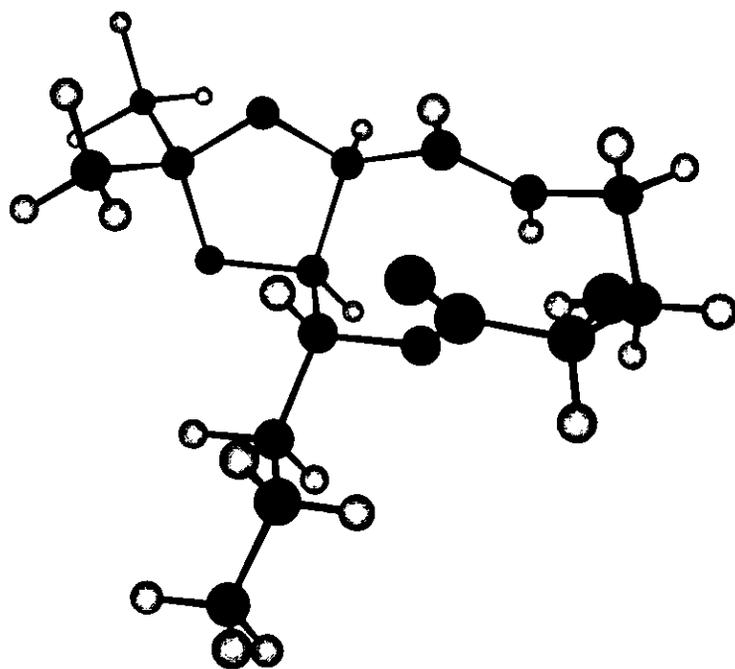


Figura 11. Confórmero de mínima energía para la 7,8-*O,O*-isopropilidenherbarumina II (192d) ($E_{\text{MMX}} = 24.3$ kcal/mol).

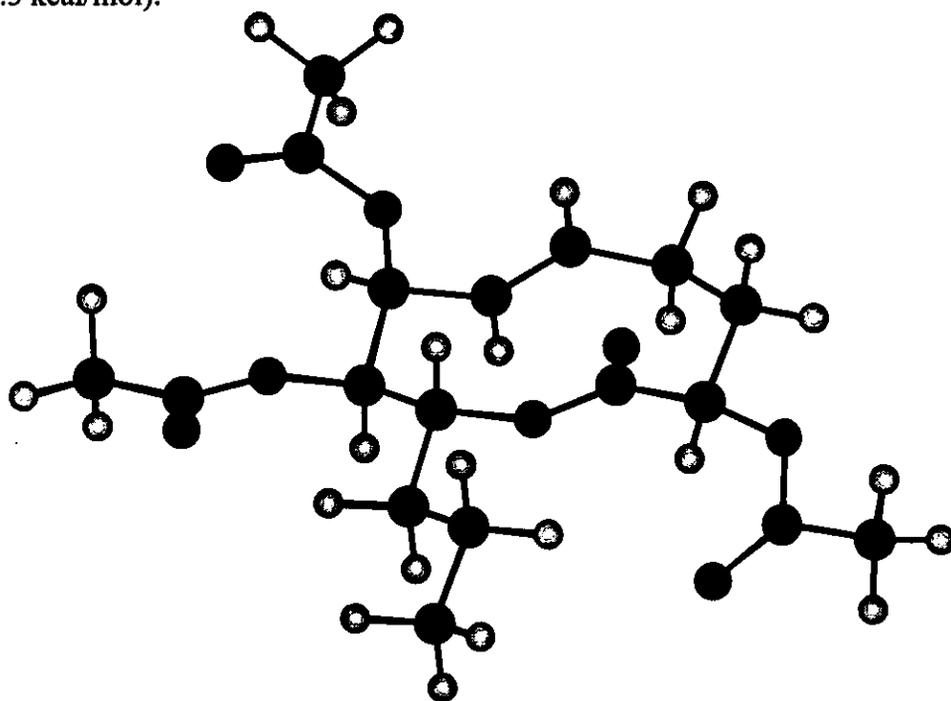


Figura 12. Confórmero de mínima energía para la 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c) ($E_{\text{MMX}} = 5.97$ kcal/mol).

El último paso en la elucidación estructural de las herbaruminas I–III (191–193) fue la determinación de la configuración absoluta de los centros quirales. Para la determinación de la configuración absoluta de los centros estereogénicos correspondientes a las funciones carbinólicas se empleó el método de la “quiralidad excitada” de Harada y Nakanishi (Cruetz y Taube; 1969; Nakanishi *et al.*, 1981; 1987; Lightner y Gurst, 2000). Mediante la aplicación de este método es factible determinar la configuración absoluta de dioles y alcoholes alílicos cíclicos. El método se basa en las interacciones dipolo–dipolo entre dos o más cromóforos de igual o distinta naturaleza. Como resultado de estas interacciones se produce una interacción deslocalizada conocida en el idioma inglés con el nombre de “exciton”.

En el caso de moléculas quirales con una orientación apropiada de los dipolos inducidos (orientación oblicua), esta excitación deslocalizada se puede evidenciar mediante el dicroísmo circular (DC) en el cual se observan dos bandas de aproximadamente igual intensidad pero de signos contrarios (Figura 13). Estas dos bandas representan la sumatoria de dos curvas de DC de signos opuestos y cada una de ellas corresponde a las transiciones excitadas.

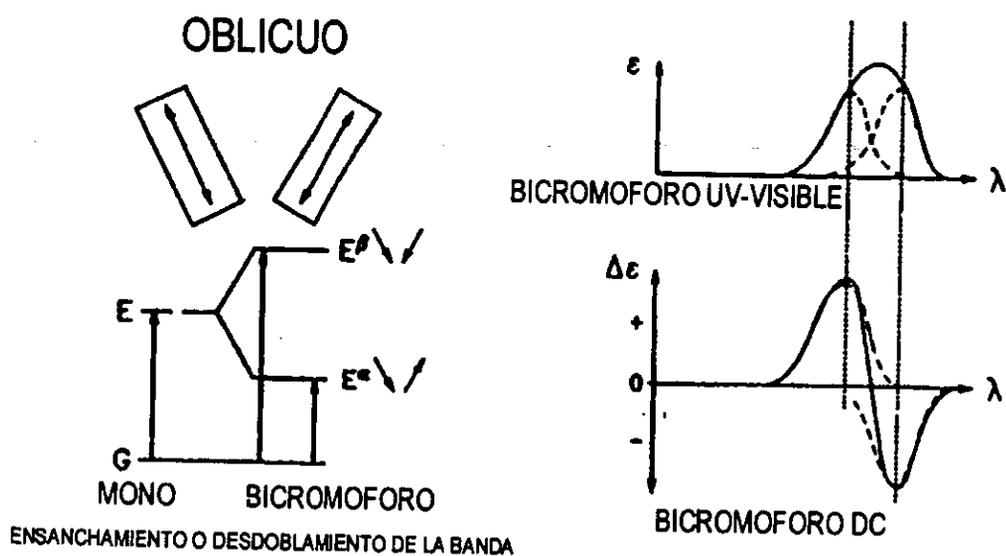


Figura 13. Orientación óptima de los cromóforos interactuantes y observación del efecto “exciton” en el UV y DC.

El orden de los signos de cada una de las bandas observadas en el espectro de DC se puede correlacionar con la orientación absoluta de los cromóforos que interaccionan. Cuando los dipolos eléctricos inducidos están orientados de tal forma que generan un ángulo de torsión positivo (quiralidad positiva) el efecto Cotton de mayor longitud de onda es positivo y por el contrario cuando los dipolos eléctricos inducidos forman un ángulo de torsión negativo el efecto Cotton de mayor longitud de onda es negativo (quiralidad negativa) (Figura 14).

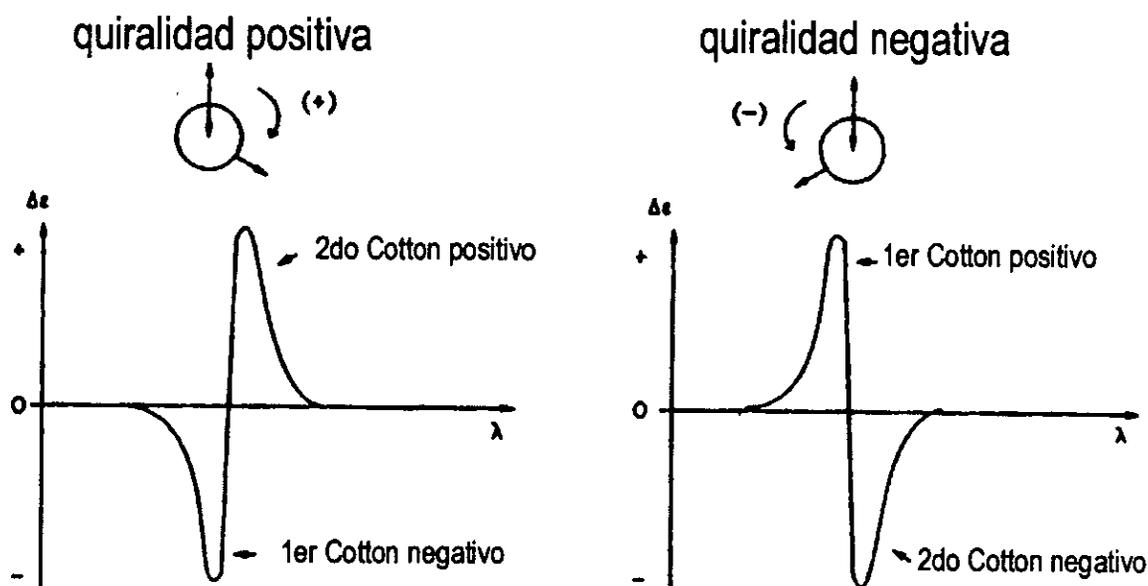


Figura 14. Relación de los ángulos de torsión de los dipolos interactuantes con el orden de los signos de los efectos Cotton en el DC.

Para aplicar el método de Harada y Nakanishi en el caso de la herbarumina I que presenta un diol vecinal en C-7 y C-8 en primer lugar se procedió a la preparación del derivado *bis-p*-bromobenzoilado con la finalidad de introducir los grupos cromóforos adecuados. Estos grupos presentan transiciones electrónicas locales muy intensas y por lo tanto apropiadas para observar el fenómeno de la "excitación deslocalizada" (Cruetz y Taube; 1969; Nakanishi *et al.*, 1981; 1987; Lightner y Gurst, 2000). Posteriormente, se registró el DC de la 7,8-*bis(p*-bromobenzoil)herbarumina I (191a) encontrándose en que el efecto Cotton de mayor longitud de onda es positivo (Figura 15). En consecuencia se determinó que la quiralidad es positiva (+). Estos resultados son congruentes con una configuración *S* tanto en C-7 como en C-8. La configuración en C-9 se determinó como *R* considerando la relación *trans* diaxial entre H-8 y H-9. Con base en las evidencias descritas la herbarumina I (191) se caracterizó como la (7*S*,8*S*,9*R*)-7,8-dihidroxi-9-propil-5-nonen-9-olida (191).

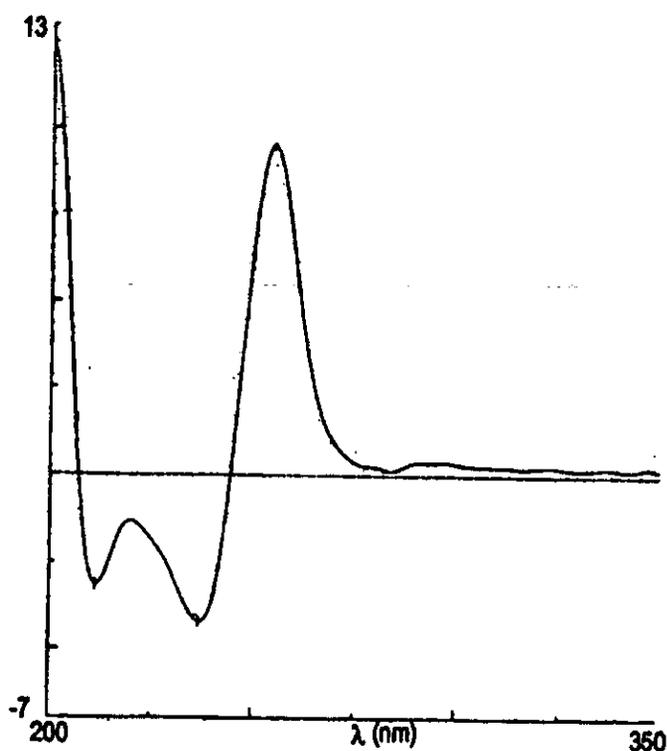


Figura 15. Espectro de DC de la 7,8-*bis(p*-bromobenzoil)herbarumina I (191a).

La configuración absoluta de los centros estereogénicos C-7 y C-8 de la herbarumina II se determinó utilizando de nueva cuenta por el método de Harada y Nakanishi y para ello se preparó el derivado 2,7,8-tris(*p*-bromobenzoil)herbarumina II (192e). Al registrar el espectro de DC (Figura 16) se observó que el efecto Cotton de mayor longitud de onda es positivo. En consecuencia la configuración absoluta en C-7 y C-8 se determinó como *S*. La configuración de la cadena lateral en C-9 se determinó como *R* siguiendo el mismo razonamiento que en la herbarumina I (191). Por último, la configuración absoluta de C-2 se estableció como *R* considerando la interacción entre H-2 y H-8 observada en el espectro NOESY de la 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c)(Figura 17).

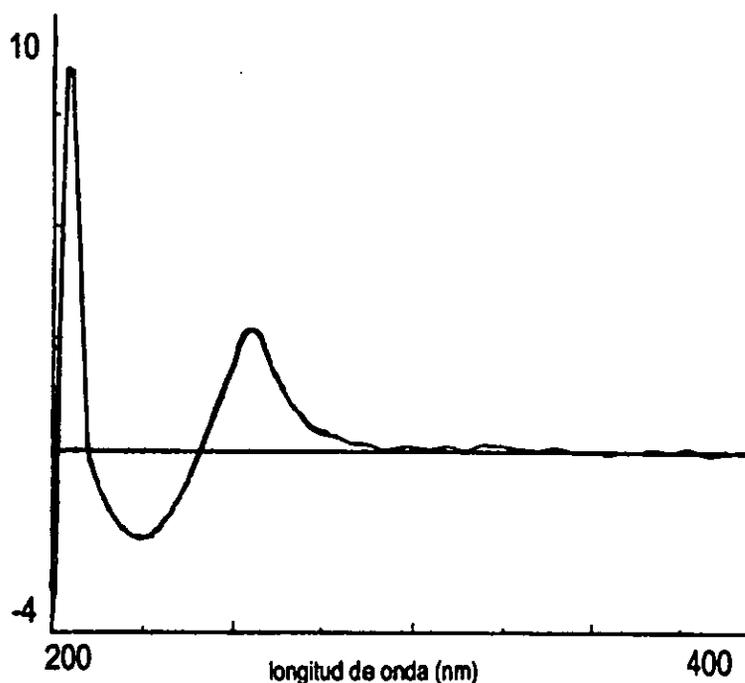


Figura 16. Espectro de DC de la 2,7,8-tris(*p*-bromobenzoil)herbarumina II (192e).

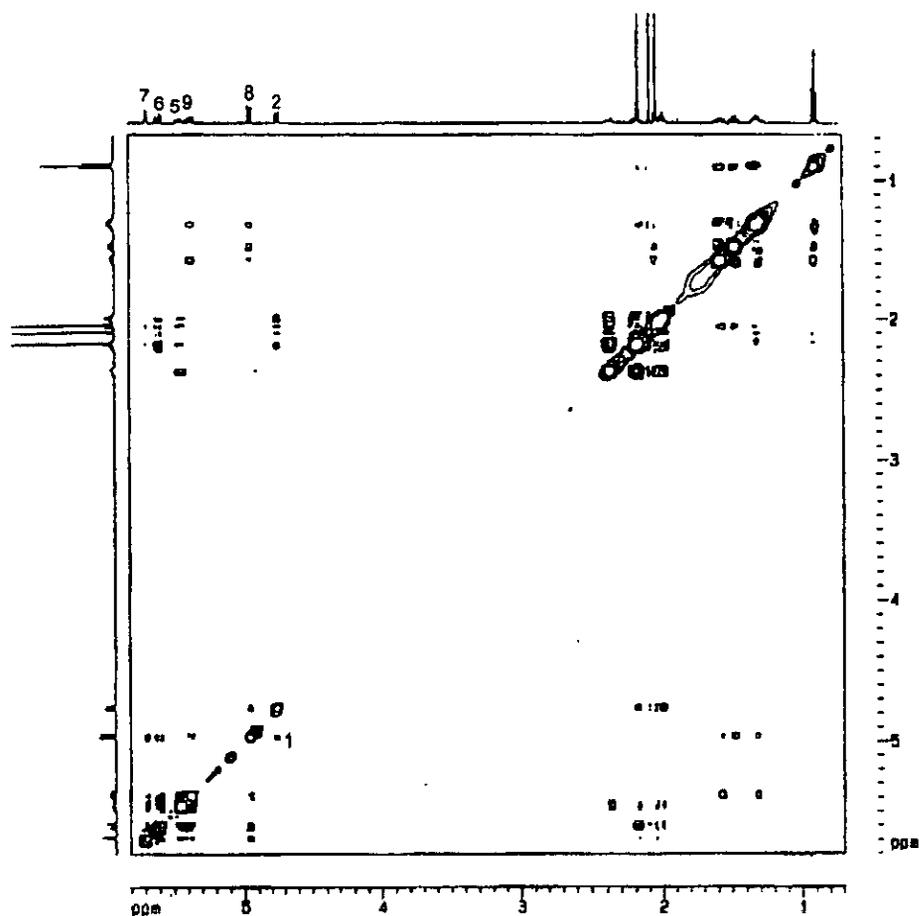


Figura 17. Espectro de RMN^1H bidimensional homonuclear NOESY del compuesto **192e**. Efecto nOe: 1, $\text{H}_2\text{-H}_8$

Con base en las evidencias descritas la estructura de la herbarumina II (**192**) se asignó como la $(2R,7S,8S,9R)$ -2,7,8-trihidroxi-9-propil-5-nonen-9-olida (**192**).

En el caso de la herbarumina III (**193**) la configuración absoluta del hidroxilo alílico en C-7 se determinó también mediante el método de Harada y Nakanishi. Para ello se preparó el derivado *p*-bromobenzoilado de la herbarumina III (**193**). En este caso los cromóforos interactuantes fueron la doble ligadura entre C-5 y C-6 y el *p*-bromobenzoilo introducido en C-7. Al registrar el espectro de DC se observó que el efecto Cotton es negativo (Figura 18), en consecuencia la

configuración absoluta del centro C-7 se determinó como *R*, ya que se sabe que los benzoatos derivados de alcoholes alílicos secundarios de configuración *R* dan efectos Cotton negativos (Nakanishi *et al.*, 1994). La configuración absoluta del centro de quiralidad en C-9 se determinó como *R* con base en consideraciones biogénicas.

Para corroborar esta última propuesta se compararon las constantes de acoplamiento teóricas de los estereoisómeros *R* y *S* en C-9 de la herbarumina III (193) con las obtenidas experimentalmente para la herbarumina III (193). Para ello se generó la conformación de mínima energía de la (7*R*,9*R*)-7-hidroxi-9-propil-5-nonen-9-olida mediante cálculos de mecánica molecular. Posteriormente se calcularon las constantes de acoplamiento teóricas de H-7, H-8, H-9 y H-10 (Cuadro 31). Los resultados que se resumen en el Cuadro 31 indican que las constantes de acoplamiento teóricas del producto con una configuración *R* en C-9 mostraban mucha mejor correlación con las encontradas experimentalmente para la herbarumina III (193).

Cuadro 31. Comparación de los ángulos diedros (ϕ_{MMX} en grados), las constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) para las configuraciones C-9 (*R*) y C-9 (*S*) con las constantes de acoplamiento registradas (J_{obs} en Hz) para la herbarumina III (193).

| H(x)-C-C-H(y) | 193 | | C-9(<i>R</i>) | | C-9(<i>S</i>) | |
|---------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|--|
| | J_{obs} | ϕ_{MMX} | J_{calc} | ϕ_{MMX} | J_{calc} | |
| x,y | | | | | | |
| 7,8a | 5.4 | -59 | 4.0 | -55 | 4.5 | |
| 7,8b | 2.2 | +57 | 2.3 | +57 | 2.2 | |
| 8a,9 | 2.0 | -64 | 1.7 | +73 | 1.0 | |
| 8b,9 | 11.0 | +180 | 11.5 | -41 | 6.8 | |
| 9,10a | 1.5 | +64 | 2.0 | -174 | 11.7 | |
| 9,10b | 11.0 | -179 | 11.5 | -61 | 2.1 | |

Con base en las evidencias descritas en los párrafos anteriores la estructura de la herbarumina III (193) se asignó como la (7*R*,9*R*)-7-hidroxi-9-propil-5-nonen-9-olida.

Cabe mencionar que aunque el descriptor estereoquímico de C-7 sufra una variación a consecuencia de los cambios en la prioridad de grupos, la configuración absoluta de las herbaruminas I-III (191-193) es la misma. Este argumento se refuerza al comparar las gráficas de dicroísmo circular de estas tres sustancias que resultaron ser muy similares (Cuadros 23-25). Es importante mencionar que los derivados *p*-bromobenzoilados de las herbaruminas I-III (191-193) fueron objeto también de una búsqueda conformacional sistemática mediante cálculos de mecánica molecular. En las Figuras 19, 20 y 21 se ilustran las conformaciones de mínima energía para los tres derivados y los valores de las constantes de acoplamiento. Como se desprende de los resultados la conformación del anillo lactónico de los derivados es similar al de los productos naturales correspondientes. Por lo tanto la interpretación de los resultados de la configuración absoluta por el método de Harada y Nakanishi pueden asumir validez como no empíricos.

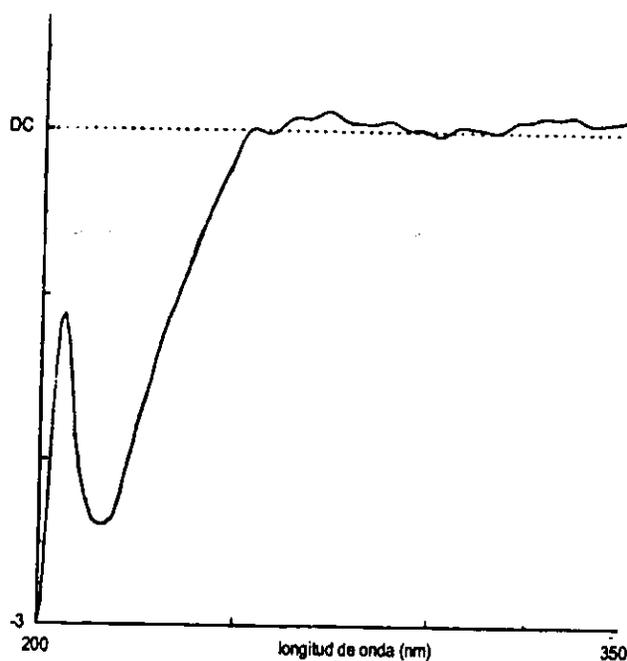


Figura 18. Espectro de DC de la 7-*p*-bromobenzoilherbarumina III (193).

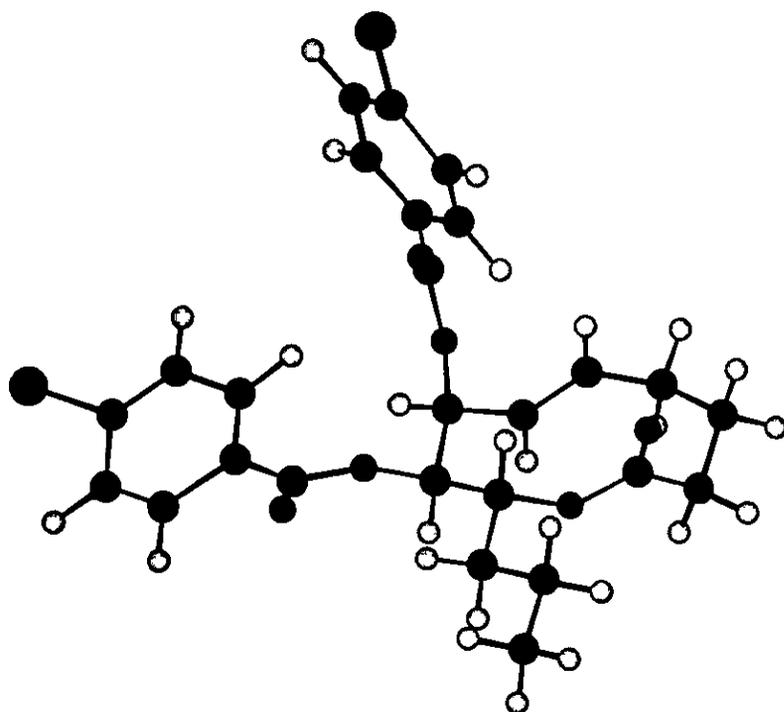


Figura 19. Conformación de mayor estabilidad de la 7,8-*bis*(*p*-bromobenzoyl)herbarumina I (191a).

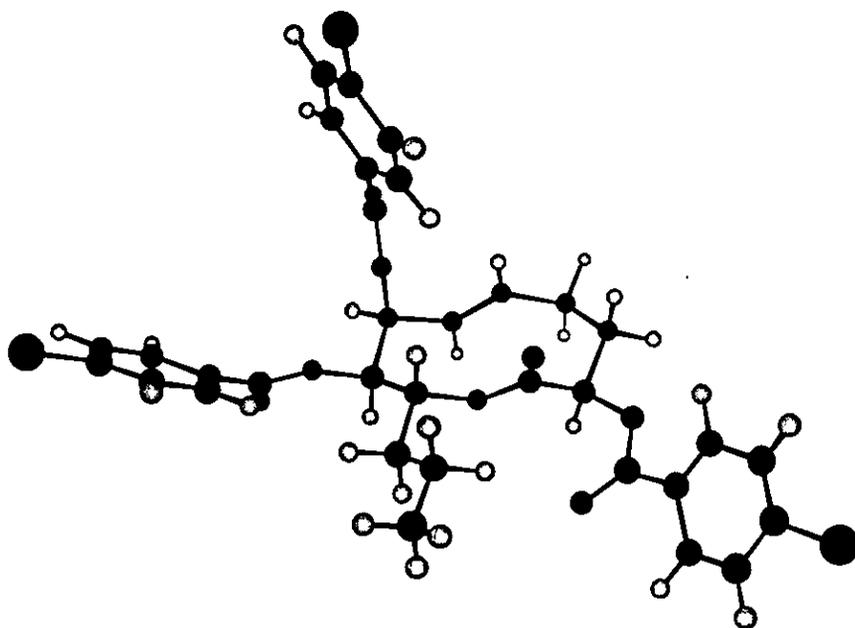


Figura 20. Conformero de mínima energía para la 2,7,8-*tris*(*p*-bromobenzoyl)herbarumina II (192e).

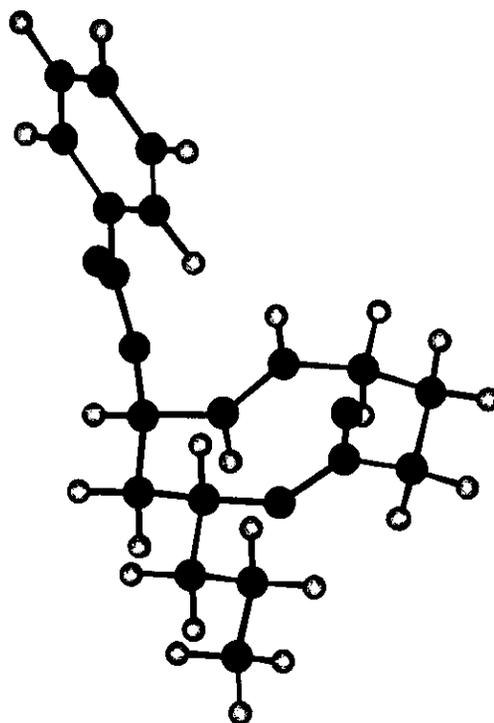


Figura 21. Confórmero de mínima energía para la 7-*p*-bromobenzoilherbarumina III (193a).

5.5 Evaluación del potencial fitotóxico y exploración de los posibles blancos de acción de los compuestos derivados de los estudios químicos biodirigidos de las especies *P. herbarum* y *P. sorghina*.

De acuerdo a la estrategia diseñada para la presente investigación se realizaron los ensayos biológicos conducentes a determinar el potencial fitotóxico de los compuestos aislados y algunos derivados. La evaluación del potencial fitotóxico consistió en determinar la actividad fitotóxica de tipo pre y post-emergente. La actividad fitotóxica de tipo pre-emergente se evaluó mediante la determinación del efecto de los compuestos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. La actividad biológica de tipo post-emergente se evaluó mediante la determinación del efecto de los compuestos puros sobre la producción de biomasa de las especies vegetales *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

Posteriormente se exploró de forma preliminar los posibles blancos de acción de los compuestos fitotóxicos. Los estudios relacionados para tal fin incluyeron la evaluación de los compuestos fitotóxicos sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca y sobre la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPcarboxilasa) de maíz y la glutamino sintetasa (GS) de amaranto. De manera adicional se investigó la posible interacción de las herbaruminas I-III (191-193) con la proteína reguladora calmodulina (CaM bovina y CaM de espinaca).

Los blancos de acción se escogieron considerando el mecanismo de acción de las principales fitotoxinas fúngicas.

5.5.1 Determinación del efecto de las herbaruminas I–III (191–193), la 7,8-*O,O*-isopropilidenherbarumina II (192d), la 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c), la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y los alterporrioles D (196) y E (197) sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.

La determinación del efecto fitotóxico pre-emergente las herbaruminas I–III (191–193), la 7,8-*O,O*-isopropilidenherbarumina II (192d), la 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c), la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y los alterporrioles D (196) y E (177) se realizó de acuerdo con la metodología descrita en la sección experimental, utilizando como semilla de prueba *A. hypochondriacus*. Como control positivo se utilizó el herbicida comercial 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

Los resultados obtenidos de este estudio indicaron que las herbaruminas I–III (191–193) inhiben de manera significativa la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. Los valores de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del crecimiento radicular se muestran en el Cuadro 32 y como se desprende de los mismos, el compuesto que presentó la mejor actividad fue la herbarumina I (191). Por otro lado, la comparación del efecto fitotóxico del producto 192 con los obtenidos para los derivados 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c) y 7,8-*O,O*-isopropilidenherbarumina II (192d) indican que la presencia del diol libre le confiere una mayor actividad fitotóxica a la herbarumina II (192). Así mismo es importante resaltar que el efecto fitotóxico pre-emergente presentado por los productos 191–193 es comparable al obtenido para el herbicida comercial 2,4-D.

La evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos 137 y 194–197 sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* indicaron que la macrosporina (194), el altersolanol D (195) y los alterporrioles D (196) y E (197) no tienen

un efecto significativo sobre la germinación de *A. hypochondriacus* (Cuadro 32). Sin embargo el altersolanol A (137) afectó de manera importante el crecimiento radicular.

Los productos 137 y 195 han sido previamente identificados como fitotoxinas, las cuales ejercen su efecto mediante la estimulación de la oxidación del NADH en mitocondrias aisladas de cultivos de células de *N. rustica*. De manera adicional, se ha demostrado que los altersolanoles actúan como aceptores de electrones de la cadena mitocondrial, siendo el compuesto más activo el altersolanol A (Haraguchi *et al.*, 1992).

El altersolanol A (137) también presenta una notable actividad antibacteriana contra la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080. Los estudios sobre el mecanismo antimicrobiano del altersolanol A indican que este compuesto inhibe de manera inespecífica la síntesis de DNA, RNA y de proteínas e incrementa la respiración celular y la oxidación del NADH en células bacterianas intactas (Haraguchi *et al.*, 1992; Okamura *et al.*, 1993, Yagi *et al.*, 1993). Por otra parte el altersolanol A (137) ha demostrado actividad citotóxica sobre células HeLa (Haraguchi *et al.*, 1992). Por último, estudios recientes han demostrado que la macrosporina (194) posee efectos mutagénicos en ratones de laboratorio (Hosoe, *et al.*, 1990).

Cuadro 32. Efecto de los extractos y compuestos puros aislados de *P. herbarum* y *P. sorghina* sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.

| Compuesto | Inhibición del crecimiento radicular CI_{50} (M) | Inhibición de la germinación CI_{50} (M) |
|---|--|--|
| extracto (<i>P. herbarum</i>) ^a | 35.80 | 109.3 |
| extracto (<i>P. sorghina</i>) ^a | 112.7 | 153.8 |
| herbarumina I (191) | 5.43×10^{-5} | 9.70×10^{-3} |
| herbarumina II (192) | 1.25×10^{-4} | 3.25×10^{-3} |
| herbarumina III (193) | 2.06×10^{-5} | 5.76×10^{-3} |
| 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c) | 1.47×10^{-3} | 4.63×10^{-2} |
| 7,8- <i>O,O</i> -ispropilidenherbarumina (192d) | 2.75×10^{-3} | 2.75×10^{-2} |
| macrosporina (194) | $> 1 \times 10^{-2}$ | $> 1 \times 10^{-2}$ |
| altesolanol A (137) | 5.2×10^{-4} | 4.79×10^{-3} |
| altesolanol D (195) | 7.8×10^{-3} | 9.81×10^{-2} |
| alterporriol D (196) | $> 1 \times 10^{-2}$ | $> 1 \times 10^{-2}$ |
| alterporriol E (197) | $> 1 \times 10^{-2}$ | $> 1 \times 10^{-2}$ |
| 2, 4-D ^b | 1.92×10^{-4} | 2.78×10^{-3} |

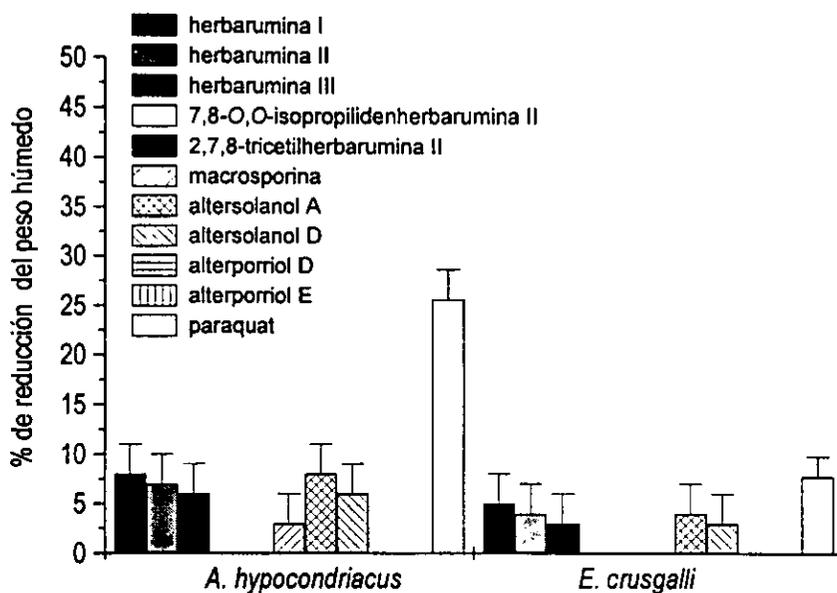
^aExpresada en $\mu\text{g/ml}$.

^b ácido 2,4-diclorofenoxiacético (control positivo)

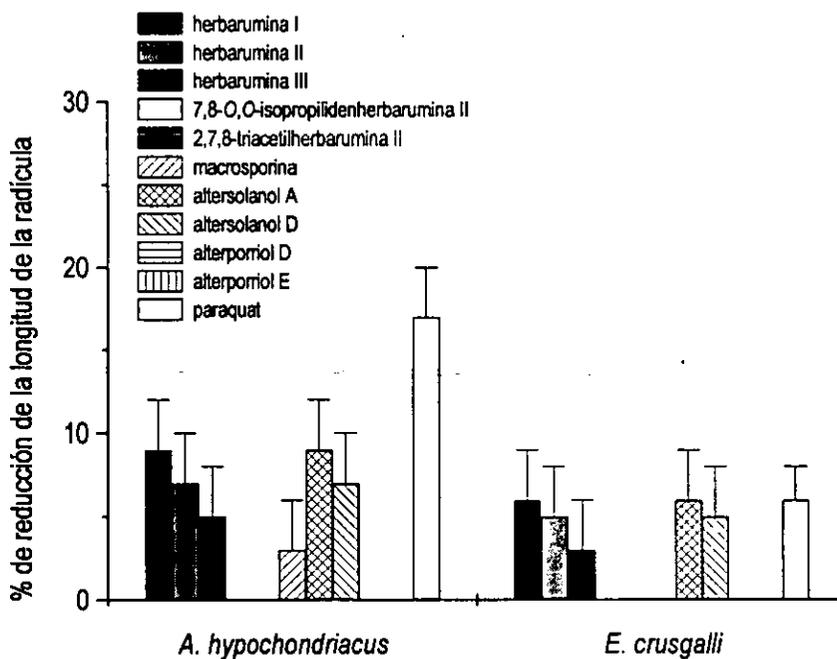
5.5.2 Determinación del efecto de las herbaruminas I–III (191–193), la 7,8–O,O–isopropilidenherbarumina II (192c), la 2,7,8–triacetilherbarumina II (192d), la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y los alterporrioles D (196) y E (197) sobre la producción de biomasa de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

La evaluación de la actividad fitotóxica post-emergente *in vivo* se realizó mediante la determinación del efecto de la aplicación foliar de una solución de concentración de 1×10^{-4} M de las herbaruminas I–III (191–193), la 7,8–O,O–isopropilidenherbarumina II (192c), la 2,7,8–triacetilherbarumina II (192c), la macrosporina (194), los altersolanoles A (137) y D (195) y los alterporrioles D (196) y E (197) sobre las especies *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. El tratamiento se realizó durante tres semanas y los controles positivo y negativo fueron metilviológeno (Paraquat®) 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 las plántulas, para ello se calculó el porcentaje de reducción de estos parámetros comparados con el control de crecimiento y el control de Tween 80.

Los resultados de estas evaluaciones permitieron determinar que los productos 137, 191–193 y 194–196 no modifican el peso fresco ni la longitud de las plántulas. En la Figura 22 se resumen los resultados obtenidos.



(A)



(B)

Figura 22. Efecto de la aplicación foliar de los productos 137 y 194–197 (1×10^{-4} M) sobre el peso fresco de la plántula (A) y sobre la longitud de las especies vegetales (B).

5.5.3 Efecto de las herbaruminas I–III (191–193), los altersolanoles A (137) y D (195) sobre las síntesis de ATP.

Tomando en cuenta la actividad fitoinhibidora de las herbaruminas I–III (191–193) y los altersolanoles A (137) y D (195) sobre la especie *A. hypochondriacus* y con la finalidad de explorar con mayor profundidad su potencial herbicida, se decidió evaluar el efecto de este producto sobre la síntesis de ATP.

Este posible blanco de acción se seleccionó tomando como referencia el blanco de acción de los herbicidas comerciales y al considerar que algunas fitotoxinas fúngicas como la tentoxina inhiben el proceso de la fotosíntesis (Einhelling, 1993; 1995b; Duke y Abbas, 1995).

La síntesis de ATP se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Dilley (1972). Este procedimiento se basa en medir el cambio de pH en el medio de reacción inducido por la síntesis de ATP en presencia de ADP y Pi (Castañeda *et al.*, 1998). Durante la síntesis de ATP a pH 8.0, la enzima Mg^{2+} -ATPasa consume irreversiblemente un protón por cada molécula de ATP sintetizada de acuerdo con la siguiente reacción: $ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+ \longrightarrow ATP^{4-} + H_2O$. En consecuencia, la variación de pH debido al consumo de protones es proporcional a la cantidad de ATP generado.

En la Figura 23 se muestra el efecto de los compuestos evaluados sobre la síntesis de ATP cuando los electrones se transportan del H_2O al metilviológeno (MV) (aceptor artificial de electrones). Los resultados derivados de esta evaluación indicaron que los compuestos no inhiben de manera significativa el proceso de la fotofosforilación.

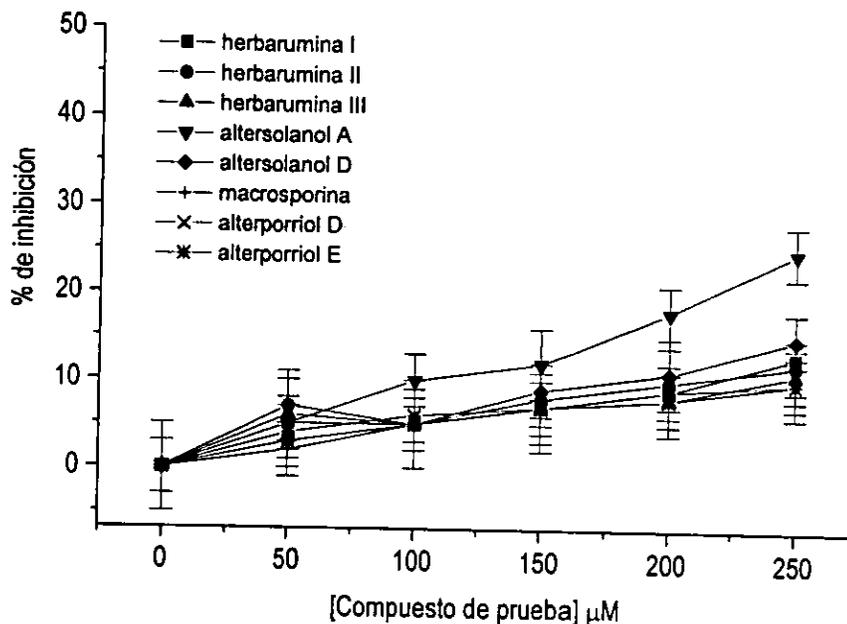


Figura 23. Efecto de las herbaruminas I–III (191–193), los altersolanoles A (137), la 7,8-*O,O*-isopropilidenherbarumina II (192d), la 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c) y los alterporrioles D (196) y E (137) en las velocidades de síntesis de ATP ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$).

5.5.4 Efecto de las herbaruminas I–III (191–193) sobre la enzima glutamino sintetasa (GS).

La enzima glutamino sintetasa es una enzima que cataliza la síntesis de glutamina a partir del glutamato. Esta enzima junto con la glutamato deshidrogenasa (GDH) son las responsables de la asimilación de nitrógeno a partir del amonio incorporándolo a compuestos orgánicos nitrogenados en los seres vivos (Cai y Wong, 1989; Muhitch, 1989; Sakamoto, 1990; Stryer, 1995; Vincent *et al.*, 1997; Zhana *et al.*, 1997).

La actividad de la enzima glutamino sintetasa se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Kamamori y Matsumoto (1992). Este procedimiento se basa en medir la actividad de la enzima GS siguiendo la producción de γ -glutamihidroamato a 540 nm. Las determinaciones se realizaron por sextuplicado siendo la desviación estándar menor

a $\pm 10\%$ en todos los casos. Como control positivo se utilizó el herbicida comercial bialafos (Lavrik *et al.*, 1996; Duke y Lydon; 1987).

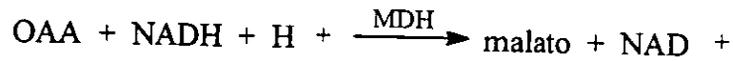
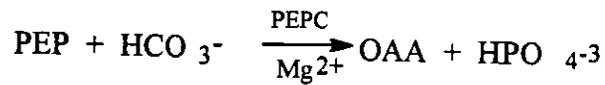
Los resultados derivados de la presente investigación indican los productos 137 y 191–193 no tienen un efecto significativo sobre la actividad de la enzima glutamino sintetasa.

5.5.5 Efecto de las herbaruminas I–III (191–193) sobre la enzima PEPcarboxilasa (PEPcarboxilasa).

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPcarboxilasa) es una enzima citosólica ubicua en las plantas superiores y ampliamente distribuida en las bacterias, cianobacterias y algas verdes. En las plantas con metabolismo C_4 y con metabolismo del ácido crasuláceo (CAM), la enzima PEPcarboxilasa participa en la asimilación de CO_2 atmosférico. Por esta razón su actividad en hojas de plantas C_4 y CAM ha recibido una considerable atención y se han publicado numerosos estudios de sus características moleculares y cinéticas (Collet *et al.*, 1996; Mújica–Jiménez *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de trabajos publicados sobre esta enzima son escasos los estudios acerca del efecto de productos naturales sobre la actividad de esta importante enzima.

La actividad de la enzima PEPcarboxilasa se determinó espectrofotométricamente utilizando la metodología que se describe en la sección experimental. El procedimiento se basa en medir la actividad de la enzima mediante un ensayo acoplado, utilizando a la enzima málico deshidrogenasa y siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm en un espectrofotómetro equipado con un programa cinético. Las determinaciones se realizaron por triplicado siendo la desviación estándar menor al $\pm 10\%$ en todos los casos.

Las reacciones involucradas en la determinación se indican a continuación:



Los resultados derivados de esta evaluación indican que los productos 191–193 no tienen un efecto significativo sobre la actividad de la enzima PEPcarboxilasa (Figura 24).

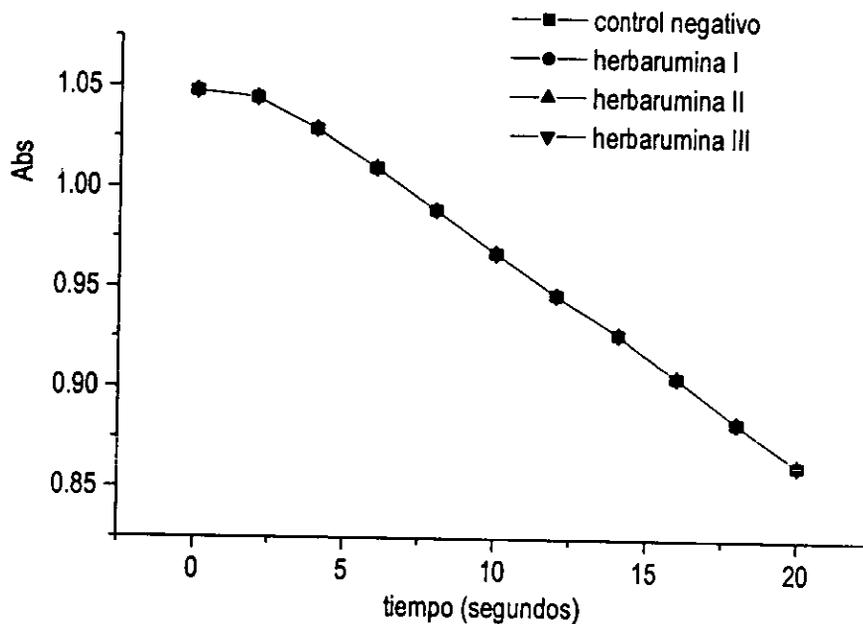


Figura 24. Efecto de las herbaruminas I–III (191–193) sobre la enzima PEPcarboxilasa.

5.5.6 Efecto de las herbaruminas I–III (191–193) sobre la proteína reguladora calmodulina.

La calmodulina es una proteína multifuncional ubicua que juega un papel central en la transducción de los efectos inducidos por el calcio a nivel intracelular. En los organismos eucariotas esta proteína ejerce sus efectos regulatorios a través de su interacción con una

serie de enzimas y proteínas nucleares (Dieter, 1984; Roberts *et al.*, 1986; Roberts y Harmon, 1992; Alberts *et al.*, 1994; Lehninger *et al.*, 1993; Bush, 1995; *inter alia*). Entre las enzimas y proteínas que regula la calmodulina se encuentran la glutamato descarboxilasa, la NADcinasas, la apirasa, la superóxido dismutasa, la Ca^{2+} -ATPasa, la proteínkinasa II dependiente de calmodulina, el factor de elongación 1α , la kinesina, la proteínkinasa activada por Ca^{2+} /CaM, la fosfoproteínfosfatasa 2B, el factor de transcripción TGA3 y la proteína de unión FK506 (Zielinski, 1998; Leung *et al.*, 1984; 1985). Numerosas investigaciones han demostrado claramente la participación de la calmodulina en los procesos de regulación y transducción de señales que tienen lugar durante los eventos de germinación y crecimiento vegetal (Dieter, 1984; Roberts *et al.*, 1986; Roberts y Harmon, 1992; Bush, 1995). Así durante la primera fase en la germinación de las semillas de rábano hay un incremento en los niveles de calmodulina y una disminución en la concentración de sustancias de naturaleza proteica que inhiben la actividad de la calmodulina (Coccuci y Negrini, 1988). La germinación de *Phacelia tanacetifolia* se inhibe en presencia del calmidazolonio, una antagonista de la calmodulina (Coccuci y Negrini, 1991). Estudios *in vitro* utilizando cultivos embriogénicos de zanahoria doméstica permitieron establecer que durante la germinación los niveles de calmodulina se duplican. De manera adicional, se observó un incremento en la concentración de una proteína dependiente de la calmodulina (Oh *et al.*, 1992). En estudios más recientes se comprobó que la alteración de los niveles de calmodulina o de sus modificaciones post-transduccionales en plantas transgénicas de papa alteran el desarrollo y crecimiento de las plantas (Poovaiah *et al.*, 1996). En la literatura contemporánea de los productos naturales existen antecedentes de varios metabolitos secundarios de origen vegetal y fúngico que

interaccionan con la calmodulina. Entre ellos destaca la fitotoxina fúngica ofobiolina A (Leung *et al.*, 1984; 1985) y más recientemente las fitotóxicas aisladas del hongo coprófilo *Guanomyces polytrix* (Macías *et al.*, 2000).

Con la finalidad de demostrar si los productos fitotóxicos 191–193 interaccionan con la calmodulina se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS–PAGE al 12%). En la Figura 25 se observa que la calmodulina bovina tratada con Ca^{2+} (1mM) y las herbaruminas I (191) y III (193)(0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$) presentan una menor movilidad electroforética que la calmodulina tratada solo con Ca^{2+} (Control). En el caso de la calmodulina de espinaca tratada en las mismas condiciones se observa un aumento en la movilidad de la calmodulina tratada con las herbaruminas I–III (191–193) (Figura 26).

En síntesis las fitotoxinas aisladas del hongo *P. herbarum* interaccionan con las calmodulinas de bovino y espinaca; en un caso retardan la movilidad de la proteína y en otro la aumentan.

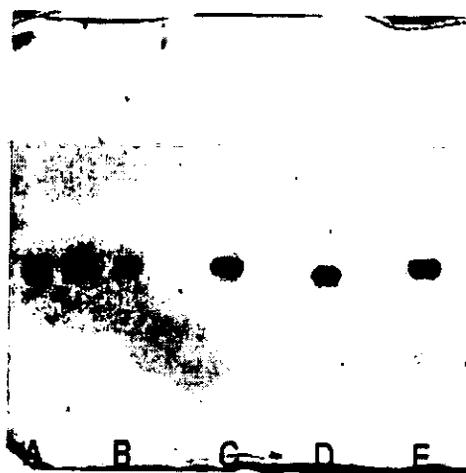


Figura 25. Electroforesis desnaturalizante (SDS–PAGE) de la calmodulina bovina después del tratamiento con las herbaruminas I–III (191–193). Electroforesis de 2 μg de calmodulina en presencia de Ca^{2+} 1mM. Pretratamientos de las muestras de calmodulina, 1.5 h a 30°C en presencia de Ca^{2+} 1mM: A, calmodulina; B, (+)–(2*S*,3*S*)–5–hidroxi–6,8,10–trimetoxi–2,3–dimetil–2,3–dihidronaftopirona (control positivo); C, 191; D, 192 y E, 193.

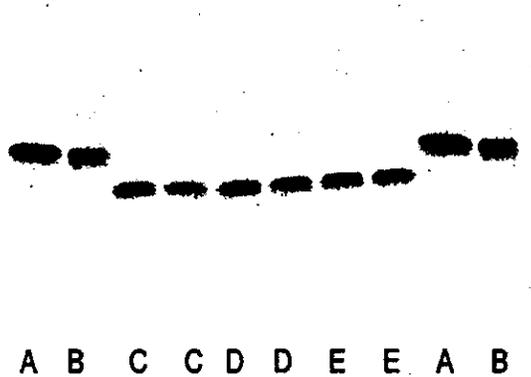
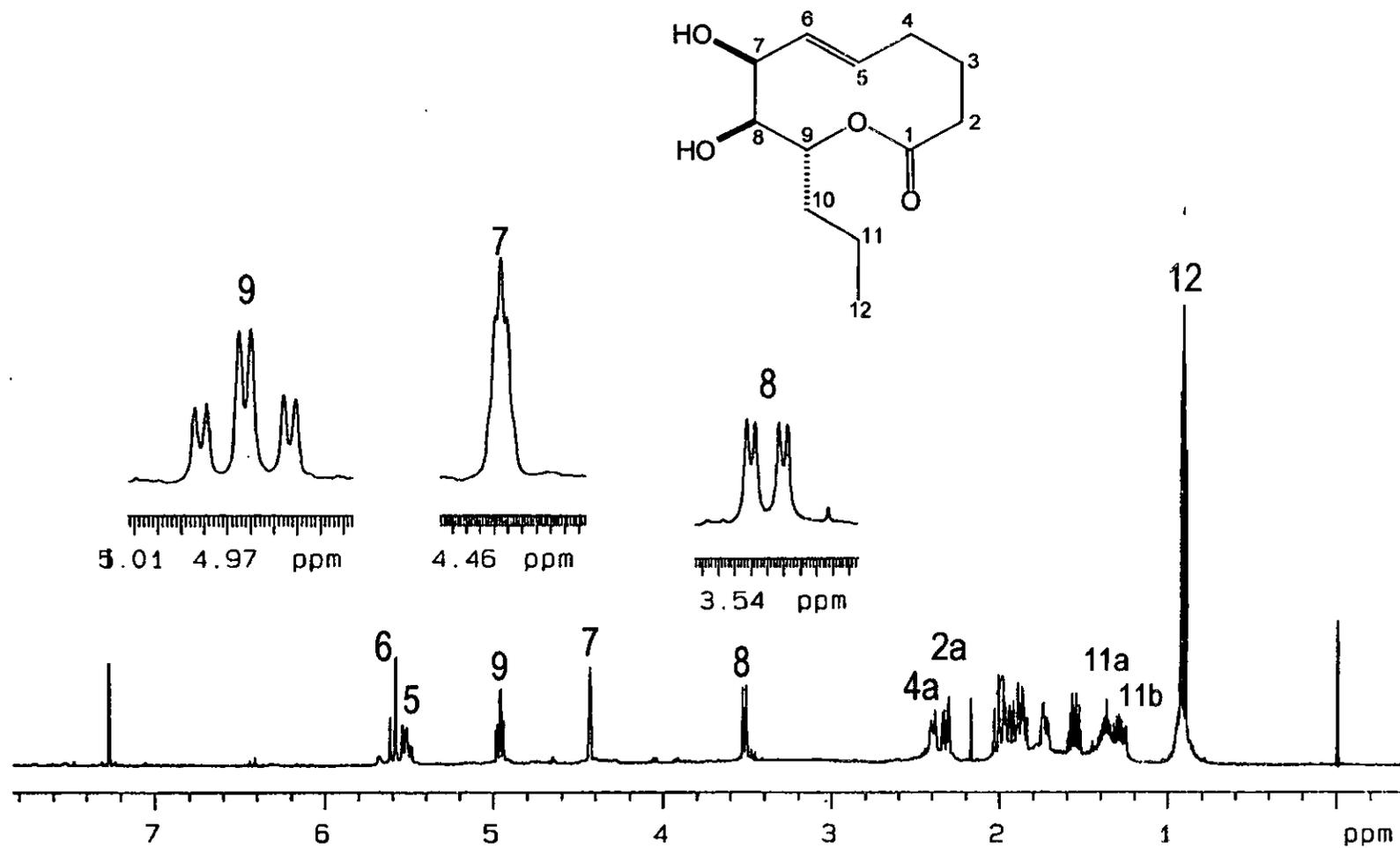
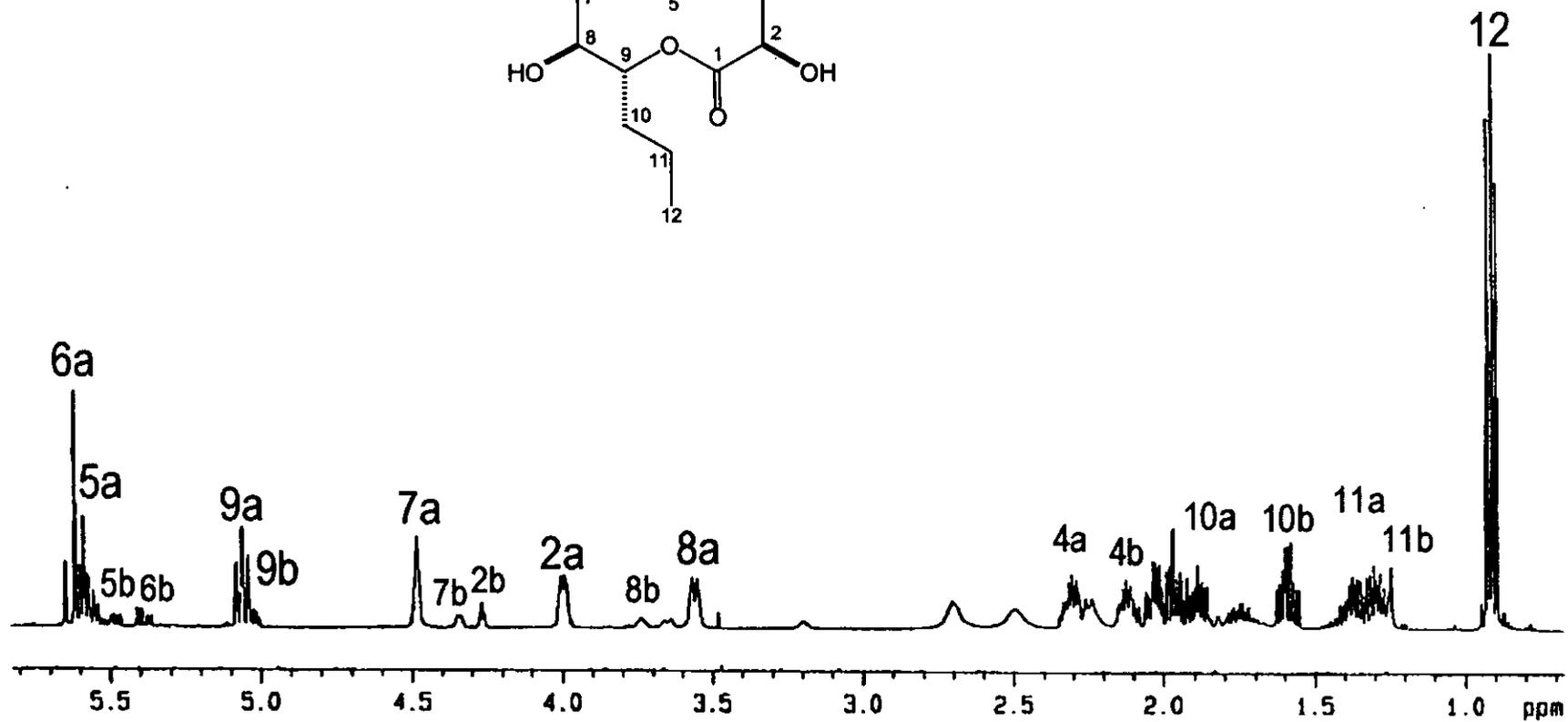
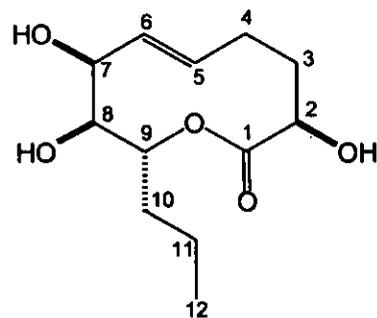


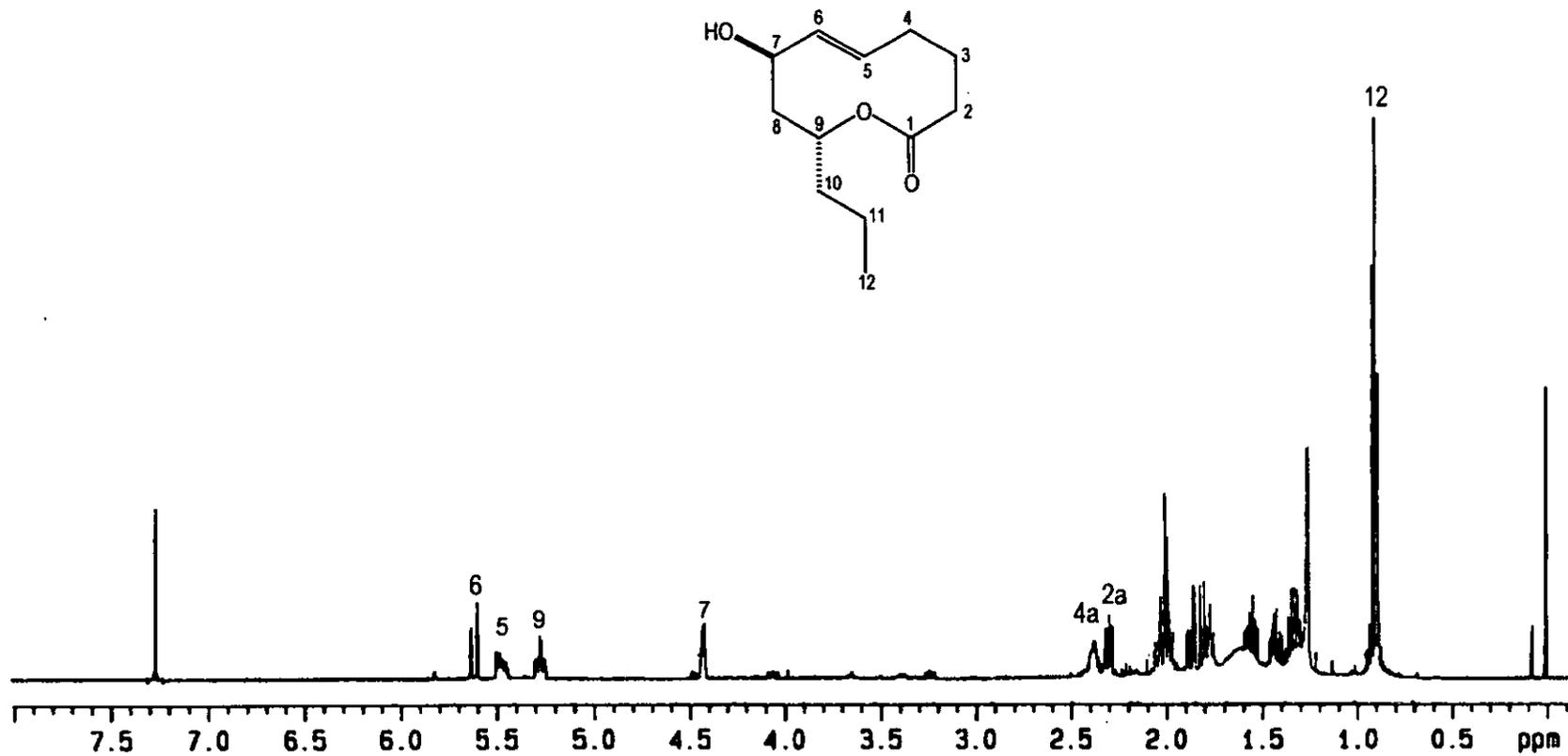
Figura 25. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) de la calmodulina de espinaca después del tratamiento con las herbaruminas I-III (191-193). Electroforesis de 2 μ g de calmodulina en presencia de Ca²⁺ 1mM. Pretratamientos de las muestras de calmodulina, 1.5 h a 30°C en presencia de Ca²⁺ 1mM: A, calmodulina; B, (+)-(2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (control positivo); C, 191; D, 192 y E, 193.



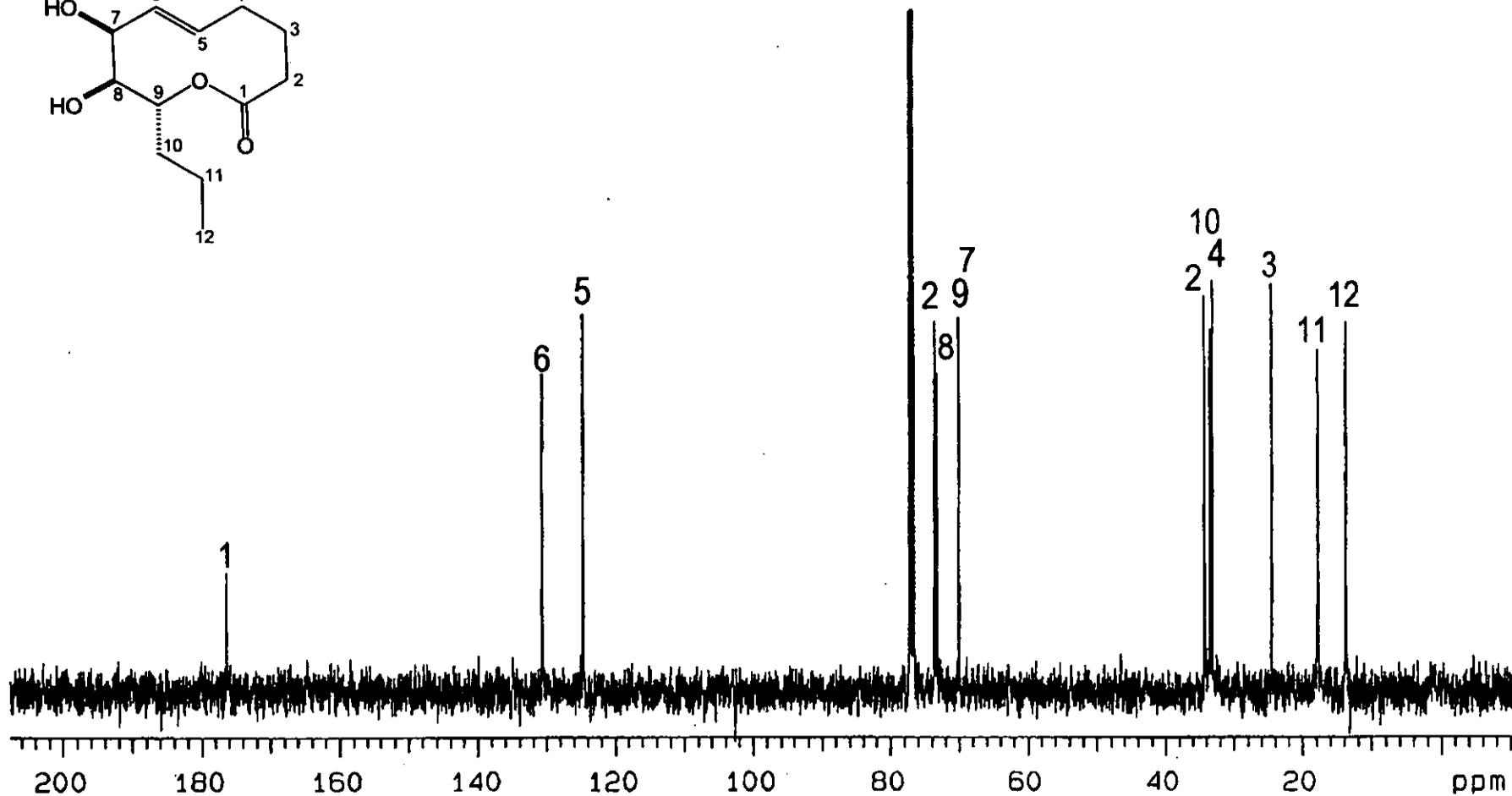
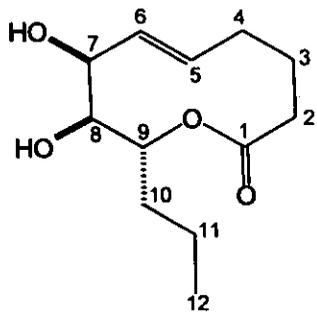
Espectro 1. RMN ¹H de la herbarumina I (191) (500 MHz, CDCl₃).



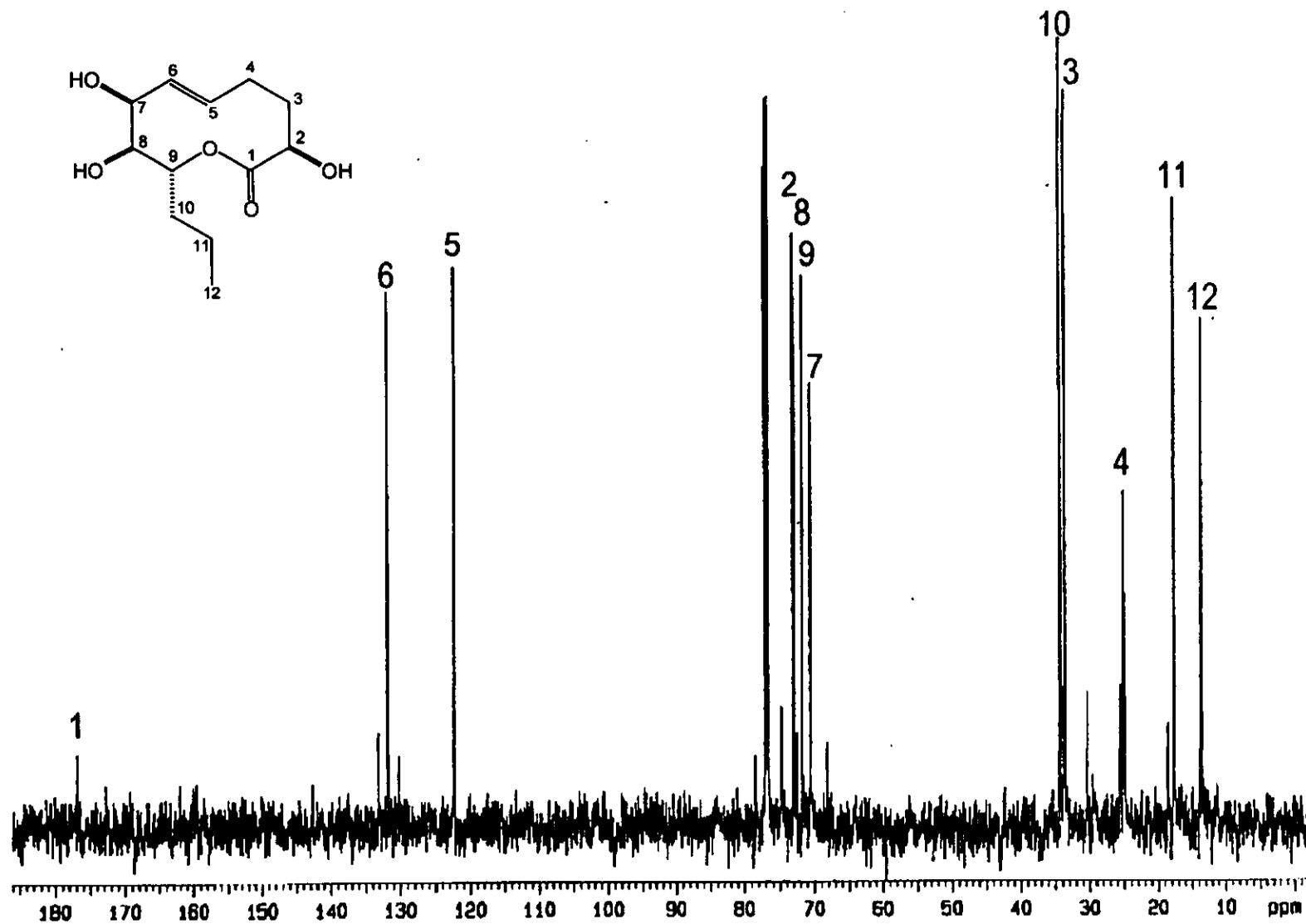
Espectro 2. RMN ^1H de la herbarumina II (192) (500 MHz, CDCl_3).



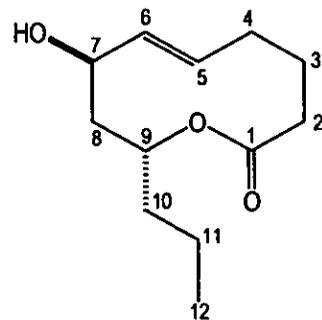
Espectro 3. RMN ¹H de la herbarumina III (193) (500 MHz, CDCl₃).



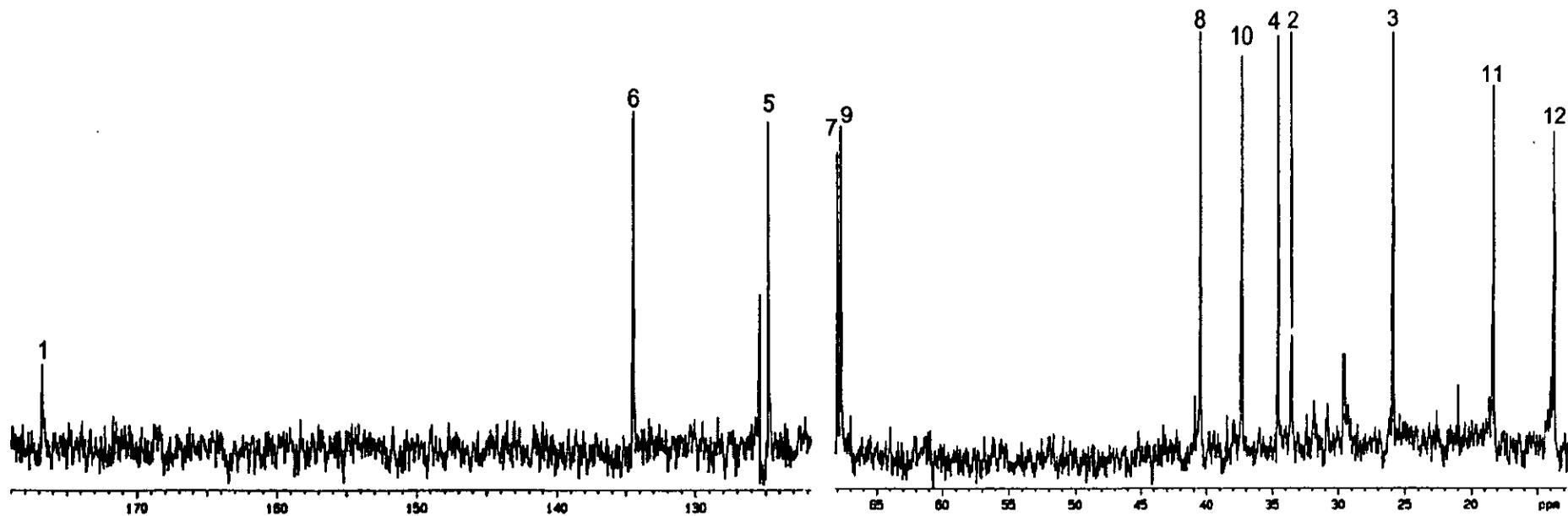
Espectro 4. RMN ¹³C de la herbarumina I (191) (125 MHz, CDCl₃).



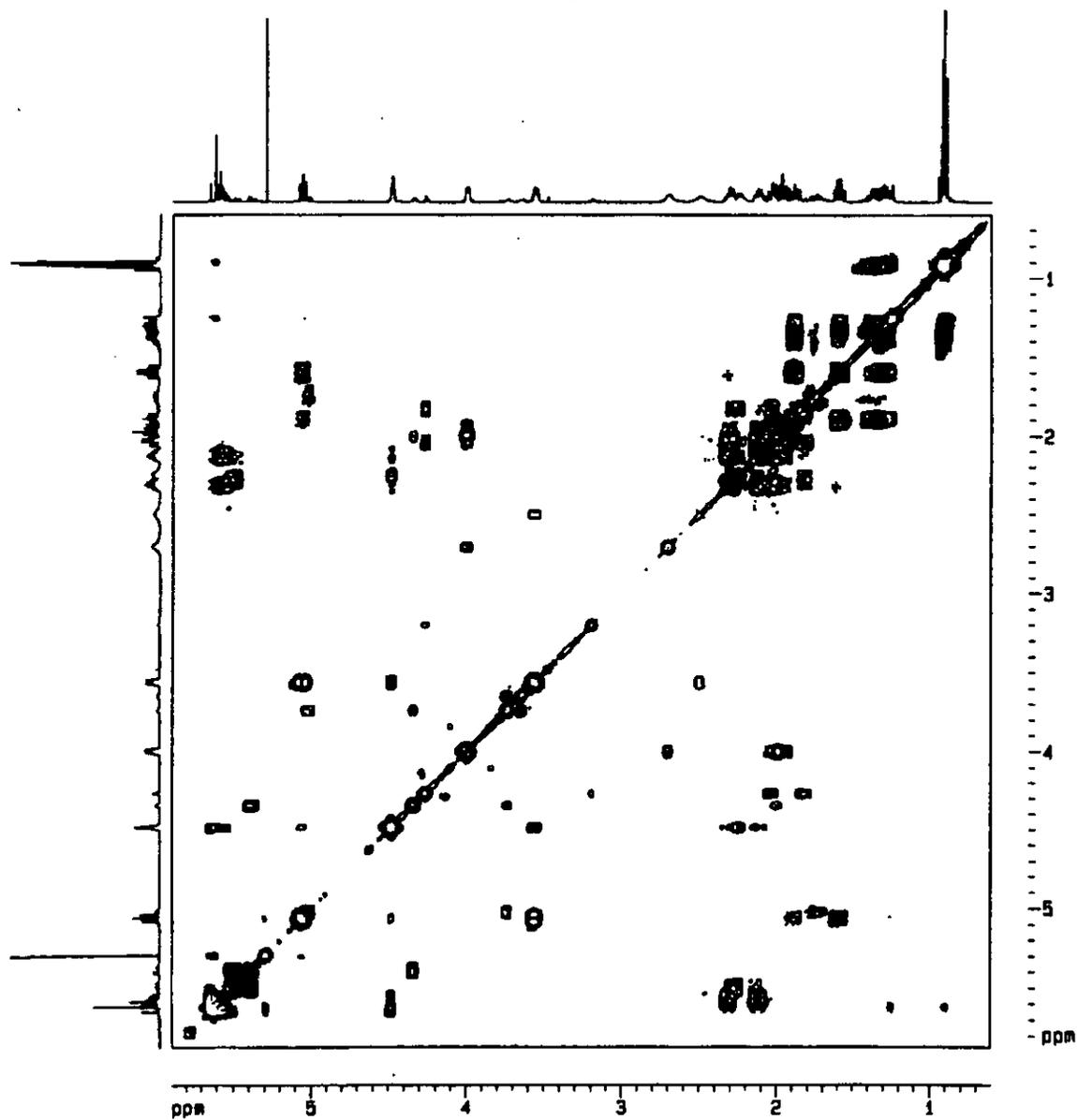
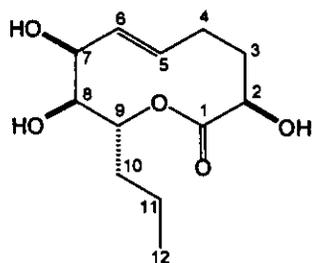
Espectro 5. RMN ^{13}C de la herbarumina II (192) (125 MHz, CDCl_3).



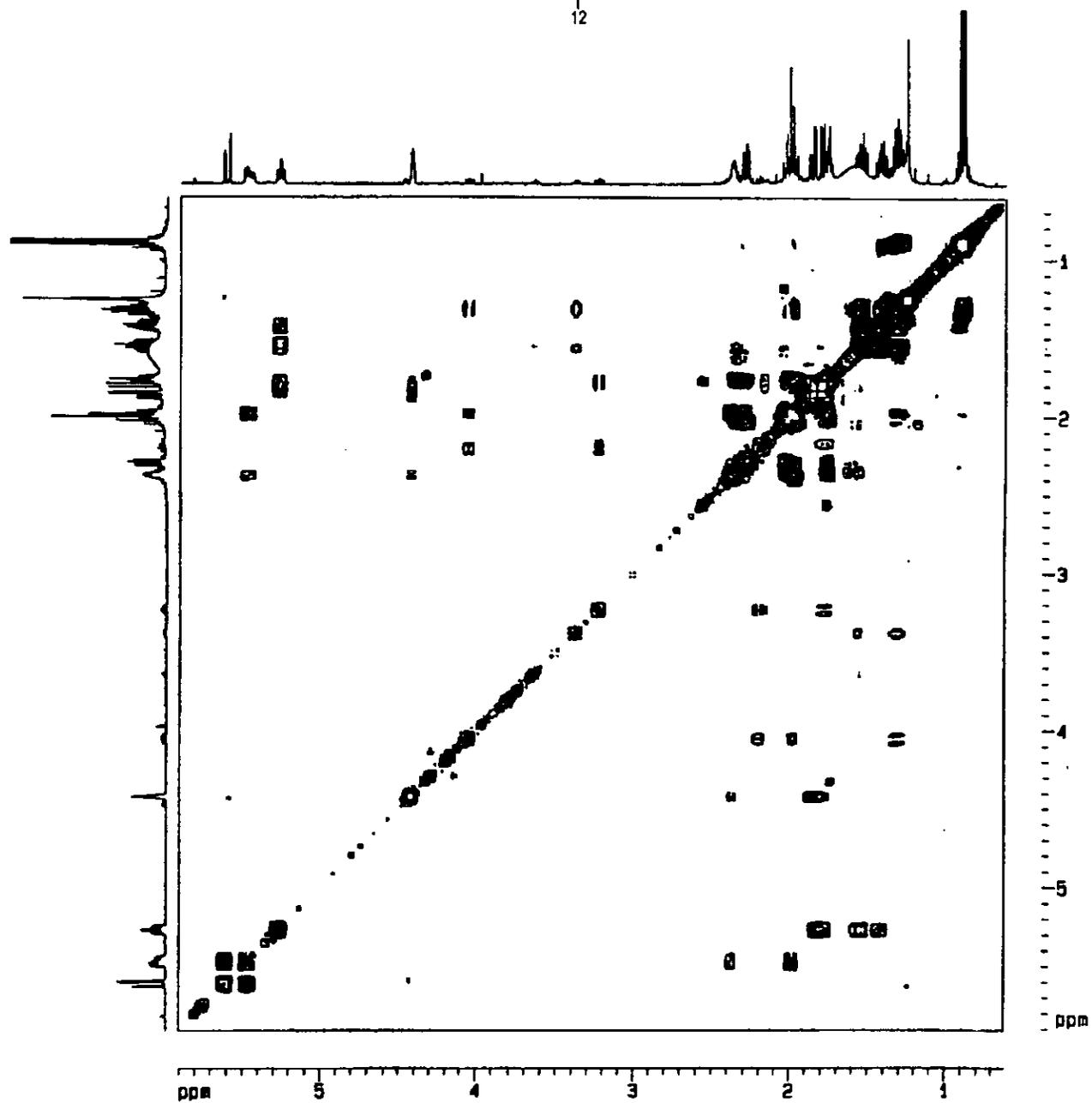
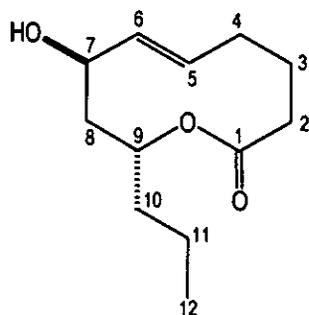
137



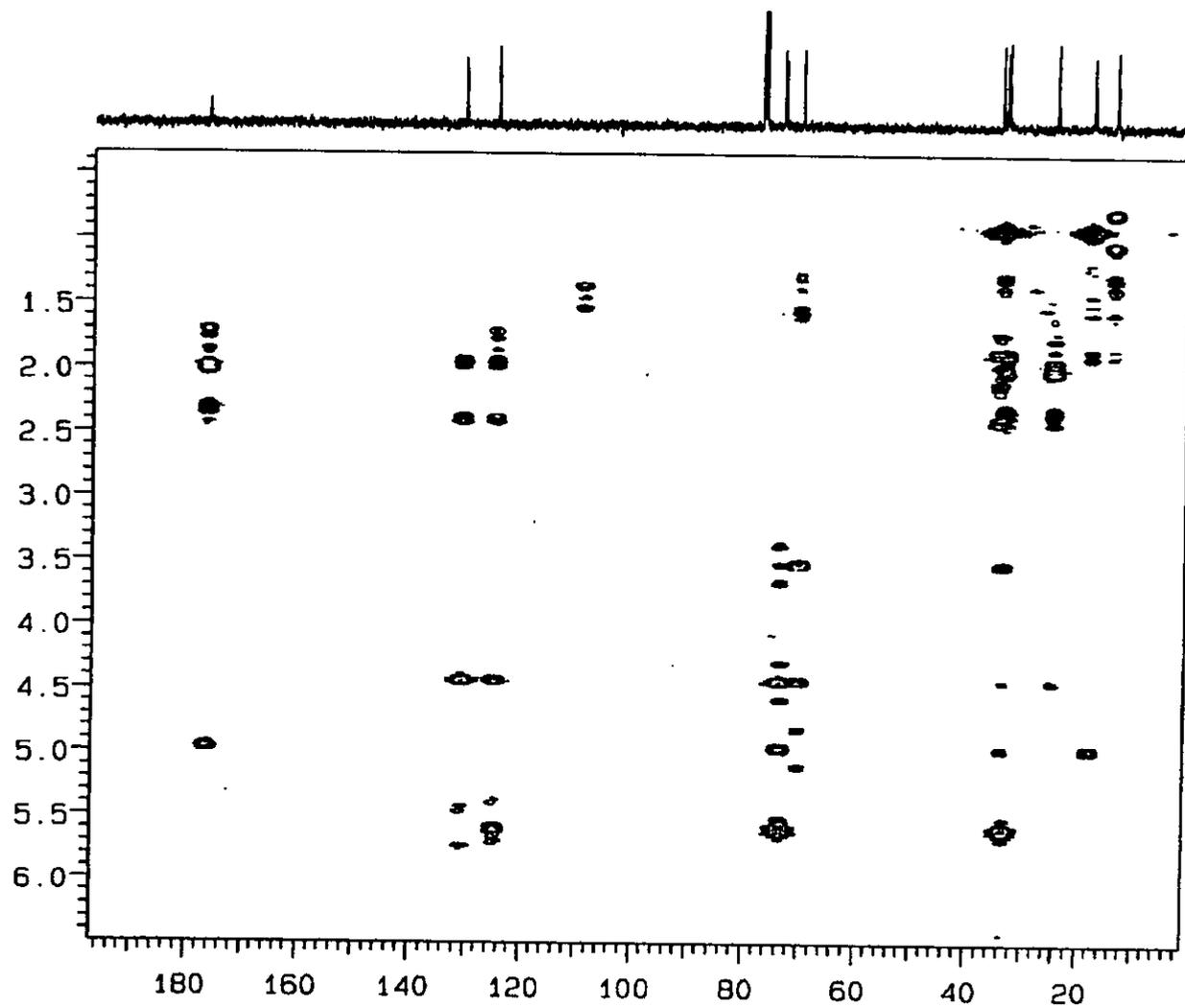
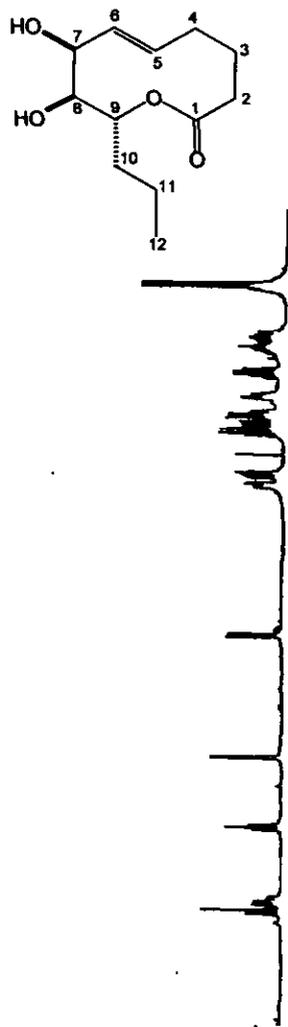
Espectro 6. RMN ^{13}C de la herbarumina III (193) (125 MHz, CDCl_3).



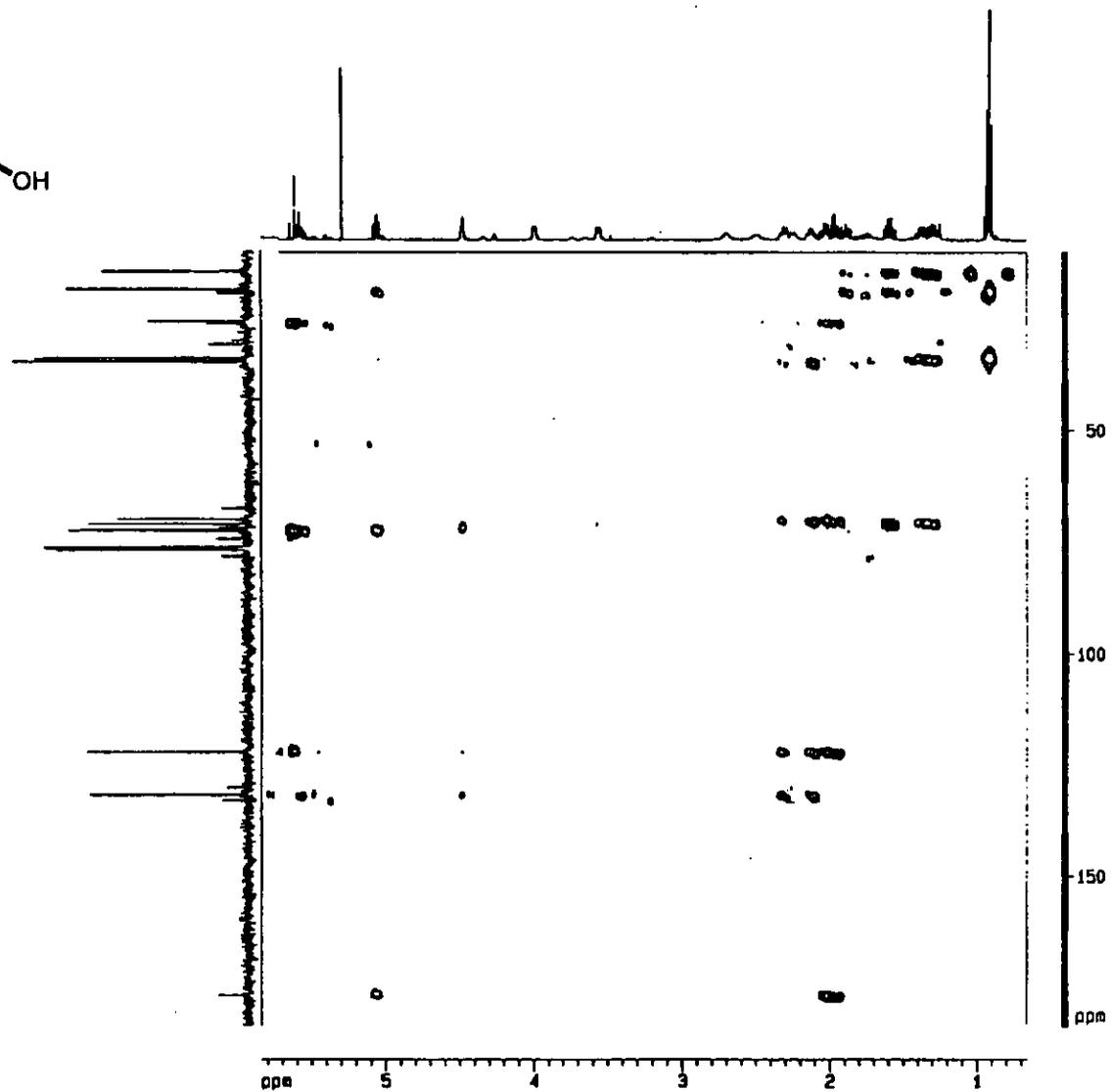
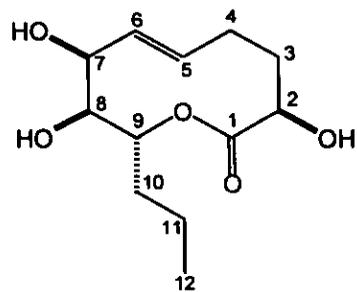
Espectro 7. Espectro de RMN ^1H bidimensional COSY de la herbarumina II (192).



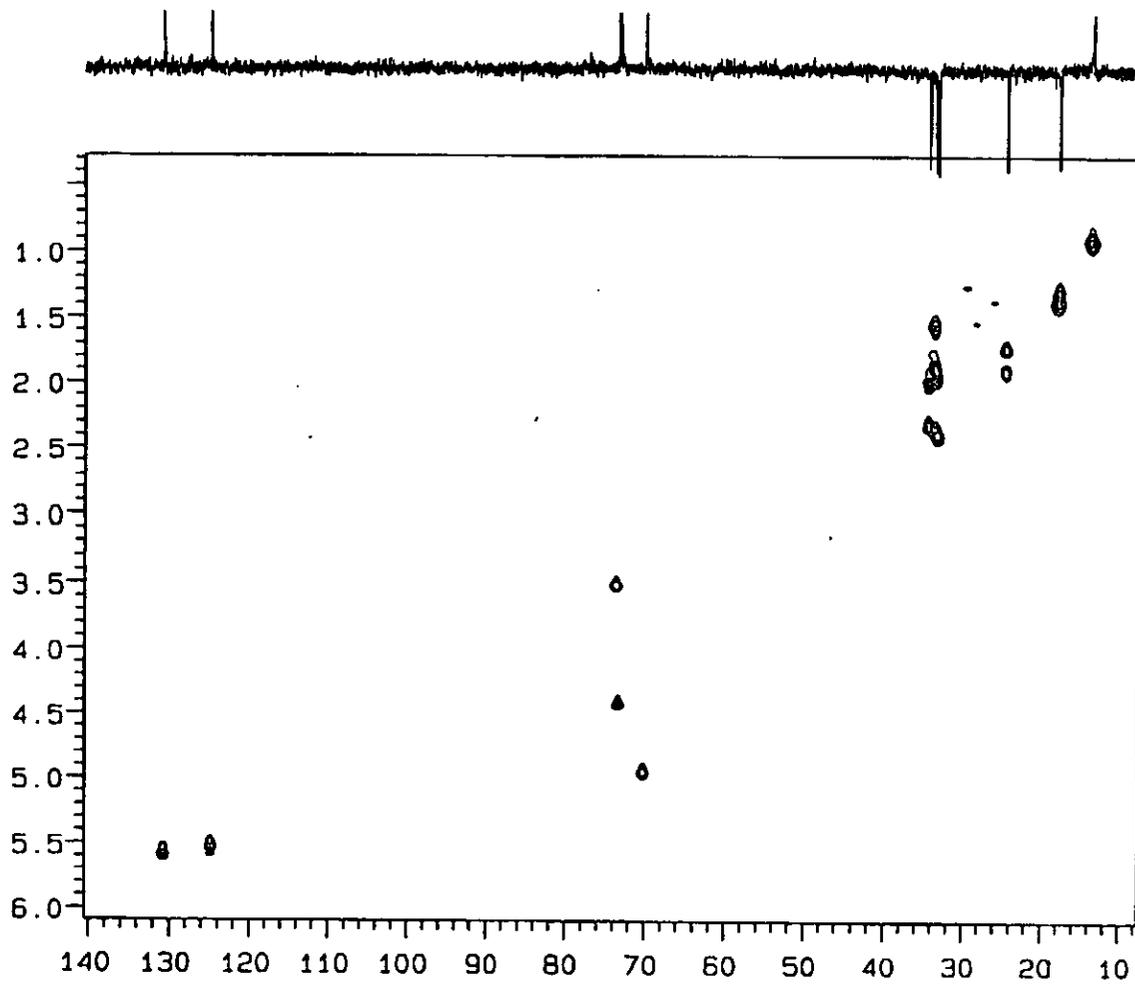
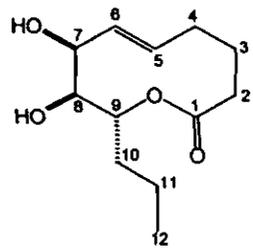
Espectro 8. Espectro de RMN ^1H bidimensional COSY de la herbarumina III (193).



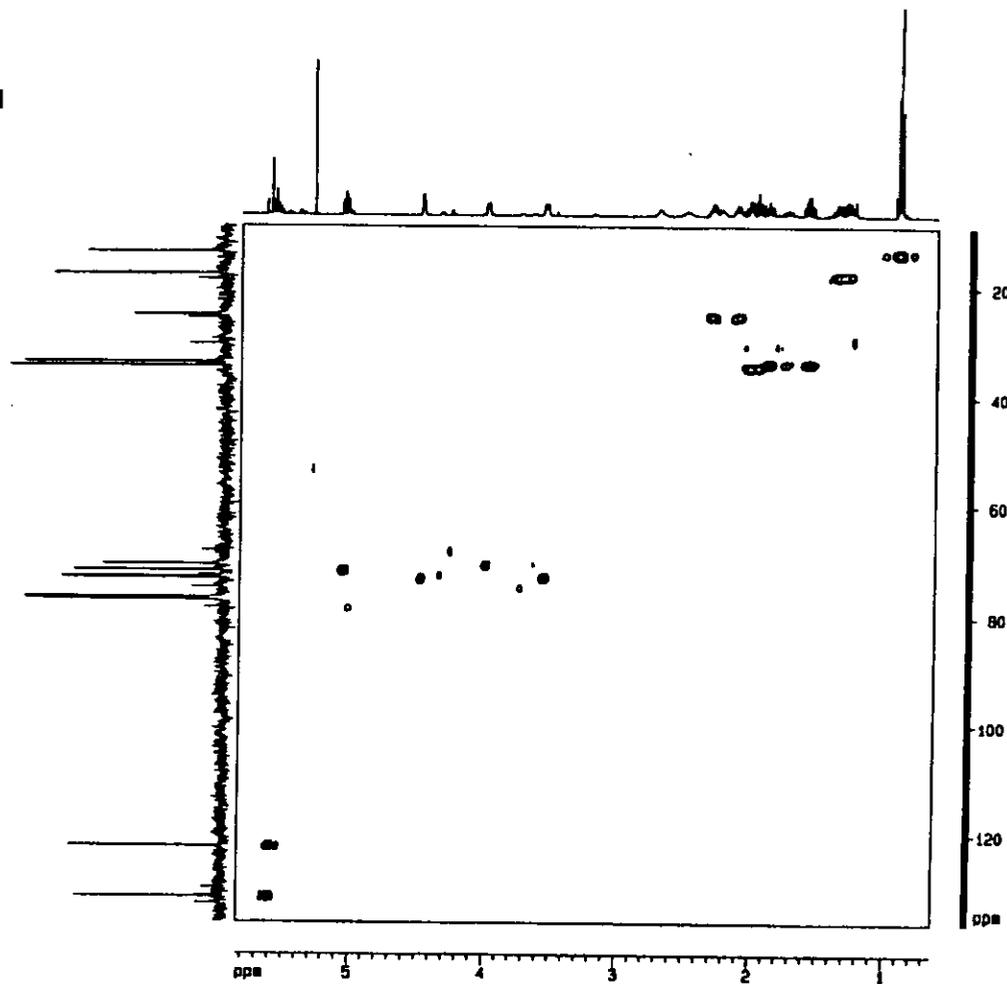
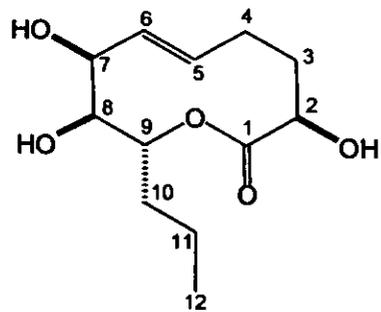
Espectro 9. Espectro bidimensional HMBC de la herbarumina I (191).



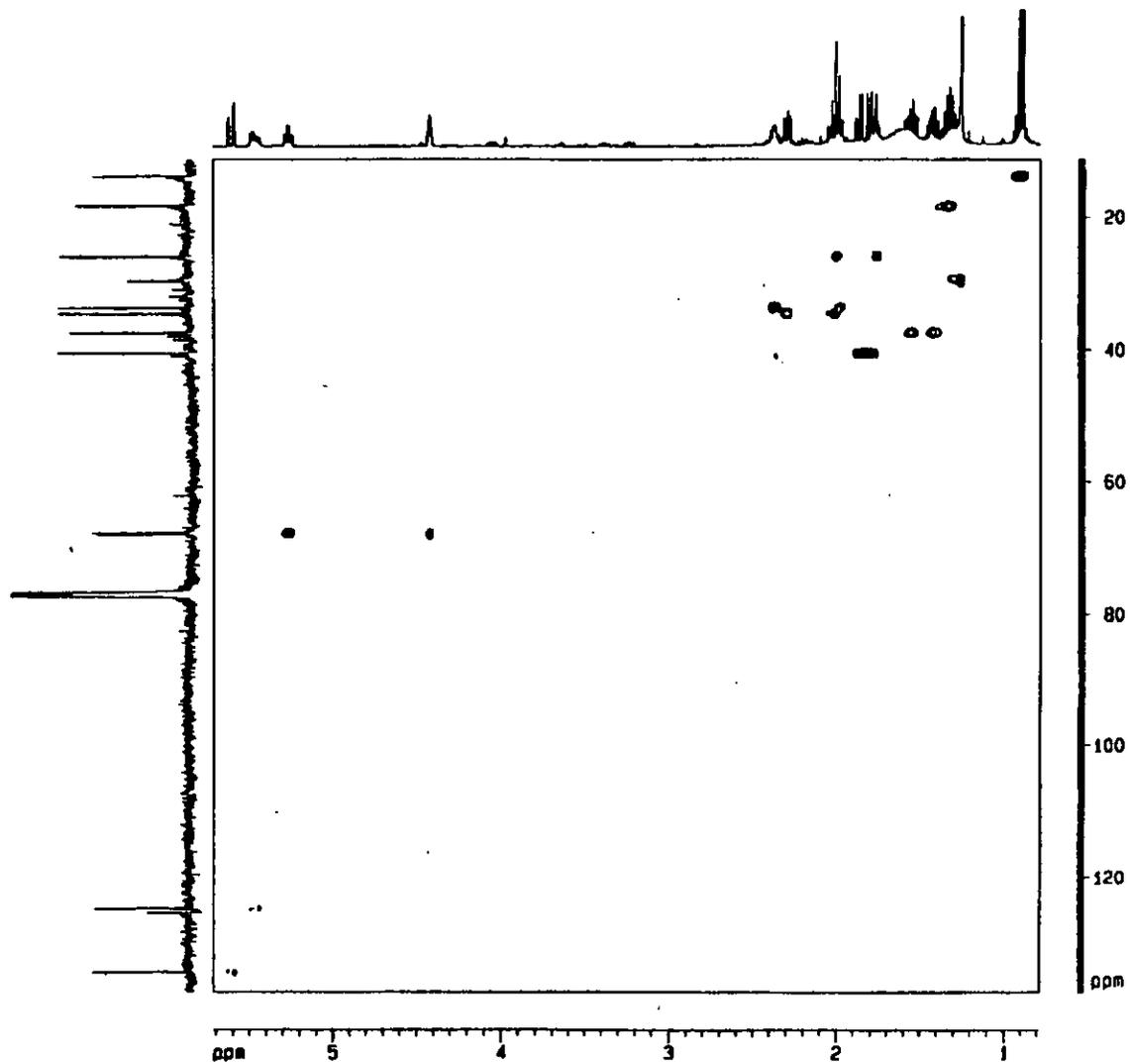
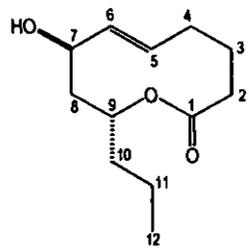
Espectro 10. Espectro bidimensional HMBC de la herbarumina II (192).



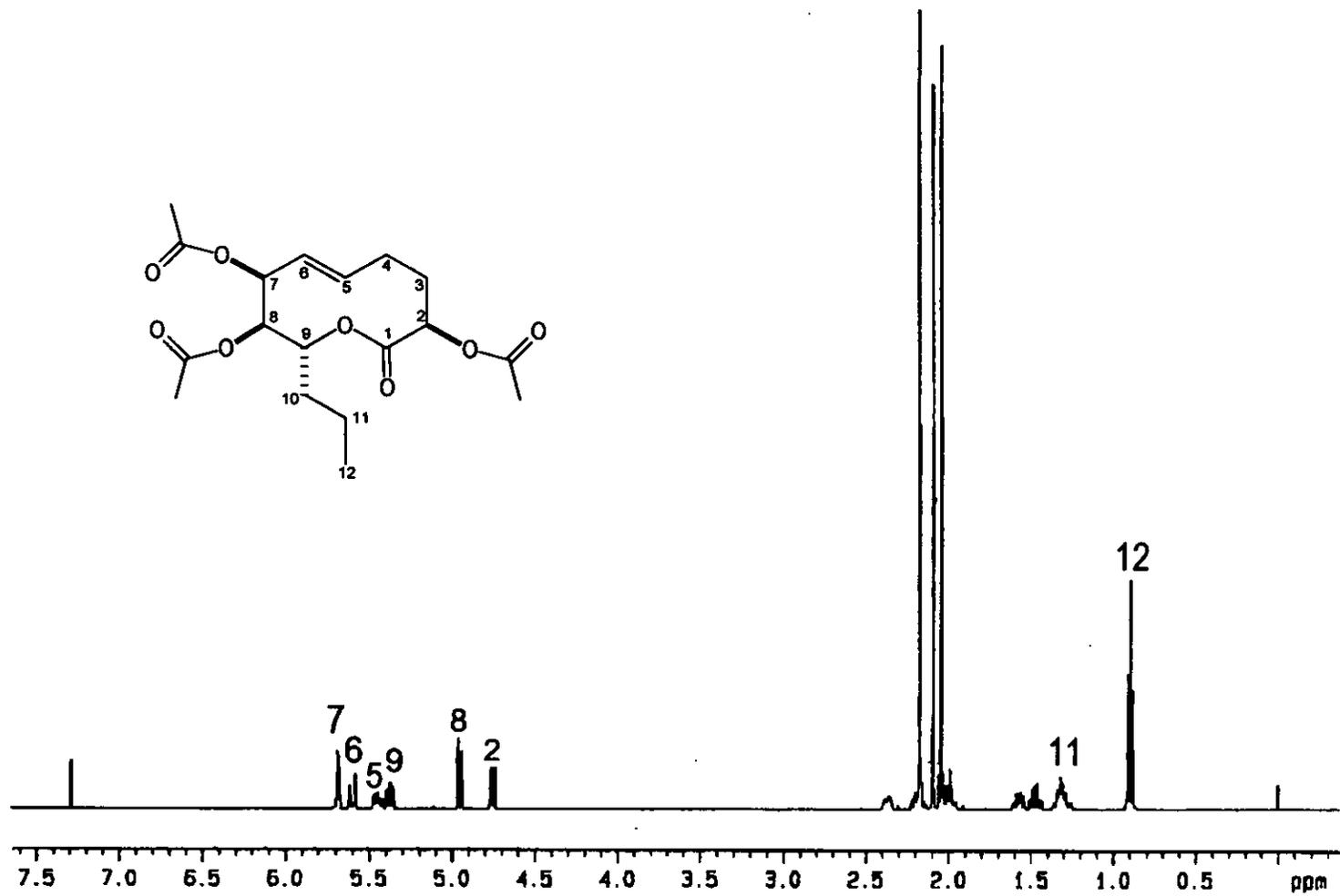
Espectro 12. Espectro bidimensional HMQC de la herbarumina I (191).



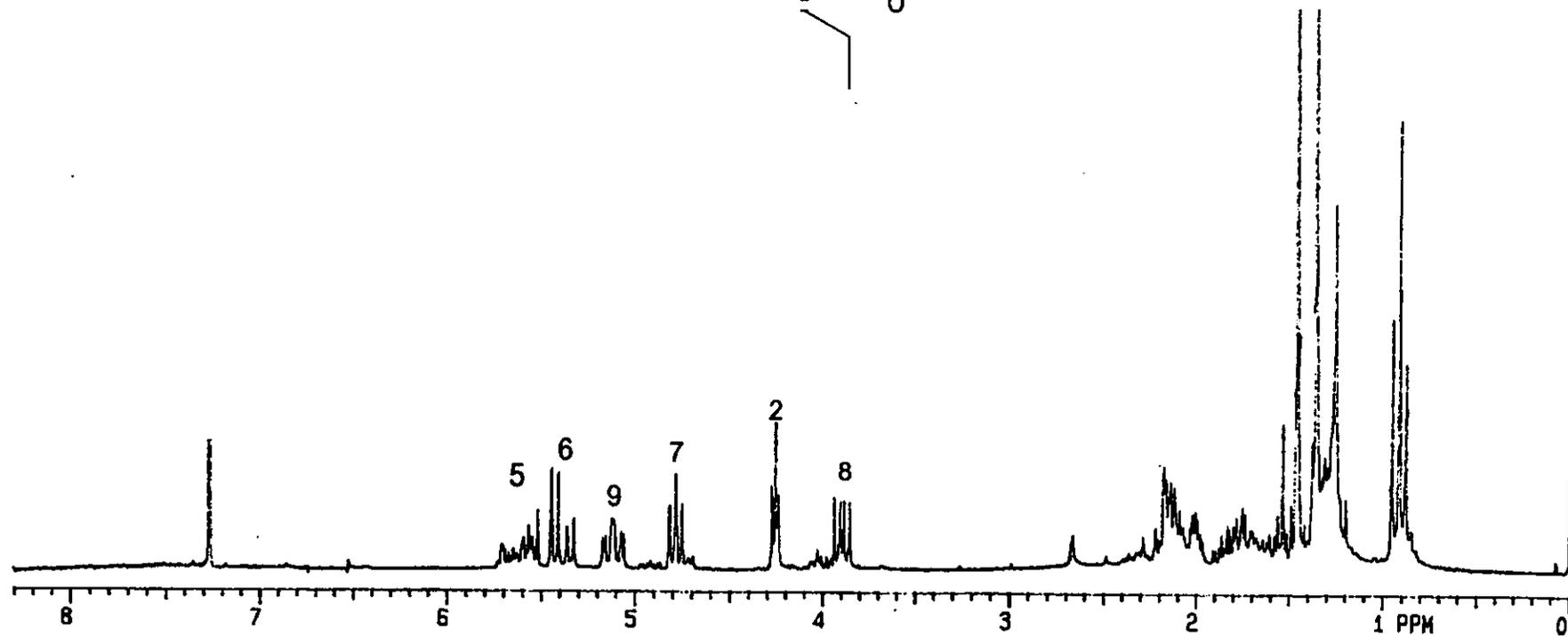
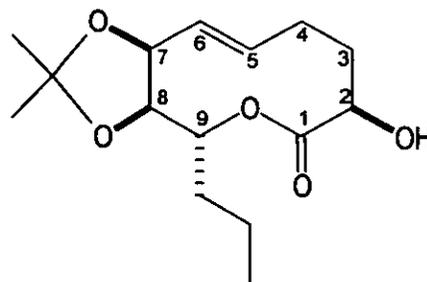
Espectro 13. Espectro bidimensional HMQC de la herbarumina II (192).



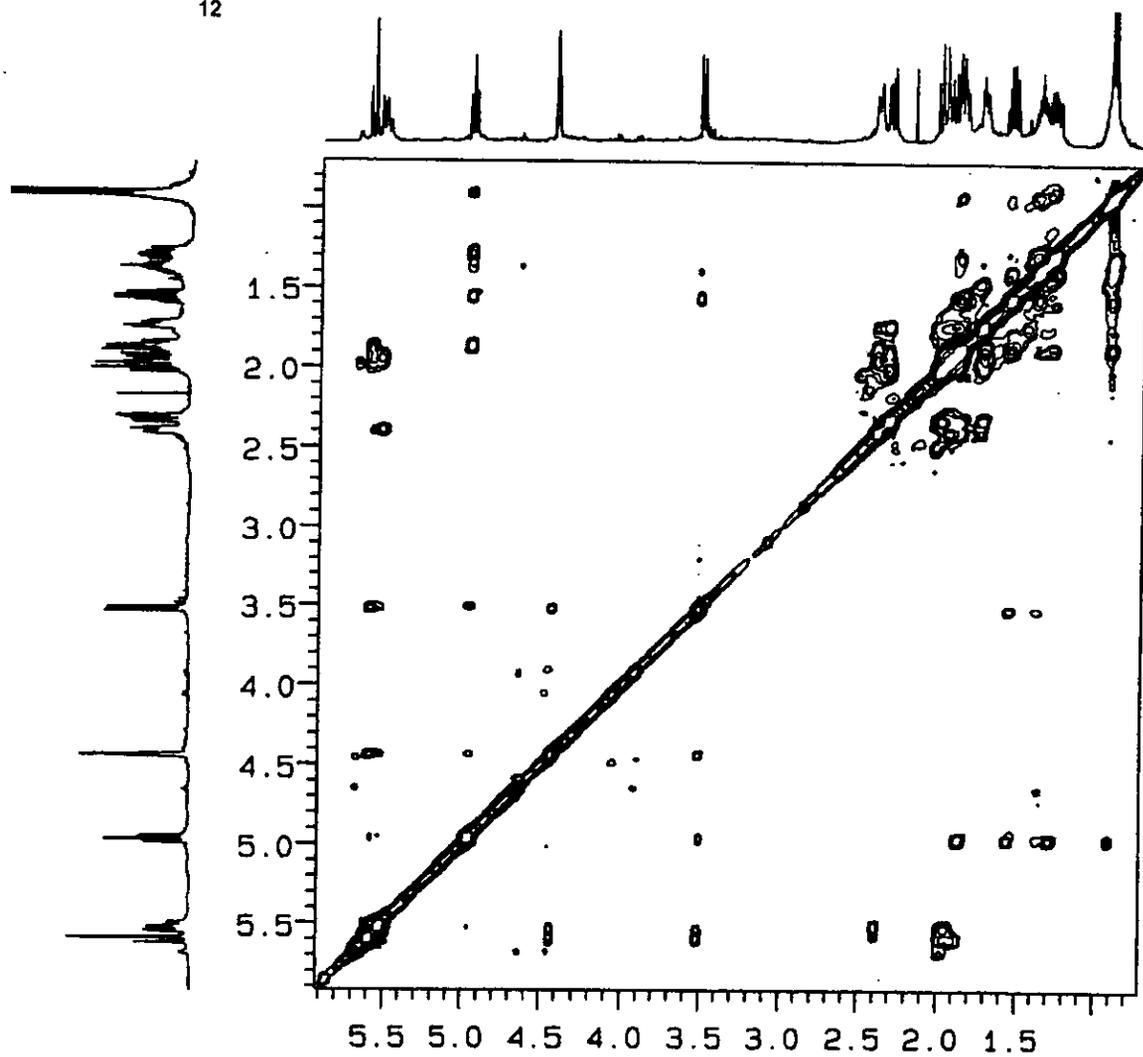
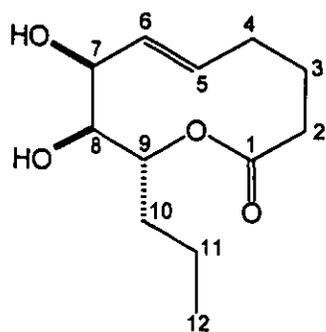
Espectro 14. Espectro bidimensional HMQC de la herbarumina III (193).



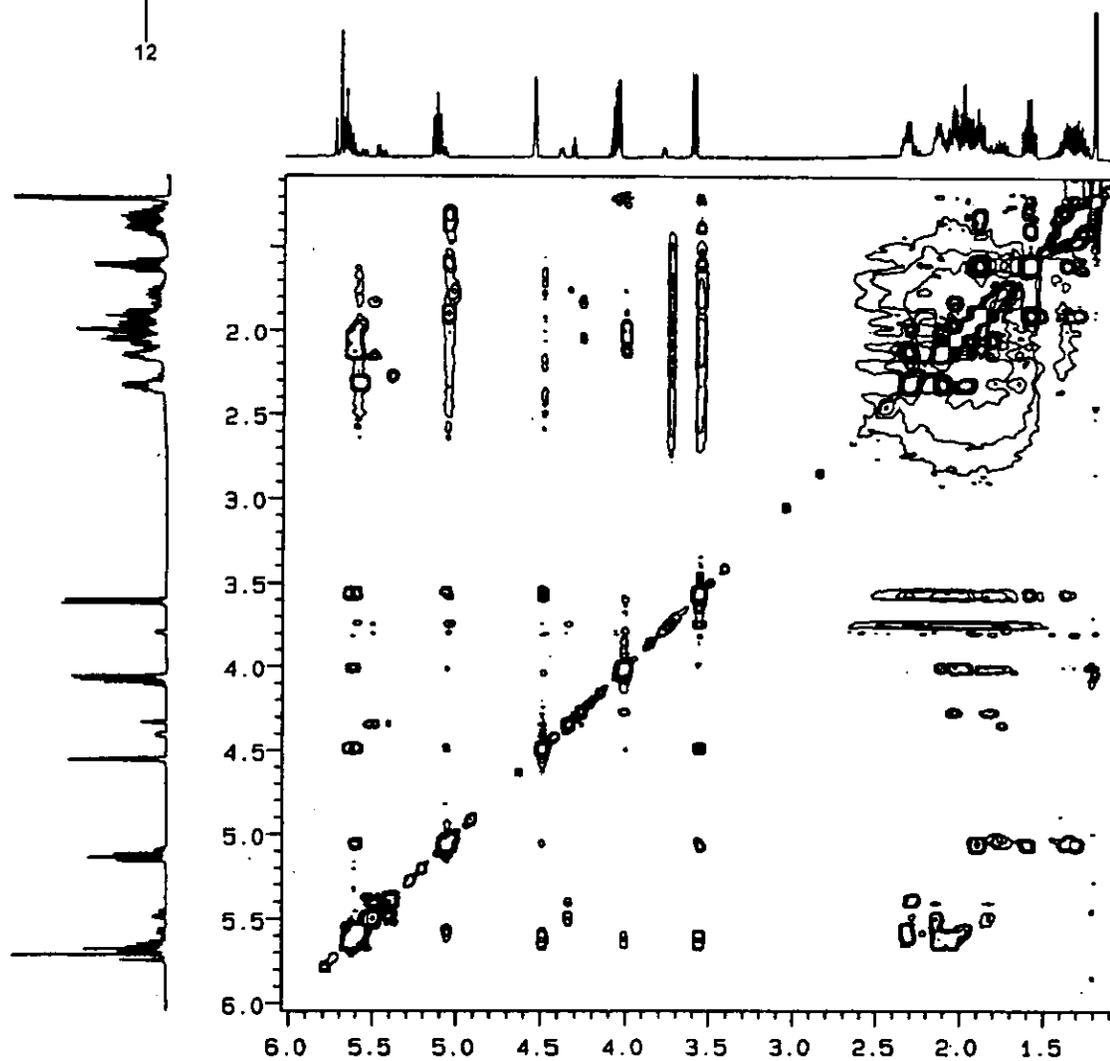
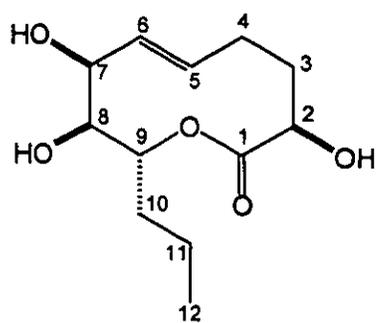
Espectro 15. Espectro de RMN ^1H de la 2,7,8-triacetilherbarumina II (192c).



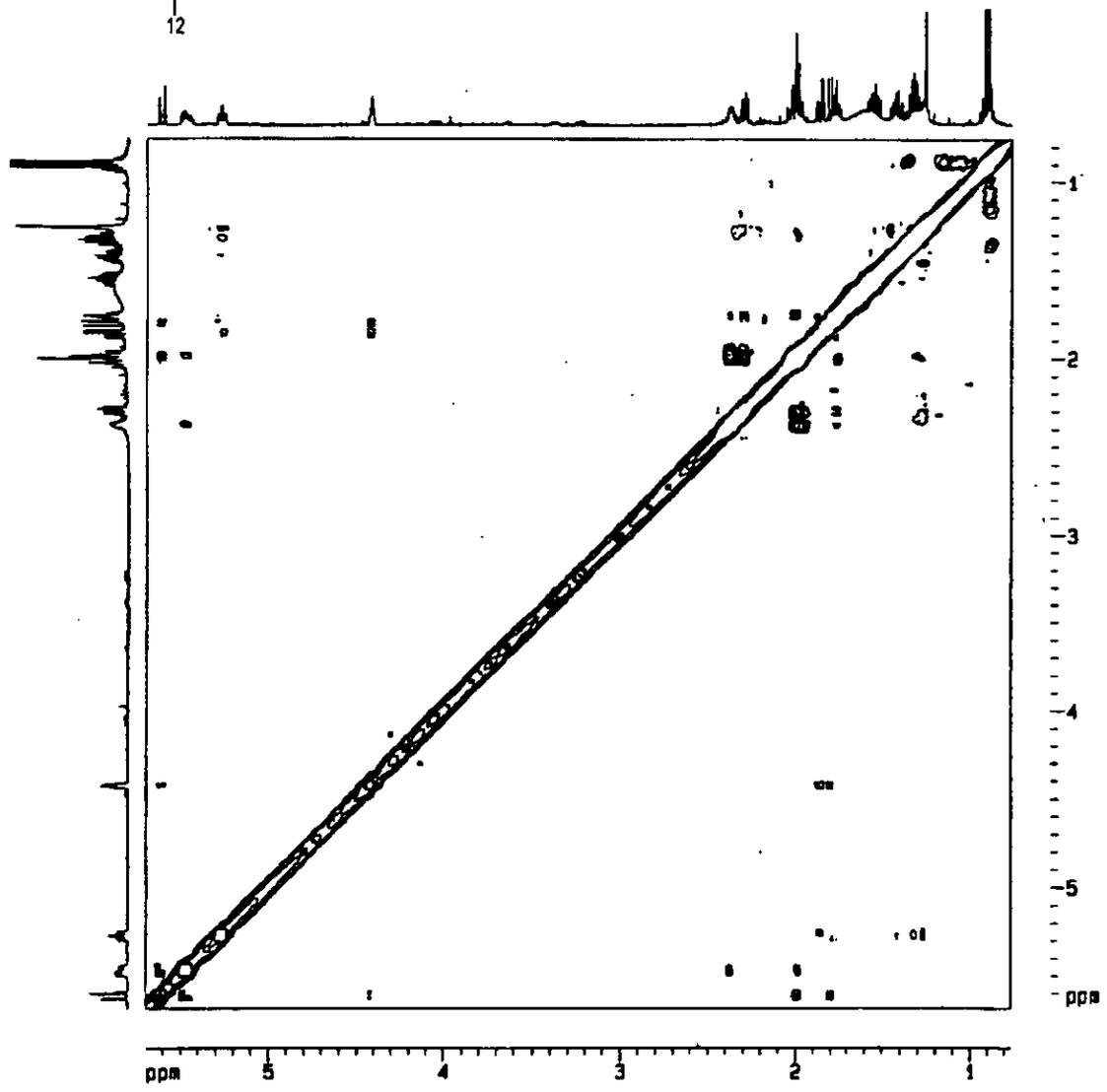
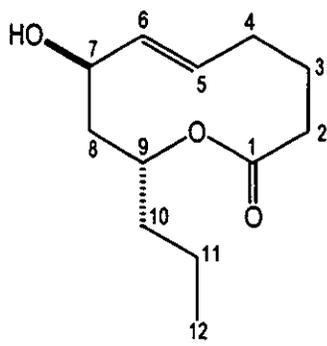
Espectro 16. Espectro de RMN ^1H de la 7,8-*O,O*-isopropilidenherbarumina II (192d).



Espectro 17. Espectro de RMN ^1H bidimensional homonuclear NOESY de la herbarumina I (191).

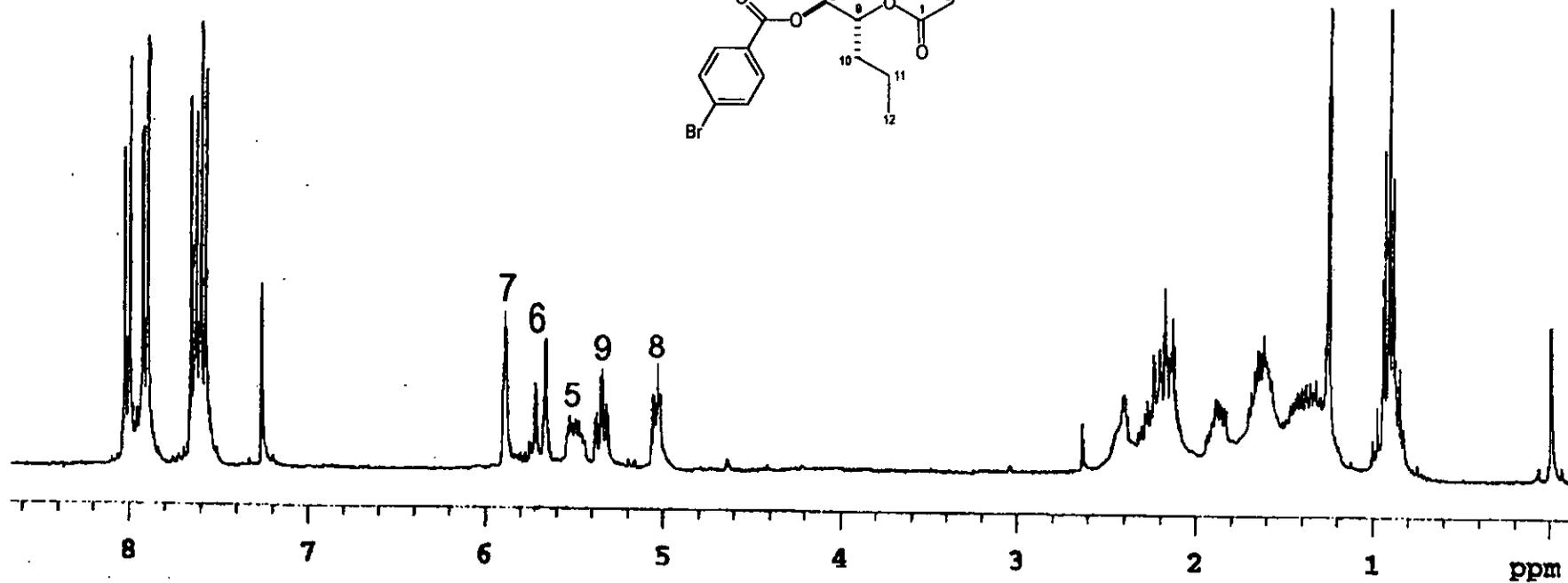
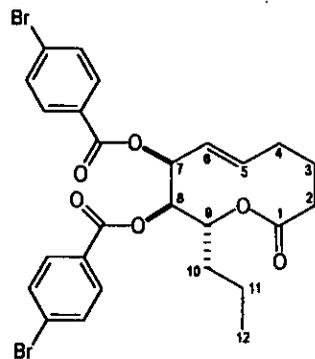


Espectro 18. Espectro de RMN ^1H bidimensional homonuclear NOESY de la herbarumina II (192).

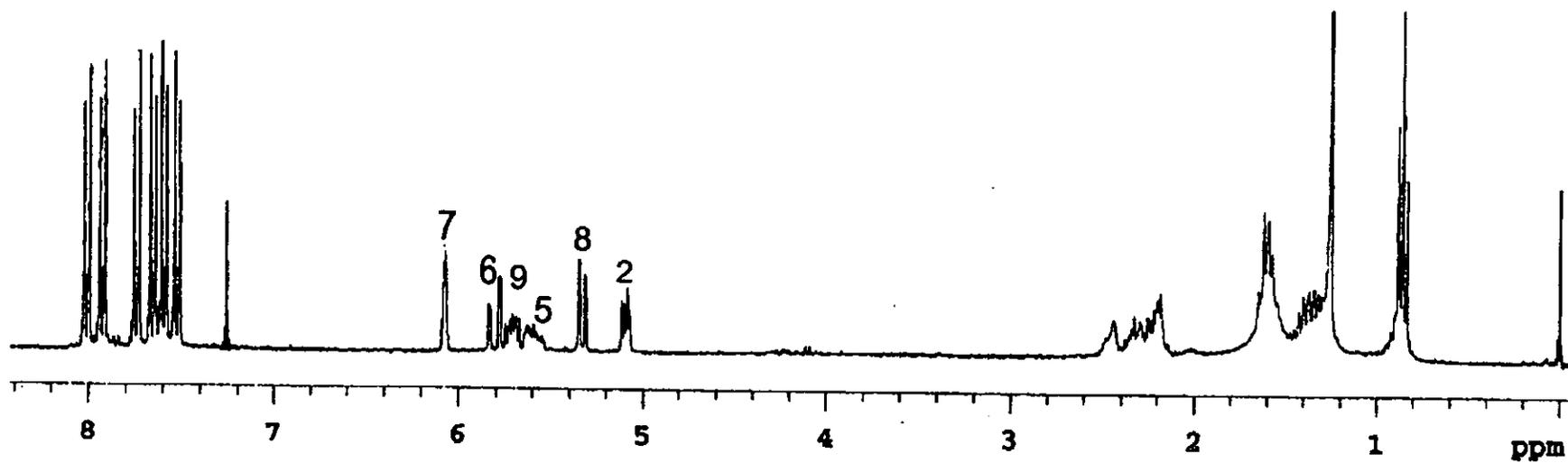
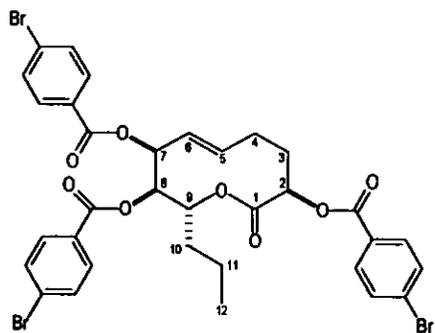


Espectro 19. Espectro de RMN ^1H bidimensional homonuclear NOESY de la herbarumina III (193).

151



Espectro 20. Espectro de RMN ¹H del compuesto 191a.



Espectro 21. Espectro de RMN ^1H del compuesto 192e.

5.CONCLUSIONES

- Los resultados de la presente investigación indican que la selección de organismos fúngicos de acuerdo a un criterio ecológico en conjunto con los ensayos de determinación del potencial fitotóxico pueden conducir al descubrimiento de productos fitotóxicos novedosos como sucedió en el caso de *Phoma herbarum*. Sin embargo la aplicación de esta estrategia no siempre garantiza la detección de hongos que biosinteticen productos biodinámicos novedosos ya que el estudio de *Phoma sorghina* conllevó a la obtención de algunos productos fitotóxicos conocidos.
- El organismo *Phoma herbarum* biosintetiza policétidos del tipo de las nonenólidas. Estas nonenólidas (herbaruminas I-III), son análogos novedosos de las pinolidoxinas y, demostraron una notable actividad fitotóxica de tipo pre-emergente. En el caso de la herbarumina II (192) el efecto fue comparable al producido por el herbicida de uso comercial 2,4-D. Este hallazgo permite inferir que la presencia del diol entre C-7 y C-8 es un requisito estructural importante para la actividad fitotóxica y que el aumento o disminución del grado de hidroxilación en la macrolactona provoca una disminución significativa de la actividad biológica.

La proteína reguladora calmodulina podría constituir un posible blanco de acción de las fitotoxinas de *P. herbarum* ya que estos productos modifican la movilidad electroforética de esta importante proteína. Sin embargo, las herbaruminas I-III (191-193) no modifican la actividad de las enzimas glutamino sintetasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa, ni afectan la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca. Estos resultados evidentemente contribuyen a la recopilación de

información acerca de los posibles blancos de acción en el metabolismo vegetal de las herbaruminas I–III (191–193).

- La ausencia de la herbarumina III (193) en el medio de cultivo de la fermentación de *P. herbarum* durante tres semanas y su presencia en el cultivo correspondiente a la fermentación de dos semanas permite especular que este producto es el precursor biogénico de las herbaruminas I (191) y II (192). De tal forma, que la herbarumina III (193) podría ser hidroxilada en la posición C–8 del núcleo por la acción de una monooxigenasa dependiente de la citocromo P–450 oxidasa para generar la herbarumina I (191). La oxidación de esta última en C–2 por la acción de una oxidasa similar conllevaría a la formación de la herbarumina II (192). Considerando los antecedentes de las decaestricninas A–D es también altamente factible que estos productos se biosinteticen a partir de la acetil y malonil coenzima A por catálisis de una policétido sintetasa de tipo I.
- El estudio químico biodirigido del extracto orgánico derivado del caldo de crecimiento y del micelio de la especie *Phoma sorghina* permitió el aislamiento de cinco antraquinonas identificadas como la macrosporina (194), altersolanoles A (137) y D (195) y alterporrioles D (196) y E (197). De estos productos solo el altersolanol A (137) demostró propiedades fitotóxicas de tipo pre-emergente sobre *A. hypochondriacus* (CI_{50} de 5.20×10^{-4} M).
- La presencia de la macrosporina (194) y los altersolanoles A (137) y D (195) [compuestos citotóxicos y mutagénicos] de *P. sorghina*, hongo contaminante del grano de sorgo, es un factor de riesgo para los animales consumidores del sorgo. En consecuencia, sería conveniente alertar a los productores y consumidores acerca de

los posibles riesgos por el uso de semillas contaminadas. Indudablemente los resultados generados en esta investigación podrían servir como base para el desarrollo de técnicas analíticas apropiadas para la detección de estos compuestos como parte de un control de calidad de los granos de sorgo comerciales.

- Los resultados de la investigación constituyen una aportación adicional al conocimiento químico de las especies de hongos del género *Phoma* y evidencian una vez más, el potencial de este género como una fuente potencial de nuevos compuestos con actividad fitotóxica.

6. PERSPECTIVAS

Explorar el efecto de las herbaruminas I-III (191-193) sobre otros blancos de acción en el metabolismo vegetal.

Determinar el efecto fitotóxico pre y post-emergente de las herbaruminas I-III (191-193) sobre distintas especies de plantas nocivas y plantas de interés agrícola.

Debido a los escasos estudios sobre la biosíntesis de nonenólidas simples con cadenas laterales alquílicas se propone iniciar los estudios conducentes a determinar la biosíntesis de las herbaruminas I-III (191-193) utilizando precursores marcados ($^{13}\text{CH}_3\text{-COOH}$, $\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COOH}$ y $^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COOH}$).

Considerando que las herbaruminas I-III (191-193) interaccionan con las calmodulinas de bovino y de espinaca, se considera pertinente determinar si las interacciones de las herbaruminas I-III (191-193) con la proteína reguladora calmodulina son de carácter reversible o irreversible.

Evaluar el efecto de otros derivados de las herbaruminas I-III (191-193) 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.

- ▣ Abbasher, A. A. Kroschel, J. y Sauerborn, J. (1995) Microorganisms of *Striga hermonthica* in northern Ghana with potential as biocontrol agents, *Biocontrol Science and Technology*, **5**, 157–161.
- ▣ Abbasher, A. A., Hess, D. E. y Sauerborn, J. (1998) Fungal pathogens for biological control of *Striga hermonthica* on sorghum and pearl millet in West Africa, *African Crop Science Journal*, **6**, 179–188.
- ▣ Ackland, M. J., Hanson, J. R. y Hitchcock, P. B. (1984) The structure of thiobiscephalosporolide A, a dimeric pentaketide macrolide from *Cephalosporium aphidicola*, *J. Chem. Soc. Perk. I*, 2755–2757.
- ▣ Agrios, G. N. (1986) *Fitopatología*, 2a Edición., Editorial Limusa, México, D. F., 1–49.
- ▣ Aldridge, D. C., Armostrong, J.J., Speanke, R.N. y Turner, W.B. (1967) The cytochalasins, a new class of biologically active mold metabolites, *Chem. Commun.*, **1**, 26–27.
- ▣ Aldridge, D. C., Burrows, B. F. y Turner, W.B. (1972) The structures of the fungal metabolites cytochalasins E and F, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 148–149.

- ▣ Allenmark, S. G. (2000) Chiroptical methods in the stereochemical analysis of natural products, *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 145–155.
- ▣ Alvi, K. A., Nair, B., Pu, H., Ursino, R., Gallo, C. y Mocek, U. (1997) Phomactins: three novel antitumor cytochalasan constituents produced by *Phoma* sp., *J. Org. Chem.*, **62**, 2148–2151.
- ▣ Anaya, A. L., Calera, M. R., Mata, R. y Pereda–Miranda, R. (1991) Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* CAV (convolvulaceae), *J. Chem. Ecol.*, **16**, 2145.
- ▣ Anaya, A.L., Hernández–Bautista, B. E., Palayo–Benavides, R. H., Calera, M. y Fernández–Luiselli, E. (1995) Allelopathy in Mexican Plants. More recent studies. En: *Allelopathy Organisms, Process and Applications*. K. Inderjit, M. Dakshini y F. A. Einhelling (Editores), ACS Symposium Series, **582**, 225–241.
- ▣ Appleby, A. P., Müller, H. y Carpy S. (2000) Weed control. En: *Agrochemicals. Composition, Production, Toxicology and Applications*. F. Müller (Editor), Wiley–VCH, Federal Republic of Germany, 687–735.
- ▣ Arie, T., Kobayashi, Y., Kono, Y., Gen., O. y Yamaguchi, I. (1999) Control of clubroot of crucifers by *Phoma glomerata* and its product epoxydon, *Pestic. Sci.*, **55**, 602–604.
- ▣ Assante, G. y Nasini, G. (1987) Identity of the phytotoxin stemphylin from *Stemphylium botryosum* with altersolanol A, *Phytochemistry*, **26**, 703–705.

- ▣ Au, T. K., Wallace, S. H. C. y Leung, P. C. (2000) Initial kinetics of the inactivation of calmodulin by the fungal toxin ophiobolin A, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **32**, 1173-1183.
- ▣ Au, T. K., Wallace, S. H. C. y Leung, P. C. (2000) The biology of ophiobolins, *Life Sciences*, **67**, 733-742.
- ▣ Ayer, W. A. y Jiménez, L. D. (1994) Phomalone, an antifungal metabolite of *Phoma etheridgei*, *Can. J. Chem.*, **72**, 2326-2332.
- ▣ Beagley, B., Larsen, D. S., Pritchard, R. G. y Stoodley, R. J. (1989) Revision of the absolute configuration of (–)-bostrycin, *J. Chem. Soc Chem. Commun.*, 17-19.
- ▣ Blows, W. M., Foster, G., Lane, S. J., Noble, D., Piercey, J. E., Sidebottom, P. J. y Webb, G. (1994) Squalestatins, novel inhibitors of squalene synthase produced by a species of *Phoma* sp. V. Minor metabolites, *J. Antibiot.*, **47**, 740-754.
- ▣ Bodo, B., Molho, L., Davoust, D. y Molho, D. (1983) Fungal macrolides: Structure determination and biosynthesis of achaetolide, a lactone from *Achaetomium cristalliferum*, *Phytochemistry*, **22**, 447-451.
- ▣ Bonilla, T., López, M. O., Mena, J., Rodríguez, K., Pérez, E. y Tomas, Y. (1999) Mycobiota of *Sorghum halepense* (L.) Pers. and evaluation of capability of some species for biological control, *Revista de Protección Vegetal*, **14**, 65-68.

- ▣ Boyette, C. D. y Abbas , H. K. (1995) Weed control with mycoherbicides and phytotoxins. En: Allelopathy Organisms, Process and Applications. K. Indrejit, M. Dakshini y F. A. Einhelling (Editores), ACS Symposium Series, **582** , 280–299.
- ▣ Brebaum, S. N. y Boland, G. J. (1999) First report of *Phoma herbarum* and *Phoma exigua* as pathogens of dandelion in Southern Notario, *Plant Disease*, **83**, 200.
- ▣ Cai, X. y Wong, P. P. (1989) Subunit composition of glutamine synthetase isozymes from root nodules of bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Plant Physiol.*, **91**, 1056-1062.
- ▣ Capasso, R., Evidente, A. y Burro, M. (1991) Cytochalasins from *Phoma exigua* var *heteromorpha*, *Phytochemistry*, **30**, 3945–3950.
- ▣ Capasso, R., Randazzo, G. y Ritieni, A. (1986) Analysis of phomenone in cultures of *Phoma destructiva* and *Phoma betae* by high–performance liquid chromatography and thin layer chromatography, *J. Chromatogr.*, **356**, 359–366.
- ▣ Cappaso, R., Evidente, A. y Ritieni, A. (1988) Ascochalsin, a new cytochalsin from *Ascochyta heteromorpha*, *J. Nat. Prod.*, **51**, 567–571.
- ▣ Carlile, M. J. y Watkinson, S. C. (1998) *The Fungi*, 4th Printing, Academic Press, New York, 63–64, 109–177 y 449–457.
- ▣ Chaluat, M. M. y Perris, S. (1994) Pathogenic fungi in seeds of tropical forage species, *Pasturas Tropicales*, **16**, 41–43.

- ▣ Chandler, I. M., McIntyre, R.C. y Simpsons, T.J. (1992) Biosynthesis of LL-D253 α , poliketide chromanone metabolite of *Phoma pigmentivora*: incorporation of ^{13}C , ^2H and ^{18}O labelled precursors, *J. Chem. Soc. Perk. I*, 2285–2293.
- ▣ Chandler, I. M., McIntyre, R.C. y Simpsons, T.J. (1992) Structural revision and synthesis of LL-D253 α and related chromanone fungal metabolites, *J. Chem. Soc. Perk. I*, 2271–2284.
- ▣ Charudattan, R. (1990) Pathogens with potential for weed control. En: *Microbes and Microbial Products as Herbicides*. R. E. Hoagland (Editor), ACS Symposium Series, **439**, 132–154.
- ▣ Chollet, R., Vidal, J. y O'Leary, M. H. (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 273–298.
- ▣ Chu, M., Patel, M.G., Gullo, V. P., Truumees, I. y Puar, M.S. (1992). Sch 47918: A novel PAF antagonist from the fungus *Phoma* sp., *J. Org. Chem.*, **57**, 5817–5818.
- ▣ Chu, M., Truumees, I., Gunnarson, I., Bishop, W. R. Kreutner, W., Horan, A. C. y Patel, M. G. (1993). A novel class of platelet activating factor antagonists from *Phoma* sp., *J. Antibiot.*, **46**, 554–563.
- ▣ Clericuzio, M., Toma, L. y Vidari, G. (1999) Fungal metabolites, 44. Isolation of a new caryophyllane ester from *Lactarius subumbonatus* conformational analysis and absolute configuration, *Eur. J. Org. Chem.*, 2059–2065.

- Closse, A., Mauli, R. y Sigg, H.P. (1966) Die konstitution von epoxydon, *Helv. Chim. Acta*, **49**, 204–213.
- Coccuchi, M. y Negrini, N. (1988) Changes in the levels of calmodulin and of clamodulin inhibitor in the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination, *Plant Physiol.*, **88**, 910-914.
- Cowley, P., Fischer, H. y Devonshire, A. (1998) Feed the world, *Chem. Brit.*, 25–28.
- Cramer, H. M. (2000) Crop Protection. En: Agrochemicals. Composition, Production, Toxicology and Applications. F. Müller (Editor), Wiley–VCH, Federal Republic of Germany, 288–317.
- Creutz, C. y Taube, H. (1969) A method for detemining the chiralities of optically active glycols, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3989–3991.
- Cutler. H. G. (1988) Natural Products and their potential in agriculture. En: Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture. Cutler. H. G. (Editor), ACS Symposium Series, **380**, 1–22.
- Dadwal, V. S. (1991) Unrecorded diseases of *Grevillea pteridifolia*, *Journal of Tropical Forestry*, **7**, 248–249.
- Dale, J. (1973a) Exploratory calculations of medium and large rings. Part 1. Conformational minima of cycloalkanes, *Acta Chem. Scand.*, **27**, 1115–1129.

- ▣ Dale, J. (1973b) Exploratory calculations of medium and large rings. Part 2. Conformational interconversions in cycloalkanes, *Acta Chem. Scand.*, **27**, 1130–1148.
- ▣ Dale, J. (1973c) Exploratory calculations of medium and large rings. Part 3. Mono- and Bis(*gem*-dimethyl)cycloalkanes, *Acta Chem. Scand.*, **27**, 1149–1158.
- ▣ Dayan, F. E., Romagni, J. G. y Duke, S. O. (2000) Investigating the mode of action of natural phytotoxins, *J. Chem. Ecol.*, **26**, 2079–2094.
- ▣ Devys, M., Ferezou, J. P., Topgi, R. S., Barbier, M., Bousquet, J. F. y Kollmann, A. (1984) Structure and biosynthesis of phomanoic acid, an antifungal compound isolated from *Phoma lingam* Tode, *J. Chem. Soc. Perk. I*, 2133–2137.
- ▣ Devys, M., Topgi, S. R., Férézou, J., Quaino, L., Bousquet, J. F., Kollmann, A. y Barbier, M. (1986) Phomanolactone, an antifungal substance from *Phoma lingam*, *Phytochemistry*, **25**, 531–532.
- ▣ Dieter, P. (1984) Calmodulin and calmodulin-mediated process in plants, *Plant Cell and Environment*, **7**, 371–380.
- ▣ Domsch, K. H., Grams, W. y Anderson, T. H. (1980) Compendium of soil fungi, vol 2, Academic Press, New York, 630–643.
- ▣ Dräger, G., Kirschning, A., Thiericke, R. y Zerlin, M. (1996) Decanolides, 10-membered lactones of natural origin, *Nat. Prod. Rep.*, **13**, 365–375.

- ▢ Duke, O. S. y Abbas, H.K. (1995) Natural products with potential use as herbicides, ACS Symposium Series, **582**, 348–362.
- ▢ Duke, O.S. y Lydon, J. (1993) Natural phytotoxins as herbicides. En: Pest control with enhanced environmental safety. ACS Symposium Series, **524**, 110–124.
- ▢ Duke, S. O, y Lydon, J. (1987) Herbicides from natural compounds, *Weed Technol.*, **1**, 122–128.
- ▢ Dunn, A.W., Entwistle, Y. D., y Johnstone, R.A.W. (1975) Terrein and others metabolites of *Phoma* species, *Phytochemistry*, **14**, 2081–2082.
- ▢ Einhelling, F. A. (1985) Allelopathy: A natural protection allelochemicals. En: CRC Handbook of Natural Pesticides: Methods Volume 1 Theory, Practice and Detection. Mandava, B. (Editor), CRC Press, USA, 174–200.
- ▢ Einhelling, F.A. (1995a) Allelopathy: Current status and future goals. En: Allelopathy organisms, Process and Applications. K. Indrejit, M. Dakshini y F. A. Einhelling (Editores), ACS Symposium Series, **582**, 1–24.
- ▢ Einhelling, F.A. (1995b) Mechanisms of action of allelochemicals in allelopathy. En: Allelopathy organisms, Process and Applications. K. Indrejit, M. Dakshini y F. A. Einhelling (Editores), ACS Symposium Series, **582**, 96–116.
- ▢ Evans, D. (1998) Agrochemicals– benefits and risks, *Chem. Brit.*, **2**, 20–23.

- Evidente, A. (1987) Cavoxinine, a minor metabolite from *Phoma cava* and cavoxinone, its corresponded chroman-4-one, *J. Nat. Prod.*, **50**, 173–177.
- Evidente, A. y Motta, A. (2001) Phytotoxins from fungi, pathogenic for agrarian, forestal and weedy plants. En: *Bioactive Compounds from Natural Sources*. C Tringalli (Editor), Taylor and Francis, England, 475–525.
- Evidente, A., Capasso, R., Abouzeid, M. A., Lanzetta, R., Vurro, M. y Bottalico, A. (1993) Three new pinolidoxins from *Ascochyta pinodes*, *J. Nat. Prod.*, **56**, 1937–1943.
- Evidente, A., Capasso, R., Andolfi, A., Vurro, M. y Zonno, M. C. (1998) Putaminoxins D and E from *Phoma putaminum*, *Phytochemistry*, **48**, 941–945.
- Evidente, A., Lanzetta, R., Capasso, R., Andolfi, A., Vurro, M. y Zonno, M. C. (1997) Putaminoxins B and C from *Phoma putaminum*, *Phytochemistry*, **44**, 1041–1045.
- Evidente, A., Lanzetta, R., Capasso, R., Andolfi, A., Vurro, M. y Zonno, M. C. (1995) Putaminoxin, a phytotoxic nonenolide from *Phoma putaminum*, *Phytochemistry*, **40**, 1637–1641.
- Evidente, A., Lanzetta, R., Capasso, R., Vurro, M. y Bottalico, A. (1992) Cytochalasins U and V, two new cytochalasans, from *Phoma exigua* var *heteromorpha*, *Tetrahedron*, **48**, 6317–6324.

- ▣ Evidente, A., Lanzetta, R., Capasso, R., Vurro, M. y Bottalico, A. (1993) Pinolidoxin, a phytotoxic nonenolide from *Ascochyta pinodes*, *Phytochemistry*, **34**, 999–1003.
- ▣ Evidente, A., Randazzo, G., Iacobellis, N.S. y Bottalico, A. (1985) Structure of cavoxin, a new phytotoxin from *Phoma cava* and cavoxone, its related chroman-4-one, *J. Nat. Prod.*, **48**, 916–923.
- ▣ Ferezou, J. P., Quesneau-Thierry, A. y Barbier, M. (1980) Structure and synthesis of phomalide, a new piperazine-2,5-dione related to the sidoresmins, isolated from the culture medium of *Phoma lingam* Tode, *J. Chem. Soc. Perk. I*, 113–115.
- ▣ Fisher, P. J. y Petrini, O. (1992) Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.), *New Phytologist*, **120**, 137–143.
- ▣ García-Aguirre, G. y Flores-Martínez, R. (1991) Análisis micológico de granos de sorgo dulce, *Rev. Mex. Mic.*, **7**, 129–138.
- ▣ Gbodi, T. A., Nwude, N., Aliu, Y. O. e Ikediobi, C. O. (1986) The mycoflora and some mycotoxins found in acha (*Digitaria exilis* Stapf) in Plateau State Nigeria, *Food and Chemical Toxicology*, **24**, 339–342.
- ▣ Geriach, K., Quitschalle, M. y Kalesse M. (1999) Synthesis of the northern hemisphere of epothilone A by a ten-membered ring closing metathesis reaction, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 3553–3556.

- ▣ González, H. H. L., Martínez, E. J. y Resnik, S. L. (1997) Fungi associated with sorghum grain from Argentina, *Mycopathologia*, **1**, 35–41.
- ▣ Gupta, V. P., Sharma, D. D. y Chandrashekar, D. S. (1999) Soil solarization for the control of nursery diseases in mulberry, *Indian Journal of Sericulture*, **38**, 44–47.
- ▣ Haasnoot, C. A. G., De Leeuw, F. A. A. M. y Altona, C. (1980) The relationship between proton–proton NMR coupling constants and substituent electronegativities–I. An empirical generalization of the Karplus equation. *Tetrahedron*, **36**, 2783–2792.
- ▣ Harada, N. y Nakanishi, K. (1972) The exciton chirality method and its application to configurational and conformational studies of natural products, *Accounts Chem. Res.*, **8**, 257–263.
- ▣ Haraguchi, H., Abo, T., Fukuda, S., Okamura, N. y Yagi, A. (1996) Mode of action of altersolanols, *Phytochemistry*, **43**, 989–992.
- ▣ Haraguchi, H., Abo, T., Hashimoto, K. y Yagi, A., (1992) Action–mode of antimicrobial altersolanol A in *Pseudomonas aeruginosa*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1221–1224.
- ▣ Heap, I. M. (1997) The occurrence of herbicide–resistant weeds worldwide, *Pestic. Sci.*, **51**, 235–243.
- ▣ Hedin, P. A. (1991) Use of natural products in pest control. En: Natural Pest Control Bioregulators. P. A. Hedin (Editor). ACS Symposium Series, **449**, 1–11.

- ▣ Herrera, T. y Ulloa M. (1990) El reino de los hongos. Micología básica y aplicada, FCE-UNAM, 1a. Edición, 51-66 y 203.
- ▣ Hilderbrandt, R. L., Weiser, J. D. y Montgomery, L. K. (1973) The conformations and structures of cyclodecane as determined by electron diffraction and molecular mechanics calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 8598-8605.
- ▣ Hiremath, R. L. (1991) Effect of sorghum seed infection by *Phoma sorghina* on the germination, *Sorghum Newsletter*, **32**, 45.
- ▣ Hoagland, R. E. (1990) Microbes and microbial products as herbicides, an overview. En: *Microbes and Microbial Products as Herbicides*, ACS Symposium Series, **439**, 1-52.
- ▣ Howard, C. C. y Johnstone R. A. W. (1973) Fungal metabolites. Part III. Isolation of a secalonic acids from *Phoma terrestris*, *J. Chem. Soc. Perk. I*, 2440-2444.
- ▣ Howard, C. C. y Johnstone R. A. W. (1973) Isolation of a new secalonic acid, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 464.
- ▣ Ichihara, A., Oikawa, H., Hashimoto, M., Sakamura, S., Haraguchi, T. y Nagano. (1983) A phytotoxin, beteaenone C, and its related metabolites of *Phoma betae* Fr., *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2965-2967.
- ▣ Ichihara, A., Oikawa, H., Hayashi, K. y Sakamura, S. (1983) Structures of betaenones A, B, novel phytotoxins from *Phoma betae* Fr., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 2907-2908.

- ▢ Ichihara, A., Sakamura, S. y Sawamura, S. (1984) Structures of altitoxins A and B, phytotoxins from *Phoma esparagi* Sacc., *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3209–3212.
- ▢ Jayasuriya, H., Ball, R. G., Zink, D. L., Smith, J. L., Goertz, M. A., Jenkins, R. G., Nallin–Omstead, M., Silvermann, K. C., Bills, G. F., Lingham, R. B., Singh, S. B., Pelaez, F. y Cascales, C. (1995) Barcelonic acid A, a new farnesyl–protein transferase inhibitor from a *Phoma* species, *J. Nat. Prod.*, **58**, 986–991.
- ▢ Justum, A. L., Heaney, S. P., Perrin, B. M. y Wege, P. J. (1998) Pesticide resistance: assesment of risk and the development and implementation of effective management strategies, *Pestic. Sci.*, **54**, 435–446.
- ▢ Kakeya, H., Morishita, M., Onozawa Ch., Usami, R., Horikoshi, K., Kimura, K., Yoshihama, M. y Osada, H (1997) RKS–1778, a new mammalian cell–cycle inhibitor and a key intermediate of the [11]cytochalasin group, *J. Nat. Prod.*, **60**, 669–672.
- ▢ Kamamori, T. y Matsumoto, H. (1972) Glutamine synthetase from rice and roots, *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 400–412.
- ▢ Khammees, M. A. F. y Schlosser, E. (1990) Seed–borne fungi on sesame in the Sudan, *Mededeligen van de Facultiet Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*, **55**, 877–887.
- ▢ Khare, D., Atri, D. C. y Shrivastava, C. J. (1995) A new fruit rot disease of chilli, *Indian Phytopathology*, **48**, 111.

- ▣ Krohn, K. Markus, H., Kraemer, H. P. y Frank, W. (1988) *Rac*-altersolanol A and related tetrahydroanthraquinones total synthesis and cytotoxic properties, *Liebigs Ann. Chem.*, 1033–1041.
- ▣ Kumar, P. S. y Kumar, P. R. P. (2000) A new leaf spot disease of *Parthenium hysterophorus* caused by *Phoma sorghina*, *Indian Phytopathol.*, **53**, 115.
- ▣ Lavrik, P. B., Isaac, B. G., Ayer, S. W. y Stonard, R. J. (1996) Herbicidal aminoacids of microbial origin, *Developments in Industrial Microbiology Series Microbial Metabolites*, **32**, 79-91.
- ▣ Lax, A.R. y Shepherd, S.H. (1988) Tentoxin: A cyclic tetrapeptide having potential herbicidal usage, *ACS Symposium Series*, **380**, 24–34.
- ▣ Lazarovits, G., Steele, R. W. y Stoessl, A. (1988) Dimers of altersolanol A from *Alternaria solani*, *Z. Naturforsch.*, **43c**, 813–817.
- ▣ Lee, S. H., Seo, H. Y., Kim, J. C., Heo W. D., Chung, W. S., Lee, J. K., Kim, M. C., Cheong, Y. H., Choi, J. Y., Lim, C. H. y Cho, J. M. (1997) Differential activation of NAD kinase by plant calmodulin isoforms. The critical role of domain I, *The J. Biol. Chem.*, **272**, 9252–9259.
- ▣ Lee, S. H., Seo, H. Y., Kim, J. C., Lee, M. S., Heo W. D., Seo, H. Y., Yoon, H. W., Hong, J. C., Lee, S. Y., Bahk, J. D., Hwang, I. y Cho, M. J. (1995) Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes, *The J. Biol. Chem.*, **270**, 21806–21812.

- ▢ Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H. y Tripton, C. L. (1984) Ophiobolin A. A natural inhibitor of calmodulin, *The J. Biol. Chem.*, **259**, 2742–2747.
- ▢ Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H. y Tripton, C. L. (1985) Role of calmodulin inhibition in the mode of action of ophiobolin A, *Plant Physiol.*, **77**, 303–308.
- ▢ Lightner D. A. y Gurst, J. E. (2000) Exciton coupling and exciton chirality. En: Organic Conformational Analysis and Stereochemistry from Circular Dichroism spectroscopy, Wiley–VCH, New York, 423–456.
- ▢ Lin, Y. Y., Risk, M., Ray, S. M., van–Engen, D., Clardy, J., Golik, J., James, J. C. y Nakanishi, K. (1981) Isolation and structure of brevitoxin B from the “red tide” dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*), *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6673–6675.
- ▢ Ling, V. y Assmann, S. M. (1992) Cellular distribution of calmodulin and calmodulin–binding proteins in *Vicia faba* L., *Plant Physiol.*, **100**, 970–978.
- ▢ Macías, F. (1995) Allelopathy in the serch for natural herbicide models, ACS Symposium Series, **582**, 310–329.
- ▢ Macías, M., Ulloa, M., Gamboa, A. y Mata, R. (2000) Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *Guanomyces polytrix*, *J. Nat. Prod.*, **63**, 757–751.
- ▢ Mäck, G. (1995) Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine-synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of NH_4^+ , *Planta*, **196**, 231–238.

- ▣ Malavolta, V. M. y Bedendo, I. P. (1999) Losses due to rice discoloration caused by *Bipolaris oryzae* and *Phoma sorghina*, in several infection times, *Summa Phytopathologica*, **4**, 324–330.
- ▣ Mattana, M., Bertani, A. y Reggiani, R. (1994) Expression of glutamine synthetase during the anaerobic germination of *Oryza sativa* L., *Planta*, **195**, 147-149.
- ▣ Mayer, M. y Thiericke, R. (1993) Biosynthetic studies on the decarestrictine family, *J. Chem. Soc. Perk. T. I.*, 495–500.
- ▣ McGahren, W.J., Ellestad, G. A., Morton, G.O. y Kunstmann, M.P. (1972) LL-D253 α , β and γ , novel chromanones from the fungus *Phoma pigmentivora*, *J. Org. Chem.*, **37**, 1636–1639.
- ▣ Mohannan, C. y Sharma, J. K. (1988) Diseases of exotic acacias in India, *Journal of Tropical Forestry*, **4**, 357–361.
- ▣ Muhitch, M. J. (1989) Purification and characterization of two forms of glutamine synthetase from the pedicel region of maize (*Zea mays* L.) kernels, *Plant Physiol.*, **91**, 868-875.
- ▣ Mújica-Jiménez, C., Castellanos-Martínez, A. y Muñoz-Clares, R. A. (1998) Studies of the allosteric properties of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase with the phosphoenolpyruvate analog phosphomycin as activator, *Biochim. Biophys. Acta*, **1386**, 132–144.

- ▣ Nakanishi, K., James, J. C., Gloolik, J., Clardy, J., van Engen, D., Ray, S. M., Risk, M. y Lin, Y. Y. (1981) Isolation and structure of brevetoxin B from the "red tide" dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*), *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 6773-6775.
- ▣ Nakanishi, K., Kuroyanagi, M., Nambu, H., Oltz, E. M., Takeda, R., Verdine, G. y Zask, A. (1984) Recent applications of circular dichroism to structural problems, specially oligosaccharide structures, *Pure Appl. Chem.*, **56**, 1031-1048.
- ▣ Nukina, M., Sassa, T. e Ikeda, M. (1980) A new fungal morphogenic substance, pyrenolide A from *Pyrenophora teres*, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 301-302.
- ▣ Nukina, M., Ikeda, M. y Sassa, T (1980) A new fungal morphogenic substance, pyrenolide A from *Pyrenophora teres*, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2671-2672.
- ▣ Oh, S. H., Steiner, H. Y., Dougall, D. K. y Roberts, D. M. (1992) Modulation of calmodulin levels, calmodulin methylation and calmodulin bindings proteins during carrot cell growth and embriogenesis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 28-34.
- ▣ Ohnishi, K., Tanabe, H., Hayashi, S. y Suemitsu, R. (1992) Biosynthesis of alterporriol-A by *Alternaria porri*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 42-43.
- ▣ Ohnishi, K., Tanabe, Suemitsu, R., Kubota, M., Matano, H. y Yamada, Y. (1991) Biosynthesis of alterporriol D y E by *Alternaria porri*, *Phytochemistry*, **30**, 2593-2595.

- ▣ Oikawa, H., Ohashi, S., Ichihara, A. y Sakamura, S. (1999) Biosynthesis of diterpenoid aphidicolin: Isolation of intermediates from P-450 inhibitor treated mycelia of *Phoma betae*, *Tetrahedron*, **55**, 7541–7554.
- ▣ Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K. Y Yagi, A. (1993) Altersolanol-related antimicrobial compounds from a strain of *Alternaria solani*, *Phytochemistry*, **34**, 1005–1009.
- ▣ Okamura, N., Mimura, K., Haraguchi, H., Shingu, K., Miyahara, K. y Yagi, A. (1996) Altersolanol-related compounds from the culture liquid of *Alternaria solani*, *Phytochemistry*, **42**, 77–80.
- ▣ Okamura, N., Yagi, A., Haraguchi, H. y Hashimoto, K. (1993) Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of altersolanol A, B, C, D, E and F, *J. Chromatogr.*, **630**, 418–422.
- ▣ Olembo, T. W. (1972) *Phoma herbarum* Westend: Pathogen of *Acacia mearnsii* de Wild. in Kenya, *East African Agricultural and Forestry Journal*, **38**, 201–206.
- ▣ Parisi, A., Piattelli, M., Tringalli, C. y Di San Lio G. N. (1993) Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*, *Phytochemistry*, **32**, 865–867.
- ▣ Pedras, M. S. C. y Séguin-Swartz, G. (1990) Rapid high-performance liquid chromatographic analysis of phytotoxins from *Phoma lingam*, *J. Chromatogr.*, **519**, 383–386.

- ▣ Pedras, M. S. C., Abrems, S. R., Séguin–Swartz, G., Wilson–Quail, J. y Jia, Z. (1989) Phomalizarine, a novel toxin from the phytophogenic fungi *Phoma lingam*, *J. Am. Chem Soc.*, **111**, 1094–1095.

- ▣ Pedras, M. S. C., Erosa–López, C. C., Quail, J. W. y Taylor, J. L. (1999) Phomalairdenone: A new host–selective phytotoxin from a virulent type of the blackleg fungus *Phoma lingam*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 3291–3294.

- ▣ Pedras, M. S. C., Morales, V. M. y Taylor, J. L. (1993) Phomaligols and phomaligadiones: new metabolites from the blackleg fungus, *Tetrahedron*, **49**, 8317–8322.

- ▣ Pedras, M. S. C., Séguin–Swartz, G. y Abrams, S.R. (1990) Minor phytotoxins from the blackleg fungus *Phoma lingam*, *Phytochemistry*, **29**, 777–782.

- ▣ Pedras, M. S. C., Taylor, J. L. y Morales, V. M. (1995) Phomalagin A and other yellow pigments in *Phoma lingam* and *P. wasabiae*, *Phytochemistry*, **38**, 1215–1222.

- ▣ Pedras, M. S. C., Taylor, J. L. y Nakashima, T. T. (1993) A novel chemical signal from the “blackleg” fungus: beyond phytotoxins and phytoalexins, *J. Org. Chem.*, **58**, 4778–4780.

- ▣ Pérez–Reyes, M. C. J. (1997) Microbiota en granos de sorgo: incidencia natural de alternarios. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, 1–39.

- Peña-Valdivia, C. B., Rodríguez-Flores, I., Tuena de Gómez-Poyou, M y Lotina-Hennsen, B. (1991) Inhibition of photophosphorilation and electrón transport by N,N-dimethylformamide, *Biophysic Chemical*, **41**, 169-174.
- Pilli, R. A. y Victor, M. M. (1998) Total synthesis of (-)-decarescricnine D through a stereoselective intramolecular Nozaki-Hiyama-Kishi Reaction, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4421-4424.
- Prakash, O. y Raoof, M. A. (1985) New records of fungi on leaves and twigs of mango (*Mangifera indica*), *Indian Journal of Plant Pathology*, **3**, 243-244.
- Putnam, A. R. (1988) Allelochemicals from plants as herbicides, *Weed Technol.*, **2**, 510-518.
- Rabie, C. J. y Lubben, A. (1984) The mycoflora of sorghum malt, *South African Journal of Botany*, **4**, 251-255.
- Rabie, C. J., Lubben, A., Marais, G. J. y Vuuren, H. J. van (1997) Enumeration of fungi in barley, *International Journal of Food Microbiology*, **35**, 117-127.
- Rahim, A. M. A. y Tawfig, S. (1984) Pathogenicity of fungi and bacteria from the Sudan water hyacinth, *Weed Res.*, **24**, 233-238.
- Rao, P. B. y Mallaiah, K. V. (1988) Effect of phylloplane fungi on the leaf spot pathogen *Cercospora canescens*, *Indian Journal of Microbiology*, **28**, 103-107.

- ▣ Rekha, R., Tribhuwan, S. y Dalbir, S. (1990) Occurrence, detection and pathological effect of *Phoma sorghina* on sorghum seeds in Rajasthan, *Acta Botanica Indica*, **18**, 266–269.

- ▣ Rhodes, D. J. (1993) Formulation of biological control agents. En: Exploitation of Microorganisms D.G. Jones (Editor), Chapman & Hall, London, 1–17.

- ▣ Riche, C., Pascard–Billy, C., Devys, M., Gaudmer, A., Barbier, M. y Bousquet, J. F. (1974) Structure cristalline et moleculaire de la phomenone, phytotoxine produite par le champignon *Phoma exigua* var *non oxydabilis*, *Tetrahedron Lett.*, **52**, 2765–2766.

- ▣ Roberts, D. y Harmon, A. (1992) Calcium modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, **43**, 375-314.

- ▣ Roberts, D., Lukas, T. J., y Watterson, D. M. (1986) Structure, function and mechanism of action of calmodulin, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, **4**, 311-339.

- ▣ Sakamoto, A., Takeba, G. y Tanaka, K. (1990) Synthesis de novo of glutamine synthetase in the embryonic axis, closely related to the germination of lettuce seeds, *Plant Cell Physiol.*, **31**, 677-682.

- ▣ Sakamura S., Ichihara, A., y Yoshihara, T. (1988) Toxins of phytopathogenic microorganisms, En: Biologically Active Natural Products. Cutler, H. G. (Editor). ACS Symposium Series, **380**, 57–63.

- ▢ Schlede, U., Nazaré, M. y Waldmann, A. (1998) Efficient enantioselective synthesis of β -hydroxyepoxide building block for the construction of the natural products, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 1143–1144.
- ▢ Séquin-Frey, M. y Tamm, Ch. (1971) Gentisinacetal und chlorgentisinalkohol, zwei neue metabolite einer *Phoma* species, *Helv. Chim. Acta*, **54**, 851–861.
- ▢ Shepard, G.S., Thiel, P. G. y Sydenham, W. E. (1991) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of tenuazonic acid and related tetramic acids, *J. Chromatogr.*, **566**, 195–205.
- ▢ Silverstein, R. M., Clayton, B. G. y Morrill, C. T. (1991) Spectrometric Identification of Organic Compounds, John Wiley & Sons, New York.
- ▢ Simpson, T.J., Dillon, P.M. y Donovan, T.M. (1991) Synthetic and mecanistic studies on fungal metabolic phathways: a guide to fungicide design, *Pestic. Sci.*, **31**, 539–554.
- ▢ Singh, D. P. y Agarwal, V. K. (1989) Effect of different degrees of grain mold infection on yield and quality of sorghum seed, *Indian Journal of Plant Pathology*, **7**, 103–108.
- ▢ Singh, D. P., Agarwal, V. K. y Khetarpal, R. K. (1989) Etiology and host-pathogen relationship of grain mould of sorghum, *Indian Phytopathology*, **41**, 389–397.
- ▢ Snedden, W. A. y Fromm Hillel (1998) Calmodulin and calmodulin-related proteins and plant responses to the environment, *Trends Plant Sci.*, **3**, 299–304.

- ▣ Soga, O., Iwamoto, H., Takuwa, A., Nozaki, H., Kuramoto, J. y Nakayama, M. (1987) The revised structure of wasabidienone-A from potato culture of *Phoma wasabiae* Yokogi, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 283–284.
- ▣ Stahl, E. (1969) Thin layer chromatography, Academic Press Inc., par 487.
- ▣ Stamatakis, K., Gavalas, N. A. y Manetas, Y. (1988) Organic cosolutes increase the catalytic efficiency of phosphoenolpyruvate carboxylase, from *Cynodon dactylon* (L.) Pers., apparently through self-association of the enzymic protein, *Aust. J. Plant Physiol.*, **15**, 621-631.
- ▣ Stamatakis, K., Gavalos, N. A. y Manetas, Y. (1988) Organic cosolutes increases the catalytic efficiency of phosphoenolpyruvate carboxylase, from *Cynodon dactylon* (L.) Pers., apparently through self-association of enzymic protein, *Aust. J. Plant. Physiol*, **15**, 621–631.
- ▣ Stoessl, A. (1969) Relative stereochemistry of altersolanol A, *Can. J. Chem.*, **47**, 777–784
- ▣ Stoessl, A. (1969) Some metabolites of *Alternaria solani*, *Can. J. Chem.*, **47**, 767–776.
- ▣ Stoessl, A. y Stothers, J. B. (1983) Tetrahydroaltersolanol B, a hexahydroanthronol from *Alternaria solani*, *Can. J. Chem.*, **61**, 378–382.

- Stoessl, A., Unwin, C. H. y Stothers, J. B. (1979) Metabolites of *Alternaria solani* part V. Biosynthesis of altersolanol A and incorporation of altersolanol A-¹³C_x into altersolanol B and macrosporin, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2481–2484.
- Stoessl, A., Unwin, C. H. y Stothers, J. B. (1983) On the biosynthesis of some polyketide metabolites in *Alternaria solani* ¹³C and ²Hmr studies, *Can. J. Chemistry*, **61**, 372–377.
- Strobel, G., Kenfield, D., Bunkers, G., Sugawara, F. y Clardy, J. (1991) Phytotoxins from fungi attacking weedy plants. En: Handbook of Natural Toxins Volume 6, Toxicology of Plant and Fungal Compounds. R. Keeler y A. T. Tu, Marcel Dekker, New York.
- Strobel, G., Sugawara, F. y Clardy, J. (1987) Phytotoxins from plant pathogens of weedy plants, En: Allelochemicals: Role in agriculture and forestry. Waller, G. R. (Editor), ACS Symposium Series, **330**, 517–523.
- Suemitsu, R., Horiuchi, K., Kubota, M. y Okamatsu, T. (1990) Production of alterporriols, altersolanols and macrosporin by *Alternaria porri* and *Alternaria solani*, *Phytochemistry*, **29**, 1509–1511.
- Suemitsu, R., Horiuchi, K., Ohnishi, K. y Kubota, M. (1990) High performance liquid chromatographic determination of alterporriol D and E in fermentation of *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri, *J. Chromatogr.*, **503**, 282–287.

- ▣ Suemitsu, R., Horiuchi, K., Ohnishi, K. y Yanagawase, S. (1988) High performance liquid chromatographic determination of macrosporin, altersolanol A, alterporriol A, B and C in fermentation of *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri, *J. Chromatogr.*, **454**, 406–410.
- ▣ Suemitsu, R., Sakurai, Y., Nakachi, K., Miyoshi, I. y Ohnishi, K. (1989) Alterporriol D and E, modified bianthraquinones from *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1301–1304.
- ▣ Sugano, M., Sato, A., Iijima, Y., Furuya, K., Haruyama, H., Yoda, K y Hata, T. (1994) Phomactins, novel PAF antagonists from marine fungus *Phoma* sp., *J. Org. Chem.*, **59**, 564–569.
- ▣ Sugano, M., Sato, A., Iijima, Y., Furuya, K., Kuwano, H. y Hata, T. (1991) Phomactin E, F y G: New phomactin–group PAF antagonists from marine fungus *Phoma* sp., *J. Antibiot.*, **48**, 1188–1190.
- ▣ Sugano, M., Sato, A., Iijima, Y., Oshima, T., Kouhei, F., Haruyama, H., Kuwano, H., Hata, T. y Hanzawa, H. (1991) Phomactin A, a novel PAF antagonists from marine fungus *Phoma* sp., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5463–5464.
- ▣ Sugha, S. K. y Singh, B. M. (1987) Factors affecting spore germination and germ tube elongation of glume blight pathogen of rice, *Oryza*, **4**, 393–395.
- ▣ Sutton, B. C. (1980) The coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata, Commonwealth Micological Institute, Great Britain, 391.

- ▣ Takanishi, C., Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Udagawa, S., Kurata, H., Enomoto, M., Ohtsubo, K., Umeda, M. y Saito, M. (1973) Some observations on the metabolites of *Phoma* species, *Chem. Bull. Pharm.*, **21**, 2286–2291.

- ▣ Takeda, R., Zask, A. y Nakanishi, K. (1987) Additivity in split Cotton Effect amplitudes of *p*-phenylbenzyl ethers and *p*-phenylbenzoates, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 914–915.

- ▣ Tarp, G. L. y Kongsdal, O. (1987) Seed-borne pathogens of major food crops in Mozambique, *Seed Science and Technology*, **15**, 793–810.

- ▣ TeBeest, D. O. (1993) Biological control of weeds with fungal plant pathogens. En: *Exploitation of Microorganisms* D.G. Jones (Editor), Chapman & Hall, London, 1–17.

- ▣ Trujillo, E.E. (1994) *Frontiers in Industrial Mycology*, Chapman–Hall, New York, pag. 196–209.

- ▣ Ueno, T., Miyagawa, H., Yamaguchi, H., Okada, M. e Irie H. (1997) A new biorational approach to the development of herbicides from fungal metabolites. En: *Phytochemicals for pest control*. K. Indrejit, M. Dakshini y F. A. Einhelling (Editores), ACS Symposium Series, **582**, 239–248.

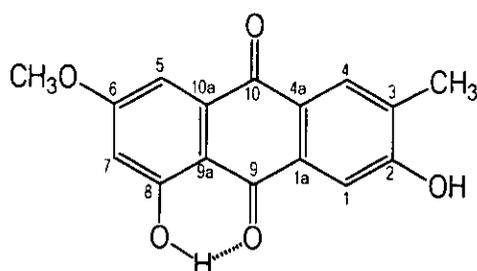
- ▣ Venkatasubbaiah, P. y Chilton, W.S. (1992) An epoxydon derived ester from *Phoma* sp. pathogenic to rhubarb, *J. Nat. Prod.*, **55**, 639–643.

- Vézina, L. P. y Margolis, H. A. (1990) Purification and properties of glutamine synthetase in leaves and roots of *Pinus banksiana* Lamb, *Plant Physiol.*, **94**, 657-664.
- Vincent, R., Fraasier, V., Chaillou, S., Limami, A., Deleens, E., Phillipson, B., Douat, C., Boutin J. P. y Hirel, B. (1997) Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development, *Planta*, **201**, 424-433.
- Wada, K e Ishida, T. (1979) A steroid hydroxylase inhibitor, diplodialide-A, and related metabolites from *Diplodia pinea*, *J. Chem. Soc. Perk. T. I.*, 1154-1158.
- Wallbridge, A. (1981) Fungi associated with crown-rot disease of boxed bananas from the Windward Islands during a two-year survey, *Transactions of the British Mycological Society*, **77**, 567-577.
- Warrior, P. (2000) Living systems as natural crop-protection agents, *Pest. Manag. Sci.*, **56**, 681-687.
- Wheeler M. M., Wheeler M. S. D. y Peterson, G. W. (1975) Anthraquinone pigments from the phytopathogen *Phomopsis juniperovora* Hahn, *Phytochemistry*, **14**, 288-289.
- Wu, W. S. (1994) A survey of rice seedborne fungi un Taiwan, *Plant Disease*, **78**, 316.

- ▣ Yagi, A., Okamura, N., Haraguchi, H., Abo, T. y Hashimoto, K. (1993) Antimicrobial tetrahydroanthraquinones from a strain of *Alternaria solani*, *Phytochemistry*, **33**, 87–91.
- ▣ Yang, X., Strobel, G., Stierle, A., Hess, W.M., Lee, J. y Clardy, J. (1994) A fungal endophyte–tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*, *Plant Sci.*, **102**, 1–9.
- ▣ Zhang, C., Peng, S., Peng, X., Chavez, A. Q. y Bennett, J. (1997) Response of glutamine synthetase isoforms to nitrogen sources in rice (*Oryza sativa* L.) roots, *Plant Sci.*, **125**, 163–170.
- ▣ Zielinsky, R. E. (1998) Calmodulin and calmodulin–binding protein in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 697–725.

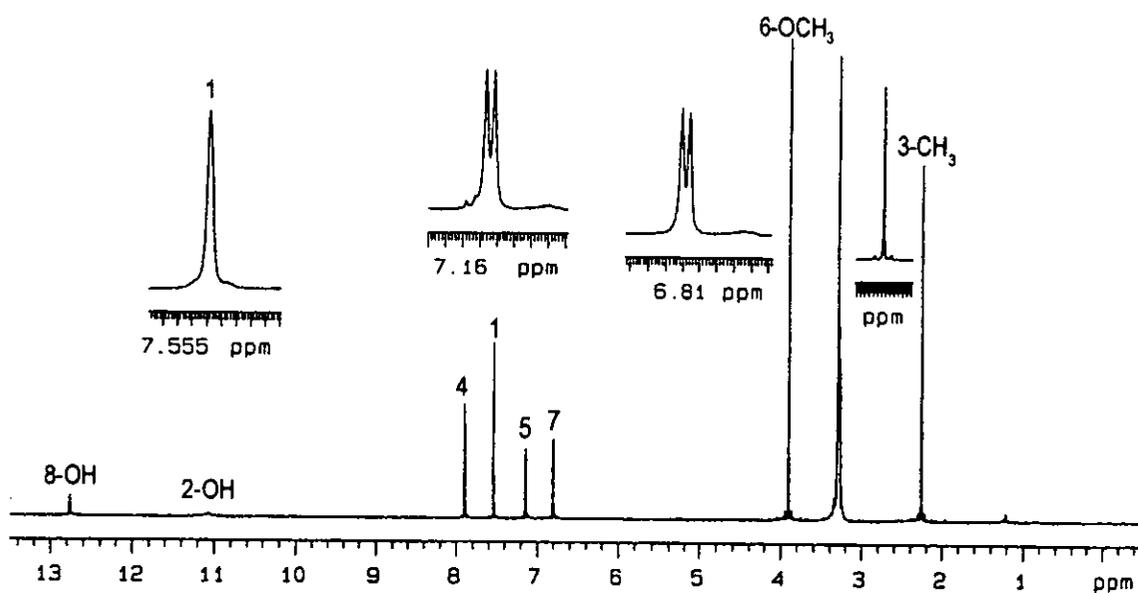
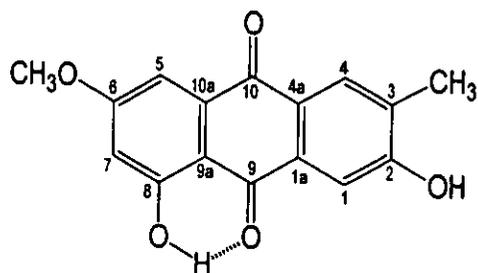
ANEXO I

Cuadro 33. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la macrosporina (194).

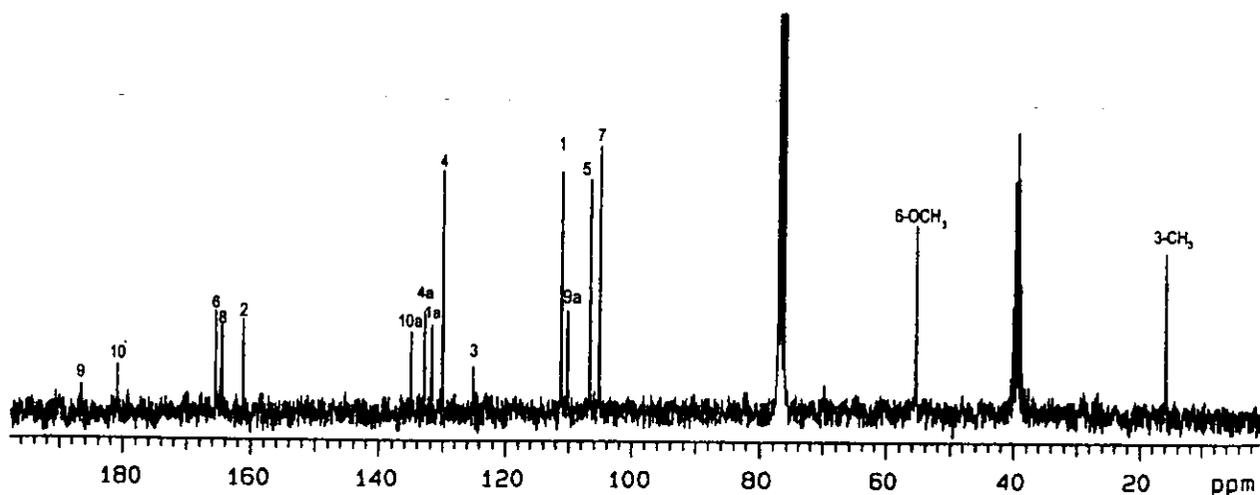


macrosporina (194)

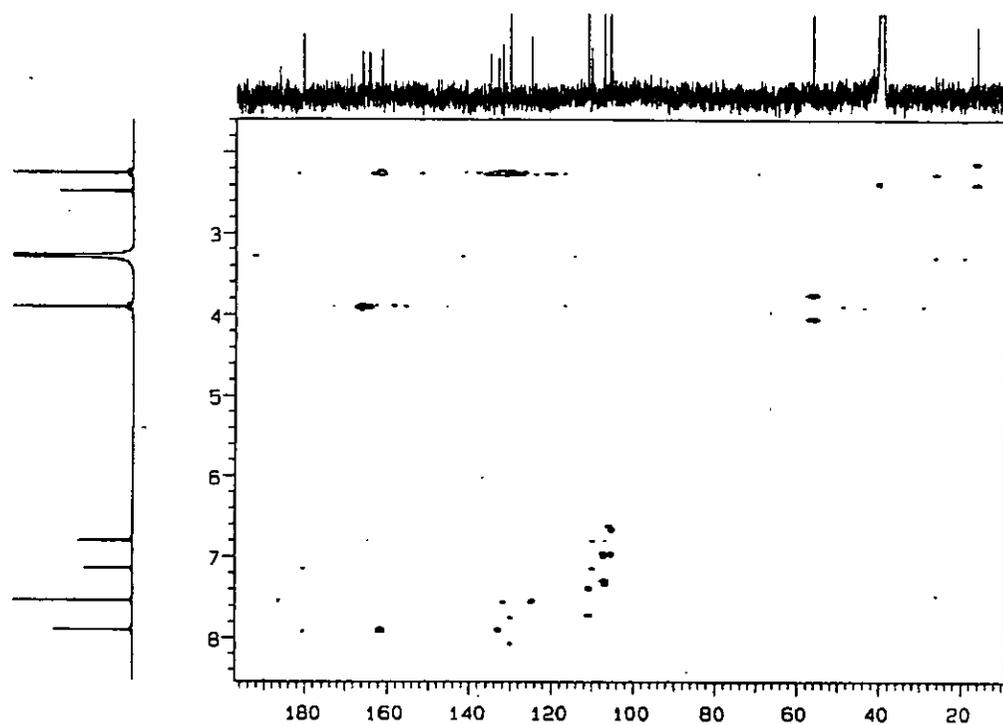
| | |
|---|--|
| p.f. = | 303–305°C |
| P.M. = | 284 uma EM-IE m/z 284 [M] ⁻ |
| F.M. = | C ₁₆ H ₁₂ O ₅ Calculada por EM de alta resolución, modalidad EM-IE 284.0691 m/z (teórico 284.0684) para M ⁻ . |
| IR = | 3298, 1656, 1637, 1573, 1446, 1393, 1320 y 973. |
| RMN ¹ H [DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz. (<i>J</i> en Hz)] | δ 12.8 (s, 8-OH), 11.1 (s, 2-OH), 7.91(d, <i>J</i> = 0.6, H-4), 7.54 (sa, H-1), 7.10 (d, <i>J</i> = 3.0, H-5), 6.81 (d, <i>J</i> = 3.0, H-7), 3.91 (s, 6-OCH ₃), 2.23 (s, 3-CH ₃) |
| RMN ¹³ C (125 MHz), δ en ppm. | δ 187.9 (C-9), 182.2 (C-10), 165.7 (C-6), 164.5 (C-8), 161.3 (C-2), 135.2 (C-10a), 131.9 (C-4a), 130.9 (C-1a), 130.1 (C-4), 125.2 (C-3), 111.3 (C-1), 110.4 (C-9a), 106.9 (C-5), 105.4 (C-7), 55.53 (6-OCH ₃), 16.0 (3-CH ₃) |
| EM-IE | m/z (int. rel.): 284 [M] ⁻ (100), 255 (15), 254 (14), 226 (10), 213 (8), 128 (10). |



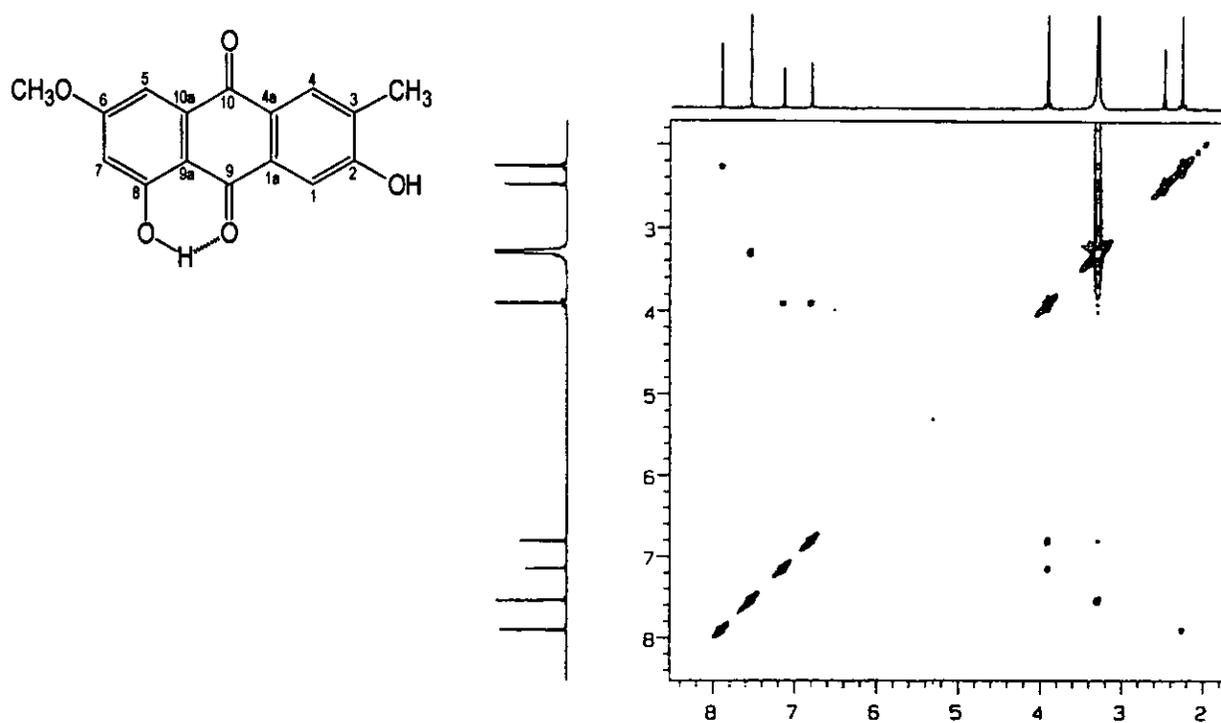
Espectro 22. Espectro de RMN ^1H de la macrosporina (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (194).



Espectro 23. Espectro de RMN ^{13}C de la macrosporina (125 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-DMSO}-d_6$) (194).

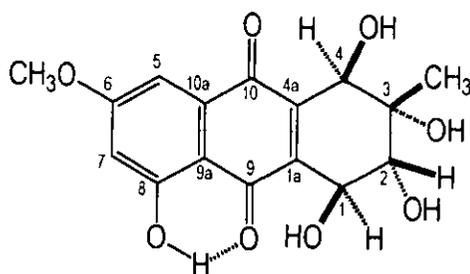


Espectro 24. Espectro bidimensional HMBC de la macrosporina (194).



Espectro 25. Espectro de RMN ^1H bidimensional homonuclear NOESY de la macrosporina (194).

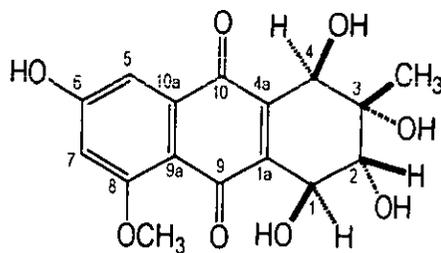
Cuadro 34. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la altersolanol A (137).



altersolanol A (137)

| | |
|---------------------------------------|--|
| p.f. | 218–220°C (descomposición) |
| P.M. | 336 uma EM–IE m/z 336 [M] ⁺ |
| F.M. | Calculada por EM de alta resolución, modalidad EM–IE m/z 336.0852 (teórico 336.0845) para M ⁺ . |
| RMN ¹ H y ¹³ C. | Cuadro 36 |

Cuadro 35. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la altersolanol D (195).



altersolanol D (195)

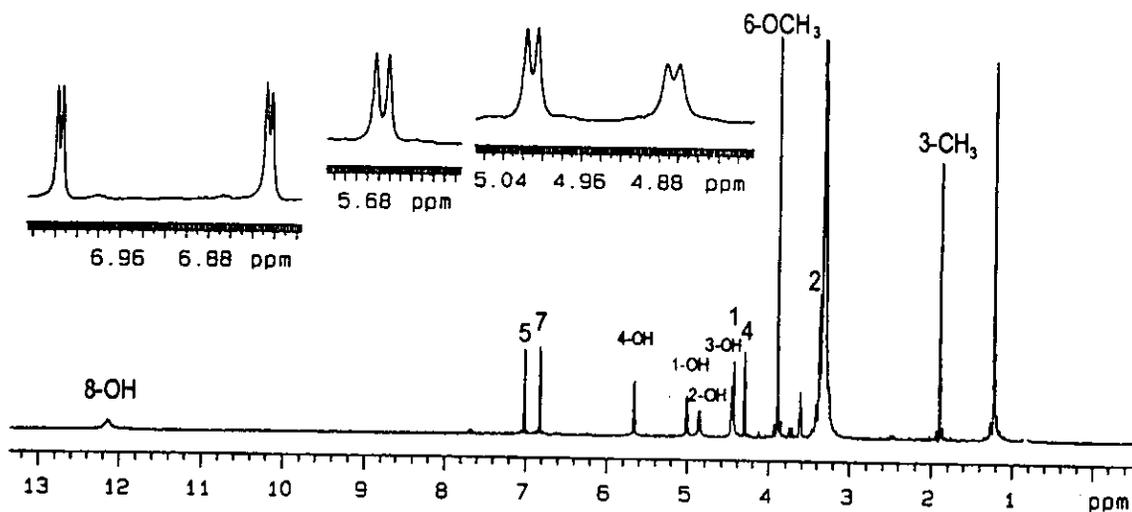
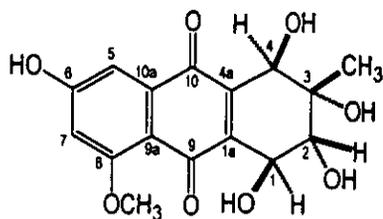
| | |
|---------------------------------------|--|
| p.f. | 246°C |
| P.M. | 336 uma EM–IE m/z 336 [M] ⁺ |
| F.M. | Calculada por EM de alta resolución, modalidad EM–IE m/z 336.0850 (teórico 336.0845) para M ⁺ . |
| RMN ¹ H y ¹³ C. | Cuadro 36 |

Cuadro 36. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del altersolanol A (137) y del altersolanol D (195).

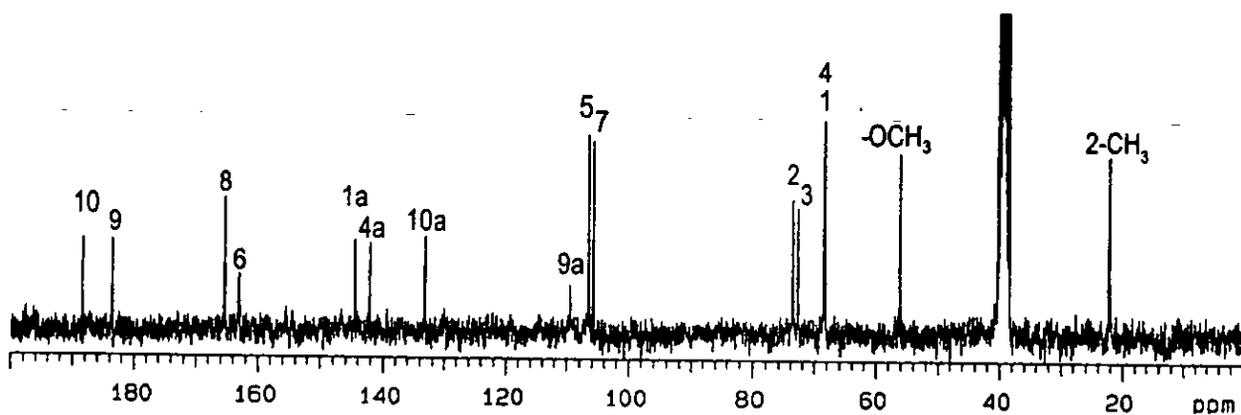
| | Altersolanol A (137) | | Altersolanol D (195) | |
|-----------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 1 | 4.56 m *4.54 (d, $J=7.0$) | 68.5 | 4.42 m | 68.3 |
| 1a | | 144.6 | | 143.3 |
| 2 | 3.64 m *3.64 (d, $J=7.0$) | 73.8 | 3.56 (d, $J=6.5$) | 73.7 |
| 3 | | 72.9 | | 72.84 |
| 4 | 4.38 (d, $J=4.0$) *4.38 s | 68.5 | 4.07 (d, $J=6.5$) | 68.3 |
| 4a | | 142.1 | | 142.8 |
| 5 | 7.02 (d, $J=2.0$) | 107.7 | 6.92 s | 122.4 |
| 6 | | 163.2 | | 163.9 |
| 7 | 6.80 (d, $J=2.0$) | 106.0 | 6.92 s | 103.7 |
| 8 | | 165.5 | | 164.6 |
| 9 | | 183.7 | | 183.7 |
| 9a | | 109.2 | | 109.4 |
| 10 | | 188.5 | | 188.6 |
| 10a | | 133.3 | | 128.8 |
| 6(8)-OCH ₃ | 3.89 s | 56.3 | 3.69 s | 56.8 |
| 8-OH | 12.1 s | | | |
| 4-OH | 5.62 (d, $J=5.8$) | | 5.63 (d, $J=7.0$) | |
| 3-OH | 4.50 s | | 4.83 s | |
| 2-OH | 4.90 (d, $J=6.5$) | | 4.46 (d, $J=6.5$) | |
| 1-OH | 5.00 (d, $J=5.8$) | | 5.05 (d, $J=7.0$) | |
| 3-CH ₃ | 1.24 s | 22.3 | 1.31 s | 22.2 |

DMSO- d_6 , ^1H [500 MHz. (J en Hz)], ^{13}C (125 MHz), δ en ppm.

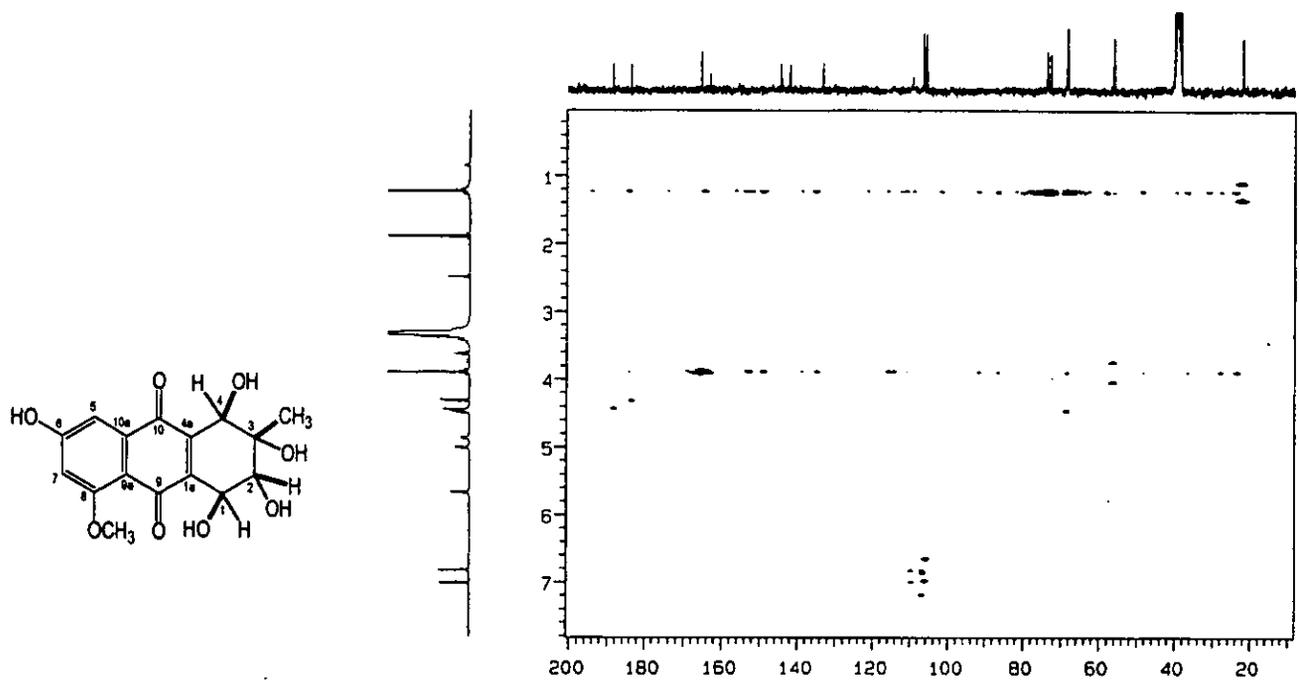
*Intercambio con D₂O



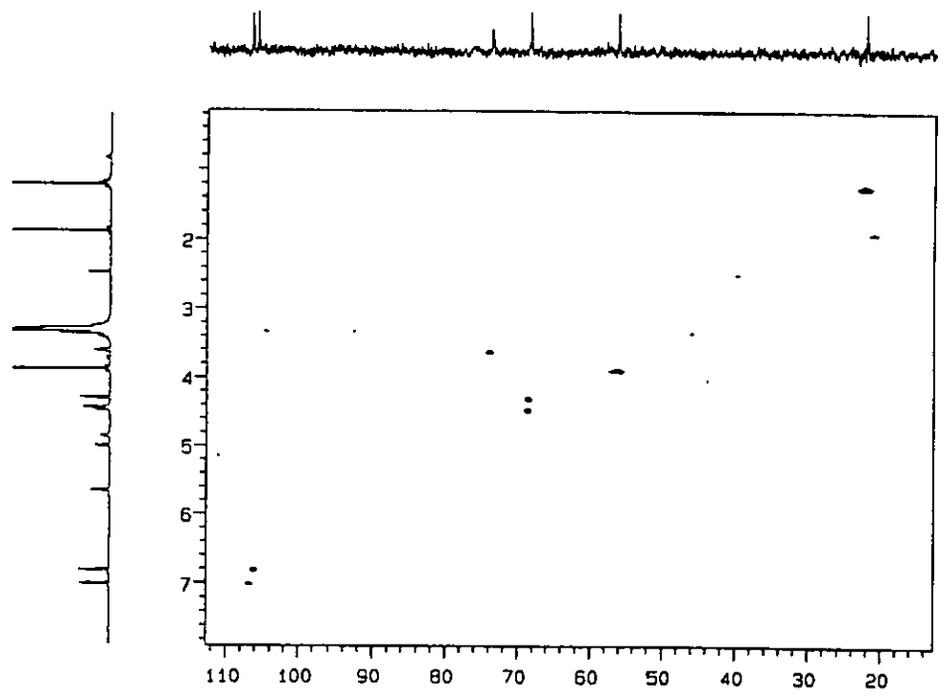
Espectro 26. Espectro de RMN ^1H del altersolanol A (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (137).



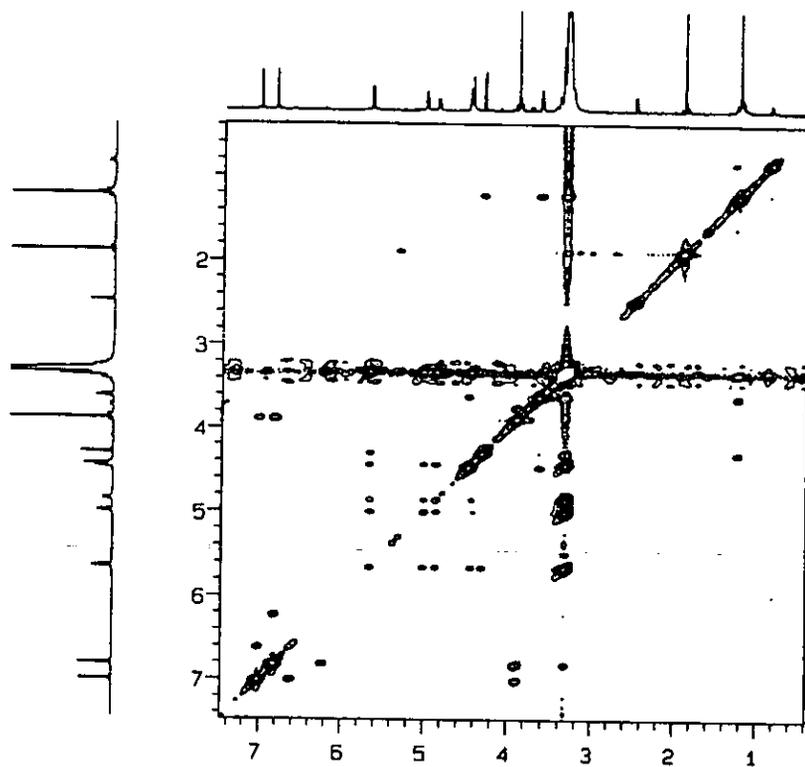
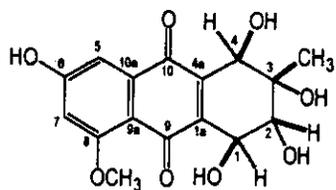
Espectro 27. Espectro de RMN ^{13}C del altersolanol A (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (137).



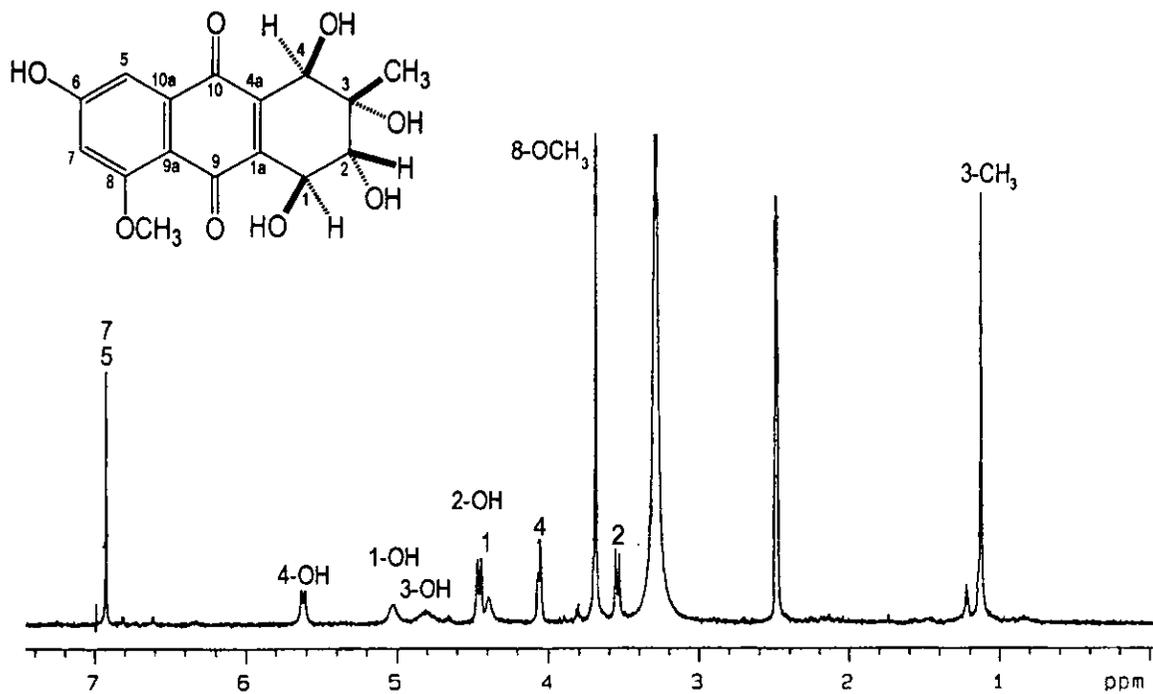
Espectro 28. Espectro bidimensional de HMBC del altersolanol A (137).



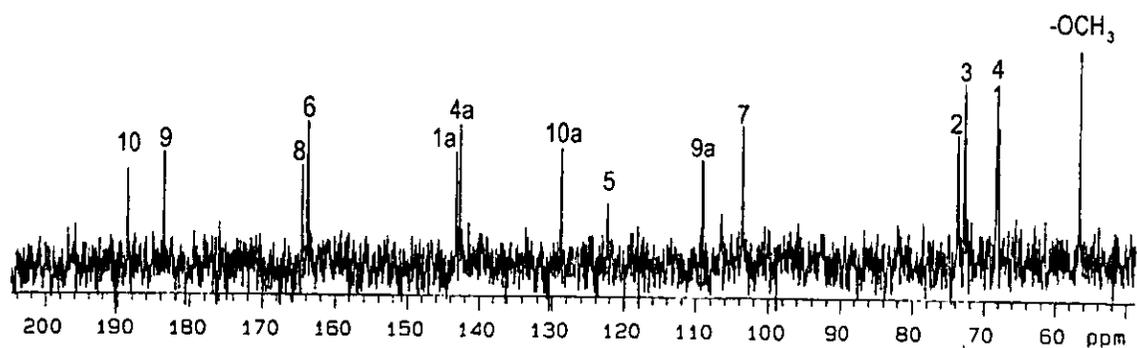
Espectro 29. Espectro de bidimensional de HMQC del altersolanol A (137).



Espectro 30. Espectro de RMN ^1H bidimensional homonuclear NOESY del altersolanol A (137).

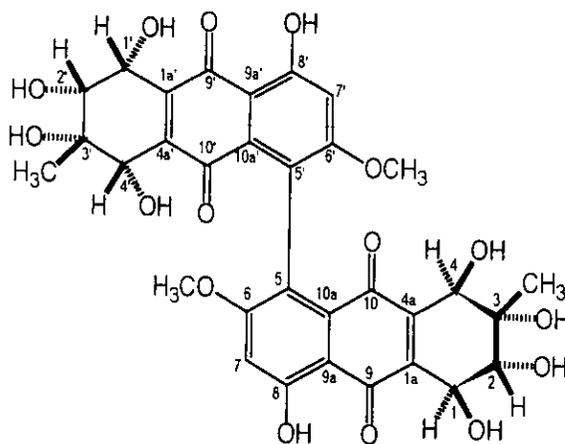


Espectro 31. Espectro de RMN ^1H del altersolanol D (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (195).

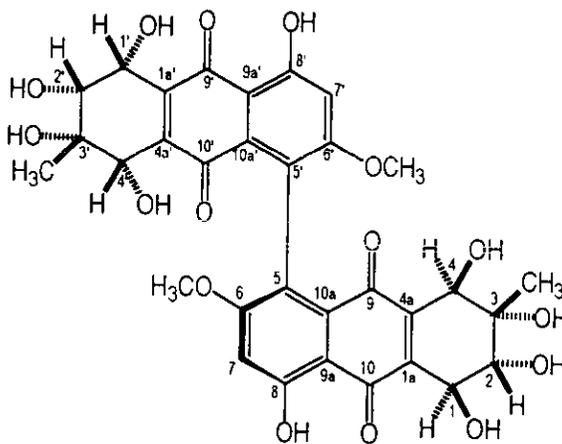


Espectro 32. Espectro de RMN ^{13}C del altersolanol D (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (195).

Cuadro 37. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los alterporrioles D (196) y E (197).



alterporriol D (196)



alterporriol E (197)

Alterporriol D (196)

Alterporriol E (197)

p.f. 285°C (descomposición)
 P.M. 670 uma EM-FAB⁺ m/z 671 [M+H]
 C₂H₃₀O₁₆ calculada por EM de alta resolución, modalidad FAB⁺ m/z 671.1621 (teórico 671.1612) para M⁺.

285°C (descomposición)
 670 uma EM-FAB⁺ m/z 671 [M+H]
 C₂H₃₀O₁₆ calculada por EM de alta resolución, modalidad FAB⁺ m/z 671.1623 (teórico 671.1612) para M⁺.

RMN ¹H y ¹³C.

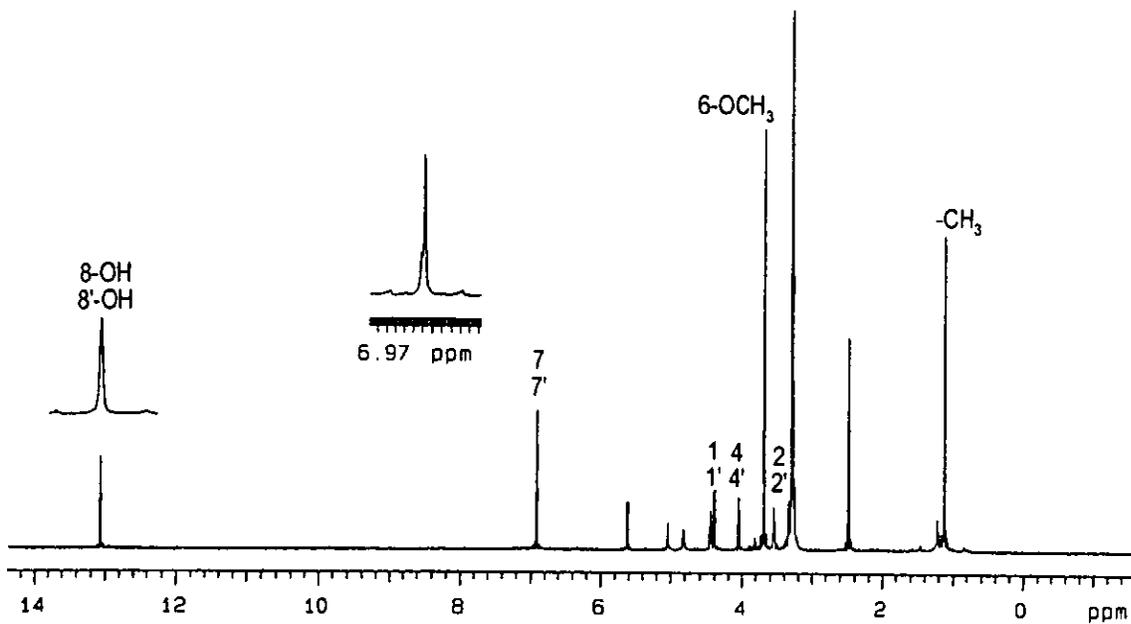
Cuadro 38

Cuadro 38

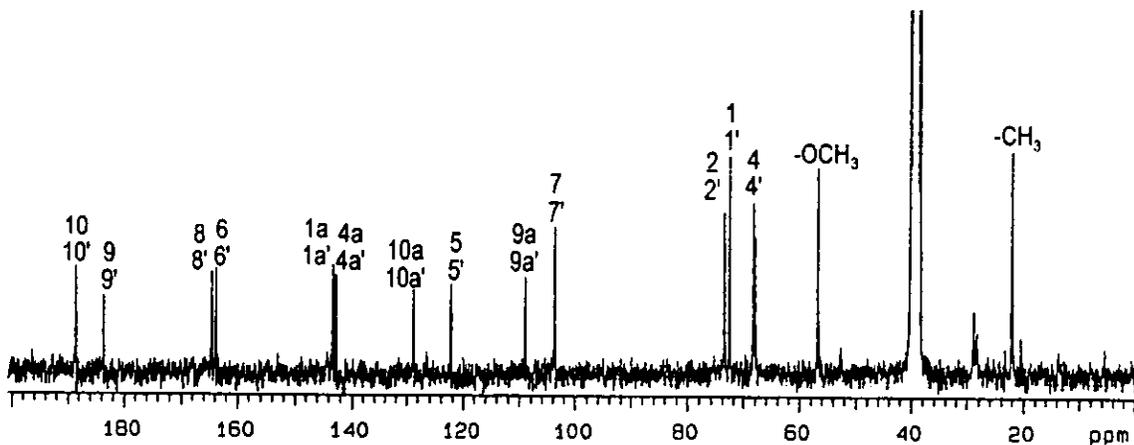
Cuadro 38. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del alterporriol D (196) y alterporriol E (197).

| | alterporriol D (196) | | alterporriol E (197) | |
|------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 1, 1' | 4.36 (d, $J=6.5$) | 68.2 | 4.41 (d, $J=6.5$) | 68.4 |
| 1a, 1a' | | 143.3 | | 143.1 |
| 2, 2' | 3.52 (d, $J=6.5$) | 73.7 | 3.54 (d, $J=6.5$) | 73.7 |
| 3, 3' | | 72.8 | | 72.8 |
| 4, 4' | 4.02 s | 68.0 | 4.06 s | 68.4 |
| 4a, 4a' | | 142.8 | | 142.8 |
| 5, 5' | | 122.4 | | 122.4 |
| 6, 6' | | 163.6 | | 163.6 |
| 7, 7' | | 104.1 | | 104.1 |
| 8, 8' | | 164.1 | | 164.1 |
| 9' | | 188.7 | | 188.7 |
| 9a, 9a' | | 109.1 | | 109.2 |
| 10, 10' | | 183.8 | | 183.7 |
| 10a, 10a' | | 129.0 | | 128.8 |
| 6, 6'-OCH ₃ | 3.67 s | 56.7 | 3.69 s | 56.5 |
| 8, 8'-OH | 13.0 s | | 13.0 s | |
| 3, 3'-CH ₃ | 1.24 | 22.2 | 1.26 | 22.3 |

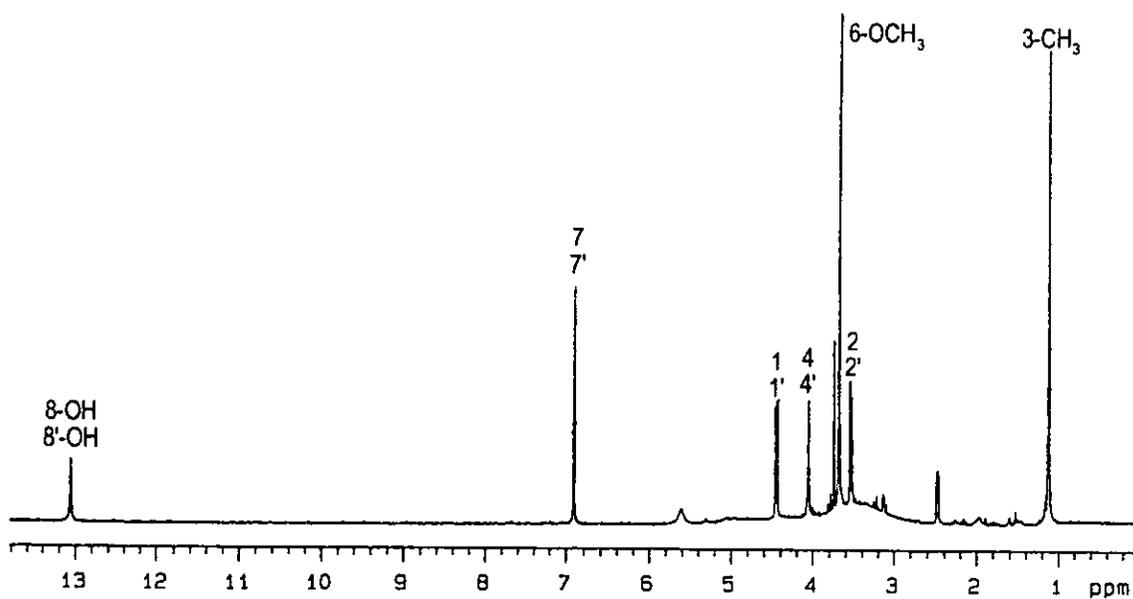
DMSO-*d*₆, ^1H [500 MHz. (J en Hz)], ^{13}C (125 MHz), δ en ppm.



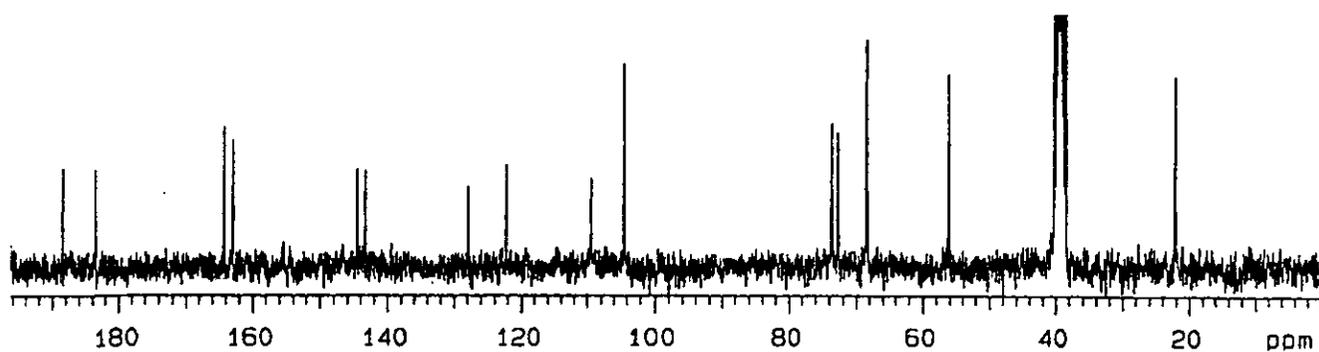
Espectro 33. Espectro de RMN ^1H del alterporriol D (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (196).



Espectro 34. Espectro de RMN ^{13}C del alterporriol D (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (196).



Espectro 35. Espectro de RMN ¹H del alteroporriol E (500 MHz, DMSO-*d*₆) (197).



Espectro 36. Espectro RMN ¹³C del alteroporriol E (125 MHz, DMSO-*d*₆) (197).

Conformational Behavior and Absolute Stereostructure of Two Phytotoxic Nonenolides from the Fungus *Phoma herbarum*^{1,2}

José Fausto Rivero-Cruz,³ Genoveva García-Aguirre,^{b,*} Carlos M. Cerda-García-Rojas^c and Rachel Mata^{a,*}

^aFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF 04510, Mexico

^bInstituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF 04510, Mexico

^cDepartamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, México, DF 07000, Mexico

Received 29 March 2000; accepted 28 May 2000

Abstract—Bioactivity-directed fractionation of extracts from the fungus *Phoma herbarum* led to the isolation of two new phytotoxic nonenolides: (7*S*,8*S*,9*R*)-7,8-dihydroxy-9-propyl-5-nonen-9-olide (**1**) and (2*R*,7*S*,8*S*,9*R*)-2,7,8-trihydroxy-9-propyl-5-nonen-9-olide (**2**), which were named herbarumins I and II, respectively. The stereostructures were elucidated by spectroscopic methods and a combination of molecular modeling, NOESY and ¹H–¹H coupling constant data, which revealed that in CDCl₃ solution, **1** exists in one preferred conformation, while **2** exhibits a conformational equilibrium. Compounds **1** and **2** caused significant inhibition of radicle growth of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus*. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

The genus *Phoma* comprises about 2000 species, many of which are phytopathogenic causing severe diseases on several economically important crops characterized by necrotic lesions on leaves, stems and fruits.¹ Some of the phytopathogenic species have yielded important phytotoxins such as phomalirazine,² the betaenones,³ the atiltoxins,⁴ epoxydon,⁵ and the putaminoxins^{6,7} among others.

As a part of our search for potential herbicidal agents from Mexican plants and microorganisms, we describe in this investigation the isolation and structural elucidation of the major phytotoxic principles from the culture broth and mycelium of an isolate of *Phoma herbarum* Westend (Sphaeropsidaceae) [syn. *Phoma pigmentivora* Masee].⁸ *P. herbarum* has a worldwide distribution and is known from a variety of substrates including herbaceous and woody plants, soil and water. This fungus inhibits the growth of the alga *Chlorella pyrenoidosa* in vitro and is pathogenic to *Avena fatua*¹ and dandelion⁸ (*Taraxacum officinale*) seedlings after artificial infection. Furthermore, *P. herbarum* was recovered and characterized from small necrotic lesions on dandelion foliage.⁸ Chemical work on

this species led to the isolation of the anthraquinones helminthosporin and 1-hydroxyhelminthosporin (cynodontin) and the isomeric chromanones LL-D253 α , LL-D253 β and LL-D253 γ .^{1,9–11}

Results and Discussion

The fungus *P. herbarum* was grown in liquid-substrate fermentation on modified M-D-1 medium.¹² The culture broth and mycelium were extracted with EtOAc. The extract showed phytotoxic activity (Table 1) when evaluated on seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* L. using a Petri dish bioassay.¹³ Bioactivity-guided fractionation of this extract led to the isolation of the new nonenolides **1** and **2**, which were given the trivial names of herbarumins I and II, respectively.

Table 1. Effect of the extract and isolated compounds from *Phoma herbarum* on radicle elongation of *A. hypochondriacus*

| Compound | IC ₅₀ (M) |
|---------------------------|-----------------------|
| Extract ^a | 35.80 |
| 1 | 5.43×10 ⁻⁵ |
| 2 | 1.25×10 ⁻⁴ |
| 4 | 1.47×10 ⁻⁵ |
| 5 | 2.75×10 ⁻⁴ |
| 2,4-D ^b | 1.92×10 ⁻⁴ |

^a Expressed in $\mu\text{g/ml}$.

^b 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as the positive control.

Taken in part from the Ph.D. thesis of José F. Rivero-Cruz.

Keywords: nonenolides; lactones; fungal metabolites; fungi; *Phoma herbarum*; configuration; conformation; phytotoxic activity.

* Corresponding authors. Tel.: +52-5622-5289; fax: +52-5622-5329; e-mail: rachel@servidor.unam.mx or ccerda@mail.cinvestav.mx

Table 2. 1D and selected 2D NMR chemical shift assignment of herbarumin I (**1**) (measured at 125 MHz for ^{13}C NMR and 500 MHz for ^1H in CDCl_3)

| Position | ^{13}C δ^a | ^1H δ^b | HMBC |
|----------|----------------------------|---------------------------------|--------------------|
| 1 | 176.4 | – | 2a, 2b, 3a, 9 |
| 2a | 34.4 | 2.32 ddd, 14.0, 6.0, 2.0 | 3a, 3b, 4a, 4b |
| 2b | | 2.01 ddd, 14.0, 12.5, 2.0 | |
| 3a | 24.6 | 1.89 m | 2a, 2b, 4a, 4b |
| 3b | | 1.73 m | |
| 4a | 33.3 | 2.40 brdt, 12.0, 3.0 | 3a, 3b, 5 |
| 4b | | 1.97 m | |
| 5 | 124.8 | 5.52 dddd, 15.5, 10.0, 4.0, 2.5 | 2a, 4b, 7 |
| 6 | 130.7 | 5.62 brd, 15.5, 2.5 | 4a, 4b, 5, 7 |
| 7 | 73.3 | 4.43 quint, 2.0 | 6 |
| 8 | 73.6 | 3.52 dd, 9.8, 2.5 | 6, 7, 9 |
| 9 | 70.2 | 4.96 td, 9.8, 2.5 | 7, 8, 10a, 10b |
| 10a | 33.7 | 1.87 m | 8, 11 |
| 10b | | 1.55 m | |
| 11a | 17.9 | 1.38 m | 9, 10a, 10b, 12 |
| 11b | | 1.30 m | |
| 12 | 13.8 | 0.89 t, 7.5 | 10a, 10b, 11a, 11b |

^a Assignments confirmed by HMQC and HMBC.

^b Coupling constants are in Hz.

Herbarumin I (**1**) was shown to have the molecular formula of $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$ (three unsaturations) from HREIMS, based on a molecular ion peak at m/z 228.1364. IR spectroscopy indicated the presence of hydroxyl (3390 cm^{-1}) and olefin functionalities (1670 cm^{-1}), in addition to the lactone group (1721 cm^{-1}). The NMR data coupled with the IR and MS indicated that herbarumin I (**1**) has a structure similar to those of pinolidoxin and related nonenolides.^{6,7,14} In particular the NMR spectra (Table 2) showed the existence of a ten-membered macrolide core, a vicinal diol, a *trans* disubstituted double bond, and an *n*-propyl unit. COSY and HMBC experiments indicated the position of the hydroxyl, *n*-propyl and olefin functionalities on the macrolactone core. Thus, the HMBC correlations C-5/H-7 and H-4b, C-7/H-6, C-8/H-6 and H-7, and C-9/H-7 and H-8 were consistent with the placement of the double bond and the diol grouping at C-5/C-6 and C7/C-8, respectively. In addition, the correlations C-9/H-10a and H-10b, and C-1/H-9 revealed that the *n*-propyl moiety and the lactone closure were located at C-9.

The stereochemistry and the solution conformation of the ten-membered ring lactone of herbarumin I (**1**) was determined by molecular mechanics modeling.¹⁵ NOESY data and the comparison of the observed vs. the calculated vicinal proton coupling constants. Thus, a systematic conformational search for this substance using the MMX force field as implemented in the PCMODEL program revealed the presence of the minimum energy conformation depicted in Fig. 1 ($E_{\text{MMX}}=9.51\text{ kcal/mol}$), which was in agreement with the NOESY correlations also indicated in Fig. 1. The dihedral angles measured in this molecular model were converted to calculated coupling constants by means of a generalized Karplus-type relationship^{16,17} and compared with the experimental coupling constants (Table 4). The close correlation between the calculated and experimental J values denoted that the ten-membered ring of herbarumin I (**1**) exists in a single conformation, which is related to the chair–chair–chair conformation found in cyclodecane.¹⁸ In this conformation, the value of the coupling constant ($J=2.5\text{ Hz}$) between H-7 and H-8 indicated their *cis*-equatorial–axial relationship. On the other hand, the value of the coupling constant ($J=9.5\text{ Hz}$) between H-8 and H-9 revealed their *trans*-diaxial relationship, as in the case of pinolidoxin.⁶ Concerning the *n*-propyl side-chain, the observed vs. the calculated coupling constant values (Table 4) supported the proposition that in solution, the C(8)–C(9)–C(10)–C(11) torsion angle is ca. 180° , as in the calculated minimum energy conformation. The absolute configuration at C-7 and C-8 was determined using the CD exciton coupling method of Harada and Nakanishi.^{19,20} Treatment of **1** with *p*-bromobenzoyl chloride gave the di-*p*-bromobenzoate derivative **3**, whose minimum energy conformation ($E_{\text{MMX}}=49.67\text{ kcal/mol}$) was similar to that of **1**. The observed coupling constants $J_{7,8}=2.0$ and $J_{8,9}=9.3\text{ Hz}$ (Table 4) were also in agreement with the calculated conformation. The CD spectrum of **3** indicated a bisignate $\{-6.42 \times 10^4 (237), 9.26 \times 10^5 (255)\}$ Cotton effect, corresponding to a positive chirality. Thus, the stereogenic centers at C-7 and C-8 were each determined to have the *S*-configuration. The absolute configuration at C-9 was therefore assigned as *R*. On the basis of the above evidence, herbarumin I (**1**) was identified as (7*S*,8*S*,9*R*)-7,8-dihydroxy-9-propyl-5-nonen-9-olide.

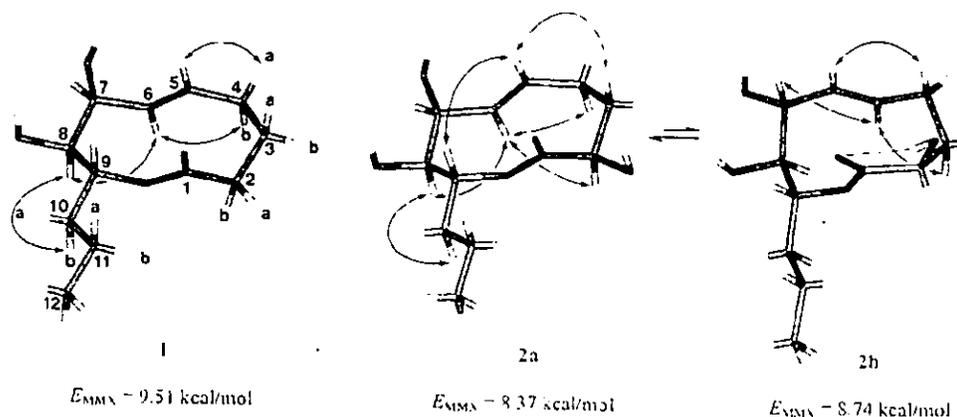
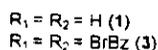
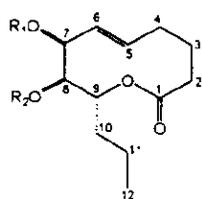
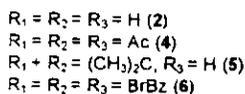
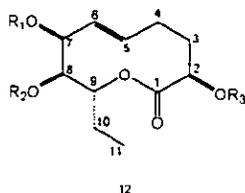


Figure 1. Minimum energy structures of herbarumin I (**1**) and herbarumin II (**2a** and **2b**), showing relevant NOESY correlations.



Herbarumin II (**2**) had the composition $C_{12}H_{20}O_5$ (three unsaturations) as determined by HREIMS, differing from **1** by 16 mass units. This observation as well as the NMR data (Table 3) suggested that **2** was the C-2 hydroxyl derivative of **1**. Treatment of **2** with pyridine/ $(CH_3CO)_2O$ yielded the triacetyl derivative **4** confirming the presence of three hydroxyl groups in the molecule. In addition, the presence of a vicinal diol in **2** was corroborated by obtaining the acetone **5** upon treatment of **2** with anhydrous Me_2CO and $CuSO_4$ (reflux). The NMR spectra of **2** were almost identical with those of **1** except for the presence of signals for an additional secondary carbinol group (δ_H/δ_C 3.99, dd, $J=8.2, 3.0$ Hz/72.6) in place of the methylene signals attributed to C-2. As in the case of **1** the disposition of the substituents along the macrolactone core was established by the analysis of the COSY and HMBC spectra.



During the NMR spectral analysis of herbarumin II (**2**) in $CDCl_3$, the presence of a small group of signals indicated the existence of a second component in (~86:14). Further purification of **2** always led to the same signal pattern and proportion. However, when the spectrum of **2** was recorded using $MeOH-d_4$, only one component was detected. On repeating the determination in $CDCl_3$, the original mixture was obtained. These observations were consistent with a conformational equilibrium between two species. It appears that in $CDCl_3$ solution their interconversion at room temperature was slower than the NMR time-scale, allowing its independent observation. Molecular mechanics calculations¹⁵ were used again to assist the rationalization of the experimental data (NOESY and coupling constants) in an effort to describe in detail the conformational properties of compound **2**. The results indicated the presence of two minimum energy conformations, which are represented in Fig. 1. The ten-membered ring in **2a** ($E_{MMX}=8.37$ kcal/mol) exists in a chair-chair-chair conformation very similar to that found in **1**, while this ring in **2b** ($E_{MMX}=8.74$ kcal/mol) resembled the twist chair-boat-chair conformation of cyclodecane.¹⁸ The NOESY spectrum of **2** exhibited the

interactions shown in Fig. 1, which were in agreement with the presence of both conformations. In particular, the interaction between H-2 and H-6 in **2a** was also consistent with a pseudoequatorial (β) disposition of the hydroxyl group at C-2. It is clear that in $CDCl_3$ solution, the formation of the O(2)H–O(1) hydrogen bond accounts for the stabilization of conformer **2b**, while in $MeOH-d_4$, this intramolecular hydrogen bonding is released by interaction and exchange of the labile hydrogen O(2)H with the solvent atoms, as revealed by the presence of a single conformer (**2a**) in the 1H NMR spectrum. In $MeOH-d_3$, the signal for the proton geminal to the C-2 oxygen of **2a** was observed as a sharp dd with $J_{2,3a}=10.2$ Hz and $J_{2,3b}=3.2$ Hz. The 1H NMR spectrum of triacetate **4** showed the same coupling pattern for H-2 (Table 3), suggesting that the ten-membered ring of **4** was also in a single conformation similar to **2a**. A molecular mechanics conformational search for triacetate **4** in combination with the calculated vs. observed coupling constants (Table 4) supported this assumption. The minimum energy structure of **4** had $E_{MMX}=5.97$ kcal/mol and closely resembled that of **2a**. Interestingly, the ten-membered ring of acetone **5** was found in a conformation similar to the minor component **2b**, as revealed by the minimum energy conformer ($E_{MMX}=24.30$ kcal/mol) and by the calculated vs. observed coupling constants listed in Table 4. Additional evidences to support the conformational equilibrium in $CDCl_3$ between **2a** and **2b** were obtained through a series of low temperature DNMR experiments. As can be seen in Fig. 2, when temperature decreases, the amount of conformer **2b** substantially increases. This is consistent with the proposed stabilization of **2b** by the O(2)H–O(1) intramolecular hydrogen bonding. Estimation of ΔG values using the $\Delta G = -RT \ln K$ equation and relevant integration values from the 1H NMR spectra of Fig. 2 afforded $\Delta G^{25^\circ C}=1.09$ kcal/mol and $\Delta G^{40^\circ C}=0.40$ kcal/mol for the **2a** \rightleftharpoons **2b** equilibrium. Interconversion of **2a** in **2b** might proceed via two non-synchronized conformational movements, involving bond rotations of the C(1)–C(2)–C(3)–C(4)–C(5) and C(4)–C(5)=C(6)–C(7) moieties, which would lead to two intermediate conformations. The presence of these conformations ($E_{MMX}=8.90$ kcal/mol and $E_{MMX}=9.90$ kcal/mol, respectively) can be envisaged by the reduction of the *trans*-diaxial coupling constants $J_{2b,3a}$ and $J_{4b,5}$ in **2a** (Table 4), on going from $MeOH-d_4$, where the interconversion process does not take place, to $CDCl_3$.

The absolute configuration of **2** at the stereogenic centers at C-2, C-7, C-8 and C-9 was determined following the same procedure as for compound **1**. The tri-*p*-bromobenzoate **6**, whose ten-membered ring conformation ($E_{MMX}=67.34$ kcal/mol) resembled those of **1**, **2a**, **3** and **4** (Table 4), showed a typical split CD and this established the chirality of the 7-OBz/8-OBz as being positive.²⁰ Therefore, herbarumin II (**2**) was characterized as (2*R*,7*S*,8*S*,9*R*)-2,7,8-trihydroxy-9-propyl-5-nonen-9-olide (**2**). Comparison of the H-2 coupling constants of **4** (10.0 and 3.5 Hz) with those of pinolidoxin (5.6 and 1.7 Hz)⁶ suggested that the stereochemistry at C-2 in both compounds might be opposite, although a conformational study of pinolidoxin would be desirable to confirm this observation.

Natural products **1** and **2** as well as derivatives **4** and **5** were

Table 3. NMR data for herbarumin II (2) and triacetylherbarumin II (4) (measured at 125 MHz for ^{13}C and 500 MHz for ^1H)

| Position | 2(CDCl ₃) | | | | 2(CD ₃ OD) | 4(CDCl ₃) | |
|----------|--------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | 2a | | 2b | | $^1\text{H} \delta^b$ | $^{13}\text{C} \delta^{a,b,d}$ | $^1\text{H} \delta^{a,b}$ |
| | $^{13}\text{C} \delta^a$ | HMBC | $^1\text{H} \delta^{a,b}$ | | | | |
| 1 | 177.0 | 2, 3a, 9 | – | – | – | 171.2 | – |
| 2 | 72.6 | 3a, 3b, 4a, 4b | 3.99 dd, 8.2, 3.0 | 4.27 t, 3.5 | – | 73.5 | – |
| 3a | 33.8 | 2, 4a, 4b | 2.05 m | 2.03 m | 3.85 dd, 10.0, 3.2 | 30.6 | 4.75 dd, 10.0, 3.5 |
| 3b | | | 2.10 m | 1.86 m | 1.92 m | | 2.00 m |
| 4a | 25.2 | 3a, 3b, 5 | 2.34 m | 2.27 m | 1.80 m | | 2.00 m |
| 4b | | | 2.15 m | 2.10 m | 2.42 m | 27.9 | 2.37 m |
| 5 | 122.4 | 4b, 7 | 5.59 dddd, 16.3, 8.0, 5.5, 2.5 | 5.51 dddd, 16.3, 10.5, 4.0, 1.0 | 2.11 m | | 2.18 dd, 15.0, 10.0, 5.0 |
| 6 | 131.9 | 4a, 4b, 5, 7 | 5.63 dd, 16.3, 2.5 | 5.39 ddd, 16.5, 6.5, 1.0 | 5.50 dddd, 16.3, 10.0, 5.5, 2.5 | 123.9 | 5.44 dddd, 15.5, 10.0, 4.5, 2.0 |
| 7 | 68.3 | 6 | 4.48 br s | 4.31 dd, 6.5, 3.0 | 5.60 dd, 16.3, 2.5 | 127.7 | 5.60 dd, 15.0, 2.5 |
| 8 | 71.8 | 6, 7 | 3.56 dd, 9.8, 2.5 | 3.71 dd, 4.5, 3.0 | 4.35 quint, 2.5 | 70.7 | 5.68 quint, 2.5 |
| 9 | 70.7 | 7, 8, 10a, 10b | 5.06 td, 9.8, 2.5 | 5.00 dt, 9.0, 4.5 | 3.53 dd, 9.8, 2.5 | 71.8 | 4.95 dd, 10.0, 2.5 |
| 10a | 33.8 | 8, 11 | 1.77 m | – | 5.37 td, 9.8, 2.5 | 70.0 | 5.37 ddd, 10.0, 8.5, 3.0 |
| 10b | | | 1.57 m | – | 1.86 m | 33.4 | 1.56 m |
| 11a | 17.8 | 9, 10a, 10b, 12 | 1.47 m | – | 1.55 m | | 1.46 m |
| 11b | | | 1.31 m | – | 1.37 m | 17.2 | 1.31 m |
| 12 | 13.8 | 10a, 10b, 11a, 11b | 0.91 t, 7.5 | 0.93 t, 7.5 | 1.37 m | | 1.31 m |
| | | | | | 0.92 t, 7.5 | 13.9 | 0.89 t, 7.5 |

^a Assignments confirmed by HMQC and HMBC.

^b Coupling constants are in Hz.

^c 2-CH₃CO: 2.17; 7-CH₃CO: 2.09; 8-CH₃CO: 2.04 ppm.

^d 2-CH₃CO: 20.6, 169.9; 7-CH₃CO: 20.7, 169.9; 8-CH₃CO: 20.8, 169.5 ppm.

Table 4. Selected dihedral angles (ϕ_{MMX} in degrees), calculated coupling constants (J_{calc} in Hz) and observed coupling constants (J_{obs} in Hz) for herbarumin I (1), herbarumin II (2a and 2b), 7,8-di-*p*-bromobenzoylherbarumin I (3), 2,7,8-triacetylherbarumin II (4), 7,8-*O,O'*-isopropylideneherbarumin II (5) and 2,7,8-tri-*p*-bromobenzoylherbarumin II (6)

| $\text{H}(x)-\text{C}-\text{C}-\text{H}(y)$ | 1 | | | 2a | | | | 2b | | | 3 | | | 4 | | | 5 | | | 6 | | |
|---|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| | ϕ_{MMX} | J_{calc} | J_{obs}^a | ϕ_{MMX} | J_{calc} | J_{obs}^b | J_{obs}^c | ϕ_{MMX} | J_{calc} | J_{obs}^d | ϕ_{MMX} | J_{calc} | J_{obs}^e | ϕ_{MMX} | J_{calc} | J_{obs}^f | ϕ_{MMX} | J_{calc} | J_{obs}^g | ϕ_{MMX} | J_{calc} | J_{obs}^h |
| 2a,3a | -68 | 1.7 | 2.0 | - | - | - | - | - | - | - | -68 | 1.7 | - ^d | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2a,3b | +48 | 5.3 | 6.0 | - | - | - | - | - | - | - | +48 | 5.3 | - ^d | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2b,3a | +175 | 13.6 | 12.5 | +177 | 11.6 | 10.2 | 8.2 | -68 | 2.8 | 3.5 | +175 | 13.6 | - ^d | +176 | 11.6 | 10.0 | -71 | 2.4 | 3.5 | +176 | 11.6 | 9.6 |
| 2b,3b | -69 | 1.7 | 2.0 | -68 | 3.1 | 3.2 | 3.0 | +46 | 3.6 | 3.5 | -69 | 1.7 | - ^d | -68 | 2.9 | 3.5 | +43 | 4.2 | 3.5 | -68 | 2.9 | 3.9 |
| 4a,5 | -57 | 3.8 | 4.0 | -62 | 3.5 | 5.5 | 5.5 | +169 | 11.3 | 10.5 | -57 | 3.8 | 4.0 | -60 | 3.4 | 4.5 | +172 | 11.4 | 9.2 | -61 | 3.5 | 4.0 |
| 4b,5 | -175 | 11.5 | 10.0 | -179 | 11.6 | 10.0 | 8.0 | +51 | 4.2 | 4.0 | -173 | 11.5 | 10.0 | -178 | 11.6 | 10.0 | +54 | 4.0 | 5.4 | -179 | 11.6 | 10.0 |
| 6,7 | -53 | 4.0 | 2.5 | -53 | 4.0 | 2.5 | 2.5 | +114 | 4.1 | 6.5 | -52 | 4.1 | 2.0 | -54 | 4.0 | 2.5 | +124 | 5.4 | 7.5 | -49 | 4.3 | 2.0 |
| 7,8 | +57 | 2.6 | 2.5 | +57 | 2.7 | 2.5 | 2.5 | +51 | 3.2 | 3.0 | +55 | 2.9 | 2.0 | +58 | 2.6 | 2.5 | +38 | 5.0 | 6.0 | +58 | 2.6 | 2.0 |
| 8,9 | +179 | 9.3 | 9.8 | -177 | 9.3 | 9.8 | 9.8 | +178 | 9.3 | 9.0 | -177 | 9.4 | 9.3 | -179 | 9.4 | 10.0 | -179 | 9.4 | 10.3 | -179 | 9.4 | 10.0 |
| 9,10a | +62 | 2.0 | 2.5 | +62 | 2.0 | 2.5 | 2.5 | +60 | 2.2 | 4.5 ^e | +63 | 1.8 | 2.7 | +68 | 1.4 | 3.0 ^e | +62 | 2.0 | 2.5 ^e | +70 | 1.3 | 5.4 ^e |
| 9,10b | +179 | 11.6 | 9.8 | +179 | 11.6 | 9.8 | 9.8 | +177 | 11.6 | 9.0 ^e | +180 | 11.5 | 12.0 | -175 | 11.2 | 8.5 ^e | +180 | 11.5 | 9.3 ^e | -173 | 11.1 | 6.3 ^e |

^a Measured at 500 MHz in CDCl_3 .^b Measured at 500 MHz in CD_3OD .^c Measured at 300 MHz in CDCl_3 .^d Signal overlapping precluded the measurement.^e Averaged by contribution of additional rotameric species in the side chain.

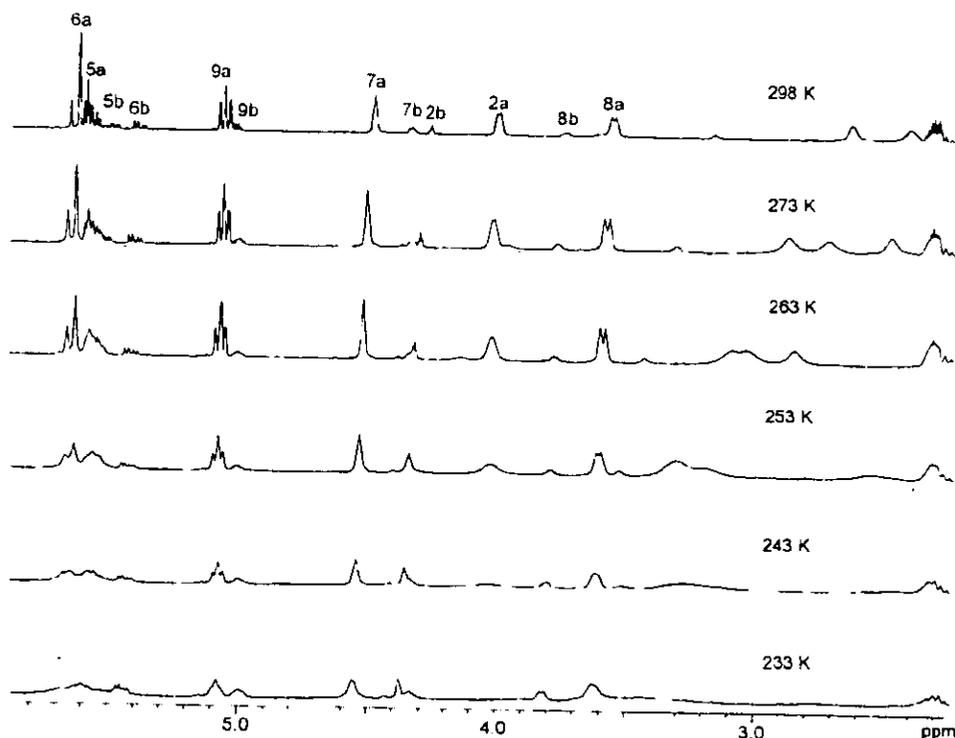


Figure 2. The δ 5.9–2.2 region of the ^1H NMR (CDCl_3) spectrum of **2** (**2a**–**2b**) recorded at low temperature.

evaluated for their ability to inhibit seed germination and seedling growth of *A. hypochondriacus*. Table 1 summarizes the phytotoxic effect of the tested compounds on seedling growth. The results are expressed as IC_{50} (50% inhibitory concentration). Compound **1** was more potent than the positive control (2,4-D), while compound **2** exhibited a similar potency with respect to 2,4-D. Blocking of the diol functionality in compound **2** significantly decreased the pre-emergent phytotoxic activity. Previously, Evidente et al. demonstrated that the post-emergent phytotoxic effect of pinolidoxin, the toxic agent of the fungus *Ascochyta pinodes*, required not only the integrity of the nonenolide ring and the propyl side chain but also the presence of hydroxyl groups at C-8 and C-9.²¹ It is important to point out that the level of activity displayed by **1** clearly revealed its potential as herbicide agent. Finally, this work is intended to be a contribution to the understanding of conformations of hydroxylated ten-membered heterocyclic rings in protic vs. aprotic solvents.

Experimental

General experimental procedures

Melting point determinations were performed on a Fisher–Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained using KBr disks on a Perkin–Elmer 599B spectrophotometer. UV spectra were obtained on a Shimadzu 160 LTV spectrometer in MeOH and EtOH solutions. Optical rotations were taken on a JASCO DIP-360 digital polarimeter. CD spectra were performed on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25°C in MeOH and EtOH solutions. NMR spectra including COSY, NOESY, HMBC and HMQC

experiments were recorded on a Varian Unity Plus 500 spectrometer or on a Bruker DMX500 in CDCl_3 at 500 MHz (^1H) or 125 MHz (^{13}C). 300 MHz ^1H NMR was recorded on a Varian VXR300S instrument. FAB/MS were recorded on a JEOL DX300 mass spectrometer in the positive mode using NBA as the matrix. EIMS data were obtained on a JEOL JMS-AX505HA mass spectrometer. HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with a Waters UV photodiode array detector (900) set at 209 nm, using a silica gel column (19 mm i.d. \times 300 mm). Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the MILLENNIUM 32 software program (Waters). Open column chromatography: silica gel 60 (70–230 mesh, Merck). Flash column chromatography: silica gel (40 μm , Baker). TLC: silica gel 60 F_{254} (Merck).

Fungal material

The fungus *Phoma herbarum* was isolated from a special variety of *Zea mays* (“maíz cacahuacintle”) grown in Michoacán, Mexico, in 1998. Cultures of the isolate are maintained in the mycological collection of Laboratorio de Micopatología, Instituto de Biología, UNAM (Voucher: TOX-01020). Stock cultures of the fungus were stored on agar slants of potato dextrose agar (PDA), with subculturing at monthly intervals. Forty 1.8 L Fernbach flasks, each containing 1 L of modified M-D-1 medium that had been sterilized at 120°C for 15 min and then cooled to room temperature, were individually inoculated with 1 cm^2 agar plugs taken from stock cultures of *P. herbarum* maintained at 4°C on PDA. Flask cultures were incubated at 28°C and

aerated by agitation on an orbital shaker at 120 rpm for 15 days.

Extraction and isolation of 1 and 2

After incubation, the content of each flask were combined and filtered. The culture filtrates (40 L) were extracted exhaustively with EtOAc (3×40 L). The combined organic extracts were filtered over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to give a brown oil (3.2 g). The mycelium was extracted with EtOAc (3×1.5 L). The mycelial extract was evaporated to yield 0.801 g of a dark brown solid. The combined mycelial and broth extracts (4.014 g) were subjected to open column chromatography on silica gel (300 g) and eluted with a gradient of increasing polarity CH₂Cl₂-*i*-PrOH (0–100%). Altogether 229 (250 mL) fractions were collected and then combined according to their TLC patterns to yield eight primary fractions (FI–FVIII). Bioactivity in the bioautographic bioassay showed one active pool (FIV). Fraction FIV, eluted with CH₂Cl₂-*i*-PrOH (90:10), was subjected to flash column chromatography on silica gel (32 g) and eluted with a gradient of increasing polarity of CH₂Cl₂-*i*-PrOH (90:10 to 50:50). 104 fractions were collected and then combined to yield eight fractions (FIV-1–FIV-8). According to the bioautographic bioassay the activity was concentrated in fraction FIV-3, eluted with CH₂Cl₂-*i*-PrOH (85:15). HPLC purification of the active fraction FIV-3 (186.4 mg) on a silica gel column [8.2 mL min⁻¹, hexane-*i*-PrOH–MeOH, (82:9:9)] yielded **1** (12.8 mg) and **2** (30.1 mg). The *R*_f values were 10.2 and 20.8 min, respectively. The *R*_f values on silica gel plates, developed with CH₂Cl₂-*i*-PrOH (88:12), were 0.55 and 0.38, respectively. HPLC purification of fraction FIV-4 using the same conditions afforded additional amounts of compounds **1** (3.2 mg) and **2** (67.0 mg).

Herbarumin I (1). White wax; mp 42–44°C; [α]_D²⁰ = +28.0° (*c* 1.0 mg/mL, EtOH); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 204 (3.58) nm; CD (EtOH) $\Delta\epsilon$ (nm) 2.70×10⁴ (205), -1.85×10⁴ (228); IR ν_{\max} (KBr) 3390, 2957, 2926, 1721, 1191, 1046 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (Table 2); EIMS *m/z*: 228 [M]⁺ (3), 210 (12), 200 (10), 157 (10), 143 (30), 125 (85), 95 (100), 79 (90), 57 (37), 41 (26). HREIMS *m/z*: 228.1364 (calcd for C₁₂H₂₀O₄, 228.1361).

Herbarumin II (2). Pale yellow needles; mp 100–101°C; [α]_D²⁰ = +30.8° (*c* 1.0 mg/mL, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 209 (3.14) nm; CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) 5.31×10⁴ (207), -2.37×10⁴ (222); IR ν_{\max} (KBr) 3560, 2962, 2931, 2873, 1720, 1053 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (Table 3); EIMS *m/z*: 244 [M]⁺ (3), 226 (5), 208 (3), 143 (75), 97 (43), 67 (100), 57 (39), 41 (29). HREIMS *m/z*: 244.1316 (calcd for C₁₂H₂₀O₅, 244.1310).

Acetylation of herbarumin II (2). A solution of **2** (10 mg) in pyridine (0.1 mL) and Ac₂O (0.1 mL) was kept at room temperature for 48 h, diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), washed with HCl 1 N (3×20 mL), saturated NaHCO₃ solution (3×20 mL) and water (3×20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness, affording the triacetate **4** (12.3 mg) as pale yellow needles; mp 63–65°C; IR ν_{\max} (KBr) 1749, 1720, 1646, 1618, 1220; ¹H and ¹³C NMR

(Table 3); EIMS *m/z*: 370 [M]⁺ (3), 228 (15), 327 (3), 310 (10), 284 (10), 267 (20), 225 (70), 183 (90), 95 (100), 67 (54), 43 (33); FABMS (positive) *m/z*: 371 [M+H]⁺ (80), 311 (95), 269 (20), 181 (23), 137 (100), 136 (75), 107 (22), 43 (42).

Benzoylation of herbarumins I (1) and II (2). To a stirred solution of **1** or **2** (5.0 mg) and 4-bromobenzoyl chloride (Sigma) (10.0 mg), in pyridine (2.5 mL) was added 4-(dimethylamino)pyridine (0.5 mg). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h, diluted with CH₂Cl₂ (10 mL), washed with HCl 1 N (3×10 mL), saturated NaHCO₃ solution (3×10 mL) and water (3×10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and evaporated to dryness. In each case, the resulting mixture was purified by TLC on silica gel (CH₂Cl₂) to yield 3.8 mg **3** and 4.0 mg of **6**. Compound **3**: white needles; UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 245 (3.96), 204 (4.01); CD (EtOH) $\Delta\epsilon$ (nm) -4.75×10⁵ (211), -6.42×10⁴ (237), 9.26×10⁵ (255); IR ν_{\max} (KBr) 3560, 2962, 2931, 2873, 1720, 1053 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.00 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2', H-6' Bz), 7.90 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2', H-6' Bz), 7.68 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3', H-5' Bz), 7.60 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3', H-5' Bz), 5.95 (1H, t, *J*=2.0 Hz, H-7), 5.75 (1H, dd, *J*=15.9, 2.0 Hz, H-6), 5.50 (1H, dddd, *J*=16.8, 10.0, 4.0, 2.0 Hz, H-5), 5.37 (1H, ddd, *J*=12.0, 9.3, 2.7 Hz, H-9), 5.03 (1H, dd, *J*=9.3, 2.0 Hz, H-8), 0.92 (3H, t, *J*=7.5 Hz, H-13); FABMS (positive) *m/z*: 595 [M+H]⁺ (8), 549 (8), 522 (6), 413 (6), 391 (20), 307 (12), 257 (5), 183 (100), 154 (90), 136 (70), 55 (42), 43 (25), 23 (8). Compound **6**: white needles; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 245 (4.42), 204 (4.08); CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) -1.89×10⁶ (221), 3.71×10⁵ (255); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.05 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2', H-6' Bz), 7.93 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2', H-6' Bz), 7.75 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2', H-6' Bz), 7.63 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3', H-5' Bz), 7.58 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3', H-5' Bz), 7.56 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3', H-5' Bz), 6.08 (1H, t, *J*=2.0 Hz, H-7), 5.81 (1H, dd, *J*=16.8, 2.0, H-6), 5.70 (1H, ddd, *J*=10.0, 5.4, 6.3, H-9), 5.60 (1H, dddd, *J*=16.8, 10.0, 4.0, 2.0 Hz, H-5), 5.33 (1H, dd, *J*=10.0, 2.0 Hz, H-8), 5.09 (1H, dd, *J*=9.6, 3.9 Hz, H-2), 0.86 (3H, t, *J*=7.5, H-13); FABMS (positive) *m/z*: 794 [M+H]⁺ (6), 705 (8), 593 (18), 413 (10), 391 (20), 389 (8), 307 (18), 289 (12), 257 (8), 183 (100), 154 (96), 136 (78), 55 (43), 43 (20), 23 (15).

Preparation of 7,8-O'-isopropylideneherbarumin II

(5). Herbarumin II (**2**) (10.0 mg) in dry Me₂CO (7.0 mL) was stirred with dry CuSO₄ (70.0 mg) under reflux for 12 h. The mixture was filtered and evaporated under reduced pressure to give an oily residue. The residue was purified by HPLC on a silica gel column [8.2 mL min⁻¹, hexane-*i*-PrOH–MeOH, (80:10:10)] to yield **5** (8.0 mg): yellow oil, ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.60 (1H, ddd, *J*=16.5, 9.2, 5.4 Hz, H-5), 5.38 (1H, dd, *J*=16.5, 7.5 Hz, H-6), 5.11 (1H, ddd, *J*=10.3, 9.3, 2.5 Hz, H-9), 4.78 (1H, dd, *J*=7.5, 6.0 Hz, H-7), 4.27 (1H, t, *J*=3.5 Hz, H-2), 3.89 (1H, dd, *J*=10.3, 6.0 Hz, H-8), 1.46 (3H, s, CH₃), 1.36 (3H, s, CH₃), 0.91 (3H, t, *J*=7.5 Hz). HREIMS *m/z*: 284.1629 (calcd for C₁₅H₂₄O₅, 284.1623).

Molecular modeling calculations

Minimum energy structures were generated using the MMX

force field as implemented in the PCMODEL program V 6.00 (Molecular Modeling Software available from Serena Software, Box 3076, Bloomington, IN 47402–3076). The conformational search for the ten-membered ring of **1** was carried out considering the pertinent restrictions according to the vicinal coupling constants found in the C(6)–C(7)–C(8)–C(9)–C(10) fragment. For the remaining portion of the ten-membered ring, those conformations obtained by torsion angle rotations of ca. 30° were minimized and evaluated taking into account the E_{MMX} convergence criterion. The propyl side-chain was minimized considering all possible alternate conformations.

Phytogrowth-inhibitory bioassays

The phytogrowth-inhibitory activity of the extract and pure compounds was evaluated on seeds of *A. hypochondriacus* using a Petri dish bioassay.¹³ In addition, a direct bioautographic bioassay system was employed to guide secondary fractionation and speed up the isolation of active compounds. The direct bioautographic assay was carried out as previously described. The results were analyzed by ANOVA ($p < 0.05$), and IC_{50} (50% inhibitory concentration) values expressed in molar concentration were calculated by Probit analysis based on percent of radicle growth inhibition. The extract was evaluated at 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The pure compounds were tested at 0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) was used as the positive control. The bioassays were performed at 28°C.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CONACYT (27978N), DGAPA (IN207300) and PADEP (207347 and 108329). We thank Isabel Chávez, Luis Velasco-Ibarra, Javier Pérez-Flores, Rocío Patiño, Georgina Duarte and Oscar Yañez from Instituto de Química and Facultad de Química, UNAM, for recording some NMR, MS, UV, IR, and CD spectra. The technical support of Laura Acevedo, Perla Castañeda and Rebeca Martínez-Flores is also acknowledged. J. F. Rivero-Cruz acknowledges the fellowships awarded by DGAPA-UNAM and CONACYT to carry out graduate studies. The authors are indebted to Drs José Calderón and Carlos Céspedes for their valuable support at some stages of the present investigation.

References

- Domsh, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H. *Compendium of Soil Fungi*, Academic: London, 1980; Vol. 1.
- Pedras, M. S. C.; Abrams, S. R.; Séguin-Swartz, G.; Quail, J. W.; Jia, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1904–1905.
- Ichihara, A.; Oikawa, H.; Hayashi, K.; Sakamura, S.; Furusaki, A.; Matsumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2907–2908.
- Parisi, A.; Piattelli, M.; Tringali, C.; Di San Lio, G. M. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 865–867.
- Kobayashi, A. T.; Kono, Y.; Yamaguchi, G. O. *Pestic. Sci.* **1999**, *55*, 602–604.
- Evidente, A.; Lanzetta, R.; Capasso, R.; Andolfi, A.; Vurro, M.; Zonno, M. C. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1637–1641.
- Evidente, A.; Lanzetta, R.; Capasso, R.; Andolfi, A.; Vurro, M.; Zonno, M. C. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1041–1045.
- Brehaun, S. N.; Borland, G. J. *Plant Disease* **1999**, *83*, 200.
- MacGahren, W. J.; Ellestad, G. A.; Morton, G. O.; Kunstmann, M. P. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1636–1639.
- Chandler, I. M.; McIntyre, C. R.; Simpson, T. J. *Perkin Trans. I* **1992**, 2271–2284.
- Chandler, I. M.; McIntyre, C. R.; Simpson, T. J. *Perkin Trans. I* **1992**, 2285–2293.
- Pinkerton, F.; Strobel, G. A. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1982**, *73*, 4007–4011.
- Mata, R.; Macías, M. R.; Rojas, S.; Lotina-Hennsen, B.; Toscano, R.; Anaya, A. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 441–449.
- Evidente, A.; Lanzetta, R.; Capasso, R.; Vurro, M.; Bottalico, A. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 999–1003.
- Burket, U.; Allinger, N. L. *Molecular Mechanics*, ACS Monograph, American Chemical Society: Washington, DC, 1982; Vol 177.
- Haasnoot, C. A. G.; de Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783–2792.
- Cerda-García-Rojas, C. M.; Zepeda, L. G.; Joseph-Nathan, P. *Tetrahedron Comp. Methodol.* **1990**, *3*, 113–118.
- Hilderbrandt, R. L.; Wieser, J. D.; Montgomery, L. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 8598–8605.
- Harada, N.; Nakanishi, K. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 257–263.
- Lin, Y. Y.; Risk, M.; Ray, S. M.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Gofik, J.; James, J. C.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6773–6775.
- Evidente, A.; Capasso, R.; Andolfi, A.; Vurro, M.; Zonno, M. C. *Natural Toxins* **1998**, *6*, 183–188.