



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“MALBRANCHEA AURANTIACA SIGLER & CARMICH, UNA FUENTE NOVEDOSA DE
FITOTOXINAS ANTAGONISTAS DE LA PROTEÍNA CALMODULINA”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. SERGIO ISMAEL MARTÍNEZ LUIS



TUTOR: Dra. Rachel Mata Essayag AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo llego a feliz término gracias a las siguientes instituciones y personas a las que deseo expresar mi más sincero reconocimiento:

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) y la Dirección General de Estudios de Posgrado (**DGEP**) por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de posgrado.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN200902) por el financiamiento parcial de esta investigación.
- Al M. en C. Víctor Arroyo y a la M. en C. Rosa Isela del Villar por el registro de los espectros de RMN. A la M. en C. Georgina Duarte por el registro de los espectros de masas. A la Q.F.B. Marisela Gutiérrez por el registro de las rotaciones ópticas y espectros en el IR y UV. Todos ellos de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM.
- A la Dra. Maria del Carmen González Villaseñor, Investigadora del Instituto de Biología de la UNAM, por su invaluable asesoría y apoyo a lo largo de este estudio. También por el aislamiento y caracterización de las especies fúngicas analizadas en la presente disertación.
- Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Investigador del departamento de Bioquímica de la Facultad de Química UNAM, por su asesoría en la realización de los ensayos conducentes a determinar el efecto antibrasinoesteroide y anti-CaM de las fitotoxinas obtenidas en este estudio.
- A los doctores Carlos Martín Cerda García-Rojas (CINVESTAV-IPN) y Enrique Ángeles Anguiano (FES-Cuatitlán), miembros de mi Comité Tutelar, por su apoyo continuo.
- A los miembros del jurado por sus acertados comentarios y observaciones que permitieron la corrección de este manuscrito de tesis.
- A la Dra. Rachel Mata Essayag por todo el tiempo dedicado a mi formación académica, por su constante interés y apoyo brindado en la realización de esta investigación.

INDICE

	Página
Lista de Esquemas	VI
Lista de Tablas	VII
Lista de Figuras	IX
Lista de Espectros	XII
Lista de Abreviaturas	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Impacto de los herbicidas sintéticos en la agricultura.	9
2.2 Antecedentes del hongo coprófilo <i>Malbranchea aurantiaca</i> Sigler & Carmich.	19
2.3 Antecedentes del hongo <i>Neorollandina mexicana</i> M. C. González, Hanlin et Glenn.	23
2.4 La proteína calmodulina como blanco de compuestos fitotóxicos.	24
2.5 Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que afectan a la proteína CaM.	30
2.6 Los brasinoesteroides como posible blanco de acción de las fitotoxinas.	40
2.7 Alcaloides prenilados derivados de triptófano.	44
3. HIPÓTESIS	53

INDICE (continuación)

	Pág.
4. OBJETIVO GENERAL	53
4.1 Objetivos particulares	53
5. PARTE EXPERIMENTAL	55
5.1 Material biológico	55
5.2 Ensayos biológicos	55
5.2.1 Determinación del efecto fitotóxico.	55
5.2.2 Método bioautográfico	56
5.2.3 Efecto de los productos naturales sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) dependiente de calmodulina (CaM).	56
5.2.4 Determinación de la constante de inhibición (<i>ki</i>) de la malbrancheamida.	57
5.2.5 Determinación del efecto antibrasinoesteroide de la malbrancheamida, la clorpromazina y el 2,4-D mediante el ensayo de la caja de Petri.	58
5.2.6 Determinación del efecto antibrasinoesteroide de la malbrancheamida, mediante el bioensayo del desenrollamiento de las hojas de trigo.	59
5.3 Fermentación de <i>Malbranchea aurantiaca</i>	60
5.4 Fermentación de <i>Neorollandina mexicana</i> .	62
5.5 Estudios químicos.	62

INDICE (continuación)

	Pág.
5.5.1 Preparación de los extractos.	62
5.5.2 Análisis cromatográficos.	62
5.5.3 Registro de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	64
5.5.4 Separación de la malbranqueamida.	64
5.5.4.1 Estudio del cultivo M1.	64
5.5.4.2 Estudio del cultivo M4.	65
5.5.4.3 Estudio del cultivo M5.	66
5.5.5 Obtención del ácido penicílico.	67
5.5.6 Separación del ácido penicílico (III) y 1-hidroxi-2-oxoperemofil-(10),7(11), 8(9)-trien-12(8)-ólida (IV).	68
5.5.7 Separación del polímero 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.	69
5.6 Análisis microscópico de las ascosporas de <i>Neorollandina mexicana</i> .	71
5.7 Análisis de difracción de rayos X.	71
5.7.1 Malbranqueamida	71
5.7.2 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida.	72

INDICE (continuación)

	Pág.
5.8 Cálculos de modelado molecular de la malbranqueamida	73
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
6.1 Selección y cultivo de <i>Malbranchea aurantiaca</i> y <i>Neorolandina mexicana</i> .	74
6.2 Fraccionamiento biodirigido.	80
6.3 Caracterización de los metabolitos secundarios.	83
6.3.1 Caracterización del compuesto II .	84
6.3.2 Caracterización del compuesto IV .	96
6.3.3 Caracterización del compuesto III .	103
6.4 Aislamiento del metabolito mayoritario de la especie fúngica <i>Neorollandina mexicana</i> .	105
6.5 Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos derivados del estudio químico biodirigido de la especie <i>M. aurantiaca</i> .	114
6.6 Evaluación de las propiedades inhibitorias de la proteína calmodulina de los compuestos derivados del estudio químico biodirigido de la especie <i>M. aurantiaca</i> .	117
6.7 Efecto antibrasinoesteroidal de la malbranqueamida y la clorpromazina.	123

INDICE (continuación)

	Pág.
7. CONCLUSIONES	129
8. PERSPECTIVAS	131
9. BIBLIOGRAFÍA	132
10. APÉNDICE 1 (Espectros)	149
11. APÉNDICE 2 (Esquemas suplementarios)	174
12. APÉNDICE 3 (Artículos)	176

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Contenido	Pág.
1	Cicloadición intramolecular tipo [4+2] que genera el sistema de anillos bicíclico [2.2.2].	49
2	Formación del azadieno intermediario en la biosíntesis grupo de los alcaloides indólicos que presentan el bicíclico [2.2.2] diazaoctano.	50
3	Biogénesis de las paraherquamidas, VM55599, brevianamidas y malbranqueamida.	52
4	Separación de la malbranqueamida del cultivo M1.	65
5	Separación de la malbranqueamida del cultivo M4.	66
6	Separación de la malbranqueamida del cultivo M5.	67
7	Separación del ácido penicílico del cultivo M2.	68
8	Separación del ácido penicílico y la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida del cultivo M3.	69
9	Separación del polímero 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona del extracto orgánico del cultivo de la especie fúngica <i>N. mexicana</i> .	70

LISTA DE TABLAS

Tabla	Contenido	Pág.
1	Ejemplos selectos de compuestos fitotóxicos de origen natural aislados por el grupo de investigación del laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química.	3
2	Resumen de biotipos de malezas resistentes a los herbicidas de acuerdo al mecanismo de acción.	13
3	Metabolitos aislados de especies fúngicas del género <i>Malbranchea</i> .	20
4	Condiciones preliminares de fermentación del hongo <i>M. aurantiaca</i> .	61
5	Agentes cromógenos utilizados para el análisis cromatográfico.	63
6	Género y hábitat de los aislamientos fúngicos evaluados de manera preliminar.	75
7	Actividad biológica (CI ₅₀) y rendimiento de los extractos en pequeña escala preparados a partir de las especies evaluadas de manera preliminar.	75
8	Composición de los medios líquidos de crecimiento utilizados para la fermentación del hongo <i>M. aurantiaca</i> .	76
9	Condiciones de cultivo y rendimiento de biomasa y extractos obtenidos de las distintas fermentaciones a mediana escala de <i>M. aurantiaca</i> .	78

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla	Contenido	Pág.
10	Efecto fitotóxico de los extractos de <i>M. aurantiaca</i> sobre el crecimiento radicular (CI ₅₀) de <i>A. hypochondriacus</i> .	79
11	Compuestos aislados a partir del hongo <i>M. aurantiaca</i> , cultivo de procedencia y su rendimiento.	80
12	Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto II .	85
13	Datos de RMN de la malbranqueamida (CD ₃ OD) ¹ H (500 MHz) y ¹³ C (125 MHz).	88
14	Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto IV .	96
15	Datos de RMN del compuesto IV (CD ₃ OD) ¹ H (500 MHz) y ¹³ C (125 MHz).	101
16	Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto III .	104
17	Datos de RMN del compuesto III (CD ₃ OD) ¹ H (300 MHz) y ¹³ C (75 MHz).	104
18	Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto VII .	108
19	Datos de RMN del compuesto VII (CD ₃ OD) ¹ H (300 MHz) y ¹³ C (75 MHz).	109
20	Efecto del extracto y los compuestos II , III y IV sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> .	115
21	Efecto de los compuestos II y IV sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina.	118

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1	Vista macroscópica del hongo <i>M. aurantiaca</i> crecido en medio V8.	19
2	Vista macroscópica del hongo <i>N. mexicana</i> crecido en medio V8.	23
3	Estructura tridimensional de la calmodulina.	25
4	Estructura tridimensional de la calmodulina una vez que se ha unido al calcio.	25
5	Representación esquemática de los estímulos y respuestas mediadas por Ca^{2+} /CaM y proteínas similares (CMLs) en plantas.	27
6	Conjunto isotópico para el ion molecular.	84
7	Vista estereoscópica de la estructura obtenida por rayos X de la malbranqueamida.	93
8	Estructura obtenida por rayos X (--) sobrepuesta a la conformación de mínima energía obtenida por el análisis Monte Carlo del compuesto II .	94
9	Estructura obtenida por rayos X (--) sobrepuesta a la estructura optimizada por la metodología DFT.	94
10	Vista estereoscópica de la estructura obtenida por rayos X del compuesto IV .	103
11	Estructura de la (-)-liguralenólida.	102

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	Contenido	Pág.
12	(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,16 <i>S</i>)-4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.	111
13	Vista microscópica de las ascosporas del hongo <i>N. mexicana</i> .	113
14	Vista microscópica de las ascosporas del hongo <i>N. hyliaospora</i> .	113
15	Potencia relativa de las fitotoxinas aisladas de <i>M. aurantiaca</i> y la clorpromazina con respecto al 2,4-D.	116
16	Efecto de diferentes concentraciones del compuesto II y de la clorpromazina sobre la actividad del complejo Ca ²⁺ -CaM-PDE1.	119
17	Efecto de diferentes concentraciones del compuesto IV y de la clorpromazina sobre la actividad del complejo Ca ²⁺ -CaM-PDE1.	120
18	Efecto de diferentes concentraciones del compuesto IV sobre la actividad del complejo Ca ²⁺ -CaM-PDE1 en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina.	121
19	Actividad de la enzima PDE1 dependiente de CaM con concentraciones constantes de AMPc y CaCl ₂ .	122
20	Efecto de diferentes concentraciones de la brasinólida sobre el crecimiento radicular de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> .	124

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	Contenido	Pág.
21	Efecto antibrasinoesteroidal de diferentes concentraciones de malbranqueamida en semillas de <i>A. hypochondriacus</i> .	125
22	Efecto de diferentes concentraciones del compuesto II sobre el desenrollamiento de las hojas de trigo en presencia de diferentes concentraciones de brasinólida.	126
23	Efecto antibrasinoesteroidal de diferentes concentraciones de clorpromazina en semillas de <i>A. hypochondriacus</i> .	127
24	Efecto antibrasinoesteroidal de diferentes concentraciones del 2,4-D.	128

LISTA DE ESPECTROS

Espectro	Contenido	Pág.
1	Ampliaciones del espectro HMBC de la malbranqueamida. Correlaciones importantes para el establecimiento de los fragmentos B y C.	89
2	Espectro bidimensional COSY de la malbranqueamida.	91
3	Espectro bidimensional COSY de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida.	98
4	Espectro HMBC de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida.	100
5	Espectro de masas modalidad FAB negativo de la mezcla de polímeros de <i>N. mexicana</i> .	106
6	Espectro de masas modalidad FAB negativo de la 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.	107
7	Espectro bidimensional COSY de la 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan -2,6,10,14-tetrona.	110
8	Espectro de masas modalidad impacto electrónico del ergosterol.	150
9	Espectro de masas modalidad impacto electrónico del ácido linoleico.	151
10	Espectro de RMN- ¹ H del ácido linoleico.	152
11	Espectro de RMN- ¹³ C del ácido linoleico.	153
12	Espectro de RMN- ¹ H del ácido oleico.	154

LISTA DE ESPECTROS (Continuación)

Espectro	Contenido	Pág.
13	Espectro de RMN- ¹³ C del ácido oleico.	155
14	Espectro de IR de la malbranqueamida.	156
15	Espectro de masas modalidad impacto electrónico de la malbranqueamida.	157
16	Espectro de RMN- ¹ H de la malbranqueamida.	158
17	Espectro de RMN- ¹³ C de la malbranqueamida.	159
18	Espectro bidimensional HMBC de la malbranqueamida.	160
19	Espectro bidimensional NOESY de la malbranqueamida.	161
20	Espectro de IR de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida.	162
21	Espectro de masas modalidad impacto electrónico de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida.	163
22	Espectro de RMN- ¹ H de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida.	164
23	Espectro de RMN- ¹³ C de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida.	165
24	Espectro bidimensional homonuclear NOESY de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida.	166

LISTA DE ESPECTROS (Continuación)

Espectro	Contenido	Pág.
25	Espectro de masas modalidad impacto electrónico del ácido penicílico.	167
26	Espectro de RMN- ¹ H del ácido penicílico.	168
27	Espectro de RMN- ¹³ C del ácido penicílico.	169
28	Espectro bidimensional COSY del ácido penicílico	170
29	Espectro de IR de la mezcla de polímeros de <i>N. mexicana</i> .	171
30	Espectro de RMN- ¹ H de la 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.	172
31	Espectro de RMN- ¹³ C de la 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.	173

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
α	Rotación observada en el polarímetro
CaM	Calmodulina
CD	Dicroísmo circular
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
COSY	Correlación homonuclear
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
eV	Electron volts
°C	Grados centígrados
EMIE	Espectro de masas modalidad impacto electrónico
FAB ⁺	Bombardeo rápido de átomos modalidad positiva

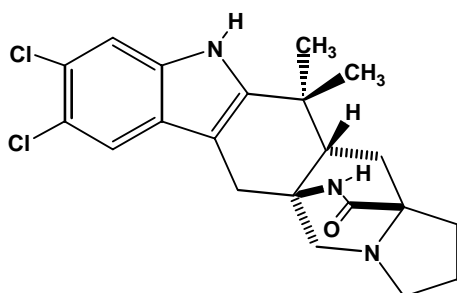
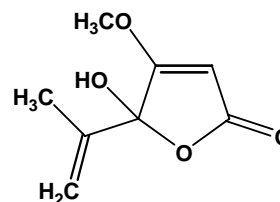
LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

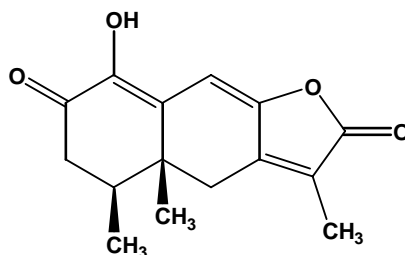
Abreviatura	Significado
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
Int. Rel.	Intensidad relativa
[M] ⁺	Ion molecular
[M-1] ⁺	Ion pseudomolecular
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
μM	Micromolar
MD-I	Medio mínimo
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singulete
sa	Singulete ancho
UV	Ultravioleta

RESUMEN.

El presente trabajo describe la investigación de los compuestos fitotóxicos de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca* y su efecto sobre la proteína calmodulina y las propiedades reguladoras del crecimiento y desarrollo vegetal promovidos por la brasinólida.

El estudio químico biodirigido de los extractos activos, preparados a partir del medio de cultivo y del micelio de *M. aurantiaca*, permitió el aislamiento y la purificación de seis metabolitos secundarios, dos de ellos con propiedades fitotóxicas. Los metabolitos activos se caracterizaron por métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X como (5a*S*,12a*S*,13a*S*)-8,9-dicloro-12,12-dimetil-2,3,11,12,12a,13-hexahidro-1*H*,6*H*-5a,13a(epiminometano)indolizino [7,6b]carbazol-14-ona (**II**) y la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida (**IV**). El producto **II** se designó con el nombre trivial de malbranqueamida. De manera adicional, se aislaron y caracterizaron el ácido penicílico (**III**), el ergosterol (**I**), el ácido linoléico (**V**) y el ácido oléico (**VI**).

**(II)****(III)**



(IV)

La determinación del efecto de los compuestos aislados sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de la maleza *Amaranthus hypochondriacus* permitió establecer que los metabolitos **II** – **IV** presentan propiedades fitotóxicas significativas. De hecho los compuestos **III** y **IV** mostraron una mayor potencia que la del 2,4-D.

Con la finalidad de obtener información acerca del posible mecanismo de acción se evaluó el efecto de los compuestos **II** y **IV** sobre la proteína calmodulina. Este efecto fue analizado mediante un método enzimático funcional usando a la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina (PDE1) como monitora de la actividad de la calmodulina.

Mediante la aplicación de esta metodología se comprobó que el compuesto **II** inhibe la activación de la PDE1 de manera dependiente de la concentración. El valor de la CI_{50} calculada fue de 3.65 μM , mostrando un efecto comparable al de la clorpromazina ($CI_{50} = 2.75 \mu\text{M}$). Para obtener mayor información acerca del papel de la calmodulina en la inhibición del complejo CaM-PDE1, se realizó un análisis cinético de

la inhibición de la actividad de la PDE1 usando diferentes cantidades de calmodulina en la presencia de diferentes concentraciones de la fitotoxina **II**. El resultado de este experimento ($K_i = 7.4 \mu\text{M}$) indicó que el metabolito **II** es un antagonista competitivo de la calmodulina y que actúa compitiendo con la formación del complejo activo CaM-PDE1.

El efecto del compuesto **IV** sobre la PDE1 fue similar al de la malbranqueamida (**II**). Este compuesto también inhibió la activación de la PDE1 ($CI_{50} = 10.2 \mu\text{M}$) y su efecto incluso fue mayor que el de la clorpromazina ($CI_{50} = 18.4 \mu\text{M}$).

El efecto antibrasinoesteroide de la malbranqueamida se determinó mediante la inhibición del crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* promovida por la brasinólida. Este efecto de la malbranqueamida se comprobó utilizando el bioensayo del desenrollamiento de las hojas de trigo. El análisis cinético realizado en este ensayo demostró que la malbranqueamida inhibe de manera acompetitiva el efecto de los brasinoesteroides en las hojas de trigo.

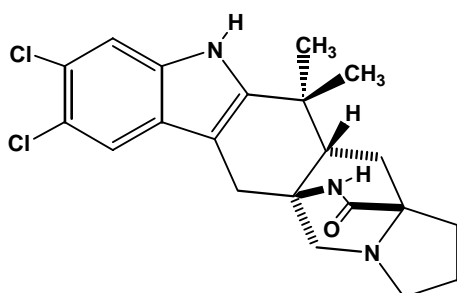
ABSTRACT.

As a part of a research program to discover potential herbicidal agents from selected fungi from Mexico, it was found that the organic extracts prepared from the culture broth of the coprophilous fungus *Malbranchea aurantiaca* induced significant inhibition of radicle growth of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus*.

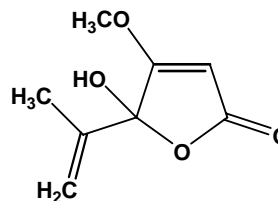
Bioactivity-guided fractionation of a phytotoxic extract ($IC_{50} = 195.0 \mu\text{g/ml}$) from a fermentation accomplished in dark conditions at 25 °C led to the isolation of two phytotoxins, which were characterized as 1-hydroxy-2-oxoeremophil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olide (**IV**), a new natural product, and penicillic acid (**III**), a known phytotoxin. On the other hand, from the active extract from the mycelium and broth obtained from the fermentation of *M. aurantiaca* carried out in warmer surroundings (~32 °C) and under natural day-light cycles, a novel indole alkaloid characterized as (5a*S*,12a*S*,13a*S*)-8,9-dichloro-12,12-dimethyl-2,3,11,12,12a,13-hexahydro-1*H*,6*H*-5a,13a(epiminomethano)indolizino[7,6*b*]carbazol-14-one was obtained. The latter phytotoxin was given the trivial name of malbrancheamide (**II**). The structures of these compounds were established on the basis of spectroscopic and spectrometric methods.

Compounds **II-IV** were evaluated for their ability to inhibit the germination and radicle growth of the seeds of *A. hypochondriacus*. In general, the tested compounds

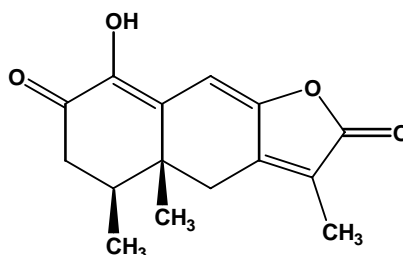
showed significant phytotoxic activity reducing the radicle growth of the target species in a concentration-dependent manner. The activity of compounds **III** and **IV** was comparable to that of 2,4-D.



(II)



(III)



(IV)

Once the phytotoxic activity of the compounds was evaluated, their effect on calmodulin (CaM) was established. Their effect on CaM was analyzed by means of a functional enzymatic assay using bovine brain CaM-sensitive *c*AMP phosphodiesterase (PDE1) as monitoring enzyme. PDE1 catalyzes the hydrolysis of cyclic nucleotides to nucleotide monophosphates. The activity of PDE1 was quantified spectrophotometrically using the Sharma and Wang method.

Phytotoxin **II** inhibited the activation of PDE1 in a concentration-dependent manner. The IC_{50} calculated value was 3.65 μ M. This effect was comparable to that of chlorpromazine (IC_{50} = 2.75 μ M) a well characterized CaM antagonist.

In order to obtain further evidence of the involvement of CaM in the inhibition of CaM-PDE1, a kinetic analysis of the inhibition of the activity of PDE1 was assessed using different amounts of CaM in the presence of different concentrations of **II**. The results of this experiment ($K_i = 47.4 \mu\text{M}$) suggested that compound **II** acts as competitive antagonist of CaM, thus competing with the formation of the CaM-PDE1 active complex.

The effect of compound **IV** on PDE1 was similar that the compound **II**. The activation of the calmodulin-sensitive PDE1 was inhibited in the presence of phytotoxin **IV** ($\text{IC}_{50} = 10.2 \mu\text{M}$) and CaM. The effect of compound **IV** was higher than that of chlorpromazine ($\text{IC}_{50} = 18.4 \mu\text{M}$).

The antibrassinosteroid effect of malbrancheamide was assessed by measuring its action on the germination and radicle growth of the seedlings of *A. hypochondriacus* provoked by brassinolide. This effect was corroborated using the wheat leaf unrolling bioassay. These results of this assay ($K_i = 2.46 \mu\text{M}$) indicated that compound **II** acts as acompetitive antagonist of brassinolide.

1. INTRODUCCIÓN.

El interés por los productos naturales en los programas de descubrimiento de nuevos herbicidas se ha intensificado notablemente en los últimos años. Muchos factores han contribuido a este renovado interés por los productos naturales como agentes herbicidas potenciales. En primer lugar, los progresos en el diseño e innovación tecnológica, así como el desarrollo de los métodos analíticos utilizados para la separación y la caracterización de los productos naturales han reducido considerablemente los costos de obtención de estos productos. De tal forma que las industrias agroquímicas han intensificado las investigaciones para desarrollar nuevos herbicidas a partir de las más diversas fuentes naturales (Saxena y Pandey, 2001; Duke et al., 2002; Singh et al., 2003). Además, los productos naturales son biodegradables, a menudo poseen blancos de acción específicos y sus estructuras constituyen compuestos líderes invaluable para el desarrollo de nuevos agroquímicos (Saxena y Pandey, 2001; Duke et al., 2002; Singh et al., 2003).

En el marco de este renovado interés por el estudio de los productos naturales como fuentes potenciales de agentes herbicidas, se ha enfatizado el estudio de microorganismos ya que en repetidas ocasiones se ha comprobado que los mismos biosintetizan productos fitotóxicos con estructuras novedosas. Además, las fitotoxinas de microorganismos generalmente tienen blancos de acción más específicos que las fitotoxinas aisladas de otras fuentes naturales (Saxena y Pandey, 2001; Duke et al., 2002; Singh et al., 2003).

Para el descubrimiento de compuestos fitotóxicos a partir de microorganismos se han utilizado varias estrategias siendo la más efectiva la que se resume a continuación:

En primer lugar, se realiza la preselección de las materias primas naturales. Una vez seleccionadas, es necesario cultivarlas en pequeña escala para establecer las condiciones apropiadas de fermentación. Posteriormente, se preparan los extractos del medio de cultivo

y de la biomasa utilizando los disolventes apropiados. El siguiente paso consiste en realizar pruebas biológicas de selección. Para ello se mide el efecto fitotóxico de los extractos derivados del medio de cultivo y/o biomasa sobre la germinación y el crecimiento de varias especies vegetales (Macias et al., 2002). Los extractos que demuestren respuestas positivas en los ensayos de fitoinhibición se consideran candidatos apropiados para su estudio químico biodirigido con la finalidad de aislar los principios fitotóxicos. Para el estudio biodirigido se emplean a lo largo de todo el proceso los mismos ensayos biológicos del proceso de selección. De manera alternativa, se puede emplear un método bioautográfico (Rahalison et al., 1994). Una vez que se separan los compuestos activos se identifican mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X. Posteriormente, los compuestos puros se someten a pruebas biológicas tanto de carácter específico como general. Por último, se realizan estudios adecuados para determinar el mecanismo de acción de los agentes fitotóxicos.

En el laboratorio 124 de la Facultad de Química, desde hace varios años se ha desarrollado un programa conducente al aislamiento de fitotoxinas de origen natural aplicando la secuencia metodológica recién descrita. Los estudios realizados han conducido al aislamiento y elucidación estructural de numerosos metabolitos secundarios con efectos fitotóxicos notables y con una gran diversidad estructural. En la Tabla 1 se muestran ejemplos selectos de compuestos fitotóxicos aislados en este grupo de trabajo.

La presente investigación pretende dar continuidad al aislamiento y la caracterización de compuestos fitotóxicos fúngicos novedosos promisorios para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas con un efecto sobre la proteína calmodulina y los brasinoesteroides.

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos fitotóxicos de origen natural aislados por el grupo de investigación del laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química.

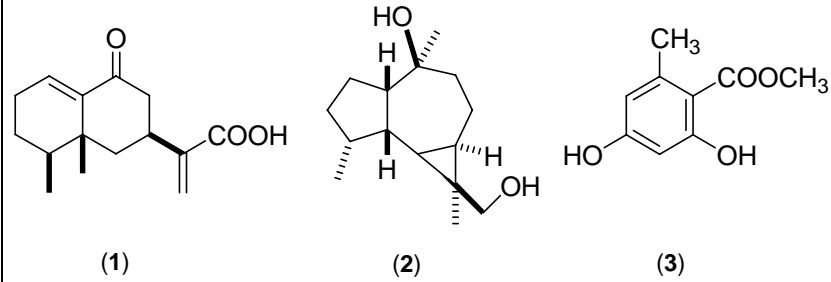
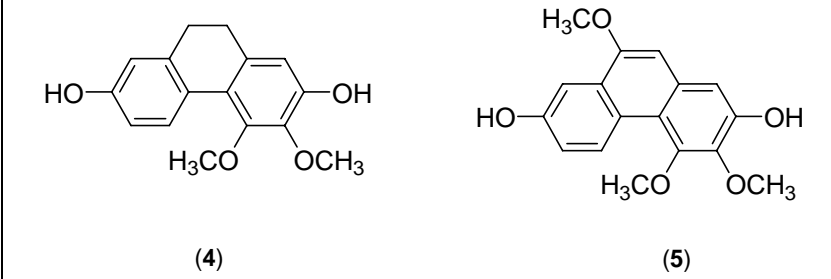
Fitotoxinas de <i>Flourensia cernua</i> (Asteraceae) (Mata et al., 2003)	Actividad fitotóxica encontrada.
 <p>(1) (2) (3)</p>	<p>Los compuestos 1-3 inhiben el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crus-galli</i> con CI_{50}'s de 0.196, 0.412, 0.92 μM y de 0.62, 4.2 y 0.31 μM respectivamente.</p> <p>Los compuestos 1-3 afectan la movilidad electroforética de la calmodulina.</p>
Fitotoxinas de <i>Maxillaria densa</i> (Orchidaceae). (Valencia-Islas et al., 2002)	Actividad fitotóxica encontrada.
 <p>(4) (5)</p>	<p>Los compuestos 4 y 5 inhiben el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> con CI_{50}'s de 58.2 y 330 μM, respectivamente.</p> <p>En <i>Lemna pausicostata</i>, los compuestos 4 y 5 provocan ruptura celular, inhibición del crecimiento y reducción del contenido de clorofila</p>

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos fitotóxicos de origen natural aislados por el grupo de investigación del laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (Continuación).

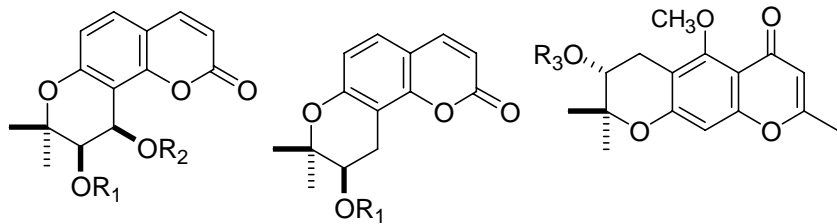

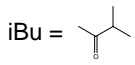
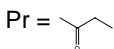
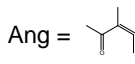
Fitotoxinas de <i>Prinosciadium watsoni</i> (Umbelliferae) (Valencia-Islas et al., 2002)				Actividad fitotóxica encontrada.			
				<p>Todos los metabolitos inhiben el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> en un rango de CI_{50}'s de 6.19 a 863 μM.</p> <p>Los compuestos 12 y 13 reducen el crecimiento y el contenido de clorofila de <i>Lemna pausicostata</i>.</p> <p>Todos los compuestos modifican la movilidad electroforética de la proteína calmodulina.</p>			
	R ₁	R ₂		R ₁		R ₃	
(6)	Ac	Pr	(12)	Ang	(14)	iBu	
(7)	H	iBu	(13)	iBu	(15)	Ang	
(8)	Ang	H			(16)	H	
(9)	Ac	iBu					
(10)	Ac	Ac					
(11)	H	H					
			Ac = 		iBu = 		
			Pr = 		Ang = 		

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos fitotóxicos de origen natural aislados por el grupo de investigación del laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (Continuación).

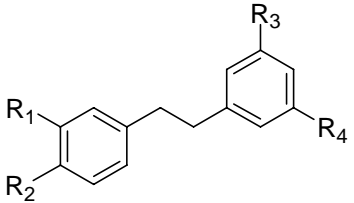
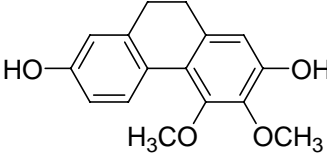
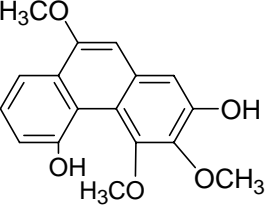
Fitotoxinas de <i>Epidendrum rigidum</i> (Orchidaceae). (Hernandez-Romero et al., 2005)	Actividad fitotóxica encontrada.
<div style="text-align: center;">  <p>(17) R₁ = OCH₃; R₂ = OH; R₃ = OCH₃, R₄ = OH (18) R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = OCH₃, R₄ = OH</p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>(19)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(20)</p> </div> </div>	<p>Los compuestos 17-20 inhiben el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> con CI₅₀'s de 0.65, 0.1, 0.12 y 5.9 μM, respectivamente.</p> <p>Todos los compuestos causan ruptura celular e inhiben el crecimiento de <i>Lemna pausicostata</i>.</p> <p>Todos los compuestos modifican la movilidad electroforética de la proteína calmodulina. Los compuestos 17 y 18 inhiben a la PDE1 de cerebro de bovino con CI₅₀'s de 7.0 y 13.3 μM, respectivamente.</p>

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos fitotóxicos de origen natural aislados por el grupo de investigación del laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (Continuación).

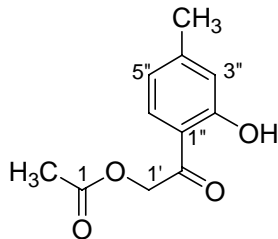
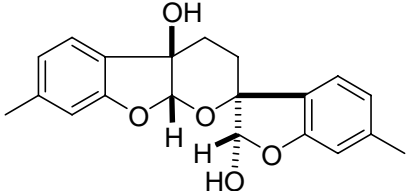
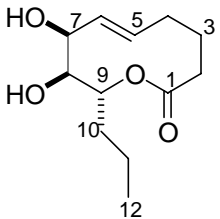
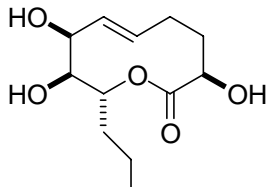
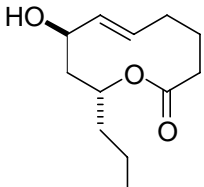
Fitotoxinas de <i>Hofmeisteria schaffneri</i> (Asteraceae) (Pérez-Vásquez et al., 2005)	Actividad fitotóxica encontrada.
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>(21)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(22)</p> </div> </div>	<p>Los compuestos 21 y 22 inhiben el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> con CI_{50}'s de 380 y 12 μM, respectivamente.</p> <p>Los compuestos 21 y 22 inhiben la activación de la PDE1 por parte de la calmodulina (CaM) con CI_{50}'s 4.4 y 4.2 μM, respectivamente.</p>
Fitotoxinas del hongo <i>Phoma herbarum</i> (Rivero-Cruz et al., 2005)	Actividad fitotóxica encontrada.
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>(23)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(24)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(25)</p> </div> </div>	<p>Los compuestos 23-25 inhiben del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> con CI_{50}'s de 35.8, 54.3 y 125.4 μM, respectivamente.</p> <p>Todos los compuestos modifican la movilidad electroforética de la proteína calmodulina. Los compuestos 23 y 24 interfieren con la activación de la PDE1.</p>

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos fitotóxicos de origen natural aislados por el grupo de investigación del laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (Continuación).

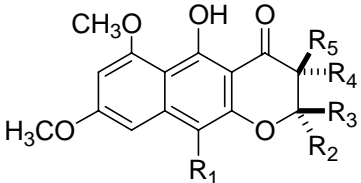
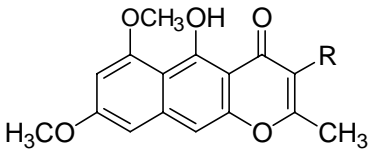
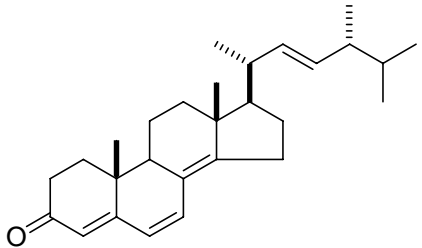
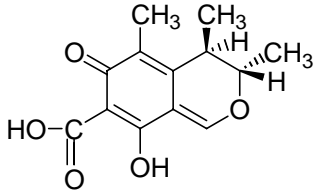
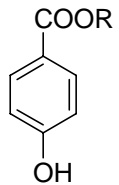
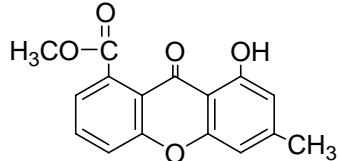
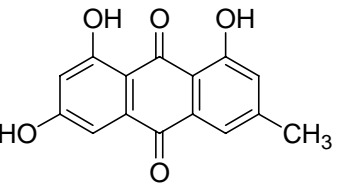
Fitotoxinas del hongo <i>Guanomyces polythrix</i> (Macias et al., 2000, 2001; Mata et al., 2003)	Actividad fitotóxica encontrada.
 <p>(26) R₁=H, R₂=CH₃, R₃=H, R₄=H, R₅=CH₃ (27) R₁=CH₃O, R₂=CH₃, R₃=H, R₄=H, R₅=CH₃ (28) R₁=H, R₂=CH₃, R₃=H, R₄=H, R₅=H (29) R₁=CH₃O, R₂=CH₃, R₃=H, R₄=H, R₅=H (30) R₁=H, R₂=CH₃, R₃=H, R₄=CH₃, R₅=H (31) R₁=CH₃O, R₂=CH₃, R₃=H, R₄=CH₃, R₅=H</p>  <p>(32) R=CH₃ (33) R=H</p>	<p>Todos los compuestos inhiben el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> en un rango de CI₅₀'s de 13 a 320 μM.</p> <p>Los compuestos 26-35 modifican la movilidad electroforética de la proteína calmodulina, así como la activación de la PDE1 de cerebro de bovino.</p> <p>Los compuestos 30, 34, 35 y 36 inhiben a la enzima NADK de chícharo dependiente de calmodulina.</p>

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos fitotóxicos de origen natural aislados por el grupo de investigación del laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (Continuación).

Fitotoxinas aisladas deL hongo <i>Guanomyces polythrix</i> (Macias et al., 2000, 2002; Mata et al., 2003)	Actividad fitotóxica encontrada.
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>(34)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(35)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>(37) R=H (39) R=CH₃</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(36)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(38)</p> </div> </div>	<p>Todos los compuestos inhiben el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> en un rango de CI₅₀'s de 13 a 320 μM.</p> <p>Los compuestos 26-35 modifican la movilidad electroforética de la proteína calmodulina, así como la activación de la PDE1 de cerebro de bovino.</p> <p>Los compuestos 30, 34, 35 y 36 inhiben a la enzima NADK de chícharo dependiente de calmodulina.</p>

2. ANTECEDENTES

2.1 IMPACTO DE LOS HERBICIDAS SINTÉTICOS EN LA AGRICULTURA.

La agricultura es la actividad humana que más estrecha relación tiene con la subsistencia humana en el mundo, ya que es indispensable para satisfacer las necesidades de alimentos de la creciente población mundial. A lo largo del tiempo esta actividad ha evolucionado significativamente y hoy día constituye una de las industrias más relevantes a nivel global.

Sin embargo, la agricultura altamente industrializada ha causado efectos adversos sobre el medio ambiente y las tierras de cultivo ya que áreas originalmente fértiles han dejado de serlo por completo.

Los principales problemas a los que se enfrenta la agricultura actualmente son:

- Proliferación de las malas hierbas.
- Aparición de biotipos de malezas resistentes a los herbicidas de uso comercial.
- Contaminación de ríos, lagos y aguas subterráneas con nitrógeno y fósforo elementos presentes en los fertilizantes químicos y agentes biocidas de mayor uso.
- Transformación de ecosistemas naturales de todo tipo en terrenos cultivados.
- Pérdida de la biodiversidad.
- Erosión de los terrenos.
- Agotamiento de los minerales del suelo.
- Salinización del suelo en zonas secas.

Muchos de estos problemas han ocasionado el agotamiento de los suelos cultivables obligando a los agricultores ha abandonar unos terrenos para arar otros nuevos que, a su vez se agotan, creando un círculo vicioso que va destruyendo el entorno gradualmente.

Estas circunstancias hacen evidente la urgencia de respuestas efectivas al doble reto de aumentar la productividad agrícola al tiempo de alcanzar un manejo ambientalmente adecuado de los recursos. Además, se requieren hacer cambios encaminados a reducir el impacto ambiental negativo que ha tenido la intensificación de la agricultura, la mayoría de las veces por el uso indiscriminado de los herbicidas indispensables para la eliminación de las malezas.

La palabra maleza o “mala hierba” se utiliza para designar a una planta que crece en un lugar no deseado especialmente en cultivos o jardines donde estas interfieren con el crecimiento de plantas cultivables. Mediante el análisis del polen de distintas malezas y plantas cultivables se ha visto que ambos tipos de vegetales han evolucionado de manera conjunta desde tiempos inmemoriales.

Las malezas tienen ciertos rasgos o características que les permite una rápida proliferación. Los más importantes son: su rápida reproducción, crecimiento veloz de sus radículas en la fase sexual, plasticidad fenotípica y una alta tolerancia a la heterogeneidad ambiental asociada con estas plantas (Kohli et al., 2006; Singh et al., 2003). Cabe señalar que las malezas representan solamente el 0.1% de la flora mundial y que su origen es múltiple; algunas son introducidas de una área geográfica a otra para algún propósito útil, posteriormente aumenta su población y toman su papel de malezas. Otras invaden de manera accidental los cultivos (Kohli et al., 2006; Singh et al., 2003). Algunos reportes de la India, México y otras partes del mundo señalan que las malezas pueden ser útiles como alimento, forraje, fibra y remedios tradicionales. Así mismo se estima que al alrededor de 240 de estas especies son alelopáticas (Altieri, 1988; Liebman, 2001; Kohli et al., 2006).

El impacto negativo de las malezas en agro- y otros ecosistemas ha sido destacado por diversos investigadores (Shaw, 1988; Zimdahl, 1999; Liebman et al., 2001; Kohli et al., 2006). Los daños más frecuentes que ocasionan las malezas son los siguientes:

- Compiten con las plantas cultivables por los nutrientes del suelo.
- Incrementan los costos de producción de los cultivos de utilidad.
- Reducen la calidad de los cultivos.
- Causan problemas en el manejo del agua y de salud humana.
- Disminuyen el valor de la tierra.
- Reducen el número de especies cultivables en determinados terrenos.
- Disminuyen la estética de los jardines y terrenos de cultivo.
- Son refugio de insectos y patógenos.
- Ocasionan con frecuencia grandes incendios.

El costo de erradicar las malezas es muy grande. En los Estados Unidos, las malezas causan cerca del 12% de pérdidas en el rendimiento de los cultivos de importancia económica, dicho costo es cercano a los 35 billones de dólares (Singh et al., 2003). En el año 2002, por ejemplo, la venta global de herbicidas fue de aproximadamente 28 millones de dólares, es decir el 47% del total de agroquímicos usados en el mundo (Agror, 2003). Cabe resaltar que el costo de estos productos aumenta considerablemente cada año, debido a las complicaciones cada vez mayores para el control de las malezas (Kohli et al., 2006; Singh et al., 2003).

El esfuerzo para controlar a las malezas es tan viejo como la agricultura misma. Para el control de las malezas existen varias técnicas. Las primeras fueron de tipo manual y mecánico. Posteriormente, se utilizó la rotación de cultivos y las prácticas de policultivo. Con el surgimiento de los herbicidas sintéticos el rendimiento de los cultivos se incrementó de manera considerable (Kohli et al., 2006; Singh et al., 2003).

En los pasados cuarenta y cinco años, se han descubierto y comercializado alrededor de 270 herbicidas. La mayoría de estos compuestos son de origen sintético. Sin embargo, durante los 80 el control químico de malezas empezó a perder popularidad

debido al aumento en los costos de cultivo y, a los riesgos ambientales y de salud asociados con su uso. Además los herbicidas sintéticos han conducido al rápido desarrollo de malezas resistentes (Cole et al., 2000).

En la actualidad, se han identificado aproximadamente 313 biotipos de malezas resistentes pertenecientes a 183 especies -110 dicotiledóneas y 73 monocotiledóneas- todos relacionados con el uso de los herbicidas comerciales (Heap, 2006). Las 10 malezas de mayor importancia económica que han desarrollado resistencia a los herbicidas son: el vellico (*Lolium rigidum*), la avena silvestre (*Avena fatua*), el bleo o sabia (*Amaranthus retroflexus*), el chaguaquelite o quelite verde (*Chenopodium album*), la cola de zorro (*Setaria viridis*), el zacate pinto (*Echinochloa crus-galli*), la pata de gallo o zacatón (*Eleusine indica*), la coquia (*Kochia scorparia*), la hierba caballo (*Conzya canadiensis*) y el quelite blanco (*Amaranthus hybridus*) (Heap, 2007).

Los principales factores de riesgo para que las malezas generen resistencia a los herbicidas son los siguientes: i) La aplicación recurrente de herbicidas eficaces con un mecanismo de acción idéntico. ii) El surgimiento de malezas que crecen con una densidad de población alta y amplia distribución, genéticamente variables, productoras de semillas proliferables y que tienen mecanismos eficientes de diseminación de sus genes (semillas o polen). iii) La prevalencia de sistemas de cultivo simples que favorecen a unas cuantas especies dominantes (Kohli et al., 2006; Singh et al., 2003).

La resistencia de las malezas a los herbicidas puede ser de dos tipos: a) resistencia cruzada (un sólo mecanismo de resistencia conferido por uno o más genes) y b) resistencia múltiple (dos o más mecanismos de resistencia) (Singh et al., 2003).

Una estrategia importante para evitar la resistencia de las malezas a los herbicidas es la aplicación de dos o más herbicidas con distintos mecanismos de acción en el mismo cultivo. Esta estrategia es de utilidad cuando el mecanismo que la confiere se basa en el

sitio de acción, la especie de maleza se poliniza así misma o la propagación de sus semillas es restringida (Kohli et al., 2006; Singh et al., 2003). En relación al sitio de acción, desafortunadamente, los herbicidas comerciales de uso rutinario generalmente tienen el mismo o similar modo de acción. De tal forma que el 50 % de los herbicidas comerciales afectan principalmente unos pocos blancos de acción como se indica en la tabla 2 (Heap, 2006).

Tabla 2. Herbicidas que han provocado la aparición de especies resistentes de malezas.

Familia química	Ejemplo de herbicida comercial	Modo de acción	Especies resistentes
Bipiridilos	Paraquat	Fotosistema I- Interferencia con el transporte de electrones	23
Sulfonilureas Imidazolinonas Triazolopirimidinas Pirimidinil benzoatos Sulfonilaminocarbonil- triazolinonas	Clorsulfuron Imazapic Diclosulan Piribenzoxin Flucarbazona- Na	Inhibición de la acetolactato sintasa	95

Tabla 2. Herbicidas que han provocado la aparición de especies resistentes de malezas
(Continuación).

Familia química	Ejemplo de herbicida comercial	Modo de acción	Especies resistentes
Triazinas	Atrazina		
Triazinonas	Metamitron		
Triazolinonas	Amicarbazona		
Uracilos	Bromacilo	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II.	87
Piridazinonas	Pirazon		
Fenilcarbamatos	Fenmedifan		
Ureas	Diuron		
Amidas	Propanil-pentanocloro		
Nitrilos	Bromofenoxina		
Benzotiadiazinonas	Bentazona		
Fenilpiridazinas	Priridafol		
Carbamatos	Propam		

Tabla 2. Herbicidas que han provocado la aparición de especies resistentes de malezas
(Continuación).

Familia química	Ejemplo de herbicida comercial	Modo de acción	Especies resistentes
Cloroacetamidas Acetamidas Oxiacetamidas Tetrazolinonas	Acetocloro Difenamida Flufenacet Fentrazamida	Inhibición de la división celular	3
Difeniléteres Fenilpirazoles	Oxifluorfenó Fluazolato	Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa	3
N-fenilftalimididas Triazolinonas Oxazolidinedionas Pirimidindionas	Flumioxazina Azafenidina Pentoxazona Benzofendizona		
Triazoles Isoxazolidinonas	Amitrol Clomazona	Decoloración: Inhibición de la biosíntesis de carotenoides en un paso desconocido.	4

Tabla 2. Herbicidas que han provocado la aparición de especies resistentes de malezas
(Continuación).

Familia química	Ejemplo de herbicida comercial	Modo de acción	Especies resistentes
Piridazinonas	Norflurazona	Decoloración: Inhibición de la biosíntesis de carotenoides en el paso de la fitoeno desaturasa	2
Piridinecarboxamidas	Diflufenican		
Dinitrofenoles	DNOC	Daño a la membrana celular	0
Tiocarbamatos	Triallato	Inhibición de la síntesis de lípidos	8
Fosforoditioatos	Bensulida		
Benzofuranos	Benfuresato		
Ácidos cloro-carbónicos	TCA		
Carbamatos	Asulan	Inhibición de la dihidropteroato sintasa	0
Ácidos fosfónicos	Bialafos	Inhibición de la glutamino sintetasa	0

Tabla 2. Herbicidas que han provocado la aparición de especies resistentes de malezas
(Continuación).

Familia química	Ejemplo de herbicida comercial	Modo de acción	Especies resistentes
Ácidos fenoxi-carboxílicos	2,4-D	Mimetizan la acción del ácido indoleacético	25
Ácidos benzoicos	Dicamba		
Ácidos piridin-carboxílicos	Picloran		
Ácidos quinolin-carboxílicos	Quinclorac		
Dinitroanilinas	Trifluralina	Inhibición del ensamblaje de los microtúbulos	10
Fosforoamidatos	Butamifos		
Piridinas	Tiazopir		
Benzamidas	Pronamida		
Ácidos benzoicos	DCPA		
Nitrilos	Diclobenilo	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	1
Benzamidas	Isoxaben		
Triazolocarboxamidas	Flupoxan		
Quinolinas	Quinclorac		

Tabla 2. Herbicidas que han provocado la aparición de especies resistentes de malezas
(Continuación).

Familia química	Ejemplo de herbicida comercial	Modo de acción	Especies resistentes
Ariloxifenoxipropionatos Ciclohexanediona Fenilpirazolinás	Metil-diclofop Aloxidina Pinoxaden	Inhibición de la acetil CoA carboxilasa	35
Glicinas	Glifosato	Inhibición de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa	12
Ácidos arilaminopropionicos Pirazoles Organoarsénicos	Flamprop-M Difenzoquat DSMA	Blanco desconocido	4
Número de biotipos resistentes a los herbicidas de acuerdo al mecanismo de acción.			313

2.2 Antecedentes del hongo coprófilo *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmich.

El hongo *Malbranchea aurantiaca* (Figura 1) pertenece a la familia Gymnoascaceae y fue descrito taxonómicamente en 1976 por Sigler y Carmich. La especie se ha aislado del suelo o excremento de animales en la India, Centro América, Australia, EU y Bélgica. Algunas cepas son moderadamente y otras marcadamente queratolíticas.

Aunque *M. aurantiaca* no cuenta con estudios químicos previos, a partir de otras especies del mismo género se han aislado benzoquinonas, hidroquinonas, benzofuranos y otros compuestos aromáticos. En la tabla 2 se indican los compuestos aislados y caracterizados de *M. pullchella* y *M. cinnamomea*.



Figura 1. Vista macroscópica del hongo *M. aurantiaca* crecido en medio V8.

Tabla 3. Metabolitos aislados de especies fúngicas del género *Malbranchea*.

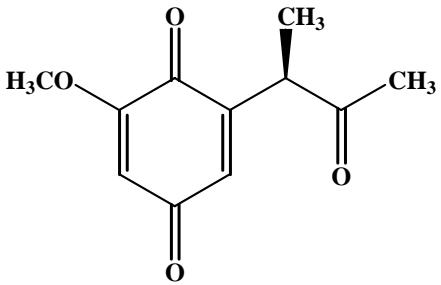
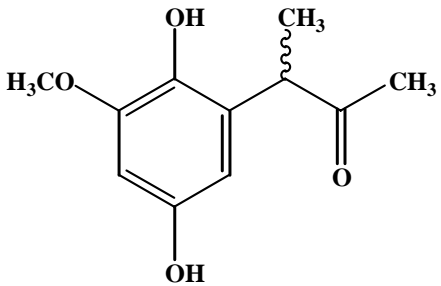
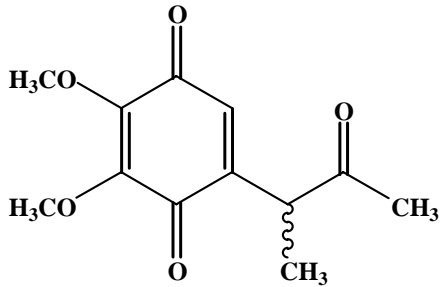
COMPUESTO	ESPECIE
 <p style="text-align: center;">malbranicina (40)</p>	<p style="text-align: center;"><i>Malbranchea cinnamomea</i></p> <p style="text-align: center;">(Chiang et al., 1993)</p>
 <p style="text-align: center;">dihidromalbranicina (41)</p>	<p style="text-align: center;"><i>Malbranchea cinnamomea</i></p> <p style="text-align: center;">(Schlegel, et al., 2003)</p>
 <p style="text-align: center;">7-metoximalbranicina I (42)</p>	<p style="text-align: center;"><i>Malbranchea cinnamomea</i></p> <p style="text-align: center;">(Schlegel, et al., 2003)</p>

Tabla 3. Metabolitos aislados de especies fúngicas del género *Malbranchea*
(Continuación).

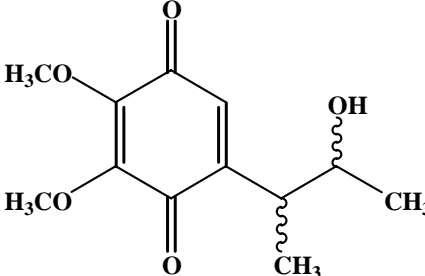
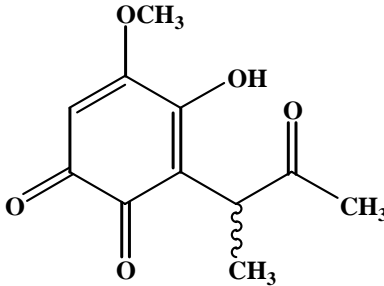
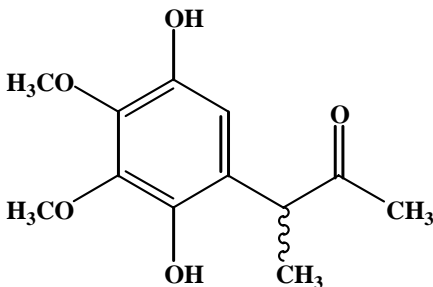
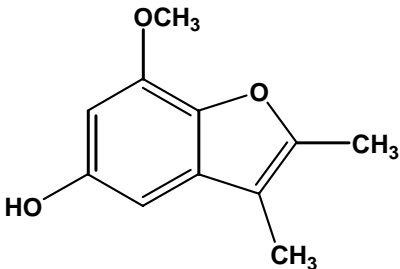
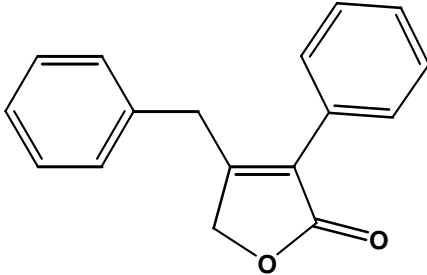
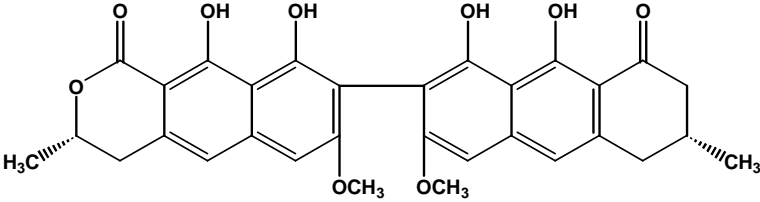
COMPUESTO	ESPECIE
 <p>7-metoximalbranicina II (43)</p>	<p><i>Malbranchea cinnamomea</i> (Schlegel, et al., 2003)</p>
 <p>7-metoximalbranicina III (44)</p>	<p><i>Malbranchea cinnamomea</i> (Schlegel, et al., 2003)</p>
 <p>7-metoximalbranicina IV (45)</p>	<p><i>Malbranchea cinnamomea</i> (Schlegel, et al., 2003)</p>

Tabla 3. Metabolitos aislados de especies fúngicas del género *Malbranchea*
(Continuación).

COMPUESTO	ESPECIE
 <p>7-metoxi-2,3-dimetilbenzofuran-5-ol (46)</p>	<p><i>Malbranchea cinnamomea</i> (Schlegel, et al., 2003b)</p>
 <p>4-benzil-3-fenil-5H-furan-2-ona (47)</p>	<p><i>Malbranchea filamentosa</i> (Hosoe et al., 2005)</p>
 <p>Tf-26VX (48)</p>	<p><i>Malbranchea pulchella</i> (Saito et al., 1979)</p>

2.3 Antecedentes del hongo *Neorollandina mexicana* M. C. González, Hanlin et Glenn.

Neorollandina mexicana (Figura 2) es una especie fúngica novedosa, perteneciente a la familia Gymnoascaceae. Aunque este hongo se aisló años atrás de la arena del suelo intermareal de una playa de Acapulco, Estado de Guerrero, su clasificación taxonómica se describió hasta el año 2006 (González et al., 2006).

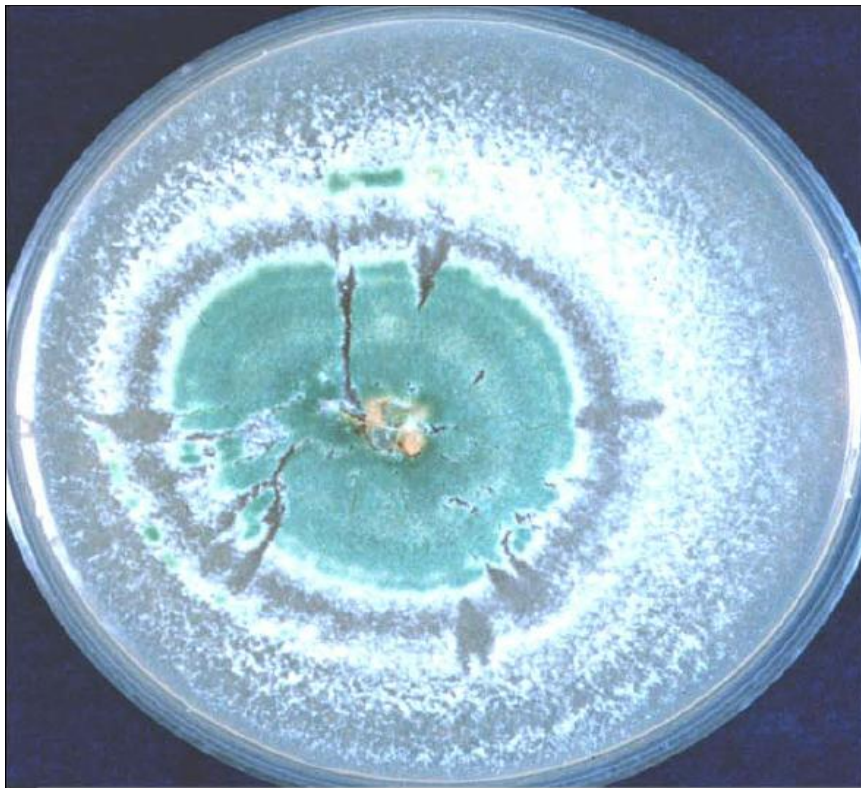


Figura 2. Vista macroscópica del hongo *N. mexicana* crecido en medio V8.

Inicialmente, este hongo fue clasificado dentro del género *Gymnascella*, pero posteriormente una comparación detallada con las especies relacionadas *G. aurantiaca*, *G. dankaliensis*, *G. hyalinospora*, *Gymnoascus reessii* y *Rollandina hyalinospora* determinó

que este aislamiento posee características morfológicas distintas. El análisis morfológico y la secuenciación del DNA del hongo permitieron incluir al aislamiento fúngico en la familia Gymnoascaceae. También, indicaron que el hongo pertenece a un nuevo género al que se designó como *Neorollandina*. A la nueva especie se le nombró *Neorollandina mexicana*.

2.4 La proteína calmodulina como blanco de compuestos fitotóxicos.

La calmodulina (CaM) es una proteína ubicua que se enlaza al calcio y regula muchos procesos celulares a través de su interacción con una gran variedad de proteínas blanco en plantas y animales. La proteína es de bajo peso molecular (16 a 18 kD) y está constituida en promedio por 148 aminoácidos arreglados en dos dominios globulares que están conectados por una larga hélice flexible (Figura 3). Cada dominio globular contiene dos sitios funcionales que se unen al ion calcio. Al enlazarse al calcio la CaM expone dos superficies hidrofóbicas rodeadas por una carga negativa, una en cada dominio globular (Figura 4). Entonces el complejo Ca^{2+} -CaM puede enlazarse a las largas cadenas de las enzimas que modula a través de interacciones hidrofóbicas (Chin y Means, 2000; Bouché et al., 2005).

La mayoría de los sitios de unión conocidos de la CaM están constituidos por fragmentos de 12 a 30 aminoácidos que de manera característica contienen una carga positiva. Las interacciones electrostáticas contribuyen principalmente a la estabilidad del complejo CaM-enzima blanco. Las primeras estructuras resueltas en tres dimensiones de los complejos CaM-enzimas blanco sugieren que los dos dominios globulares de la CaM se enrollan alrededor de la enzima, formando una estructura globular (Chin y Means, 2000; Bouché et al., 2005).

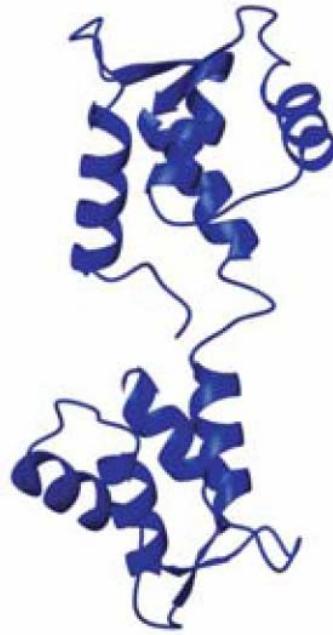


Figura 3. Estructura tridimensional de la apo-calmodulina.



Figura 4. Estructura tridimensional de la calmodulina una vez que se ha unido al calcio.

En algunas plantas, como trigo, papa, soya y *Arabidopsis*, existen múltiples genes que codifican para la expresión de un gran número de isoformas de la CaM (Lee et al., 2000; Bouché et al., 2005; Yamniuk y Vogel, 2005). Mientras algunas de estas isoformas (SCaM-1 a SCaM-3) tienen un alto grado de homología (90%) con la CaM de mamíferos, dos isoformas (SCaM-4 y SCaM-5) muestran solamente el 78% de identidad; éstas son las isoformas de la CaM con mayor divergencia (Bouché et al., 2005).

La CaM y sus enzimas blanco constituyen una red compleja que participa en casi todos los procesos celulares (regulación del metabolismo, transporte de iones, proliferación celular, división celular, transcripción, fosforilación y desfosforilación, metabolismo de fosfolípidos, etc.). Por lo tanto, esta proteína es importante en la regulación de varios procesos fisiológicos en las plantas incluyendo los relacionados con el crecimiento y la defensa (Black et al., 2004; Kortvely y Gulya, 2004).

La CaM regula más de 50 enzimas y canales iónicos y el número de proteínas moduladas por CaM sigue en aumento. Algunas de las proteínas reguladas por CaM incluyen varias cinasas (CaM cinasa II), fosfatasas (calcineurina y fosfodiesterasa), oxido nítrico sintasas, adenilato ciclasas (1 y 8), varios canales iónicos, canales de calcio dependientes de voltaje, receptores de IP3 y un gran número de proteínas del citoesqueleto incluyendo a las proteínas caldesmona, espectrina, MARCKS y aducina (Toutenhoofd y Strehler, 2000; Black et al., 2004; Bouché et al., 2005). Algunas de estas proteínas son exclusivas de plantas como por ejemplo las proteínas cinasas (CaMKs), la calcio ATPasa ACA9, de importancia particular para el desarrollo normal de los tubos polínicos; la fosfatasa ser/thr PP7 y la proteína específica del polen NPG1, entre otras. Algunas proteínas tienen homólogos en otros organismos pero son reguladas por la CaM únicamente en plantas. Ejemplos de estas proteínas son la glutamato descarboxilasa, la apirasa y la NAD-cinasa. El resto son enzimas que tienen homólogos reguladas por CaM tanto en plantas como en otros organismos. Ejemplos de este último grupo son las ATPasas de la membrana plasmática, varias proteínas cinasas y la proteína kinesina (Bouché et al., 2005).

La CaM curiosamente activa enzimas blanco que catalizan reacciones contrarias, tales como fosforilación y desfosforilación de proteínas; síntesis y degradación de nucleótidos cíclicos; canales y bombas de calcio. Las razones de esta dualidad son aún desconocidas.

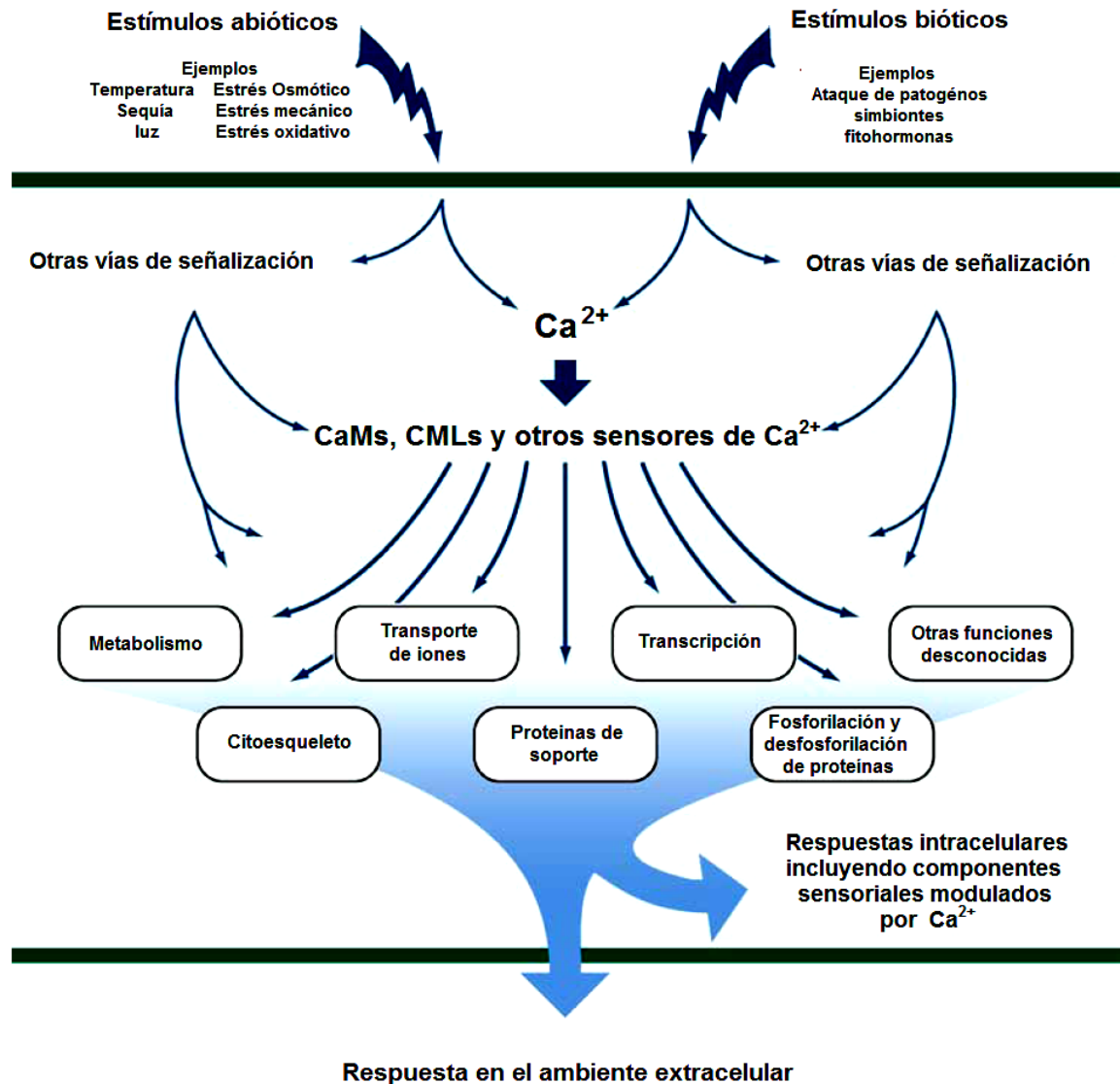
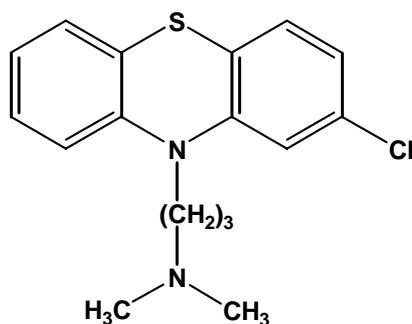


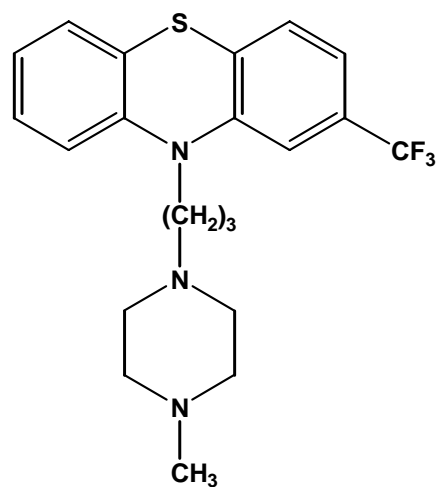
Figura 5. Representación esquemática de los estímulos y respuestas mediadas por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ y proteínas similares (CMLs) en plantas (Adaptado de Bouché et al., 2005).

La CaM es importante a nivel extracelular ya que también es sensible a estímulos abióticos (ej. estrés osmótico, estrés mecánico, estrés oxidativo, temperatura, luz y sequía) y bióticos (ej. Ataque de patógenos, simbiontes y fitohormonas). Estos estímulos producen cambios transitorios en los niveles de Ca^{2+} citosólicos y/o de los organelos, los cuales son transducidos por CaMs y proteínas similares a CaM (CMLs por sus siglas en inglés) y otros sensores de Ca^{2+} (Figura 5). Las CaMs y CMLs interactúan con efectores que modulan numerosas funciones bioquímicas y celulares vitales en las plantas. Algunos estímulos exógenos también estimulan vías de señalización independientes del Ca^{2+} . Estas pueden interactuar con las vías de señalización del Ca^{2+} en varios puntos de la cascada de transducción de señales.

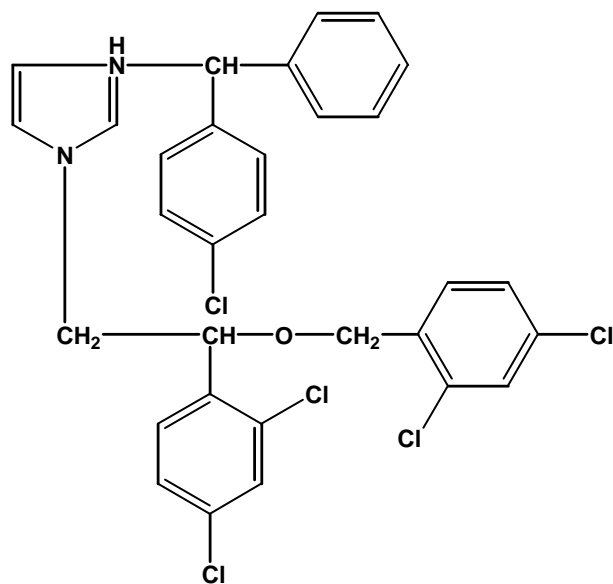
Muchos compuestos químicos interactúan con la CaM e inhiben sus propiedades moduladoras. Los inhibidores más estudiados de la CaM pertenecen a un grupo de tranquilizantes conocidos comúnmente como fenotiazinas. Entre las más importantes se encuentran la clorpromazina (49) y la trifluoroperazina (50). El calmidozolio (51) y el compuesto W7 (52) son otros inhibidores de la proteína ampliamente utilizados como herramientas de investigación en los procesos en los que participa la CaM. Todos estos compuestos inhiben la activación de las enzimas dependientes de CaM.



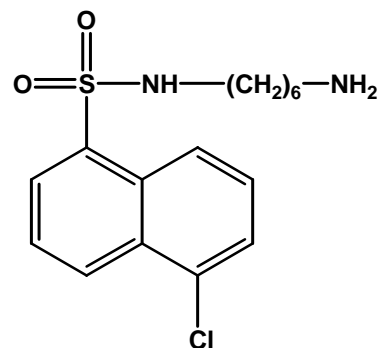
(49)



(50)



(51)



(52)

Para detectar la interacción de la CaM con compuestos naturales y drogas se han utilizado muchos métodos; la mayoría de ellos *in vitro*. Estos métodos incluyen la cromatografía de afinidad (Molnar et al., 1995; Ovadi, 1989), la proteólisis limitada (Ovadi, 1989), la espectroscopia UV, el dicroísmo circular (Molnar et al., 1995; Harmat et al., 2000; Vertessy et al., 1998), la electroforesis en gel (Leung et al., 1985), la fluorescencia de energía de resonancia (Au et al., 2000; Molnar et al., 1995; Sharma et al., 2005), la resonancia magnética nuclear (Zhou et al., 1994; Craven et al., 1996), la difracción de rayos X (Vertessy et al., 1998; Harmat et al., 2000), la mutagénesis dirigida – útil para identificar sitios de unión e inhibición en las proteínas - (Odom et al., 1997), y los ensayos enzimáticos funcionales utilizando enzimas sensibles a la CaM (Orosz et al., 1988, 1990; Ovadi, 1989; Molnar et al., 1995; Sharma et al., 1997). La enzima dependiente de CaM que más se ha utilizado para detectar antagonistas de la CaM es la fosfodiesterasa del AMP cíclico (PDE-1) de cerebro o corazón de bovino (Apéndice 2). Esta enzima cataliza la hidrólisis de nucleótidos cíclicos a nucleótidos de monofosfato. La actividad de la PDE1

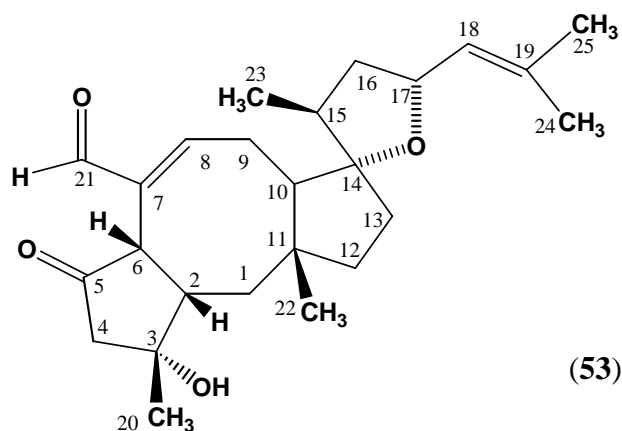
puede medirse mediante diversos procedimientos. Los dos más utilizados son el de radioinmunoensayo y el espectrofotométrico. En ambos la actividad de la enzima se correlaciona con la cantidad de P_i generado por la hidrólisis del AMPc en presencia de una nucleotidasa (Apéndice 2) (Ovadi, 1989; Sharma y Wang, 1979).

2.5 Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que afectan a la proteína CaM.

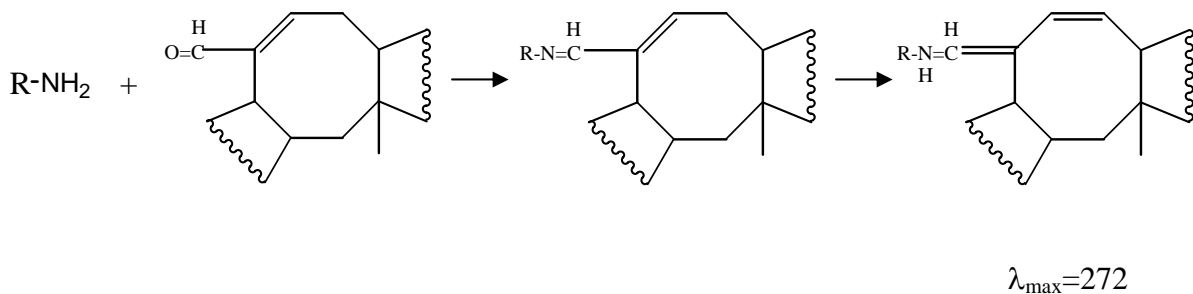
Varios metabolitos aislados de microorganismos inhiben las propiedades moduladoras de la proteína CaM, estos metabolitos presentan una gran diversidad estructural y se han aislado de actinomicetos, bacterias y hongos.

Sin duda alguna, la ofiobolina A (**53**) es el producto natural inhibidor de la CaM que más ampliamente se ha investigado. Esta potente toxina es un sesterterpenoide aislado de varios hongos fitopatógenos de los géneros *Bipolares* y *Drechslera*. Los primeros infectan a los cultivos de arroz, maíz y sorgo. Su actividad inhibitoria de la CaM se demostró inicialmente a través de un ensayo funcional enzimático utilizando la PDE1 (CI_{50} 9 μ M) dependiente de CaM como enzima monitora. Posteriormente, mediante un experimento de inhibición de la fluorescencia intrínseca a la tirosina de la CaM de cerebro de bovino se demostró la interacción directa entre la ofiobolina A (**53**) y la proteína. La disminución de la fluorescencia de la tirosina correlaciona muy bien con la pérdida de actividad de la CaM (Au et al., 2000).

En estudios de electroforesis (SDS-PAGE) fue posible determinar que la ofiobolina A (**53**) retarda la movilidad electroforética de la CaM, y que la unión entre la ofiobolina A (**53**) y la CaM es de naturaleza covalente (Au et al., 2000).



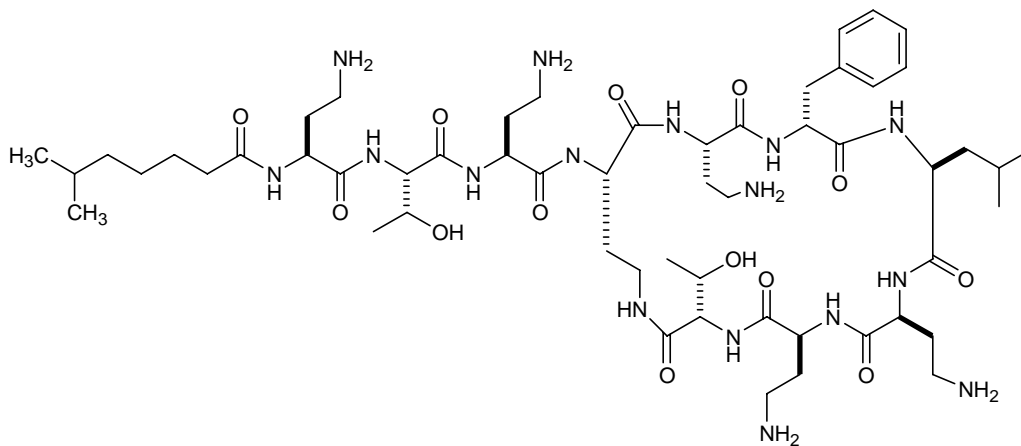
En estudios de espectroscopia UV se observó que la ofiobolina A (**53**) reacciona con la CaM para dar un compuesto con una absorción máxima a 272 nm. El mismo máximo de absorción se encontró cuando se hizo reaccionar a la ofiobolina A con el grupo ϵ -amino de la lisina. También este estudio reveló que una molécula de CaM reacciona con dos moléculas de ofiobolina A (**53**) (Au et al., 2000).



Recientemente, Au y Leung (2000) determinaron mediante mutagénesis dirigida que la ofiobolina A (**53**) inhibe la CaM de cerebro de bovino a través de su unión al residuo lisina 75. La lisina 148 es otro sitio de unión, pero no de inhibición.

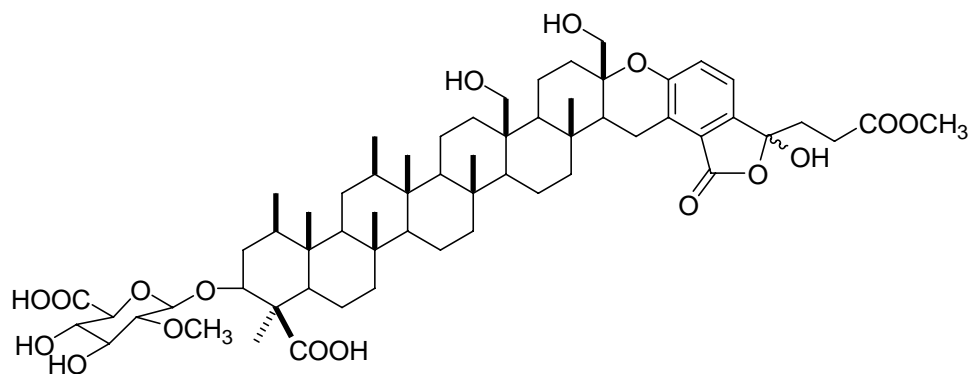
Finalmente, en varios experimentos *in vivo* con plantas de maíz se encontró que el efecto fitotóxico de la ofiobolina A (**53**) correlaciona muy bien con el efecto inhibitorio a la CaM. Ambos efectos fueron dependientes del tiempo e irreversibles (Au et al., 2000). De manera adicional, Evidente y colaboradores (2006) demostraron que la ofiobolina A (**53**) tiene un gran potencial para el desarrollo de agentes herbicidas. El compuesto **53** provocó necrosis en distintas especies de malezas, aún a bajas concentraciones. En este mismo estudio se encontró que las características estructurales más importantes para la fitotoxicidad son el grupo hidroxilo en C-3, la estereoquímica en C-6 y el grupo aldehído en C-7 (Evidente et al., 2006).

La polimixina B (**54**) es un péptido cíclico con propiedades antibióticas producida por *Bacillus polymyxa*. El péptido inhibe a la PDE1 de corazón de bovino con una CI_{50} de 80.5 nM en la presencia de 500 μ M de Ca^{2+} . Un análisis cinético reveló que el efecto inhibitorio de la polimixina B (**54**) es competitivo con respecto a la CaM (Hegemann et al., 1991). De manera adicional, la interacción de la polimixina B (**54**) con la CaM fue demostrada realizando una cromatografía de afinidad de la proteína sobre un gel de agarosa con polimixina y mediante electroforesis en gel de poliácridamida bajo condiciones desnaturizantes (Hegemann et al., 1991). La polimixina B (**54**) inhibe también a otras enzimas dependientes de CaM como son la cinasa de la miosina de cadena ligera (MLCK) y la proteína cinasa (Hegemann et al., 1991).



(54)

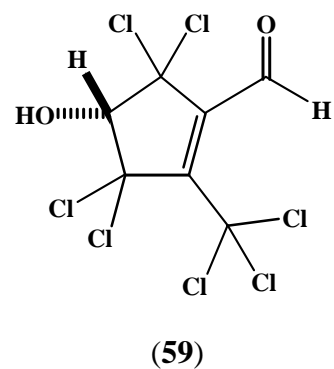
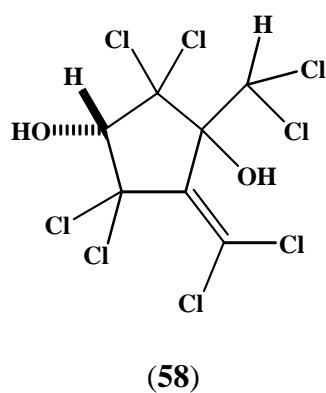
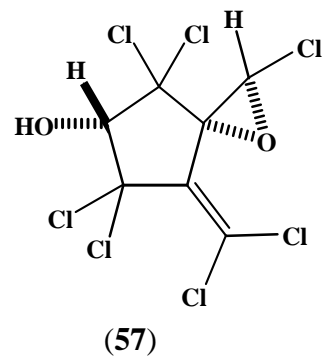
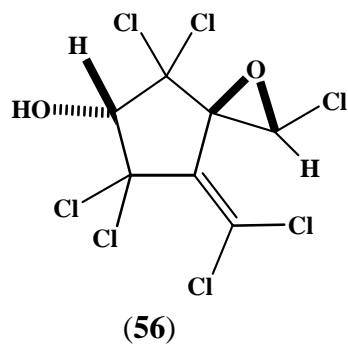
El compuesto KS-505a (**55**), aislado de *Streptomyces argenteolus* A-2, es un terpenoide con una estructura poco usual. La estructura del compuesto presenta una unidad de ácido 2-*O*-metilglucurónico, un esqueleto isoprenoide decacíclico y una hidroxilactona fusionada a un anillo aromático (Nakanishi et al., 1992; Ichimura et al., 1996).

**(55)**

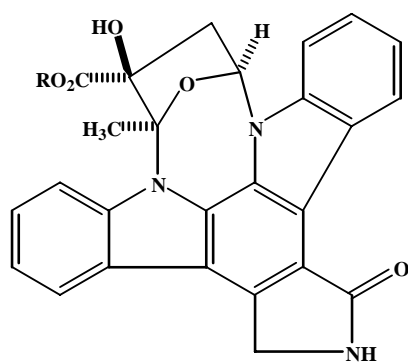
El compuesto **55** es un potente inhibidor de la PDE1 de cerebro de bovino ($CI_{50} = 0.065 \mu\text{M}$) e inhibe también a la PDE1 de corazón de bovino pero con una concentración más alta ($CI_{50} = 1.4 \mu\text{M}$). Su actividad fue comparable a la del calmidazolium ($CI_{50} = 0.12 \mu\text{M}$). Un análisis cinético indicó que su modo de acción es competitivo con respecto al Ca^{2+} y a la CaM ($ki = 0.089 \mu\text{M}$) (Nakanishi et al., 1992; Ichimura et al., 1996).

Los compuestos policlorados **56-59** se aislaron del hongo *Mollisia ventosa* Kac-1148 e inhiben varias enzimas dependientes de CaM (PDE1 de cerebro y corazón de bovino, MLCK y Ca^{2+} -ATPasa), sin afectar de manera notable la actividad de las enzimas independientes de CaM. La interacción de estos compuestos con la CaM se determinó mediante ensayos de fluorescencia (Nakanishi et al., 1990b).

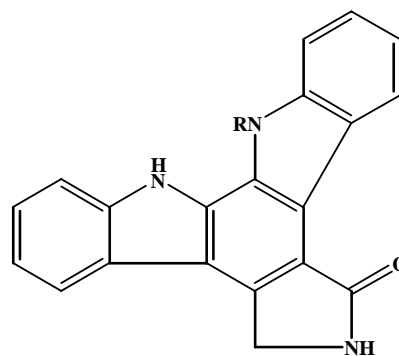
En el caso del compuesto **56**, un análisis cinético en el que se empleó a la cinasa de la miosina de cadena ligera como enzima de prueba permitió definir que su mecanismo de inhibición es competitivo con respecto a la CaM (Nakanishi et al., 1990b).



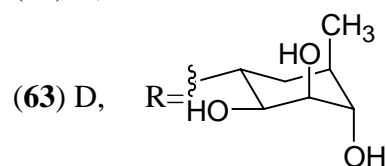
Los alcaloides K-252a-d (**60-63**), aislados de *Nocardopsis* sp, inhiben de manera específica a la PDE1 de cerebro y corazón de bovino. El compuesto **21** fue el más potente con una CI_{50} de 2.9 y 1.3 μM , respectivamente (Kase et al., 1986, Nakanishi et al., 1986).



(60) A, R= Me
(61) B, R= H

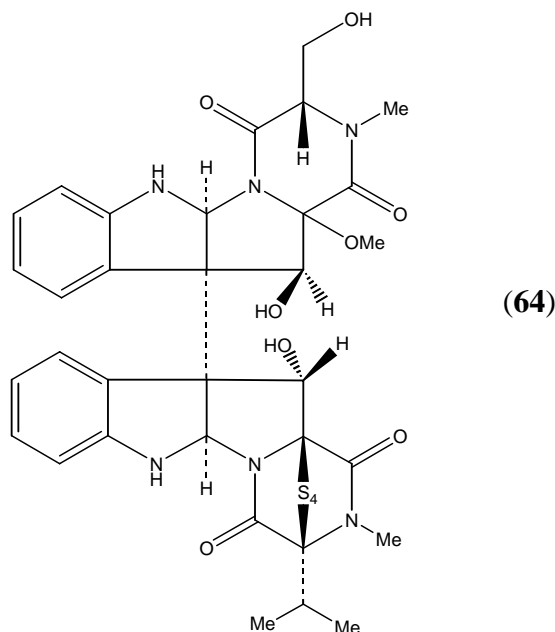


(62) C, R= H

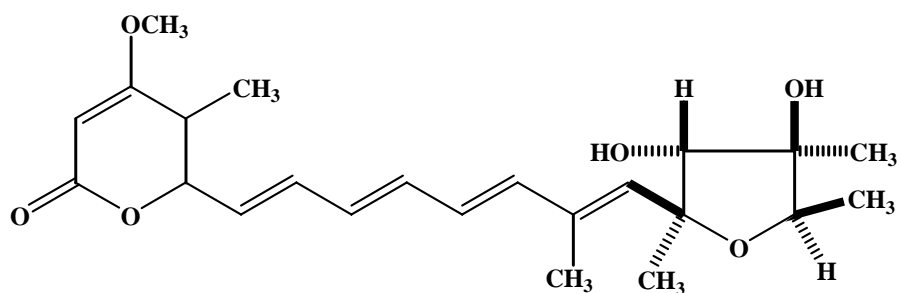


(63) D,

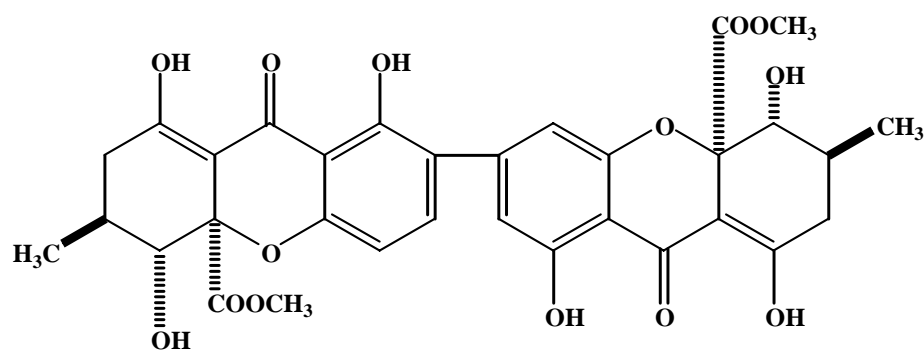
Otro alcaloide, la leptosina M (**64**), producido por la especie fúngica *Leptosphaeria* sp., inhibe entre un 40 y 70 % la actividad de la enzima cinasa III (CaMKIII) a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Takeshi et al., 2002).



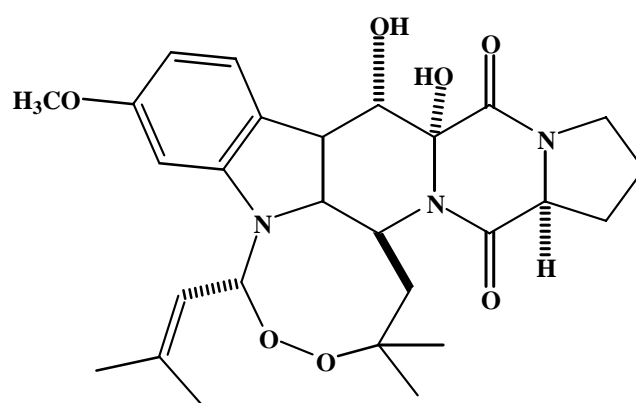
El ácido secalónico (**65**), la citroviridina (**66**) y el verruculógeno (**67**) son micotoxinas aisladas de hongos del género *Penicillium* que inhiben a la PDE1 con valores de CI_{50} de 45, 44 y 42 μM , respectivamente. Estos tres metabolitos inducen cambios en la conformación activa de la CaM, alterando así la activación de varias enzimas dependientes de CaM. La interacción directa de las micotoxinas con la CaM se demostró mediante la medición de la modificación de la fluorescencia del complejo *N*-fenil-1-naftilamina (NPN)-CaM (Pala et al., 1999).



(65)

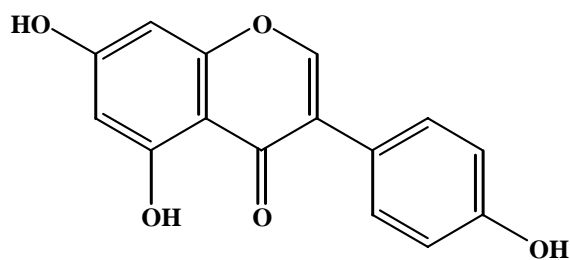


(66)



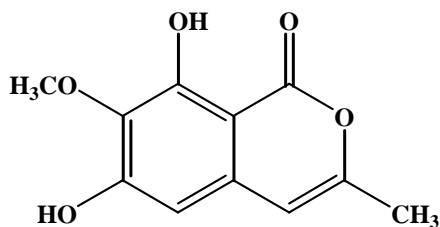
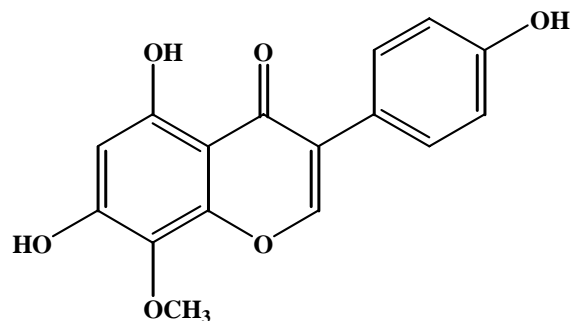
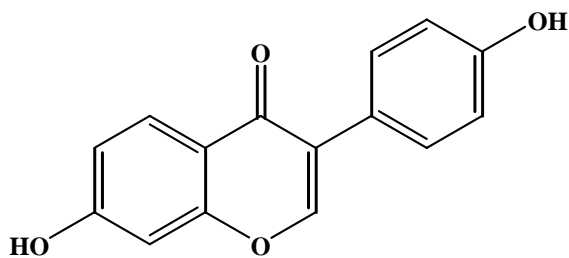
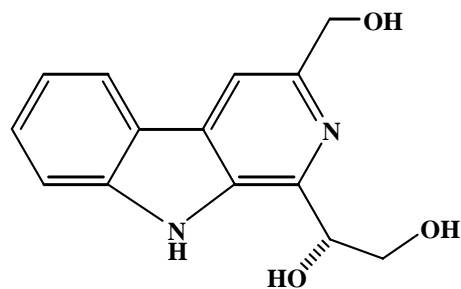
(67)

La genistenina (68), aislada de *Streptosporangium vulgare* K-254, es una isoflavona que inhibe a la PDE1 de cerebro de bovino ($CI_{50} = 20 \mu\text{M}$); la actividad de este compuesto fue dependiente de la concentración. Cabe señalar que este compuesto no afecta de manera apreciable la actividad basal de la enzima (Goto et al., 1987).

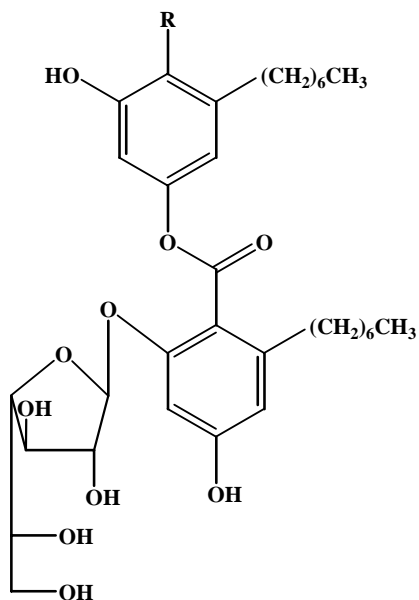


(68)

De un cultivo de *Streptoverticillium album* K-251 se aislaron los compuestos reticulol (**69**), tectorigenina (**70**), daidzeina (**71**) y pirindolol (**72**). Estos metabolitos inhiben de manera moderada a las enzimas PDE1 de cerebro y corazón de bovino sin afectar la actividad basal de las enzimas (Matsuda et al., 1988).

**(69)****(70)****(71)****(72)**

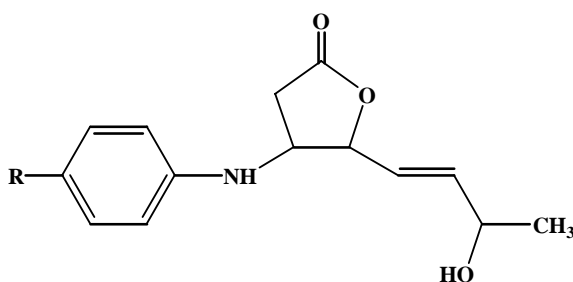
Los antibióticos de tipo alquilfenólico KS-501 (**73**) y KS-502 (**74**), aislados de un cultivo del hongo *Sporothrix sp.* KAC-1985, inhiben a la PDE-1 tanto de cerebro (CI₅₀ = 1.8 y 4.3 μM, respectivamente), como de corazón de bovino (CI₅₀ = 15 y 5.9 μM, respectivamente) (Nakanishi et al., 1990a).



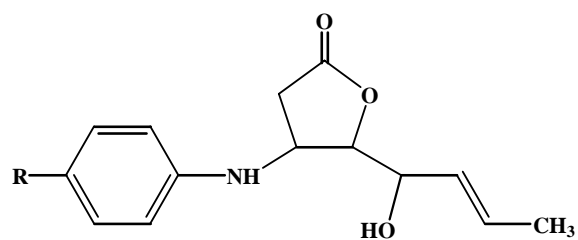
(73) R=H

(74) R=CO₂H

Las butirolactonas (**75-78**) y compuestos relacionados (**79-82**), aisladas de cultivos de *Streptomyces viridochromogenes*, inhiben de manera moderada la actividad de la PDE1. Las CI₅₀ de estos productos se encuentran en el rango de 2-15 mM (Hoff et al., 1992).

(75) R = CO₂H

(76) R = CHO

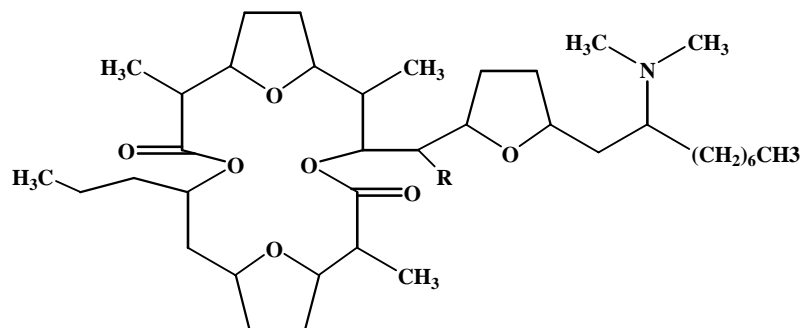
(77) R = CH₂OH(78) R = CH₂OMe

(79) R = CHO

(80) R = CHO

(81) R = CH₂OH(82) R = CH₂OMe

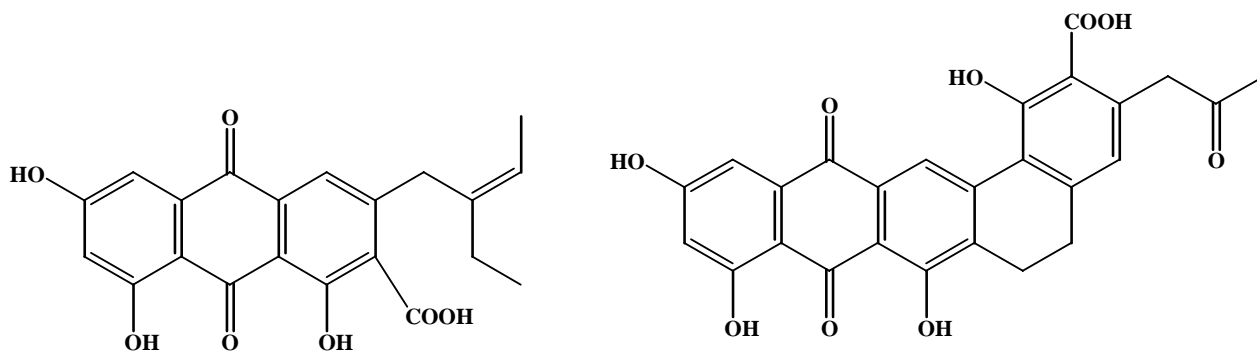
Los antibióticos MS-282a (**83**) y MS-282b (**84**), aislados de *Streptomyces tauricus* ATCC 27470, son inhibidores de la MLCK. Estos compuestos inhiben la actividad de la enzima de manera dependiente de la concentración con valores de CI_{50} de 3.8 μ M y 5.2 μ M, respectivamente. El compuesto MS-282a inhibió también a la PDE1 (CI_{50} = 4.2 μ M) (Nakanishi et al., 1994).



(**83**) R = CH₃, n = 4

(**84**) R = C₂H₅, n = 3

Las antraquinonas K-259-2 (**85**) y KS-619 (**86**), aisladas de un cultivo de *Micromonospora olivasterospora* K-259 y *Streptomyces californicus*, respectivamente, inhiben a las PDE1's de cerebro y corazón de bovino. En el caso de K-259-2 los valores de CI_{50} fueron 6.6 y 2.9 μ M, respectivamente. Los valores de CI_{50} para KS-619 fueron 2.0 y 1.5 μ M, respectivamente. Sin embargo, su efecto no fue específico, ya que también inhibieron a las enzimas independientes de CaM (Matsuda et al., 1987; Matsuda y Kase, 1987).



(**85**)

(**86**)

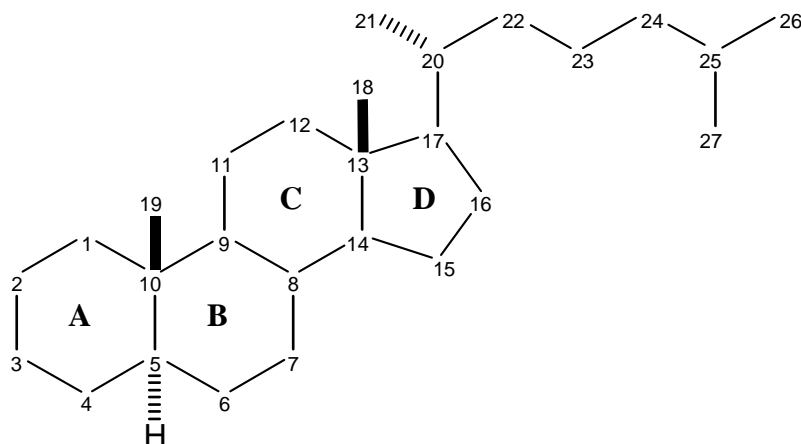
Del micelio y medio de cultivo del hongo *Guanomyces polythrix* se aislaron varias naftopironas fitotóxicas (**26-31**), dos xantonas (**32** y **33**) y un esteroide (**34**). Estos compuestos afectan la movilidad electroforética de las CaM's de espinaca y de cerebro de bovino (Macias et al., 2000; Macias et al., 2001). De manera adicional, inhiben a las enzimas NADK y PDE1 dependientes de CaM de manera dependiente de la concentración (Mata et al., 2003). Mediante estudios de cromatografía de afinidad se demostró que los productos interaccionan con la CaM de manera covalente (Macias et al., 2000; Macias et al., 2001).

Las herbaruminas I-III (**23-25**) son nonenólidas fitotóxicas aisladas de un cultivo del hongo *Phoma herbarum* (Sphaeropsidaceae). En un experimento de electroforesis SDS-PAGE se detectó que estos compuestos interactúan con la CaM de cerebro de bovino. La CaM tratada con las lactonas tuvo una menor movilidad electroforética que la CaM no tratada. En otros experimentos, diferentes concentraciones de los compuestos **23** y **24** inhibieron a la PDE1. La actividad inhibitoria de **23** ($CI_{50} = 14.2 \mu M$) y **24** ($CI_{50} = 6.6 \mu M$) fue más alta que la de la clorpromazina ($CI_{50} = 9.8 \mu M$). Estos metabolitos no inhibieron a la enzima independiente de CaM (Rivero-Cruz et al., 2003).

2.6 Los brasinoesteroides como posible blanco de acción de las fitotoxinas.

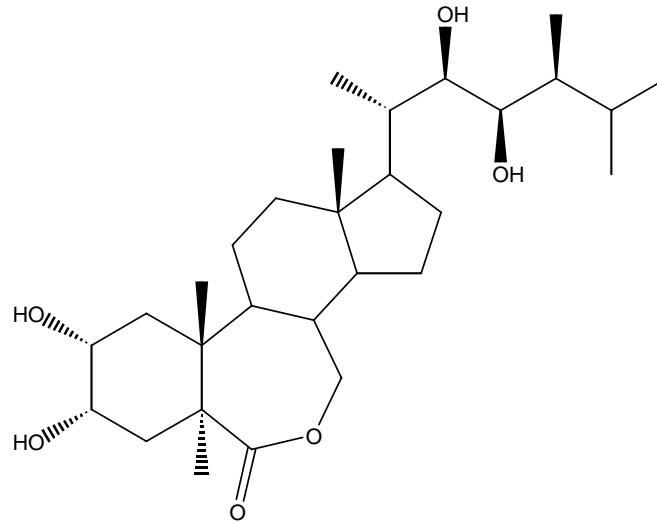
Los brasinoesteroides son hormonas esteroidales de las plantas que regulan una gran variedad de procesos de crecimiento y desarrollo. Actualmente están considerados como la sexta clase de hormonas vegetales; las otras cinco son las auxinas, las giberelinas, las citocininas, el ácido abscísico y el etileno. Los brasinoesteroides ejercen sus efectos fisiológicos a través de su interacción con receptores de cinasas transmembranales. Esta unión desencadena una cascada de fosforilaciones que transduce las señales esteroidales de la membrana celular al núcleo (Li et al., 2005).

Los brasinoesteroides son derivados hidroxilados del colestano, los cuales tienen variaciones estructurales principalmente en los anillos A y B, así como en el C-17 de la cadena lateral. Estos compuestos pueden ser clasificados como brasinoesteroides de 27, 28 y 29 carbonos, dependiendo de la longitud de la cadena lateral (Bajguz, 2007)



Núcleo del colestano

El primer brasinoesteroide descubierto fue la brasinólida (**87**) y se aisló del polen de *Brassica napus*. Se conocen 65 brasinoesteroides y cinco brasinoesteroides conjugados, los cuales han sido aislados de 58 especies de plantas entre las que se encuentran 49 angiospermas (12 monocotiledóneas y 37 dicotiledóneas), seis gimnospermas, una pteridofita (*Equisetum arvense*), una briofita (*Marchantia polymorpha*), y la alga clorofita *Hydrodictyon reticulatum* (Bajguz, 2007; Haubrick y Assmann, 2006; Bajguz and Tretyn, 2003). Los brasinoesteroides son considerados los análogos de las hormonas esteroidales del reino animal.



(87)

Los brasinoesteroides se encuentran en muy pequeñas cantidades en las plantas de 10-100 $\mu\text{g/Kg}$ de polen, de 1-100 $\mu\text{g/Kg}$ de semillas inmaduras y de 10-100 ng/Kg de retoños u hojas (Adam y Marquardt, 1986; Mandava, 1988; Takatsuto, 1994). De hecho, los brasinoesteroides son reguladores del crecimiento que ejercen su acción biológica a muy bajas concentraciones (generalmente 0.1-0.001 ppm).

Los efectos fisiológicos que provocan los brasinoesteroides en las plantas son los siguientes (Li, 2005; Haubrick y Assmann, 2006):

- Promueven la elongación y división celular en tejidos vegetales.
- En presencia de auxinas y citoquininas, estimulan el crecimiento de callos induciendo el alargamiento y la división celular.
- Aceleran la diferenciación de protoplastos y la regeneración de la pared celular.
- Hiperpolarizan el potencial eléctrico transmembranal.
- Influyen en el gravitropismo.
- Retrasan la abscisión de hojas en cítricos.
- Regulan la diferenciación de elementos traquearíos.
- Estimulan la translocación de asimilatos.

- Influyen en procesos de movilización dentro de las plantas.
- Estimulan la actividad fotosintética acelerando la fijación de CO₂.
- Incrementan la biosíntesis de proteínas y el contenido de azúcares reductores.
- Estimulan la elongación del tubo polínico.
- Promueven la diferenciación del xilema.
- Inhiben el crecimiento de las raíces.
- Favorecen el desenrollamiento de las hojas.
- Favorecen la germinación.

De manera adicional, los brasinoesteroides han mostrado la capacidad de proteger a las plantas de factores ambientales causantes de estrés entre los que se encuentran las temperaturas extremas (altas y bajas), las sequías, el exceso de sales en el suelo, los daños causados por herbicidas y el ataque de patógenos (Krishna, 2003).

La mayoría de los estudios para comprobar todos los efectos fisiológicos en plantas se realizaron mediante la aplicación exógena de algún brasinoesteroide seguido por el registro de la respuesta biológica.

La detección de los efectos biológicos de los brasinoesteroides inicialmente se realizó mediante el bioensayo de la medición del segundo internodo en fríjol, el cual fue gradualmente sustituido por los bioensayos de la inclinación de la lámina en arroz (Wada et al., 1981, 1984; Takeno y Pharis, 1982; Kim et al., 1990) y del desenrollamiento de las hojas de trigo (Wada et al., 1985; Takatsuto, 1994). También, se han utilizado métodos inmunológicos pero en menor grado (Horgen et al., 1984; Yokota et al., 1990; Schlagenhauser et al., 1991; Taylor et al., 1993).

Hasta la fecha, no hay reportes de metabolitos secundarios que inhiban los efectos fisiológicos de los brasinoesteroides, pero basándonos en el hecho de que existen herbicidas de uso comercial que actúan a nivel de la inhibición de la acción biológica de las

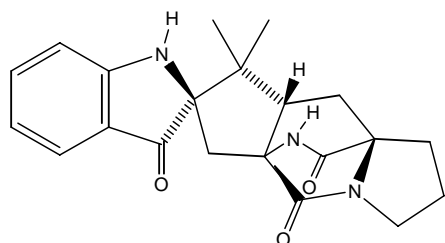
auxinas, ya sea como mimetizadores del ácido indolacético o impidiendo el transporte de auxinas, es probable que existan productos naturales que puedan tener un efecto similar en la acción biológica de los brasinoesteroides. Con base en estas consideraciones, los brasinoesteroides pueden resultar un blanco de acción novedoso, específico y poco explorado para los compuestos fitotóxicos, el cual podría ayudar a la disminución del fenómeno de resistencia provocado por los herbicidas sintéticos.

2.7 Alcaloides prenilados derivados de triptófano.

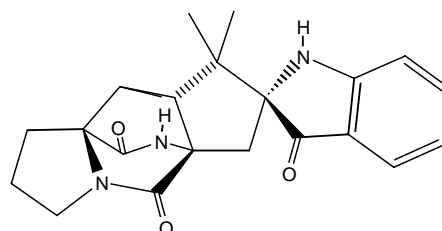
Una de las fitotoxinas novedosas obtenidas en el presente estudio pertenece a un grupo de alcaloides indólicos dipeptídicos que tienen como particularidad la presencia de un bicíclico [2.2.2] diazaoctano en sus estructuras. Esta unidad sólo se ha descrito en los grupos de alcaloides indólicos de origen fúngico designados con los nombres comunes de brevianamidas, paraherquamidas, marcfortinas, esclerotamidas, asperparalinas, aspergamidas, avrainvilamidas, estefacidinas. Todos ellos se biosintetizan a partir de triptófano, prolina (o sus derivados) y al menos una unidad de isopreno.

Los primeros compuestos de este grupo de alcaloides fueron las brevianamidas A y B (**88** y **89**), que además del bicíclico [2.2.2] diazaoctano, contienen dos anillos de cinco miembros fusionados a través de un carbono de tipo espiro. La brevianamida A (**88**) fue originalmente aislada en 1969 por Birch y colaboradores como el metabolito mayoritario del hongo *Penicillium brevicompactum* (Birch y Wright, 1970). Este metabolito se ha encontrado también en cultivos de *Penicillium viridicatum* y *Penicillium ochraceum*. Posteriormente, se aisló la brevianamida B (**89**) en conjunto con otros compuestos que se designaron con los nombres de brevianamidas C-F (**90** y **91**). Las brevianamidas C y D (**90** y **91**) se consideran artefactos que se forman fotoquímicamente a partir de las brevianamidas A y B (**88** y **89**), respectivamente. Las brevianamidas E y F (**92** y **93**) se consideran precursores biogénicos de las brevianamidas A y B (Birch y Wright, 1970; Birch y Russell, 1972).

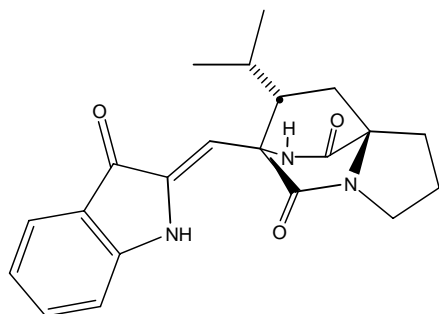
La estructura y estereoquímica absoluta de los centros estereogénicos de la brevianamida A (**88**) se establecieron mediante cristalografía de rayos X de un derivado semisintético, la 5-bromobrevianamida (Coetzer, 1974). Sin embargo, a la fecha la configuración absoluta de los centros quirales de la brevianamida B (**89**) aún no se establece.



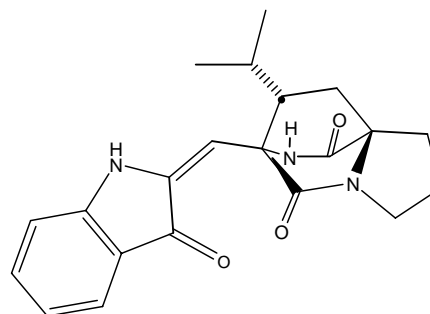
(**88**) brevianamida A



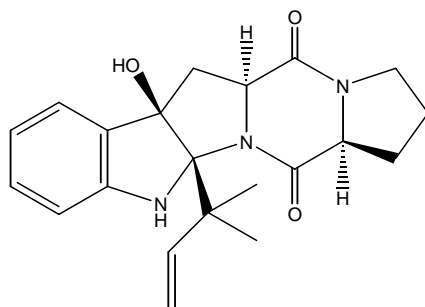
(**89**) brevianamida B



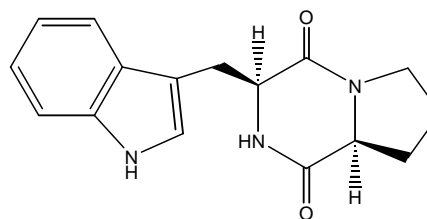
(**90**) brevianamida C



(**91**) brevianamida D

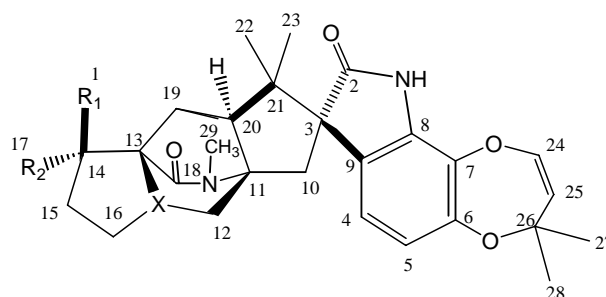


(**92**) brevianamida E

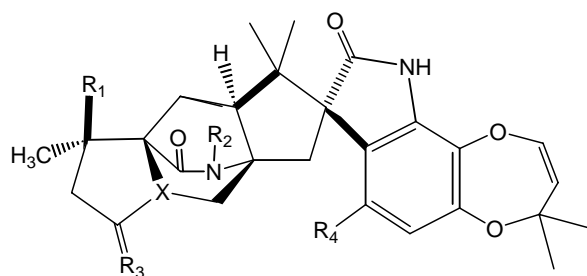


(**93**) brevianamida F

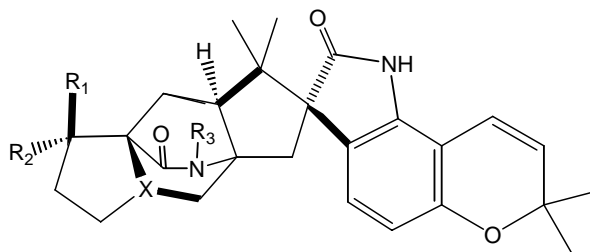
La parahercuamida A (**94**), obtenida de un cultivo de *Penicillium paraherquei* en 1980, fue el primer alcaloide de esta familia (Yamazaki, et al., 1981). Desde entonces, las parahercuamidas B-G, los compuestos VM55595, VM55596, VM55597, SB203105, SB200437 y la esclerotamida (**95-106**) se han aislado de varias especies de *Penicillium* y *Aspergillus* (Ondeyka et al., 1990; Liesch et al., 1990; Blanchflower, et al., 1991; 1993).



- (**94**) parahercuamida A, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $X = \text{N}$
 (**95**) parahercuamida B, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $X = \text{N}$
 (**96**) parahercuamida C, $R_1, R_2 = \text{H}$, $X = \text{N}$
 (**97**) parahercuamida D, $R_1, R_2 = \text{OCH}_2^-$, $X = \text{N}$
 (**98**) parahercuamida E, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $X = \text{N}$
 (**99**) VM55596, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $X = \text{N}^+ \text{-O}^-$



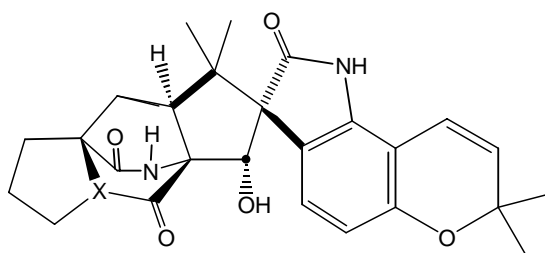
- (**100**) VM55597, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{O}$, $R_4 = \text{H}$
 (**101**) SB208105, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}_2$, $R_4 = \text{OH}$
 (**102**) SB200487, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}_2$, $R_4 = \text{H}$



(103) paraherquamida F, $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = CH_3$ (VM55594)

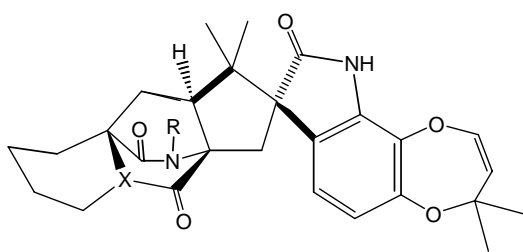
(104) paraherquamida G, $R_1 = OH$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = CH_3$ (VM54158)

(105) VM55595 $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = H$



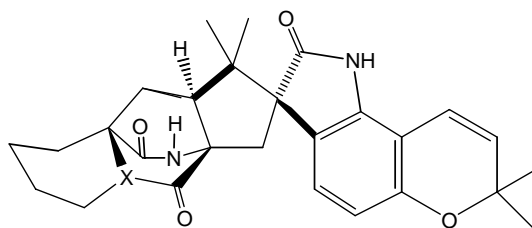
(106) esclerotamida

Otros constituyentes de esta serie de metabolitos son las marafortinas A-C (**107-109**), que tienen una unidad de ácido pipercolico en lugar de la prolina (Polonsky et al., 1980; Prange et al., 1981). El compuesto VM55599 (**110**) (Blanchflower et al., 1993), las aspergamidas A y B (**111** y **112**) y el metabolito CJ-17,665 (**113**) (Sugie, et al., 2001) contienen un grupo 2,3 indol disustituido en lugar del grupo espiro-oxindol.

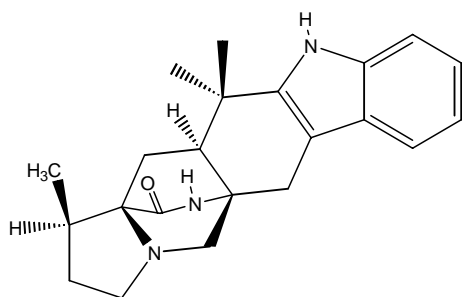


(107) marafortina A, $R = CH_3$

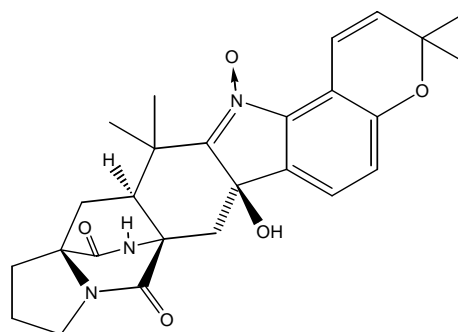
(108) marafortina B, $R = H$



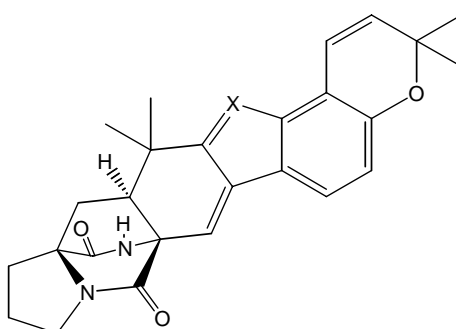
(109) marafortina C



(110) VM55599



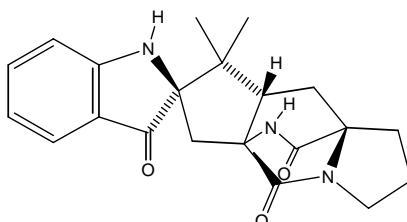
(111) aspergamida A



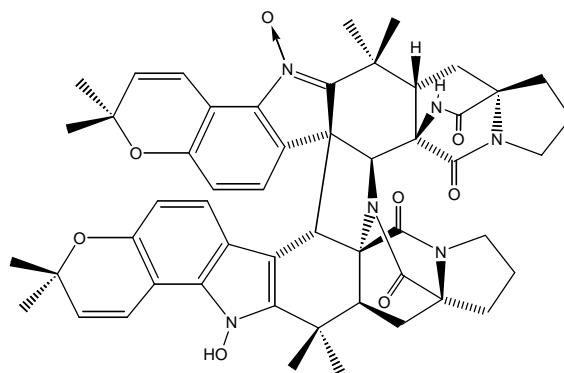
(112) aspergamida B, X = N

(113) CJ-17,665, X = N⁺-O⁻

El último grupo de estos alcaloides son las estefacidinas A y B (**114** y **115**) aisladas de un cultivo de *Aspergillus ochraceus* WC76466. Estos compuestos poseen una potente actividad citotóxica específica contra las células LNCaP prostáticas. La estefacidina B mostró la mejor actividad con una $CI_{50} = 0.06 \mu\text{M}$.

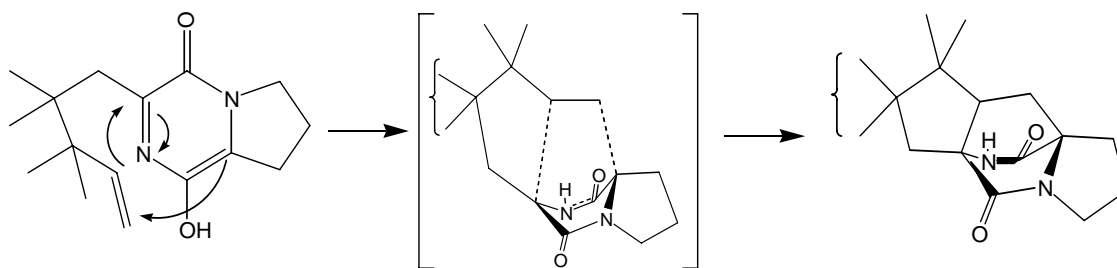


(114) estefacidina A

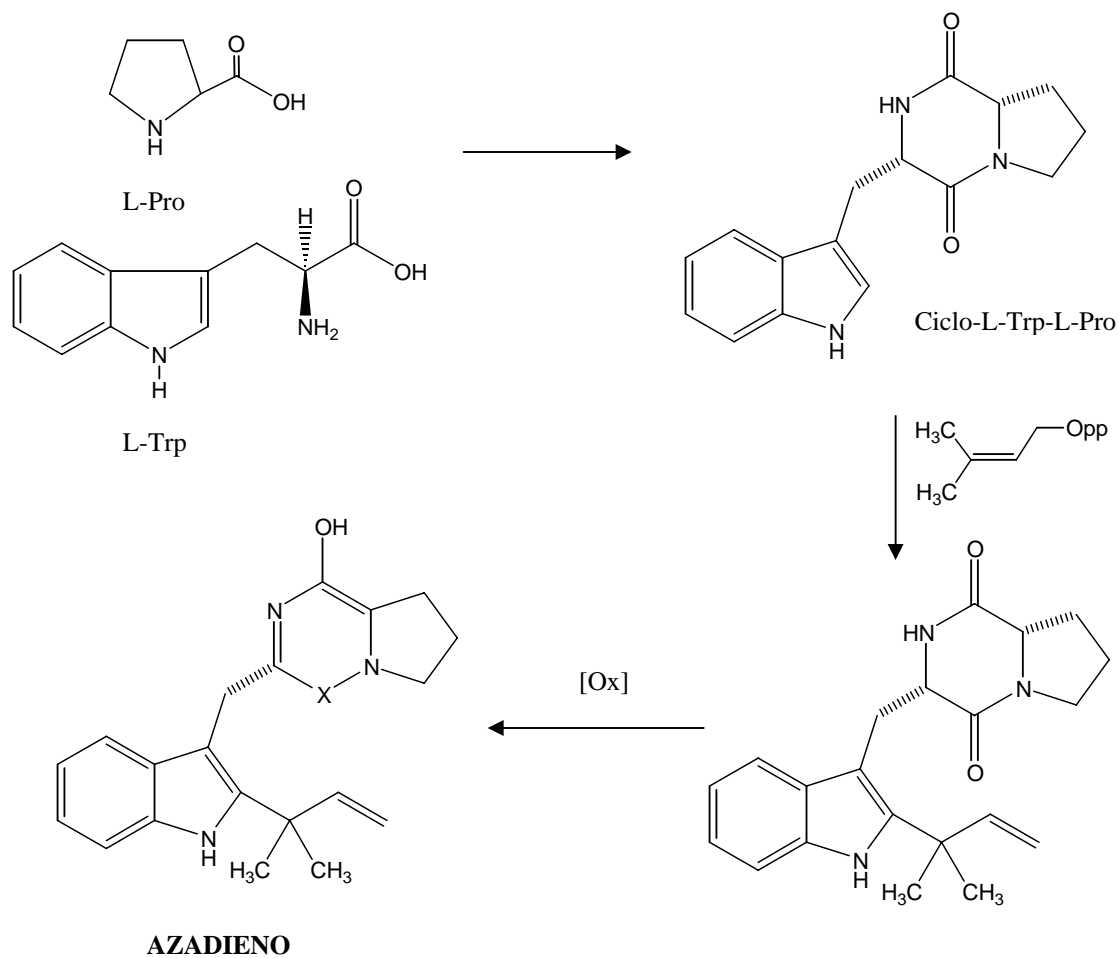


(115) estefacidina B

El biciclo[2.2.2]diazaoctano de los alcaloides antes mencionados se genera a través de una reacción intramolecular de Diels-Alder entre un azadieno intermediario y una unidad de isopreno tal como se ilustra en el esquema 1. El azadieno proviene de un dipéptido cíclico que se genera por la condensación del triptófano y la prolina; posteriormente el azadieno sufre un prenilación para formar un intermediario con la topología apropiada para la reacción intramolecular de Diels Alder (esquema 2) (Williams et al., 2000; Williams y Cox, 2003).



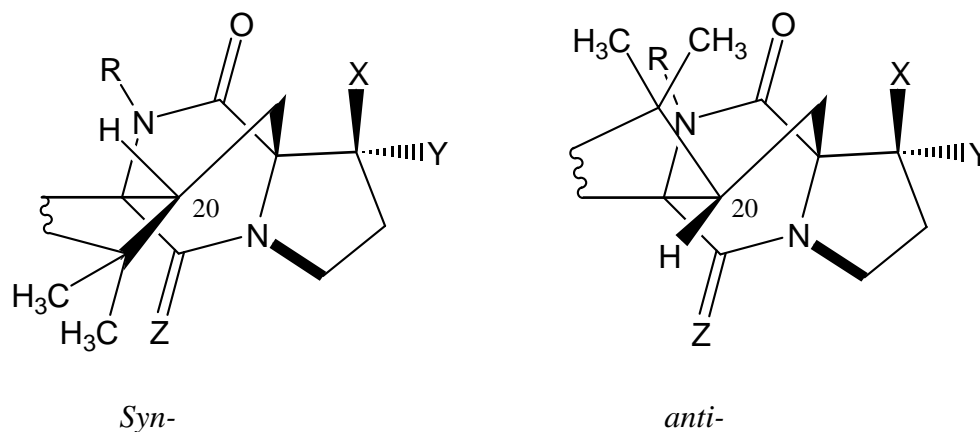
Esquema 1. Cicloadición intramolecular tipo [4+2] que genera el sistema de anillos bicíclico [2.2.2].



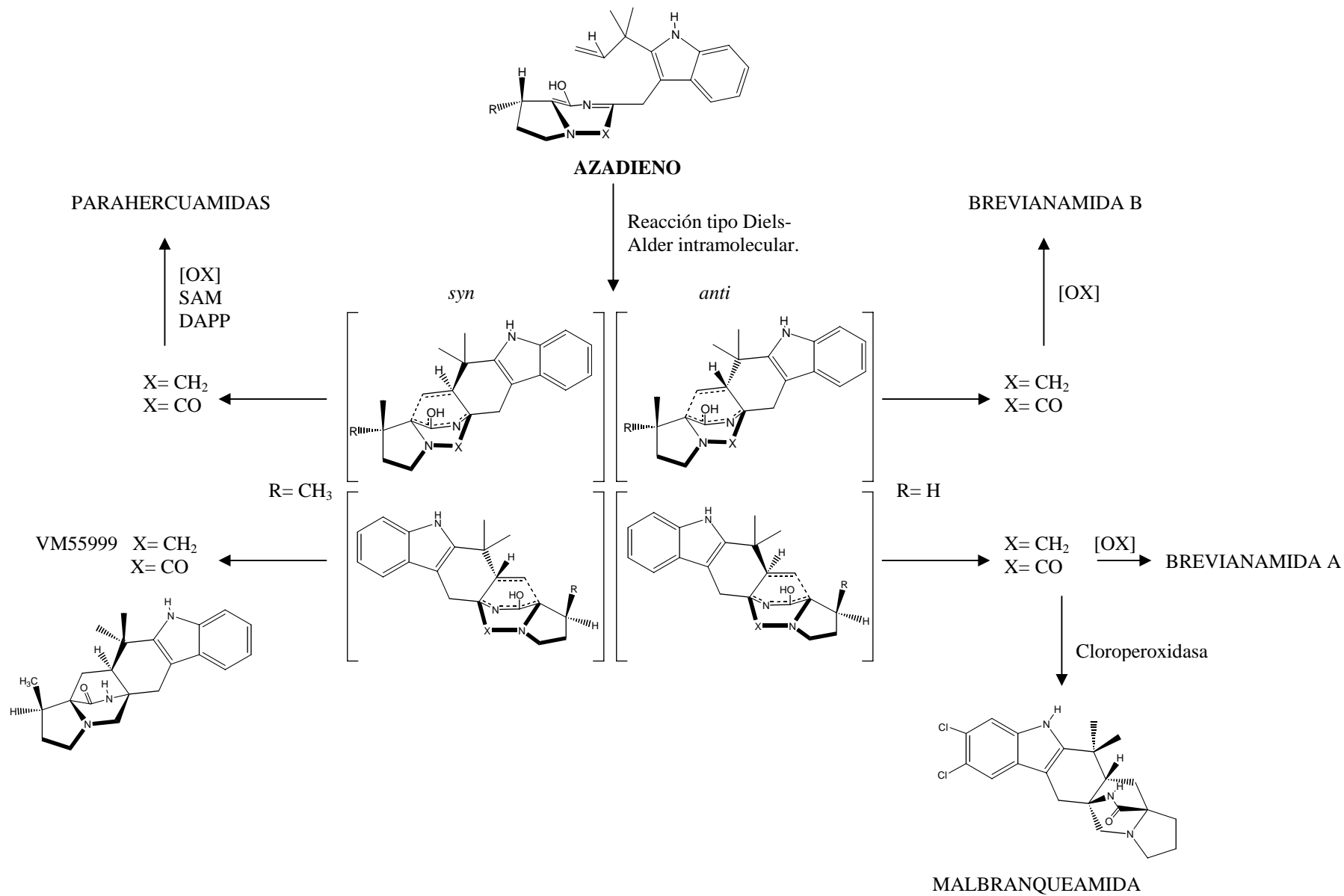
Esquema 2. Formación del azadieno intermediario en la biosíntesis grupo de los alcaloides indólicos que presentan el bicíclico [2.2.2] diazaoctano.

En la cicloadición intramolecular de Diels-Alder a partir del azadieno común, el acercamiento de la unidad de isopreno hacia el anillo de prolina o β -metilprolina puede realizarse de forma selectiva vía cualquiera de los cuatro estados de transición diastereoisoméricos que se indican en el Esquema 3. La adición tiene lugar por arriba o por abajo del plano del anillo de cinco miembros. Así las parahercuamidas se generarían a través de la adición *syn* mientras que las brevianamidas se formarían por la adición *anti*

(Esquema 3). La relación *syn/anti* se refiere a la estereoquímica relativa entre el centro estereogénico C20 (numeración de la parahercuamida A, **94**) y el residuo cíclico del aminoácido (prolina o β -metilprolina) (Williams et al., 2000; Williams y Cox, 2003).



Williams y colaboradores comprobaron esta hipótesis con experimentos de incorporación de precursores isotópicamente marcados con ^{13}C . Estos precursores se administraron al hongo *Penicillium fellutanum* al inicio de la fermentación y se encontró que la reducción del grupo carbonilo presente en la dicetopiperazina tuvo lugar antes de la cicloadición, y que las demás modificaciones (prenilaciones, C-metilaciones, rearrreglos oxidativos en el grupo indol) suceden después de la formación del biciclo[2.2.2]diazaoctano (Domingo et al., 2003). Es factible que el proceso de formación de estos productos incluyendo la formación del azadieno y la subsiguiente reacción de Diels-Alder sea catalizada enzimáticamente por una dielsalderasa.



Esquema 3. Biogénesis de las parahercuamidas, VM5599, brevianamidas y malbranqueamida.

3. HIPÓTESIS.

La hipótesis del presente trabajo considera que los ensayos biológicos sencillos para la detección de fitotoxicidad, por ejemplo el ensayo de la caja de Petri, constituyen indicadores adecuados para la detección de especies fúngicas que proporcionen compuestos fitotóxicos útiles para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas de origen natural y de menor toxicidad para los mamíferos.

4. OBJETIVO GENERAL.

Obtener nuevos agentes fitotóxicos a partir de organismos fúngicos selectos con un efecto sobre la proteína calmodulina y/o antibrasinoesteroide con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos herbicidas biodegradables y con mecanismos de acción novedosos.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Seleccionar dos especies idóneas para la obtención de principios activos a partir de una serie de aislamientos fúngicos utilizando las pruebas de fitotoxicidad adecuadas.
- 2.- Establecer las condiciones adecuadas para la fermentación en mediana escala de las especies fúngicas seleccionadas.
- 3.- Obtener los principios fitotóxicos de los extractos fúngicos mediante un estudio químico biodirigido utilizando un método bioautográfico para monitorear la actividad fitotóxica.

4.- Establecer la estructura molecular de los compuestos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X. convencionales

5.- Cuantificar el efecto fitotóxico de los productos naturales aislados mediante la determinación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* utilizando el método de la caja de Petri.

6.- Evaluar el efecto de los compuestos prometedores como posibles herbicidas sobre la proteína calmodulina utilizando un ensayo funcional enzimático.

7. Determinar el efecto antibrasinoesteroide de los compuestos más promisorios como agentes herbicidas.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

M. aurantiaca Siegler & Carmich se aisló de un guano de murciélago recolectado en las Cuevas de Juxtlahuaca localizadas en Ramal del Infierno, Estado de Guerrero en 1998. Una muestra de referencia (No. 24428) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

N. mexicana González, Hanlin & Glenn se aisló de la arena de la playa intermareal obtenida en playas de Acapulco, Estado de Guerrero en 1996. En el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, se encuentra depositada una muestra de referencia (No 25095).

5.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS

5.2.1 Determinación del efecto fitotóxico.

El potencial fitotóxico de los extractos y compuestos puros se determinó por medio de la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* utilizando el método de la caja Petri (Anaya et al., 1990). Los extractos se disolvieron en acetato de etilo y se realizaron las diluciones necesarias para generar disoluciones con concentraciones finales de 10, 100 y 1000 ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Un mililitro de las disoluciones de prueba se adicionó (sobre un disco de papel filtro) a las cajas Petri; a continuación el disolvente se evaporó en una campana, se adicionaron 3 mL de agua destilada sobre el papel filtro y por último, se colocaron 10 semillas de *A. hypochondriacus*. Para los compuestos puros se utilizó el mismo procedimiento y se ensayaron a concentraciones de 1, 10, 100 ppm. Las cajas Petri se incubaron a 30 °C

durante 24 horas. En cada caso se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación y crecimiento radicular con respecto al blanco. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se procesaron mediante la prueba estadística ANOVA ($p \leq 0.5$). Los valores de CI_{50} se determinaron mediante un análisis de regresión lineal.

5.2.2. Método Bioautográfico.

El método bioautográfico se utilizó para monitorear la actividad fitoinhibidora del extracto y de las fracciones primarias (Rahalison et al., 1994). Para ello se utilizaron placas de vidrio de gel de sílice (0.2 mm de ancho) del tamaño apropiado, en las cuales se eluyeron las muestras de prueba con la mezcla de disolventes apropiada (método convencional de cromatografía en capa fina). De manera simultánea, se eluyó una placa sin muestra de prueba (control de disolvente). Al concluir el proceso de elución, se dejó evaporar el disolvente completamente y se adicionaron a las placas una cantidad adecuada de una suspensión de agar bacteriológico (DIFCO) al 1%. Cuando se solidificó el agar, las placas se cubrieron de manera homogénea con semillas de *A. hypochondriacus*; a continuación las placas se incubaron a 28 °C en una atmósfera húmeda durante 24 horas. Al término del tiempo de incubación, se establecieron las zonas de inhibición mediante la comparación con los cromatogramas en capa fina de las muestras de prueba, eluidas en las mismas condiciones, y reveladas con un agente cromógeno. Como control positivo se emplea 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

5.2.3 Efecto de los productos naturales sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) dependiente de calmodulina (CaM).

La actividad de la PDE1 en presencia de CaM se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Sharma y Wang (Sharma y Wang, 1979) como se explica a continuación:

Preparación del medio de reacción: 0.015 unidades de PDE de cerebro de bovino, 0.83 μg de CaM de cerebro de bovino, 0.3 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalux atrox* y 30 nM de ASB (albúmina sérica de bovino) se incubaron, durante 1 hora a 30 °C, en un vial que contenía exactamente 2.5 mL de buffer de reacción.

Procedimiento: El ensayo se realizó en placas de 96 pozos (250 μL de capacidad). Para cada muestra de prueba se prepararon nueve diluciones seriadas, de forma tal de obtener concentraciones finales de 65, 50, 32, 20, 13, 7, 4, 2 y 1 μM . A continuación, se transfirieron a los pozos de la placa 10 μL de las diluciones de prueba conteniendo las concentraciones antes indicadas y 40 μL del medio de reacción previamente preparado y mantenido a una temperatura aproximada de 30 °C. Posteriormente, la placa se incubó a 30 °C durante 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se agregó a cada pozo 10 μL de AMPc 10.8 μM en intervalos de 10 segundos. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al término de este segundo periodo de incubación se adicionó a cada pozo 190 μL de verde de malaquita para detener la reacción. La cantidad de fosfato generado durante la reacción de hidrólisis del AMPc se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica de las muestras a 695 nm en un espectrofotómetro marca BioRad modelo 660. La actividad de la enzima se calculó de manera indirecta al interpolar las densidades ópticas registradas en una curva estándar preparada con fosfato monobásico de potasio en un intervalo de 0.2 a 3 nmol. Para cada muestra se realizaron seis réplicas independientes. Como control positivo se empleó clorpromazina.

5.2.4 Determinación de la constante de inhibición (K_i) de la malbrancheamida.

La evaluación de las constantes de inhibición de la malbrancheamida se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita en el inciso 4.2.3, variando únicamente la

concentración de CaM presente en el medio de reacción (10, 20, 40 y 80 ng/mL respectivamente) y en ausencia de albúmina sérica bovina. Todos los resultados fueron expresados como la media de seis réplicas.

Los valores de CI_{50} (concentración a la cual el 50% de la actividad enzimática se inhibe) fueron determinados mediante un análisis de regresión no lineal apropiado para una inhibición de tipo hiperbólica. Los valores de K_i fueron calculados mediante un ajuste global de los datos de las concentraciones del inhibidor y de la CaM usando la ecuación de inhibición competitiva siguiente:

$$V = \frac{V_{MAX} [S]}{K_{MA} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

V_{MAX} = actividad a concentraciones de saturación de CaM;

K_{MA} = constante de disociación del complejo CaM-PDE1;

I = concentración del inhibidor y

S = la concentración de CaM.

Las regresiones no lineales fueron realizadas con el programa Origin 3.0 (Microcal) o con el programa de estadística SigmaStat 2.0 (Jendel Scientific). Ambos programas dieron valores estimados muy similares.

5.2.5 Determinación del efecto antibrasinoesteroide de la malbrancheamida, la clorpromazina y el 2,4-D mediante el ensayo de la caja de Petri.

En primer lugar se determinó el efecto de la brasinólida sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas viables de *A. hypochondriacus* utilizando el método de la caja Petri (Anaya et al., 1994). El procedimiento fue idéntico al descrito en el inciso 5.2.1. La brasinólida se ensayó a concentraciones de 0.6940, 0.0694, 0.0069 y 0.0007 μ M.

El posible efecto antibrasinoesteroide de la malbranqueamida y la clorpromazina se determinó también por el método de la caja de Petri valorando el efecto de la brasinolida (0.0694 μM , concentración a la que se observó el mejor efecto inductor del crecimiento vegetal) sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* en presencia de diferentes concentraciones (0.3, 3, 30 y 300 ppm o $\mu\text{g/mL}$) del alcaloide indólico y/o la clorpromazina. Las cajas Petri se incubaron a 30 °C durante 24 horas; al cabo de este tiempo se midió la longitud de las radículas y la inhibición de la germinación con respecto al control. Estos mismos experimentos se realizaron en presencia de 2,4-D (1.666, 0.1666, 0.01666 y 0.001666 ppm o $\mu\text{g/mL}$).

5.2.6 Determinación del efecto antibrasinoesteroide de la malbranqueamida mediante el bioensayo del desenrollamiento de las hojas de trigo.

Preparación de los trigos de prueba: Las semillas de trigo se sembraron en bolsas de plástico que contenían 3/4 partes de tierra comercial (Metromix 500). La tierra se mojó con agua y luego se sembraron las semillas previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 10 %. Las semillas se cultivaron a 25 °C por 18 días en un invernadero. Pasado este tiempo, las plantas de trigo se cosecharon separando la segunda hoja enrollada, ésta se fragmentó en trozos de aproximadamente un centímetro de largo, para su uso posterior.

Bioensayo: El ensayo se realizó en cajas de Petri. Como brasinoesteroide de prueba se utilizó la brasinólida, la cual se ensayó a concentraciones finales de 0.01, 0.05, 0.001, 0.005, 0.0001 y 0.0005 $\mu\text{g/mL}$ (Wada et al., 1985). A cada caja de Petri se le agregó 1 mL de la solución de prueba; una vez que se evaporó el disolvente, se adicionaron 10 trozos de hoja de trigo enrollada y 20 ml de medio de Hogland. Las muestras se incubaron durante 24 horas a 25 °C en oscuridad.

La malbranqueamida se evaluó a las concentraciones finales de 17.92, 8.92, 4.46, 2.23 y 1.49 μM . Para realizar el bioensayo en presencia de la malbranqueamida se adicionan a cada caja de Petri 1 mL de la solución de brasinoesteroide y 1 mL de la solución de malbranqueamida, una vez evaporado el disolvente se adicionan 10 trozos de hoja de trigo y 20 ml de medio de Hogland. Las muestras se incubaron durante 24 horas a 25 °C en oscuridad.

La determinación de la constante de inhibición de la malbranqueamida se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita anteriormente, variando las concentraciones del brasinoesteroide para cada una de las cinco concentraciones de malbranqueamida ensayadas. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa Origin 3.0 (Microcal) o con el programa de estadística SigmaStat 2.0 (Jendel Scientific). Ambos programas dieron valores estimados muy similares.

5.3 FERMENTACIÓN DE *MALBRANCHEA AURANTIACA*.

En primer término se realizaron fermentaciones en pequeña escala (1L) para determinar el desarrollo del microorganismo en diferentes condiciones (Tabla 4). Con base en este estudio preliminar se realizaron cinco fermentaciones (cultivos M1-M5) a mediana escala. Los cultivos M1, M4 y M5 se realizaron en el laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química. El cultivo M3 se realizó en un cuarto de luz controlada (en completa oscuridad) en el laboratorio 314 del Departamento de Alimentos de la Facultad de Química. En todos los casos se utilizaron matraces Fernbach de 2.8 L. A cada uno de los matraces se le agregó 24 g de agar papa-dextrosa (DIFCO) y un litro de agua; posteriormente, se esterilizaron en una autoclave. Una vez esterilizados los matraces y el medio, se inocularon con el hongo desarrollado por tres semanas en agar papa dextrosa en una caja Petri. En el caso de los cultivos M1, M4 y M5, la incubación se realizó a temperatura ambiente y luz durante 15 días, con agitación continua a 200 rpm, en un

agitador orbital Standard (Lab-Line Instruments, Inc.). El cultivo M3 se realizó en las mismas condiciones a temperatura controlada de 28 °C en un cuarto oscuro. Por último, el cultivo M2 se realizó en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en un fermentador de 15 L de capacidad. Se utilizaron 240 g de agar papa-dextrosa (DIFCO) y 10 L de agua; el medio de cultivo se inoculó con el hongo desarrollado durante tres semanas en agar papa dextrosa en una caja Petri. La incubación se realizó a una temperatura de 25 °C durante 15 días, con agitación continua a 200 rpm y un flujo de aire de 10 L/min.

Tabla 4. Condiciones preliminares de fermentación del hongo *M. aurantiaca*.

CONDICIONES	1	2	3	4
Temperatura	TA	32° C	25° C	TA
Agitación	30 rpm	30 rpm	30 rpm	Estático
Luz	12 h luz-12 h oscuridad	12 h luz-12 h oscuridad	oscuridad	12 h luz-12 h oscuridad
Medio de cultivo	PDN	PDA	PDA	Medio mínimo
TA= Temperatura ambiente PDN= Papa dextrosa Natural, PDA= Papa dextrosa agar				

5.4 FERMENTACIÓN DE *NEOROLLANDINA MEXICANA*.

El cultivo de *N. mexicana* se realizó en un fermentador de 15 L de capacidad en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, a un costo similar al anterior. Se utilizaron 240 g de agar papa-dextrosa (DIFCO) y 10 mL de agua que fueron esterilizados en un autoclave de vapor; el medio de cultivo se inoculó con el hongo desarrollado por tres semanas en agar papa dextrosa en una caja Petri. La incubación se realizó a una temperatura de 30 °C durante 20 días, con agitación continua a 200 rpm y un flujo de aire de 5 L/min.

5.5 ESTUDIOS QUÍMICOS

5.5.1 Preparación de los extractos

Al término de cada fermentación el micelio se separó del medio de cultivo mediante filtración (cultivos en matraces Feernbach) o centrifugación (cultivos en el fermentador). Posteriormente, se prepararon los extractos tanto del micelio como el del medio de cultivo. El primero se elaboró mediante un proceso de maceración, y el segundo mediante una partición utilizando acetato de etilo como disolvente.

5.5.2 Análisis cromatográficos.

Para las separaciones cromatográficas preliminares en columna abierta se utilizó gel de sílice (Kieselgel 60 Merck; tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 μm ASTM). Para los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se utilizaron placas de vidrio o de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 G₂₅₄ Merck), utilizando varios sistemas de elución. Las placas primero se visualizaron con luz UV y diferentes

reveladores (sulfato cérico o reactivo de Erlich, según el caso, Tabla 5). Para el desarrollo de color luego de aplicar los reveladores fue necesario calentar a 110 °C por aproximadamente 2 minutos.

Tabla 5. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos.

Agente revelador	Composición		Referencia
Sulfato cérico	Sulfato cérico amoniacal	12.0 g	Stahl, 1969
	Ácido sulfúrico	22.5 mL	
	Hielo	350 g	
Reactivo de Erlich	Solución 1		Touchstone, 1992
	<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehído	0,5 g	
	etanol	75 mL	
	Solución 2		
	ácido clorhídrico concentrado	25 mL	
Solución de Iodo	Yodo (I ₂)	30 g	Bachmann y Seebach, 1998
	KI	2 g	
	EtOH	200 mL	
	H ₂ O	200 mL	

5.5.3 Registro de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

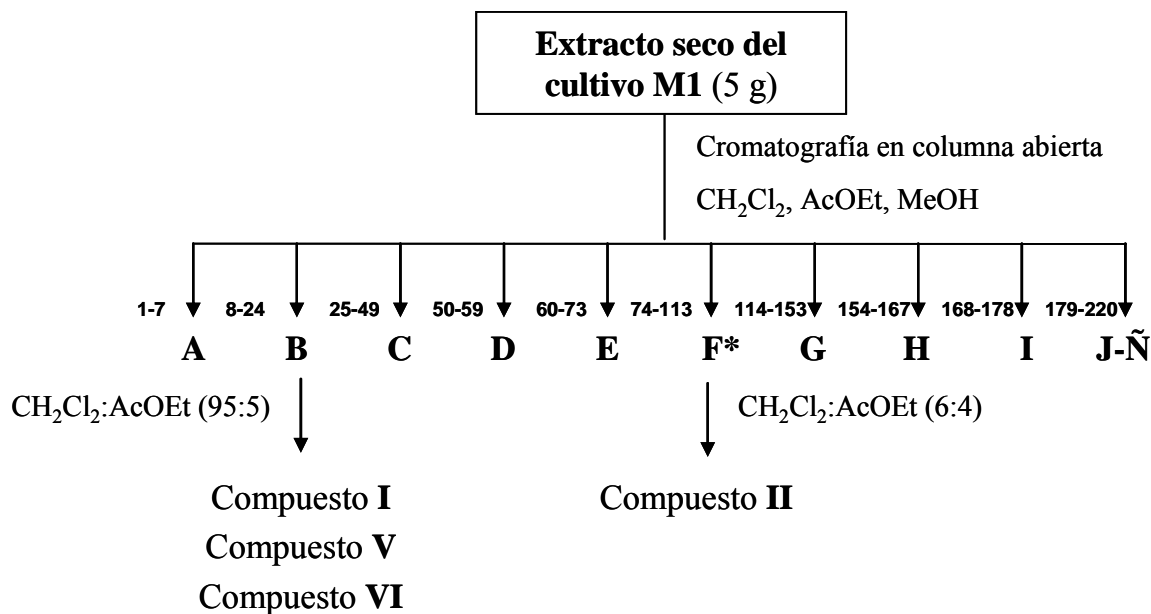
Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Jonhs y se reportan sin corregir. Los espectros en el IR se obtuvieron en pastillas de KBr o película y se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer 59913. Los espectros en el UV se registraron utilizando un espectrómetro Lambda II UV en MeOH. Los espectros de RMN uni- y bidimensionales (COSY, NOESY, HMBC y HMQC) se registraron en los espectrofotómetros Varian Mercury 300 [300 (^1H) ó 75 (^{13}C) MHz] ó Bruker DMX500 [500 (^1H) ó 125 (^{13}C) MHz]. Para el registro de los espectros de RMN se utilizó CDCl_3 o CD_3OD como disolventes y TMS como referencia interna. Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron utilizando un espectrómetro JEOL SX 102 mediante inyección directa con una energía de ionización de 70 eV. Los espectros de masas modalidad FAB^+ se registraron en un espectrómetro modelo JEOL DX300 utilizando una matriz de alcohol nitrobenílico. Los experimentos de rotación óptica se obtuvieron en un polarímetro digital JASCO DIP 360. Los espectros de dicroísmo circular fueron registrados en un espectropolarímetro JASCO 720 a 25 °C en una solución preparada con CH_3OH . El análisis de difracción de rayos X se efectuó en el Instituto de Química en un difractor Nicolet R3m.

5.5.4 Separación de la malbranqueamida.

5.5.4.1 Estudio del cultivo M1.

Debido a su similitud cromatográfica, los extractos del micelio y del medio de fermentación del cultivo M1 se reunieron. El extracto seco (3.2 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta utilizando como eluyentes mezclas de disolventes (CH_2Cl_2 , AcOEt y MeOH) con incremento de polaridad. Se obtuvieron un total de 220 fracciones primarias; éstas se reunieron de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica en

15 fracciones primarias (A-Ñ). Los detalles de este fraccionamiento se resumen en el Esquema 4. De acuerdo al análisis bioautográfico la fitotoxicidad se concentró en la fracción F.



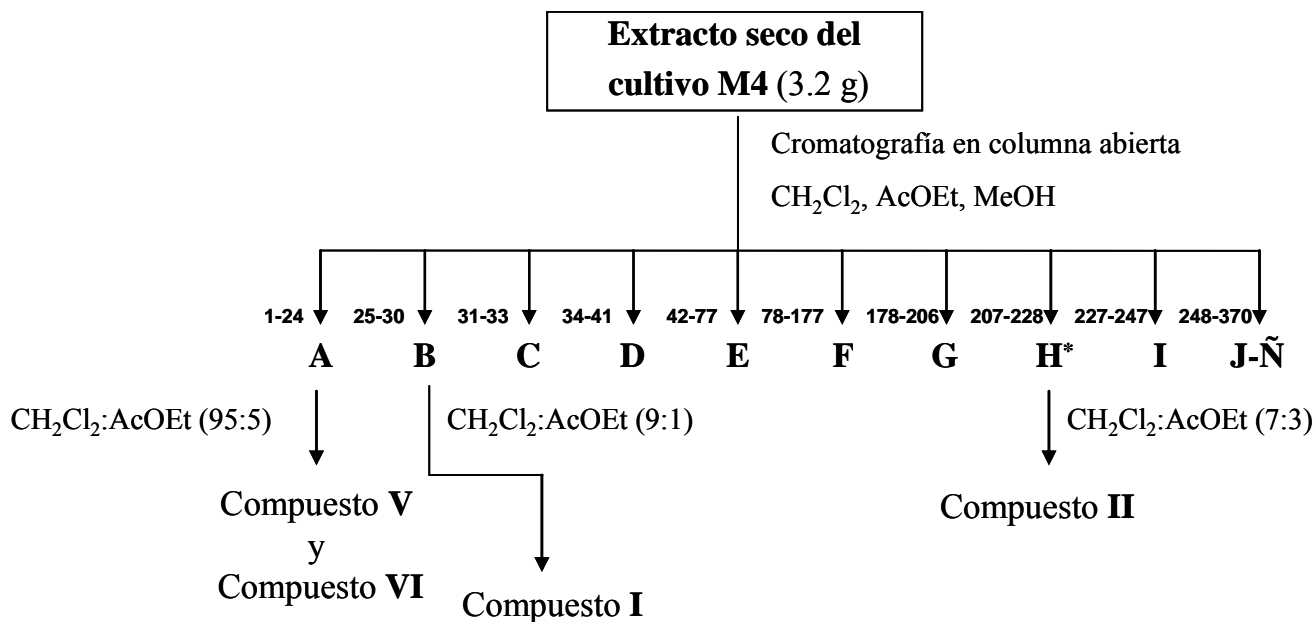
Esquema 4. Separación de la malbranqueamida del cultivo M1.

De la fracción B se obtuvieron 5 mg de los ácidos oleico (V) y linoléico (VI). De la fracción F, constituida por un compuesto mayoritario se separaron 12 mg del compuesto II mediante un proceso de cristalización (metanol-acetona 1:1). Posteriormente, el producto se purificó mediante sucesivas recrystalizaciones utilizando la misma mezcla de disolventes.

5.5.4.2 Estudio del cultivo M4.

Se realizó un nuevo cultivo (M4) en mediana escala utilizando las mismas condiciones que para el cultivo M1 con la finalidad de obtener cantidades adicionales del compuesto II. De la fermentación M4 se obtuvieron 5 g de extracto. El extracto se

fraccionó también por cromatografía en columna utilizando gel de sílice y el gradiente de elución que se indica en el Esquema 5 para generar 15 fracciones primarias (A-Ñ). La actividad fitotóxica, en este caso se concentró en la fracción H.



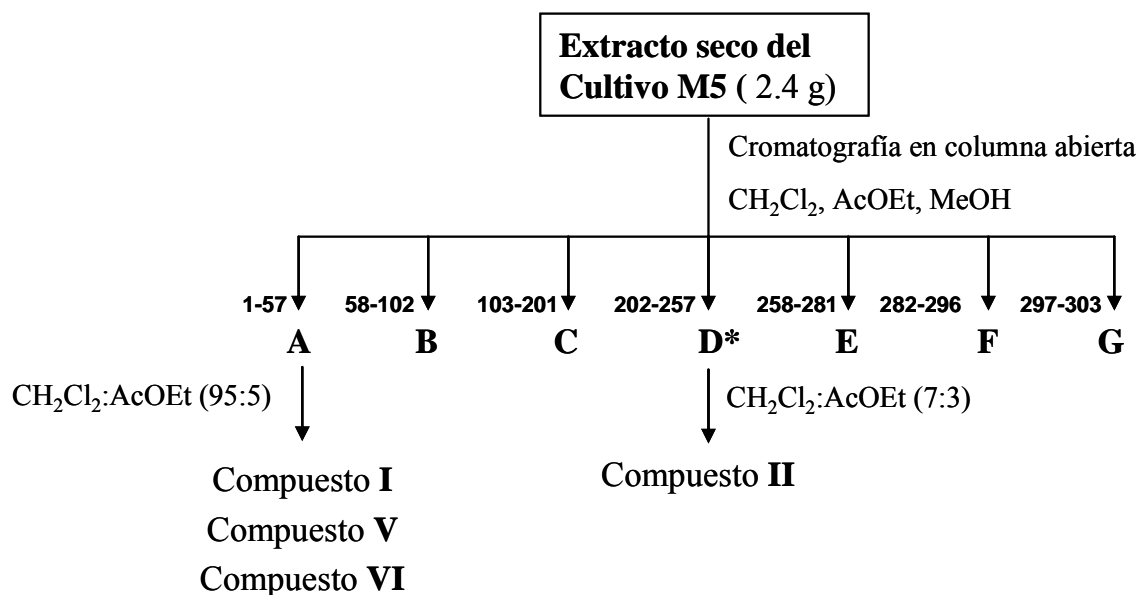
Esquema 5. Separación de la malbranqueamida del cultivo M4.

De la fracción A se obtuvieron los compuestos V y VI. De la fracción B, precipitaron 15 mg del ergosterol (I), el cual se caracterizó por CCD mediante su comparación con una muestra auténtica. De manera adicional, de la fracción I precipitaron 10 mg de compuesto II.

5.5.4.3 Estudio del cultivo M5.

Para realizar el cultivo M5 en mediana escala se utilizaron las mismas condiciones que para el cultivo M1, excepto que M5 se realizó en condiciones estáticas. El extracto seco (2.4 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta utilizando como

eluyentes mezclas de disolventes (CH_2Cl_2 , AcOEt y MeOH) con incremento de polaridad. Se obtuvieron un total de 303 fracciones primarias; éstas se reunieron de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica para dar un total de siete fracciones primarias (A-G). Los detalles de este fraccionamiento se resumen en el Esquema 6.



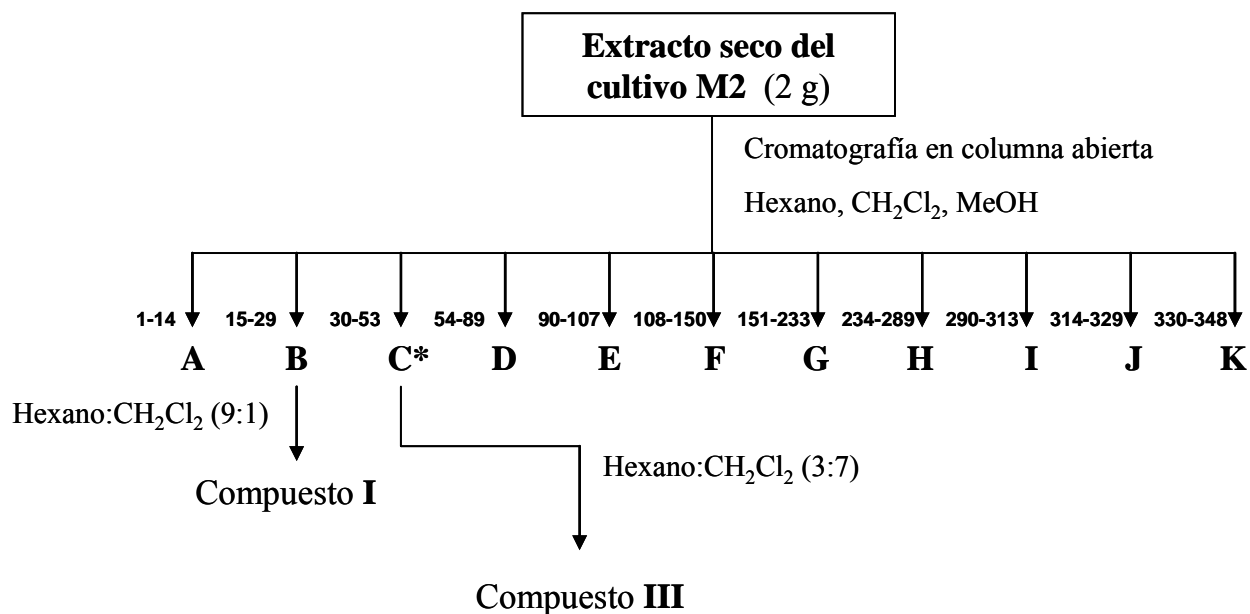
Esquema 6. Separación de la malbranqueamida del cultivo M5.

De la fracción A, nuevamente se obtuvieron 5 mg adicionales de los compuestos **V** y **VI**. De la fracción D precipitaron 10 mg del compuesto **II**, dicho producto se purificó posteriormente mediante sucesivas recrystalizaciones.

5.5.5 Obtención del ácido penicílico.

El extracto seco (2 g) del cultivo M2 se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 175 g de gel de sílice y como eluyentes CH_2Cl_2 -AcOEt, AcOEt y AcOEt- MeOH en diversas proporciones. Se obtuvieron 11 fracciones primarias (A-K).

La actividad fitotóxica se monitoreó a lo largo del proceso mediante una bioautografía. Este análisis indicó que la fracción C era la activa. Los detalles de este fraccionamiento se resumen en el Esquema 7.



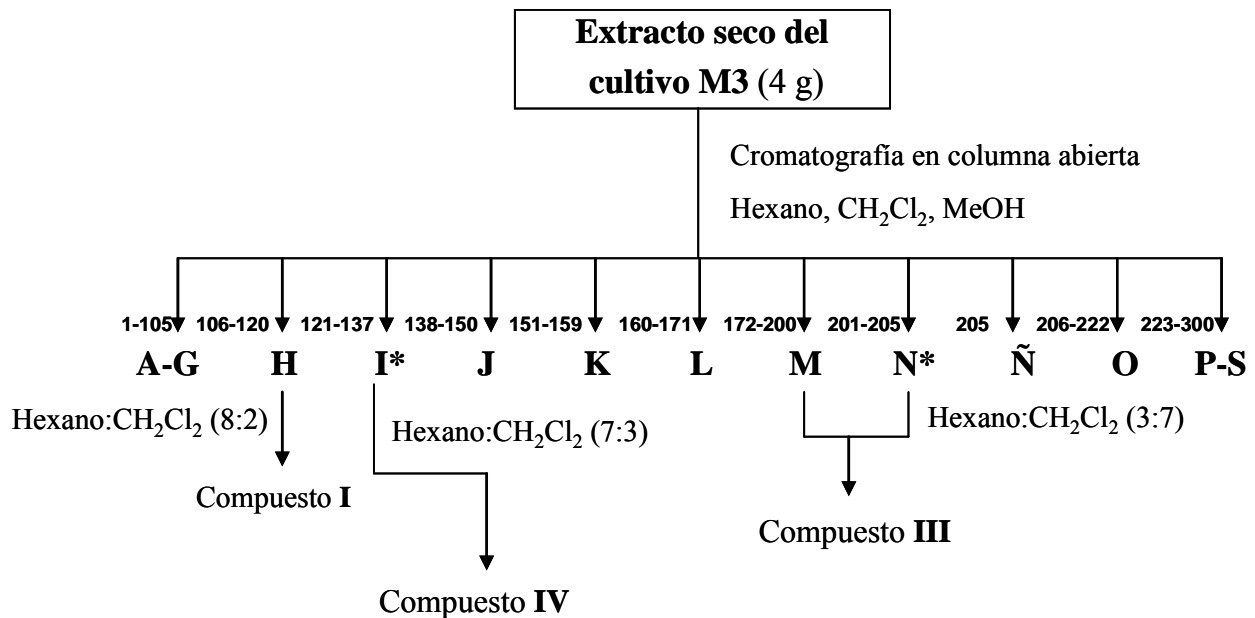
Esquema 7. Separación del ácido penicílico del cultivo M2.

De la fracción B, precipitaron cantidades adicionales de compuesto **I** (10 mg), obtenido también en el cultivo M4. De la fracción C se obtuvieron 25 mg del ácido penicílico (**III**), el cual fue purificado mediante recristalización (hexano-CHCl₃ 1:1).

5.5.6 Separación del ácido penicílico (**III**) y la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida (**IV**).

El extracto seco (4 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 300 g de gel de sílice y mezclas de CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH, con incremento de polaridad, como eluyentes. Se obtuvieron un total de 300 fracciones primarias; éstas se

reunieron de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica para dar un total de 20 fracciones primarias (A-S). Los detalles de este fraccionamiento se resumen en el Esquema 8. La actividad fitotóxica se encontró en fracciones I, M y N, de acuerdo a la bioautografía.



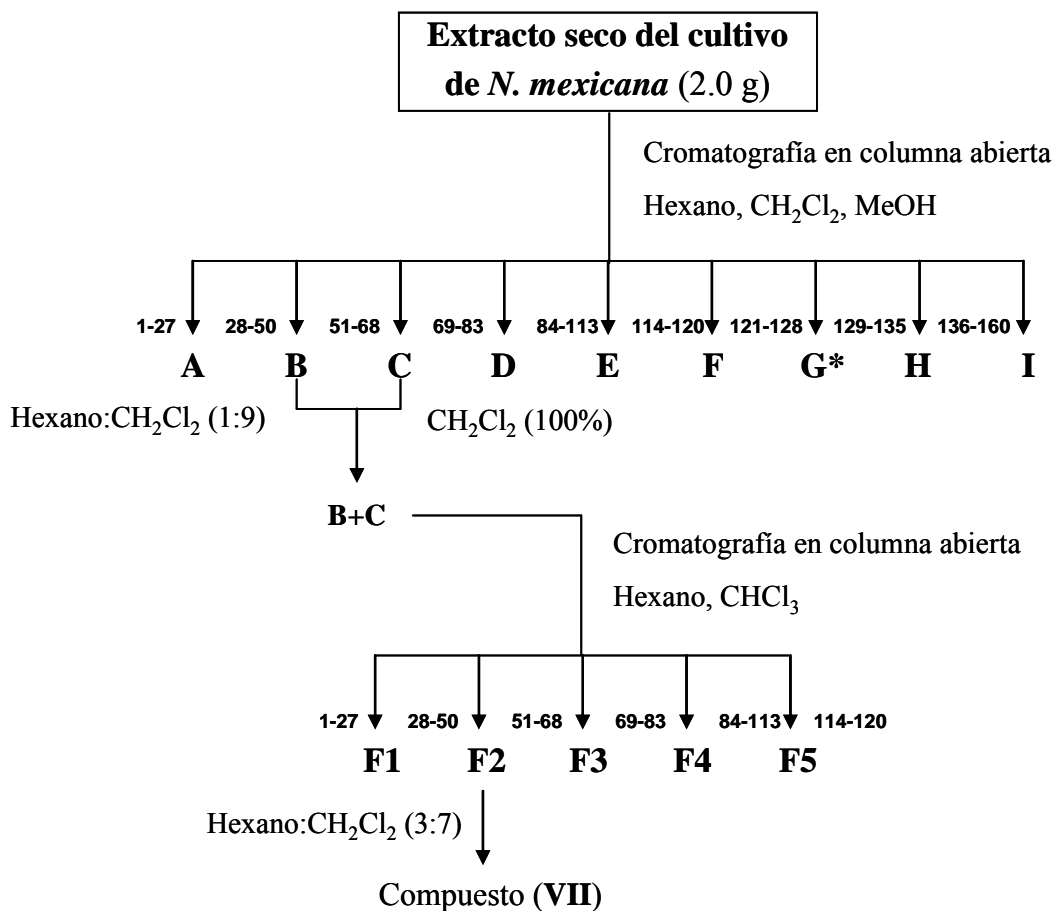
Esquema 8. Separación del ácido penicilico y el compuesto **IV** del cultivo M3.

De la fracción H, precipitaron 5 mg del compuesto **I**. De la fracción activa I precipitaron 20 mg de un sólido cristalino amarillo (compuesto **IV**). De las fracciones activas M y N precipitaron 5 mg de un producto idéntico al compuesto **III** aislado previamente del cultivo M2.

5.5.7 Separación del polímero 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.

Del extracto seco (10 g) se tomaron 2 g y se fraccionaron mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 100 g de gel de sílice y hexano, CH₂Cl₂ y

MeOH, con incremento de polaridad, como eluyentes. El proceso cromatográfico generó nueve fracciones primarias (A-I) como se indica en el Esquema 9.



Esquema 9. Separación del polímero 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona del extracto orgánico del cultivo de la especie fúngica *N. mexicana*.

De las fracciones B y C precipitaron 300 mg de una mezcla de polímeros del ácido 3-hidroxiбутанóico. Esta mezcla se sometió a una nueva separación cromatográfica utilizando una columna abierta empacada con 35 g de gel de sílice; como eluyentes se emplearon mezclas de hexano y CHCl₃ con incremento gradual de polaridad para generar cinco fracciones secundarias (F1-F5). De la fracción secundaria 2 se logró obtener en forma pura 25 mg del compuesto **7** (Esquema 8).

5.6 ANÁLISIS MISCROSCÓPICO DE LAS ASCOSPORAS DE *N. mexicana*.

Preparación de la muestra: Pequeños cubos de agar V8 -aproximadamente de 5 mm³- con el hongo desarrollado durante tres semanas se fijaron con una solución compuesta por el aldehído del ácido glutárico al 4% y tetraóxido de osmio al 5% en un buffer de fosfatos 0.1 M; posteriormente se deshidrataron con alcohol etílico (grado reactivo analítico) hasta su punto critico de secado y se recubrieron con una capa muy delgada de una mezcla de oro y paladio; esta capa incrementa el paso de la electricidad a través de la muestra así como la emisión de electrones secundarios -escasamente emitidos por muestras orgánicas- y por lo tanto el análisis de la muestra fúngica por microscopia electrónica de barrido.

Análisis de la muestra: El análisis microscópico detallado de las ascosporas de *N. mexicana* se realizó utilizando un microscopio electrónico de barrido (Leo 982 o Hitachi S-2460N).

5.7 ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.

5.7.1 Malbranqueamida (II).

La recristalizacioón de la malbranqueamida (II) con CH₂Cl₂-MeOH (8:2) generó el cristal apropiado para el análisis de rayos X. Este monocristal, un prisma incoloro y de dimensiones 0.398 × 0.232 × 0.166 mm, se ensambló sobre una fibra de vidrio y se proceso en un equipo de difracción de rayos X de monocristal marca Bruker Smart Apex CCD. Los parámetros de la celda fueron: $a = 18.888$ (4), $b = 18.888$ (4), $c = 13.134$ (3), α , β y $\gamma = 90^\circ$, $V = 4685.6$ (18) Å³, los cuales se determinaron por ajustes de mínimos cuadrados. El sistema cristalino fue tetragonal, el grupo espacial P1 con $Z = 2$ y la densidad de difracción del cristal de 1.271 g/cm³. Se registraron un total de 37574 reflexiones en la región

$1.89 < \theta < 25.03^\circ$ utilizando un monocromador de grafito de $\lambda = 0.71073$ y un emisor de radiación de Mo $K\alpha$, a la temperatura de 294 K, de las cuales sólo 4137 fueron independientes.

La estructura se resolvió por métodos directos y se refinó utilizando una matriz completa de mínimos cuadrados usando el paquete de programas SHELXTL V 6.1232 mediante el cual se refinaron 361 parámetros basados en F^2 . La configuración absoluta se determinó con un parámetro de Flack de 0.05 (9) (Flack, 1983). El R1 [$I > 2\sigma(I)$] final fue 0.0524 y $wR2$ (todas las reflexiones) fue de 0.1029. Máximo $\Delta/\rho = 0.171$; máximo $\Delta\rho = -0.229 \text{ \AA}^3$ (Flack, 1983).

Los datos cristalográficos del producto **II** se depositaron en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge bajo el número de referencia CCDC 285932.

5.7.2 1-Hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida (IV).

Los cristales apropiados del compuesto **IV** se obtuvieron mediante una recristalización con CH_2Cl_2 . El monocristal obtenido, un prisma amarillo y dimensiones $0.226 \times 0.112 \times 0.088$ mm, se montó sobre una fibra de vidrio y se transfirió a un difractómetro de monocristal (marca Bruker Smart Apex CCD), provisto de tubo de rayos X con ánodo de Mo (radiación $K\alpha$) a 293 K. Los parámetros de la celda fueron: $a = 6.5856$ (6), $b = 19.254$ (2), $c = 20.107$ (2), $\alpha = 90$, $\beta = 90$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 2549.6$ (4) \AA^3 y se determinaron por ajustes de mínimos cuadrados. El sistema cristalino es ortorrómbico, el grupo espacial P1 con $Z = 2$ y la densidad de difracción del cristal de 1.356 g/cm^3 . Se

recogieron un total de 17367 reflexiones en la región $2.03 < \theta < 25.00^\circ$ utilizando radiación de Mo K α (monocromador de grafito, $\lambda = 0.71073$) y a una temperatura T= 293K; 4483 reflexiones fueron independientes.

La estructura se resolvió por métodos directos y se refinaron 355 parámetros basados en F² (SHELXTL-97, G.M. Sheldrick, University of Göttingen, 1997). El R1 [$I > 2\sigma(I)$] final fue 0.0511 y wR2 (todas las reflexiones) fue de 0.0473. Máximo $\Delta/\rho = 0.136$; máximo $\Delta\rho = -0.123 \text{ \AA}^3$.

Los datos cristalográficos del producto **IV** se depositaron en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge (CCDC) bajo el número de referencia CCDC 262766.

5.8 CÁLCULOS DE MODELADO MOLÉCULAR DE LA MALBRANQUEAMIDA.

Las estructuras de mínima energía de la malbranqueamida se generaron utilizando el protocolo Monte Carlo (MMF94) implementado en el programa SPARTAN'04 (Software de Modelado Molecular, Wavefunction, Inc. Irving, CA). La búsqueda conformacional se realizó explorando los grados de libertad de torsión interna de los ángulos diedros seleccionados mediante el procedimiento automático reglamentario. Los ángulos de torsión considerados fueron: C12a-C13-C13a, C13a-C1-C2, C1-C2-C-3, C2-C3-N4, N4-C5-C5a. La conformación de mínima energía se obtuvo rotando el ángulo de torsión 30°. El conformero de mínima energía fue altamente optimizado mediante DFT. Los cálculos de DFT se realizaron utilizando el nivel B3LYP/631G*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en la presente investigación se discutirán en tres partes. La primera comprende todos los aspectos relacionados con la selección de las dos especies fúngicas como fuentes potenciales de compuestos fitotóxicos y la determinación de las condiciones óptimas para su cultivo. La segunda sección se refiere al aislamiento y caracterización de los principios fitotóxicos. La última parte describe los efectos de los productos fitotóxicos aislados sobre el crecimiento radicular de las semillas de amaranto, y la proteína CaM. En este inciso también se analiza el efecto antinobrasinoesteroidal del alcaloide malbrancheamida.

6.1 Selección y cultivo de *Malbranchea aurantiaca* y *Neorollandina mexicana*.

El proceso de selección de las especies fúngicas (*Malbranchea aurantiaca* y *Neorollandina mexicana*) como fuentes potenciales de fitotoxinas se realizó de acuerdo a la metodología clásica (Hoagland, 2001; Duke et al., 2002). Así, una vez que los siete aislamientos fúngicos (Tabla 6) se cultivaron en pequeña escala bajo condiciones estándares, se prepararon los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo. El potencial fitotóxico de los extractos se determinó midiendo sus efectos sobre el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus* mediante el método de la caja de Petri. Cada extracto se evaluó las concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm, por triplicado. De acuerdo a los resultados que se resumen en la Tabla 7, los aislamientos **5** (*Malbranchea aurantiaca*) y **7** (*Neorollandina mexicana*) fueron seleccionados como los más prometedores ya que sus extractos presentaron una buena actividad fitotóxica y, sus rendimientos fueron los mejores (Tabla 7). Esta última circunstancia facilitaría a posteriori el estudio químico de las especies seleccionadas.

Tabla 6. Género y hábitat de los aislamientos fúngicos evaluados de manera preliminar.

AISLAMIENTO	GÉNERO	HÁBITAT
1	<i>Chaetomium</i>	restos vegetales en arena de la playa
2	<i>Chaetomium</i>	madera sumergida en agua de los canales de Xochimilco
3	<i>Chaetomium</i>	madera sumergida en agua de los canales de Xochimilco
4	<i>Neosartorya</i>	arena de la playa
5	<i>Malbranchea</i>	guano de murciélago
6	<i>Petriella</i>	arena de la playa
7	<i>Rollandina</i>	arena de la playa

Tabla 7. Actividad biológica (CI₅₀) y rendimiento de los extractos en pequeña escala preparados a partir de las especies evaluadas de manera preliminar.

Aislamientos	Rendimiento (g)	CI₅₀ (ppm)
1	1.23	345
2	1.47	497
3	1.63	285
4	0.45	195
5	1.72	215
6	0.75	252
7	2.60	325

A continuación se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento de *M. aurantiaca* mediante la realización de fermentaciones en pequeña escala, verificando el

desarrollo del microorganismo en diferentes medios de cultivo (papa dextrosa y MD-I, Tabla 8), condiciones de incubación (estáticas vs agitación) y tiempos de fermentación (15 y 30 días) a temperatura ambiente.

Tabla 8. Composición de los medios líquidos de crecimiento utilizados para la fermentación del hongo *M. aurantiaca*.

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN	
Papa–Dextrosa natural (PDB-N)	Trozos de papa pelada	200 g
	Dextrosa	20 g
	Agua destilada	1L
Para dextrosa comercial (PDB-C)	Papa dextrosa (DIFCO)	24 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 amónio	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	

Los medios de crecimiento seleccionados fueron un medio rico (papa dextrosa) y otro con una cantidad mínima de nutrientes (medio mínimo, MD-I). El medio de papa dextrosa, ya fuese comercial o casero, resultó el más adecuado para el crecimiento del ascomiceto *M. aurantiaca*. La cantidad del micelio y el rendimiento de los extractos del medio de cultivo no variaron con el tiempo de incubación (quince o treinta días).

Los extractos obtenidos a partir del micelio y medio de cultivo resultaron similares en los análisis realizados en cromatografía en capa delgada. Por este motivo, se combinaron en todos los casos, es decir, por cada fermentación se obtuvo un sólo extracto. Finalmente se analizó cuantitativamente el efecto fitotóxico de los extractos sobre semillas de amaranto por el método de la caja de Petri. Los resultados obtenidos indicaron que los extractos del hongo cultivado en medio PDB inhiben el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* en el rango de concentraciones de 200 - 215 ppm, y no afectan la germinación.

Con base en los resultados antes descritos, se realizó la fermentación de *M. aurantiaca* en mediana escala utilizando cuatro condiciones distintas (cultivos M1-M3, y M5), mismas que se resumen en la Tabla 9. De manera adicional, se efectuó un quinto cultivo (M-4) en condiciones similares al de M-1 con la finalidad de obtener cantidades adicionales de uno de los metabolitos encontrados en este estudio. Los medios de cultivo y micelio resultantes en cada caso fueron extraídos con acetato de etilo y se analizaron por cromatografía en capa fina y, con base en su similitud cromatográfica, se combinaron para su posterior fraccionamiento. Los rendimientos de biomasa y la cantidad de los extractos obtenidos de los cultivos a gran escala se resumen en el Tabla 10. Una vez obtenido el extracto total se procedió de nueva cuenta al análisis cuantitativo del potencial fitotóxico de cada uno de los extractos utilizando el mismo ensayo de la caja de Petri (Tabla 10).

Tabla 9. Condiciones de cultivo y rendimiento de biomasa y extractos obtenidos de las distintas fermentaciones a mediana escala de *M. aurantiaca*.

Cultivo	M1 y M4	M2	M3	M5
Temperatura	Ambiente	32° C	25° C	ambiente
Agitación	30 rpm	30 rpm	30 rpm	Estático
Luz	12 h luz-12 h oscuridad	controlada	oscuridad	12 h luz-12 h oscuridad
Medio	PDB natural (12 L)	PDB natural (10 L)	PDB comercial (18 L)	PDB comercial (12 L)
Rendimiento del extracto del micelio	0.9g	1.6g	1.2g	0.5g
Rendimiento del extracto del medio de cultivo	2.3g	0.4g	2.8g	3.5g
Extracto total	3.2g	2.0g	4.0g	4.0
Biomasa	23.6g	40.0g	31.5g	29.9g

Tabla 10. Efecto fitotóxico de los extractos de *M. aurantiaca* sobre el crecimiento radicular (CI_{50}) de *A. hypochondriacus*.

Extracto	CI_{50} (ppm)
M1	195
M2	170
M3	185
M4	190
M5	195

Las condiciones óptimas de crecimiento de *N. mexicana* se establecieron de manera similar a *M. aurantiaca*. De tal forma que la realización de fermentaciones en pequeña escala, verificando el desarrollo del microorganismo en diferentes medios de cultivo (Papa dextrosa y MD-I), condiciones de incubación (estáticas vs agitación) y tiempos de fermentación (15 y 30 días) a temperatura ambiente revelaron que los mejores rendimientos y actividad se obtenían con el medio PDB, en condiciones de agitación y un tiempo de fermentación de 15 días.

Posteriormente, se realizó la fermentación en mediana escala (18 L) de *N. mexicana* en las condiciones establecidas. El medio de cultivo y micelio resultante fueron extraídos con acetato de etilo y se analizaron por cromatografía en capa fina. Debido a la similitud cromatográfica los extractos se combinaron para su posterior estudio químico. Una vez obtenido el extracto total (10 g) se realizó el análisis cuantitativo de su potencial fitotóxico, mediante la determinación de su efecto sobre el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus* ($CI_{50} = 300 \mu\text{g/mL}$)

6.2. Fraccionamiento biodirigido.

El fraccionamiento biodirigido de los extractos de *M. aurantiaca* obtenidos de las distintas fermentaciones (incisos 5.4.3, 5.4.4 y 5.4.5 de la parte experimental) condujo al aislamiento y purificación de los siguientes compuestos: ergosterol (**I**), malbranqueamida (**II**), ácido penicílico (**III**), 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida (**IV**), ácido oleico (**V**) y ácido linoléico (**VI**). En la tabla 11 se resumen las estructuras de los compuestos aislados, su rendimiento y el cultivo de procedencia.

Tabla 11. Compuestos aislados a partir de las diferentes fermentaciones de *M. aurantiaca*

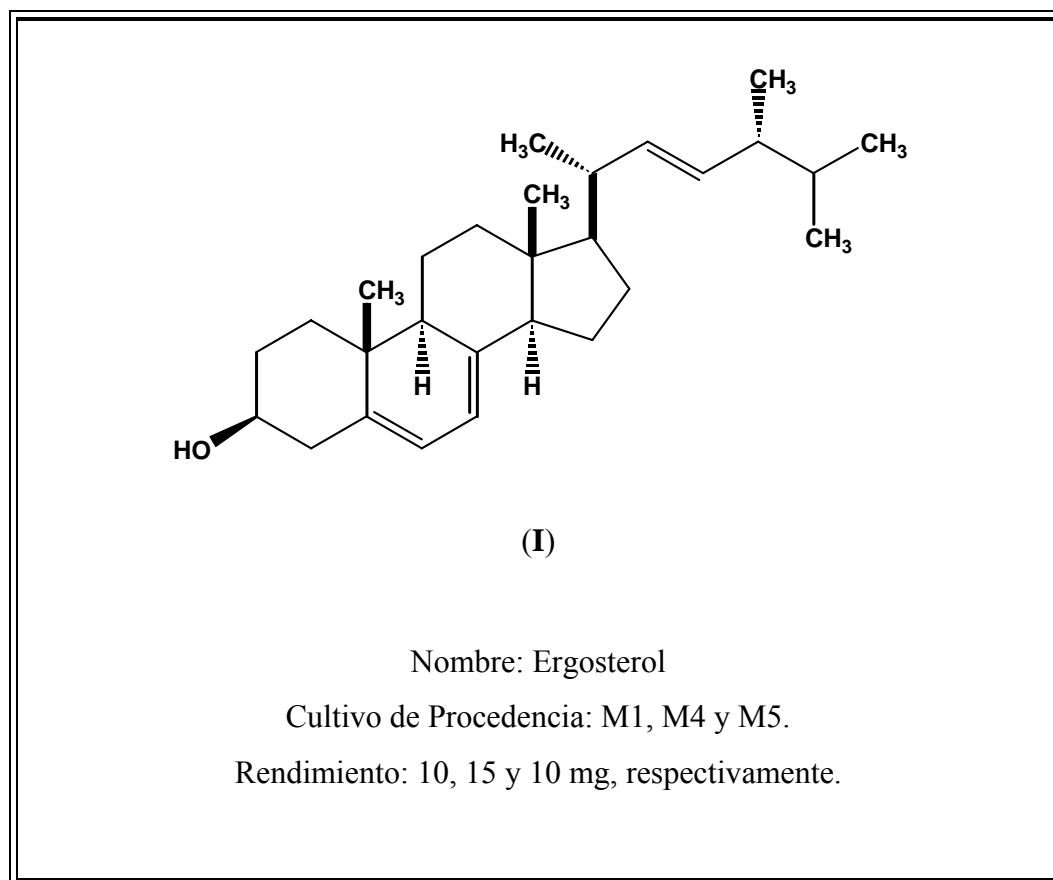
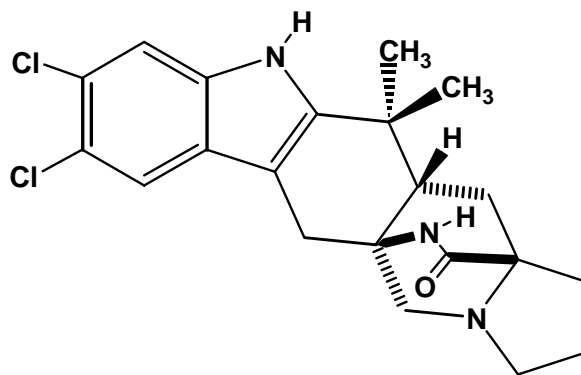


Tabla 11. Compuestos aislados a partir de las diferentes fermentaciones de *M. aurantiaca* (Continuación).

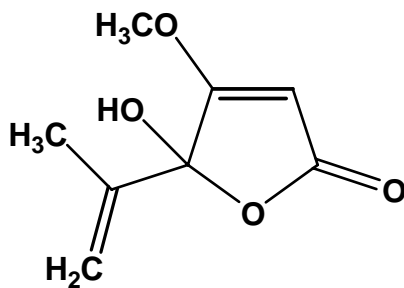


(II)

Nombre: Malbrancheamida

Cultivo de Procedencia: M1, M4 y M5.

Rendimiento: 12, 10 y 10 mg, respectivamente.



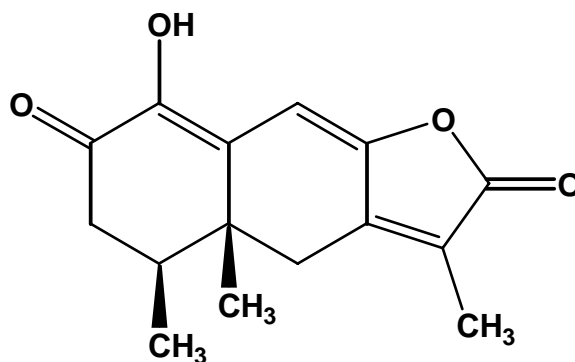
(III)

Nombre: Ácido penicílico

Cultivo de Procedencia: M2 y M3.

Rendimiento: 25 y 5 mg, respectivamente.

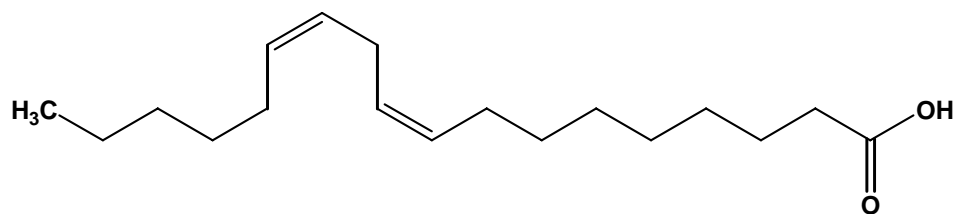
Tabla 11. Compuestos aislados a partir de las diferentes fermentaciones de *M. aurantiaca* (Continuación).



(IV)

Nombre: 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida Cultivo de Procedencia: M3.

Rendimiento: 20 mg.



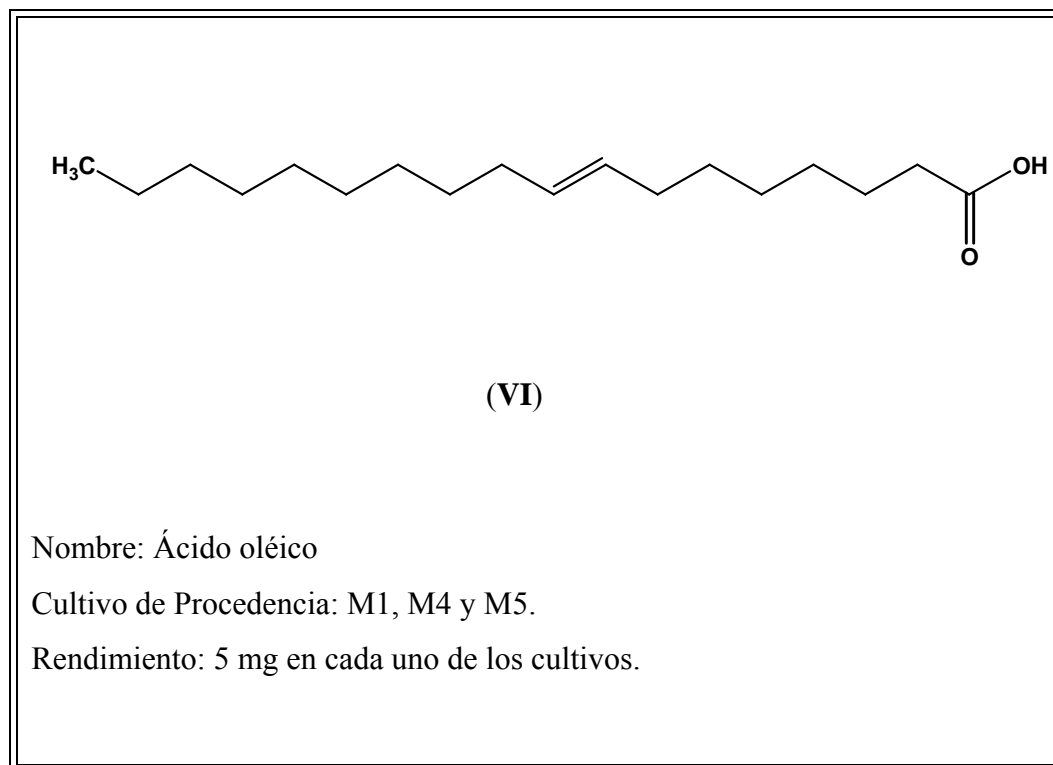
(V)

Nombre: Ácido linoléico

Cultivo de Procedencia: M1, M4 y M5.

Rendimiento: 5 mg en cada uno de los cultivos.

Tabla 11. Compuestos aislados a partir de las diferentes fermentaciones de *M. aurantiaca* (Continuación).



6.3 Caracterización de los metabolitos secundarios.

La caracterización de los metabolitos aislados se realizó utilizando métodos espectroscópicos y espectrométricos. Los compuestos **I**, **V** y **VI** se caracterizaron mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas previamente en la literatura (Smith y Korn, 1968; Dilika et al., 200). En esta sección se discutirán los aspectos más relevantes de la elucidación estructural de los compuestos **II**, **III** y **IV**.

6.3.1 Caracterización del compuesto II.

El compuesto **II** se obtuvo como un sólido cristalino incoloro, soluble en acetato de etilo, acetona y metanol; el producto reaccionó positivamente frente a los reactivos de Erlich y Dragendorff.

Su fórmula molecular se estableció por EM de alta resolución como $C_{21}H_{23}ON_3Cl_2$ que permitió calcular un índice de insaturación de 11. La presencia de dos átomos de cloro en la molécula fue consistente con la abundancia relativa de los picos $[M+2]$ y $[M+4]$ (Silverstein et al., 1991) con respecto al ion molecular $[M]^+$ en el espectro de masas. La intensidad de los picos fue aproximadamente $2/3$ y $1/10$, respectivamente, de la intensidad del pico del ion molecular (Figura 6).

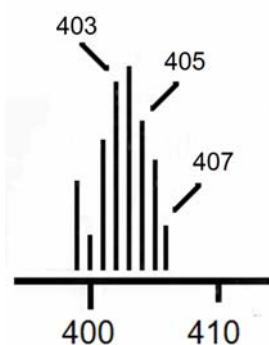


Figura 6. Conjunto isotópico para el ion molecular.

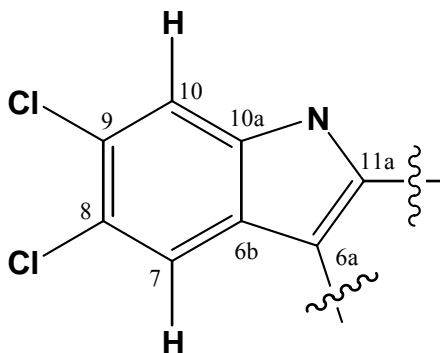
En el espectro en el IR (Tabla 12) del producto natural se observa la presencia de bandas típicas para un grupo lactama a 3299 y 1659 cm^{-1} , en tanto que en el UV se aprecian bandas de absorción máxima a 233 y 293 nm (Tabla 12). Estas evidencias espectroscópicas, así como la reacción positiva frente a los reactivos de Erlich y Dragendorff sugieren que **II** es un alcaloide de naturaleza indólica (Macabeo et al., 2005; Shoeb et al., 2005).

Tabla 12. Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto II.

Punto de fusión	321-324 °C
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₃ ON ₃ Cl ₂
Peso molecular	403
UV(MeOH) λ máx (log ε)	233 (3.94), 293 (4.74) nm
IR (ν_{max})	3299, 2959, 2924, 1739, 1659, 1460, 1317, 1241 cm ⁻¹
EM IE m/z (intensidad relativa)	407 (1), 405 (3), 404 (1), 403 [M ⁺ (5)], 363 (10.6), 361 (53.6), 359 (87.9), 345 (17.2), 325 (12.2), 264 (15.7), 262 (21.4), 240 (5), 228 (5), 180 (7), 164 (100), 163 (25), 135 (15.7), 120 (10) 96 (7)
EM IE-AR m/z	Calculado 403.1218 (M) ⁺ , encontrado 403.1106
[α]_D^t	+42 (c= 1, MeOH)
CD (MeOH) εΔ (nm)	8699 (233)

En el espectro de RMN-¹³C del compuesto II (Tabla 13) se aprecian señales para 21 carbonos, los cuales de acuerdo al análisis de espectro HSQC, corresponden a 10 carbonos cuaternarios, tres metinos, seis metilenos y dos metilos. De estas señales, la que aparece en δ_C 176.7 (C-14) es atribuible a un carbonilo de lactama, en tanto que el conjunto de señales en δ_C 104.8 (C-6a), 123.3 (C-6b), 119.6 (C-7), 125.4 (C-8), 128.2 (C-9), 113.1 (C-10), 137.3 (C-10a) y 145.2 (C-11a) son fácilmente asignables a un núcleo indólico (Shoeb et al., 2005), en congruencia con la reacción colorida de Erlich y los máximos de absorción observados en el espectro en el UV. El desplazamiento químico de las señales en δ_C 125.4 (C-8) y 128.2 (C-9) permite proponer la ubicación de los dos cloros sobre los carbonos C-8

y C-9 del anillo carbocíclicos del indol. La presencia de dos singuletes asociados a un anillo aromático tetrasustituido se encuentran en armonía con esta propuesta y permiten proponer la existencia de la estructura parcial A en la molécula.

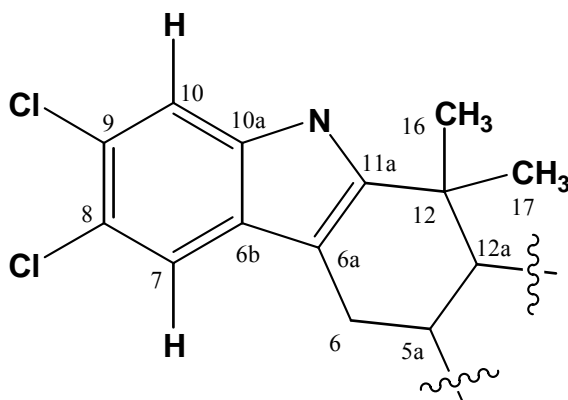


Fragmento A

El fragmento A y la lactama satisfacen siete de los once grados de insaturación requeridos para la fórmula molecular, por lo tanto la molécula contiene cuatro anillos adicionales. Con base en el análisis detallado de los espectros en dos dimensiones (COSY, HETCOR, HMBC y NOESY) fue posible establecer las conectividades de los grupos funcionales y, por consiguiente, tres estructuras parciales adicionales (fragmentos B-D).

La estructura B corresponde a un grupo dimetilciclohexano que se fusiona al núcleo indólico a través de los carbonos C-6a y C-11a. Las correlaciones más importantes observadas en el espectro HMBC que sustentan el fragmento B son las siguientes: a) La señal del único metileno bencílico [C-6, δ_H 2.86 m (H6A), 2.85 m (H6B) / δ_C 30] correlaciona con las absorciones de los carbonos C-6a y C-11a del indol y con la de un metino [C-12a, δ_H 2.14 m / δ_C 48.5]; ésta última a su vez correlaciona con las señales de los dos metilos [C-16, δ_H 1.32 s / δ_C 30.6 y C-17, δ_H 1.42 s / δ_C 24.2] presentes en la molécula. Por último, los hidrógenos de los metilos correlacionan con un carbono cuaternario [C-12, δ_C 35.5]. Estas correlaciones son consistentes con la presencia de un fragmento tipo gem

dimetilo en la molécula. El conjunto de correlaciones descritas permite entonces proponer la estructura parcial B. Asimismo las correlaciones C-10a/ H-7, C-6b/H-10, C-6a/H7 corroboraron las posiciones de los átomos de cloro.



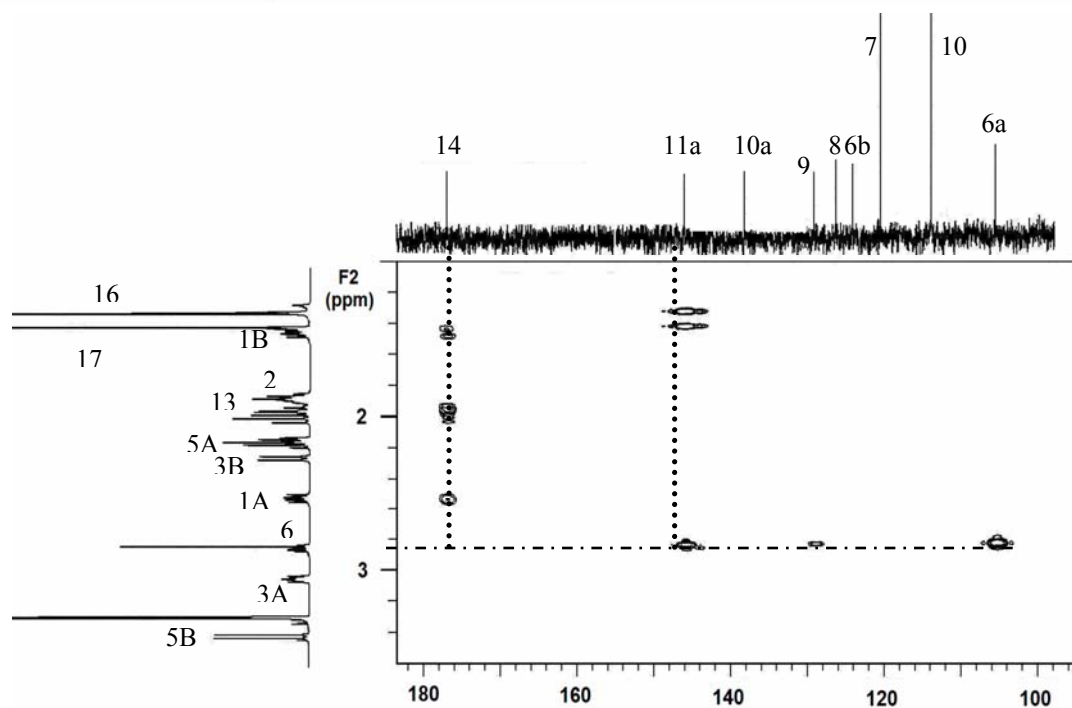
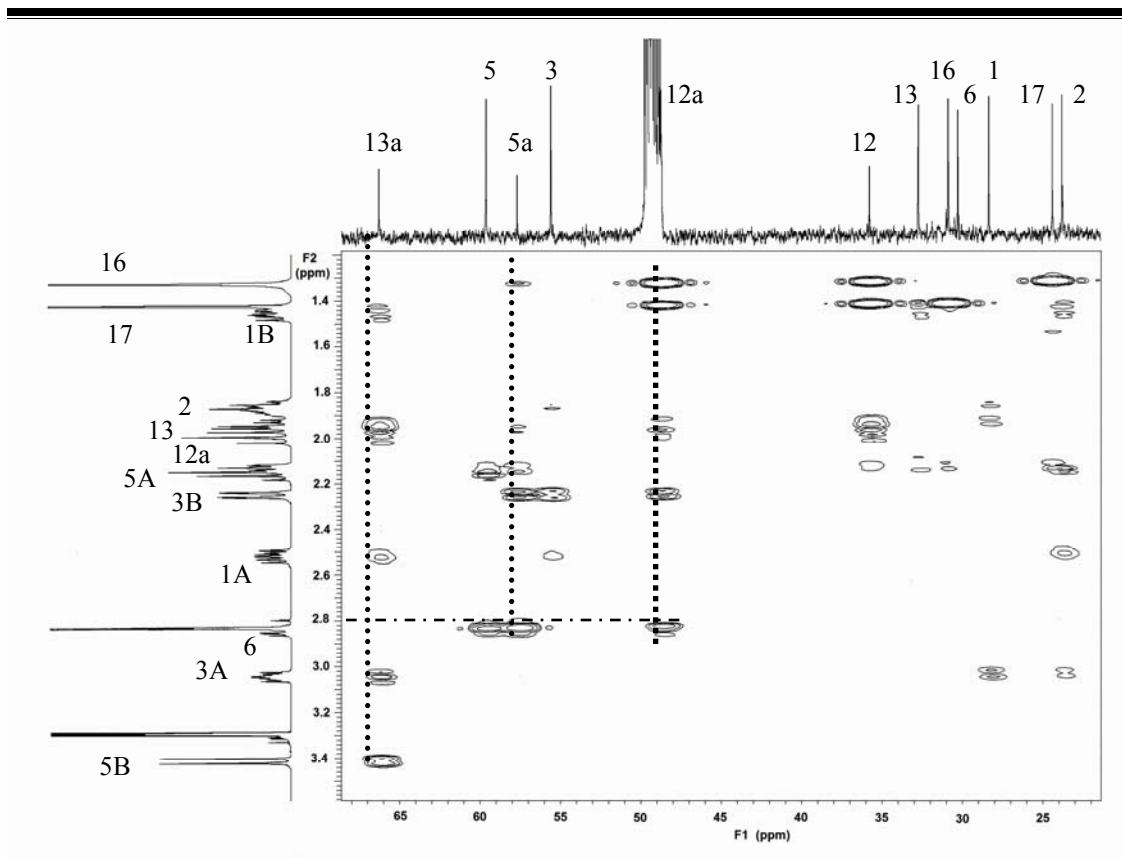
Fragmento B

La siguiente estructura parcial corresponde a un biciclo[2.2.2]diazaoctano que se une al fragmento B a través de los carbonos 12a y 5a (fragmento C). Esta propuesta está respaldada en las siguientes correlaciones: En el espectro COSY la absorción del hidrógeno del metino 12a (δ_H 2.14 m / δ_C 48.5) correlaciona con la de los protones de un metileno [C-13, δ_H 1.99 m (H13A), 1.94 m (H13B) / δ_C 32.5]; ésta última, a su vez, presenta un cuadro de conectividad en el espectro HMBC con las señales de dos carbonos cuaternarios [C-13a, δ_C 66.1; C-14, δ_C 176.4], el de campo más bajo corresponde a la lactama y, el otro al carbono α al carbonilo de lactama. Las señales del metileno bencílico (C-6) del fragmento B correlacionan con las señales de otro carbono cuaternario [C-5a, δ_C 57.5] y de un tercer metileno [C-5, A δ_H 2.25 dd 2, 10 (C-5a); 3.42 d 10 (C-5b) / δ_C 59.4]. Todas las correlaciones descritas hasta este punto permiten proponer la estructura parcial C. En particular, las correlaciones C-5a/ H-6, H-12a, H-13; C-12a/ H-13, H-6; C-13a/ H-13, H-5 y C-14/ H-13 en el espectro HMBC indican que este fragmento tiene el arreglo de un biciclo[2.2.2]diazaoctano que debe estar unido al fragmento B. La orientación del carbonilo en la estructura bicíclica provoca la desprotección del hidrógeno 5B (δ 3.42).

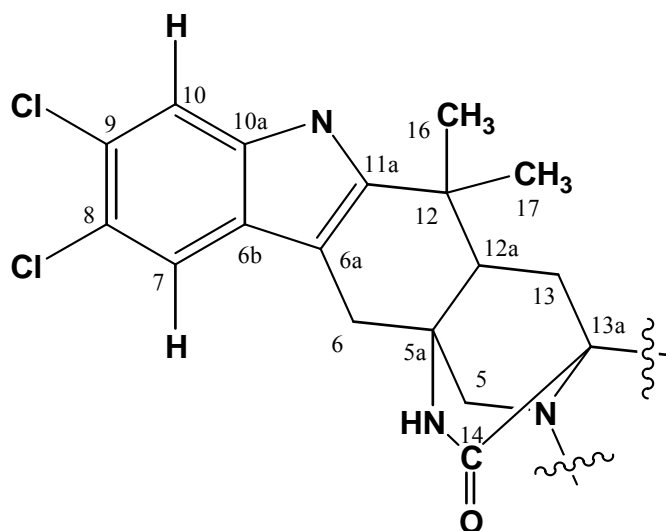
Tabla 13. Datos de RMN de la malbranqueamida (CD₃OD) ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	28.1	A 2.52 m, B 1.46 m	H ₂ , H ₃ , H ₁₃
2	23.6	1.87 m	H ₁ , H ₃
3	55.3	A 3.05 m, B 2.15 q (2, 5)	H ₁ , H ₂ , H ₅
5	59.4	A 2.25 dd (2, 10), B 3.42 d (10)	H ₃ , H ₆ , H _{12a}
5a	57.5		H ₆ , H _{12a} , H ₁₃ , H ₁₆
6	30.0	A 2.86 m, B 2.85 m	
6a	104.8		H ₆ , H ₇
6b	123.3		H ₇ , H ₁₀
7	119.6	7.47 s	H ₆ , H ₁₀
8	125.4		H ₇ , H ₁₀
9	128.2		
10	113.1	7.39 s	H ₇
10a	137.3		H ₇ , H ₁₀
11a	145.2		H ₆ , H ₁₆ , H ₁₇
12	35.5		H _{12a} , H ₁₃ , H ₁₆ , H ₁₇
12a	48.5	2.14 m	H ₆ , H ₁₃ , H ₁₆ , H ₁₇
13	32.5	A 1.99 m, B 1.94 m	H ₁ , H ₂
13a	66.1		H ₁ , H ₃ , H ₅ , H ₁₃
14	176.7		H ₁ , H ₁₃
16	30.6	1.32 s	H _{12a} , H ₁₇
17	24.2	1.42 s	H _{12a} , H ₁₆

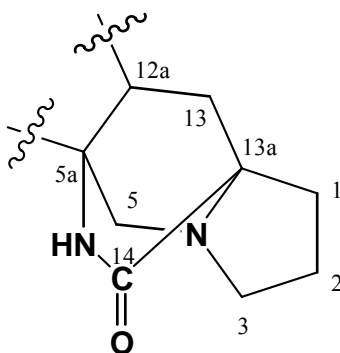
Las constantes de acoplamiento se encuentran entre paréntesis y se expresan en Hz.

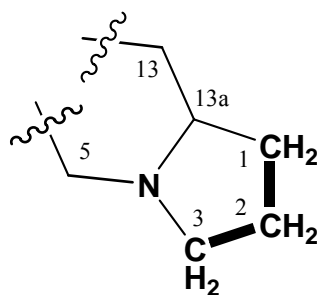
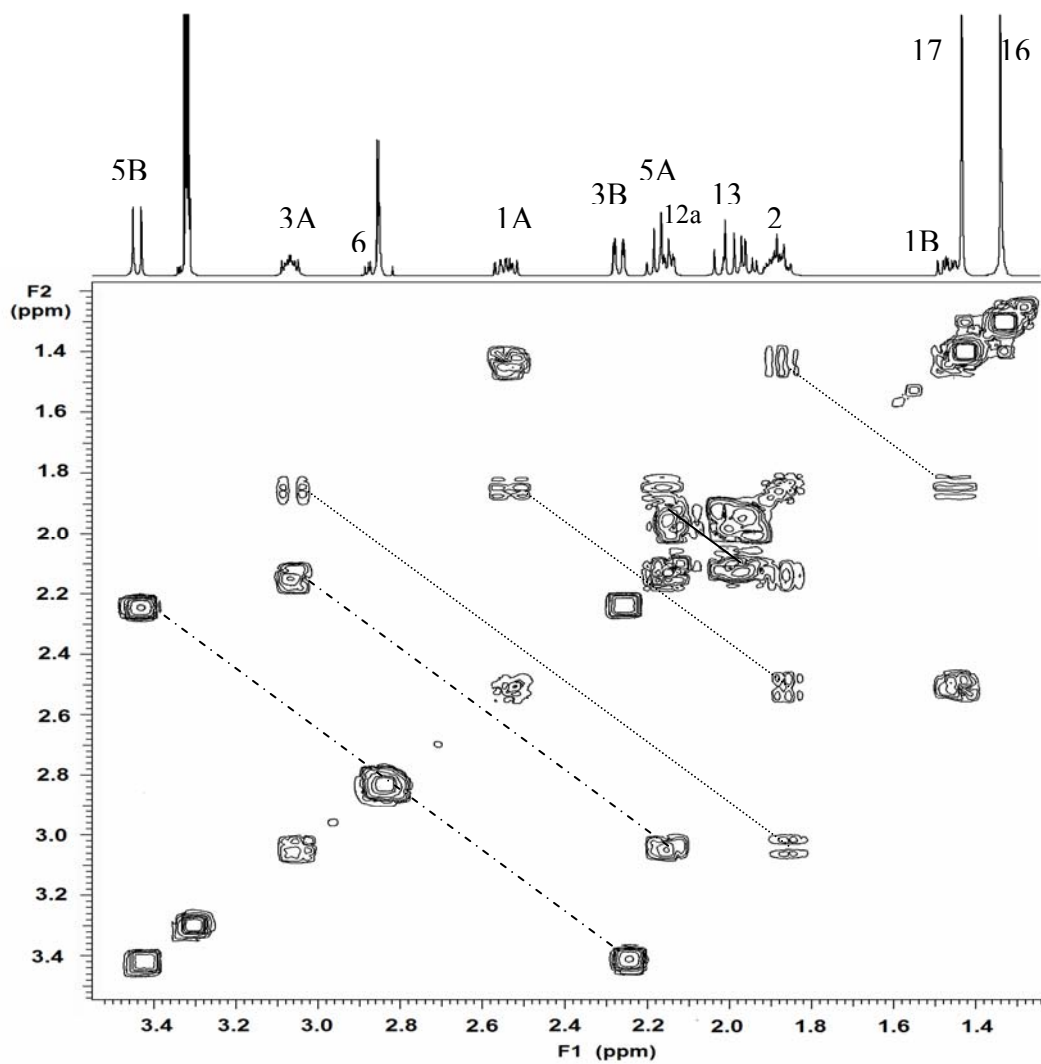


Espectro 1. Ampliaciones del espectro HMBC de la malbranqueamida. Correlaciones importantes para el establecimiento de los fragmentos B y C.

**Fragmento C**

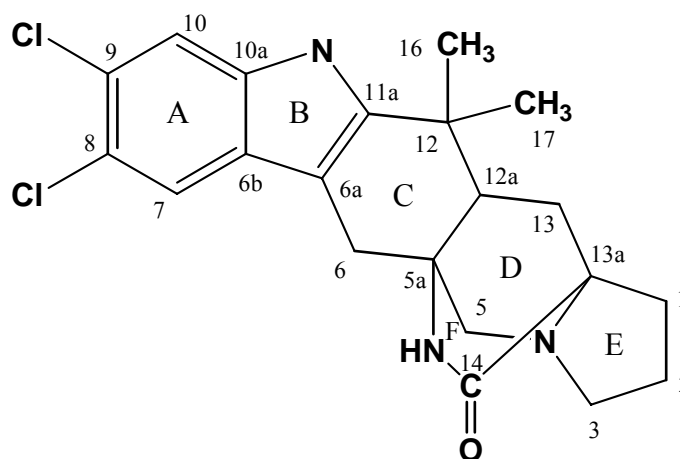
Finalmente, el fragmento D corresponde a la formación de un anillo heterocíclico de 5 miembros entre el biciclo[2.2.2]diazaoctano y los tres metilenos restantes, la presencia de este fragmento se apoya en las correlaciones C-13a/H-1 (δ_H 2.52, 1.46), H-3 (δ_H 3.05, 2.15) observadas en el espectro HMBC. Evidentemente el fragmento $^1\text{CH}_2$ - $^2\text{CH}_2$ - $^3\text{CH}_2$ se dedujo fácilmente a partir de los cuadros de conectividad observados en el espectro COSY.

**Fragmento D**



Espectro 2. Espectro bidimensional COSY de la malbranqueamida.

La integración de las estructuras parciales C y D permitieron proponer la estructura plana del compuesto **II**, misma que fue corroborada mediante su análisis de difracción de rayos X (Figura 7). Como se ilustra en la estructura de la Figura 7, en el biciclo [2.2.2] diazaoctano, el anillo C adopta una conformación de bote, mientras que el anillo F (lactama) adopta una conformación de sobre. El anillo D también presenta una conformación de sobre mientras que el anillo E adopta una conformación de sobre retorcido. Los átomos C-13a-C1-C2-C3 están localizados en el plano del anillo mientras que N4 está fuera del plano.



Malbrancheamida

Para establecer la configuración absoluta de los centros estereogénicos de la molécula se calculó el parámetro de Flack durante el proceso de refinamiento de la estructura en el transcurso de su análisis de difracción por rayos X. Este método se basa en la dispersión anómala de los rayos X, favorecida en este caso por la presencia de los átomos de cloro. Al determinar el factor de Flack en el análisis de difracción de rayos X se refinan ambas formas enantioméricas de la molécula (Flack, 1983). Cuando el valor del parámetro es igual o cercano a cero se trata del enantiómero correcto; cuando el valor es cercano a uno, la molécula analizada corresponde al enantiómero contrario; por último, cuando el valor es de 0.5 el compuesto puede ser simétrico o una mezcla racémica. Como el valor

experimental el parámetro de Flack para la malbranqueamida fue de 0.07, un valor cercano a cero, la configuración del núcleo 12a se designó como *S* (Flack, 1983).

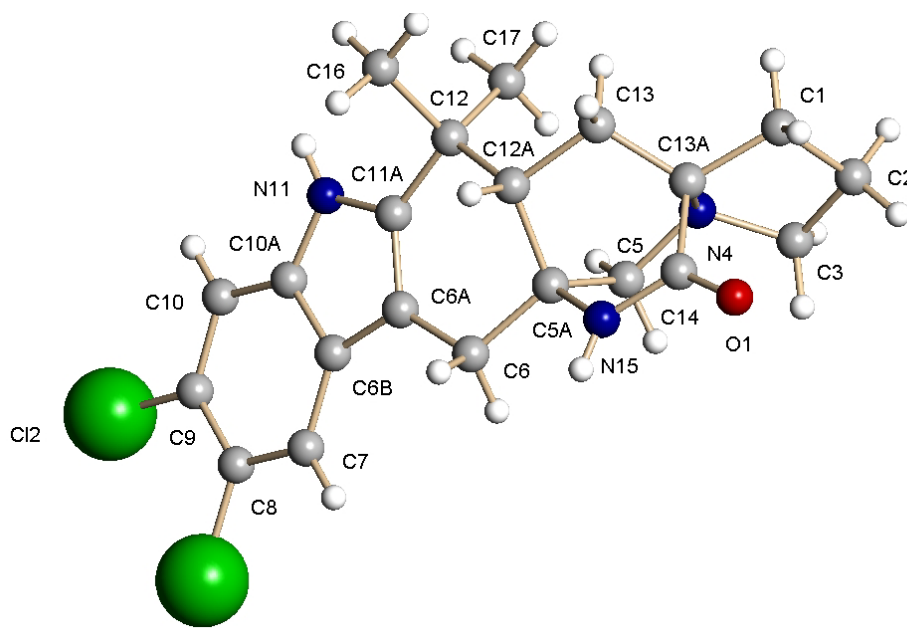


Figura 7. Vista estereoscópica de la estructura obtenida por rayos X de la malbranqueamida.

Para entender mejor el comportamiento conformacional, se realizó un análisis de la molécula utilizando la teoría de los funcionales de la densidad (DFT). La estructura inicialmente se construyó mediante los fragmentos estándares y minimizando la molécula por medio de un análisis de mecánica molecular implementado en el programa SPARTAN'04. Este estudio inicial reveló un conformero de mínima energía ($E= 137.77$ kcal/mol, Figura 8), el cual fue optimizado utilizando DFT (B3LYP/631G*). En la estructura optimizada utilizando DFT ($E= -1973.98$ kcal/mol) el anillo E exhibe una conformación de sobre y los átomos N4-C-13a-C1-C2 están localizados en el plano, mientras que C3 está fuera del plano (Figura 9).

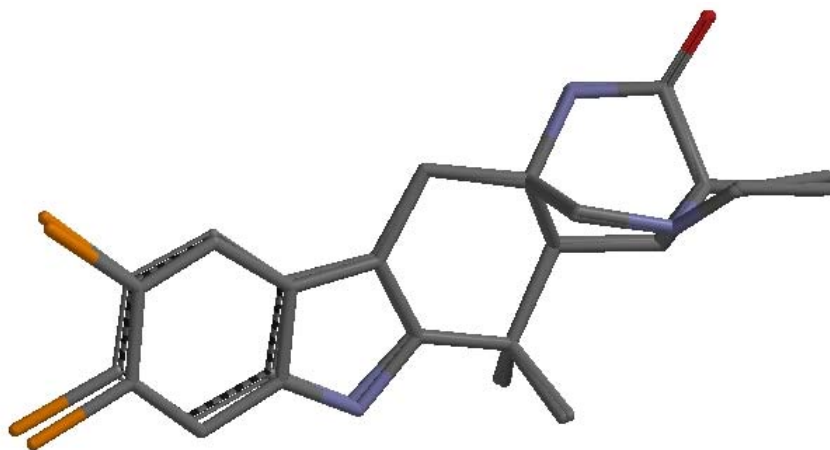


Figura 8. Estructura obtenida por Rayos X (--) sobrepuesta a la conformación de mínima energía obtenida por el análisis Monte Carlo del compuesto **II**.



Figura 9. Estructura obtenida por Rayos X (--) sobrepuesta a la estructura optimizada por la metodología DFT.

La malbranqueamida (**II**) es un nuevo miembro de la pequeña familia de 24 índoles prenilados constituido por las brevianamidas, las paraherquamidas, las marcfortinas, las esclerotamidas, las asperparalinas, las aspergamidas, las avrainvilamidas, las estefacidinas y el metabolito VM55999 (Stocking y Williams, 2003).

Al igual que los otros 24 alcaloides, el producto **II** contiene un núcleo bicíclico[2.2.2]diazaoctano que probablemente se biosintetiza a través de una reacción intramolecular de Diels-Alder a partir de un precursor de tipo azadieno, sin embargo, el alcaloide posee características estructurales particulares. De tal forma que el producto **II** es el primer miembro de la familia que contiene halógenos en su estructura. Por otra parte, la malbranqueamida y los productos VM55999, aspergamidas A y B y CJ-17, 665 son los únicos alcaloides del grupo que no poseen un anillo de tipo espiro. No obstante la malbranqueamida difiere de estos cuatro productos en la configuración de la fusión del anillo dimetilciclohexano con el bicíclico[2.2.2]diazaoctano. En la malbranqueamida esta fusión es de tipo *anti*, mientras que en los otros es *syn*.

El hallazgo de la malbranqueamida como producto natural apoya la hipótesis que Williams y colaboradores propusieron recientemente para la biosíntesis de esta familia de alcaloides. Según estos autores, la ciclización intramolecular [4 + 2] vía Diels-Alder (*syn* o *anti*) del intermediario de tipo azadieno puede generar cuatro intermediarios que sirven de precursores directos de los distintos alcaloides de esta familia como se ilustró en el Esquema 3.

Es importante señalar que en la generación de estos compuestos hay una diastereoselectividad en la estereoquímica (las brevianamidas son diastereoisómeros *anti* y las paraherquamidas son *syn*), la cual seguramente depende de la batería enzimática contenida en las distintas especies fúngicas productoras de este tipo de metabolitos.

6.3.2 Caracterización del compuesto IV.

El metabolito **IV** se obtuvo como un sólido cristalino amarillo, ópticamente activo y soluble en cloroformo, CH_2Cl_2 y acetato de etilo. Su fórmula molecular se determinó como $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$ mediante espectrometría de masas de alta resolución. Esta fórmula permitió calcular un índice de insaturación de ocho.

Tabla 14. Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto **IV**.

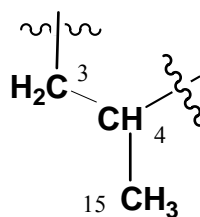
Punto de fusión	198-200 °C
Fórmula molecular	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$
Peso molecular	260
UV(MeOH) λ máx (log ϵ)	378 (4.8) nm
IR (ν_{max})	3299, 2959, 2924, 1739, 1659, 1460, 1317, 1241 cm^{-1}
EM (IE) m/z (intensidad relativa)	260 (100), 245 (18), 232 (45), 217 (25), 203 (7), 189 (13), 175 (7), 161 (7), 147 (6), 91 (6), 69 (10), 41 (7), 18 (19)
EM (IE-AR) m/z	Calculado 261.1127 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , encontrado 261.1119
$[\alpha]_{\text{D}}^{\text{t}}$	-187 ($c = 1, \text{CHCl}_3$)
CD (MeOH) $\epsilon\Delta$ (nm)	8699 (233)

El espectro en el IR (Tabla 14) de este compuesto presentó bandas de absorción asociadas con la presencia de dos grupos carbonilos conjugados, incluyendo una γ -lactona a 1779 cm^{-1} y una cetona conjugada a 1665 cm^{-1} .

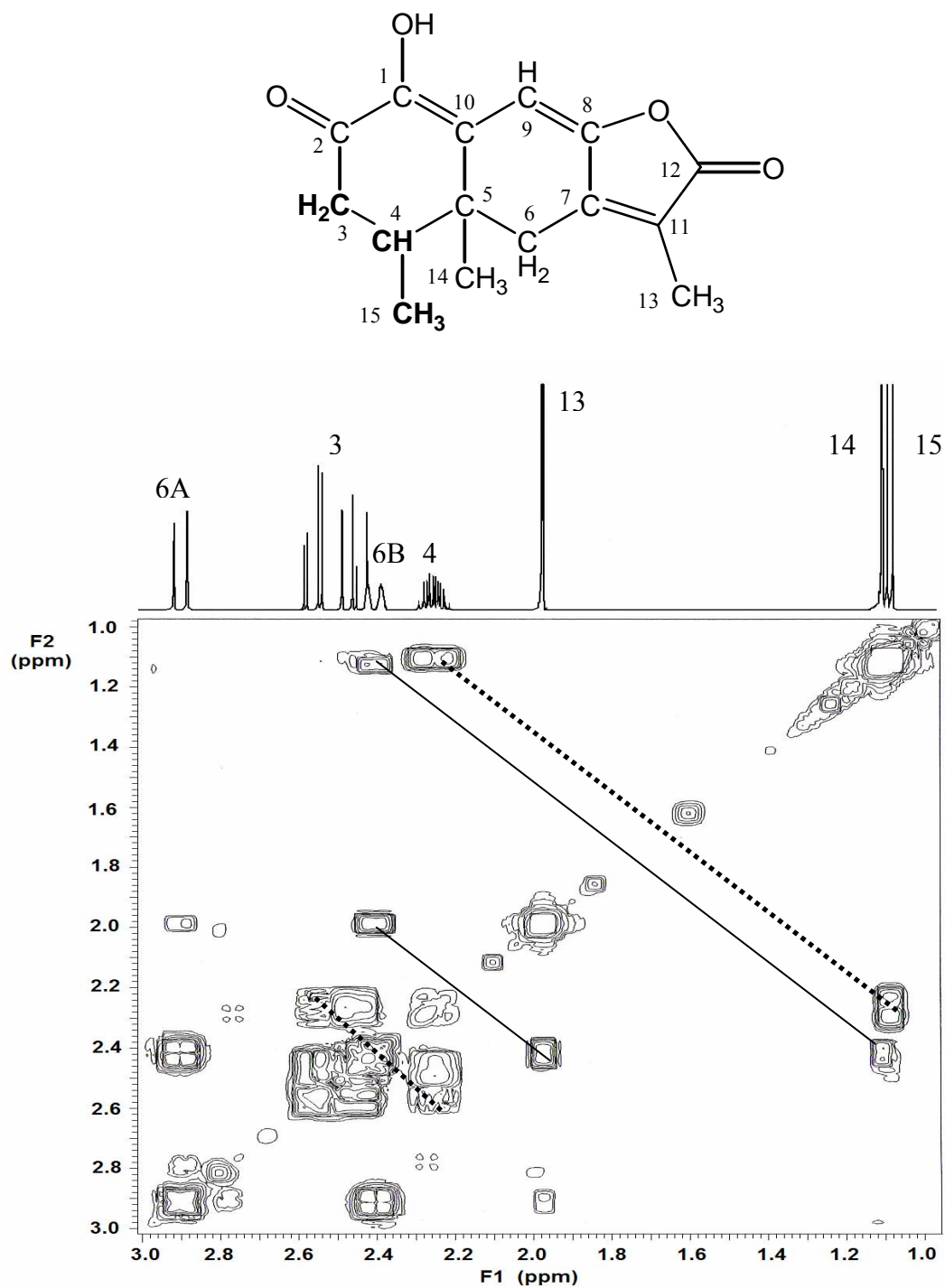
El espectro de RMN de ^{13}C reveló 15 señales (Tabla 15) que de acuerdo con el espectro HSQC fueron asignadas a ocho carbonos cuaternarios, dos metinos, dos metilenos y tres metilos. Además, el espectro permitió evidenciar la presencia en la molécula de una cetona doblemente conjugada, tres dobles ligaduras (dos tetrasustituidas y una trisustituida) y una γ -lactona α,β -insaturada. Los desplazamientos químicos de dos de los carbonos vinílicos (δ_{C}) sugieren que estos se encuentran unidos a sustituyentes oxigenados. Estas evidencias sugirieron *a priori* que el compuesto era una lactona de tipo sesquiterpenoide.

El espectro de RMN ^1H confirmó la presencia de los tres metilos, uno sobre doble ligadura, y de un hidrógeno vinílico e indicó además la existencia de un grupo hidroxilo ya que su señal desaparece al registrar el espectro en presencia de D_2O . De acuerdo al espectro de RMN de ^{13}C , el compuesto contiene dos sustituyentes oxigenados unidos a dobles ligaduras; uno es el hidroxilo evidenciado en la RMNH, y el segundo debe pertenecer al grupo lactónico.

El análisis de los cuadros de conectividades del espectro COSY permitió deducir el fragmento E. Así la señal del metino en δ_{H} 2.25 (H-4) correlaciona con las señales de un metileno en δ_{H} 2.56 (H-3a) y 2.47 (H-3b) y de un metilo en δ_{H} 1.01 (CH_3 -15).

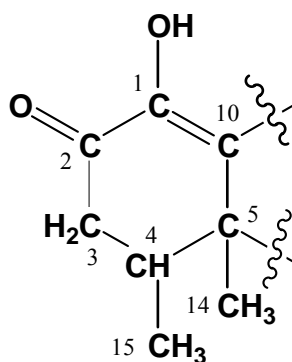


Fragmento E



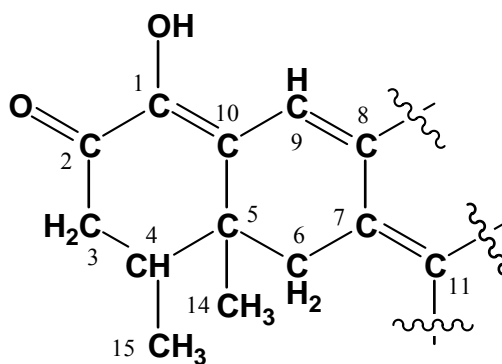
Espectro 3. Espectro bidimensional COSY de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida.

El análisis de las correlaciones del espectro HMBC (Espectro 4) permitieron ampliar la estructura E y proponer el fragmento F. Las correlaciones más relevantes que apoyaron esta propuesta son las siguientes: H-3/C-1, C-2, C-10 y OH-1/C-1, C-2, C-10.

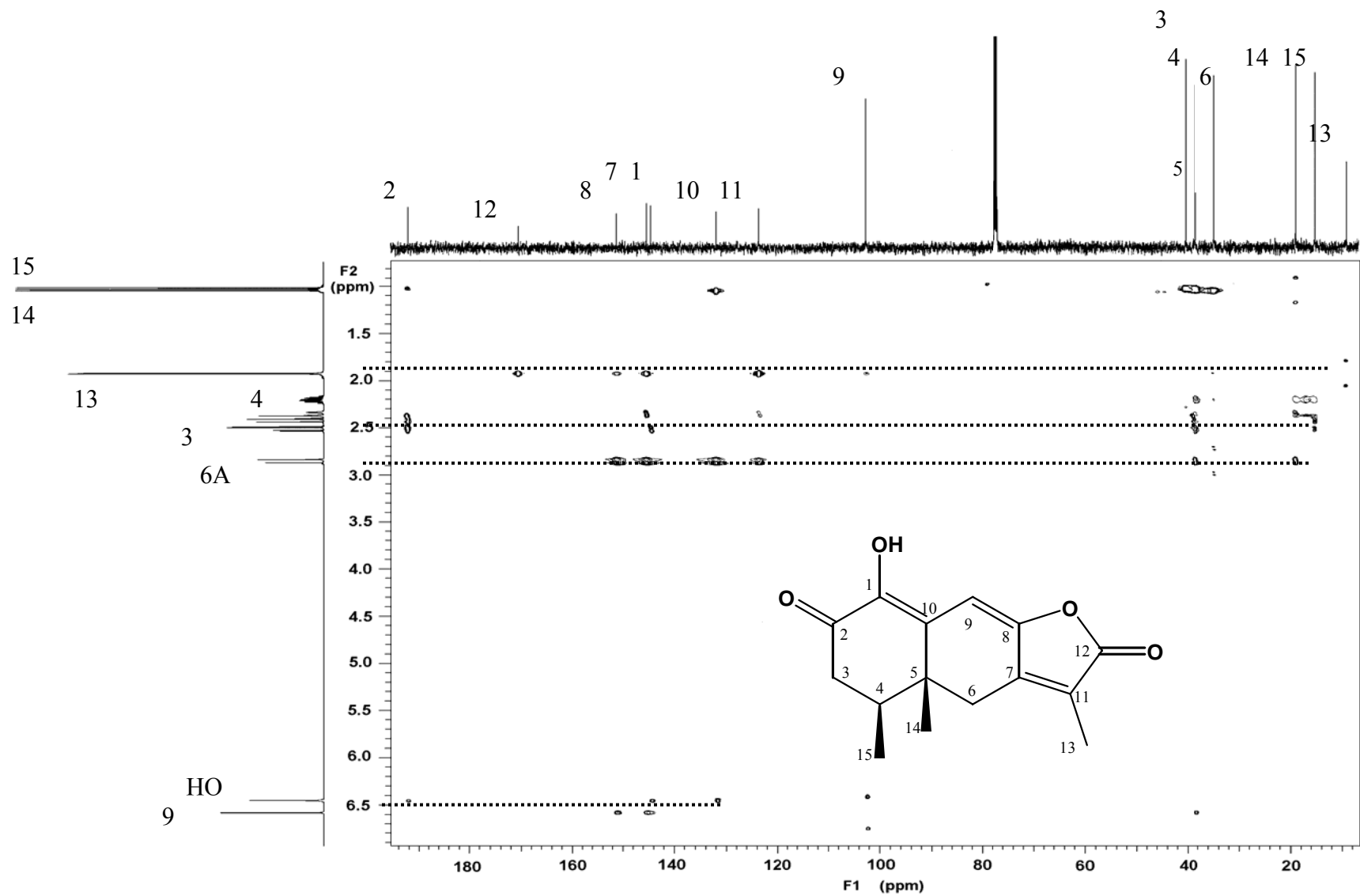


Fragmento F

A continuación, el análisis de las correlaciones en el espectro HMBC de las señales de un sistema AB en δ_H 2.90 y 2.41 (H-6) con las señales en δ_C 38.2 (C-5), 145.1 (C-7), 150.9 (C-8), 131.6 (C-10) y 123.4 (C-11) permitieron construir el fragmento G donde claramente se pone en evidencia que el sesquiterpenoide es de tipo eremofilano.



Fragmento G



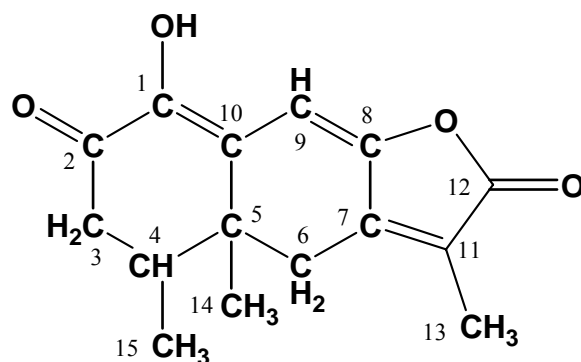
Espectro 4. Espectro HMBC de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida.

Tabla 15. Datos de RMN del compuesto **IV** (CD₃OD) ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	144.2		H _{3a} , OH
2	192.1		H _{3a} , H _{3b} , H ₄ , H ₁₅
3	40.0	a 2.56 dd (18, 4.5) b 2.47 dd (18, 7.0)	H ₁₅
4	38.5	2.26 dddd (13.5, 7.0, 4.5)	H _{3a} , H _{3b} , H ₁₄ , H ₁₅
5	38.2		H _{3a} , H _{6a} , H _{6b} , H ₉ , H ₁₄ , H ₁₅
6	34.1	a 2.90 dd (16.5, 0.5) b 2.41 ddd (16.5, 2.0, 1.0)	H ₄ , H ₁₃ , H ₁₄
7	145.1		H _{6a} , H _{6b} , H ₉ , H ₁₃
8	150.9		H _{6a} , H ₉ , H ₁₃
9	102.3	6.58 d (0.5)	H ₁₃
10	131.6		H _{6a} , H ₉ , H ₁₄ , OH
11	123.4		H _{6a} , H _{6b} , H ₁₃
12	170.3		H ₁₃
13	8.8	1.98 d (2.5)	
14	18.7	1.21 d (1.0)	H ₄ , H _{6a} , H _{6b}
15	14.9	1.01 d (6.5)	H _{3a} , H _{3b} , H _{6b} , H ₄
OH		6.45 s	

Las constantes de acoplamiento se encuentran entre paréntesis y se expresan en Hz.

La estructura final de la molécula se obtuvo al observar que la señal del metilo restante presenta un cuadro de conectividad en el espectro HMBC con las señales de los carbonos olefinicos C-7 y C-11, y con el carbonilo de la lactona [C-12, δ_{C} 170.3]. Por lo tanto, ese metilo debía estar en una doble ligadura ubicada en el anillo γ lactónico. Por último, el cierre de la lactona se hizo hacia C-8 con base en el desplazamiento observado por este carbono (δ_{C} 150.9).



1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida

La estructura del compuesto **IV** se corroboró mediante un análisis de difracción de rayos X. El anillo de ciclohexanona adopta una conformación de sobre mientras que el segundo ciclohexano adopta una conformación de bote. El grupo hidroxilo está orientado en la misma dirección que el grupo carbonilo y el núcleo eremofilano se estabiliza en el estado sólido al unirse con otra de sus moléculas mediante la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y el grupo carbonilo (Figura 10).

Finalmente, la configuración absoluta del compuesto **IV** se pudo obtener con base en el espectro de dicroísmo circular el cual muestra un fuerte efecto Cotton negativo a 378 nm, similar al del compuesto (-)-liguralenólida (Figura 11). De manera adicional, el signo de la rotación óptica (negativo), es el mismo que el de la liguralenólida (Jenniskens y Groot, 1998) sugiriendo que la estereoquímica en los carbonos asimétricos C-4 y C-5 es la misma en ambos compuestos.

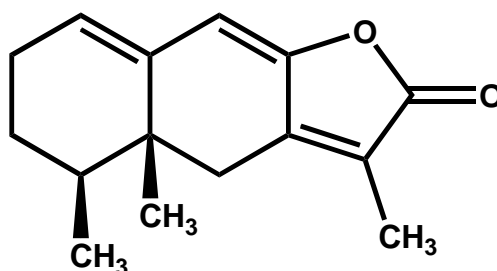


Figura 11. Estructura de la (-)-liguralenólida.

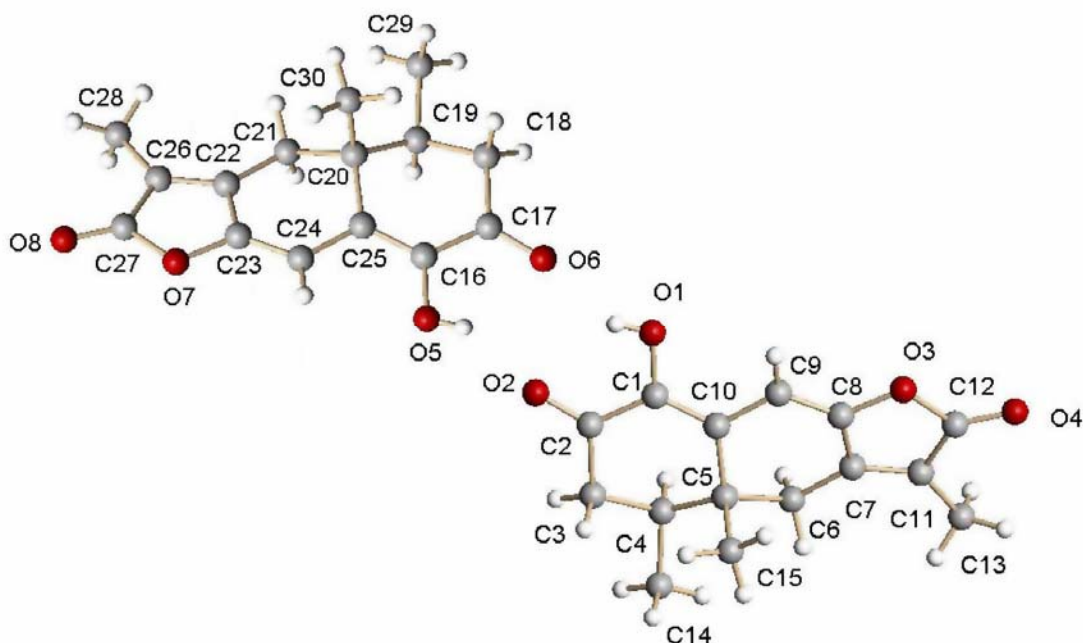


Figura 10. Proyección estereoscópica de la estructura obtenida por rayos X del compuesto **4**.

Es importante señalar que los sesquiterpenoides de tipo eremofilano altamente conjugados, aunque son comunes en plantas, son escasos en hongos, ya que sólo se han encontrado en el género *Penicillium* (Tabata et al., 1997). Por lo que la presencia de este compuesto en el género *Malbranchea* puede ser de importancia quimiotaxonómica ya que ambos géneros de hongos pertenecen al mismo orden.

6.3.3 Caracterización del compuesto **III**.

El producto natural **III** se obtuvo como un sólido cristalino blanco y soluble en cloroformo y CH_2Cl_2 . Su caracterización se realizó mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas (Tablas 16 y 17) con las reportadas en la literatura (Pohland et al., 1982).

Tabla 16. Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto **III**.

Punto de fusión	82-84 °C
Fórmula molecular	C ₈ H ₁₀ O ₄
Peso molecular	170
IR (ν_{\max})	3300, 1740, 1645 cm ⁻¹
EM (IE) m/z (intensidad relativa)	170 [M+ (100)] (13), 142 (10), 129 (80), 101 (15), 84 (20), 69 (100), 41 (28)

Tabla 17. Datos de RMN del compuesto **III** (CD₃OD) ¹H (300 MHz) y ¹³C (75 MHz).

Posición	δ ¹³ C	δ ¹ H
1	173.29	
2	89.86	
3	181.74	
4	104.64	
5	141.61	5.26 s
6	116.12	A 5.13 sa, B 5.38 sa
7	17.57	1.73 s
8	60.53	3.91 s

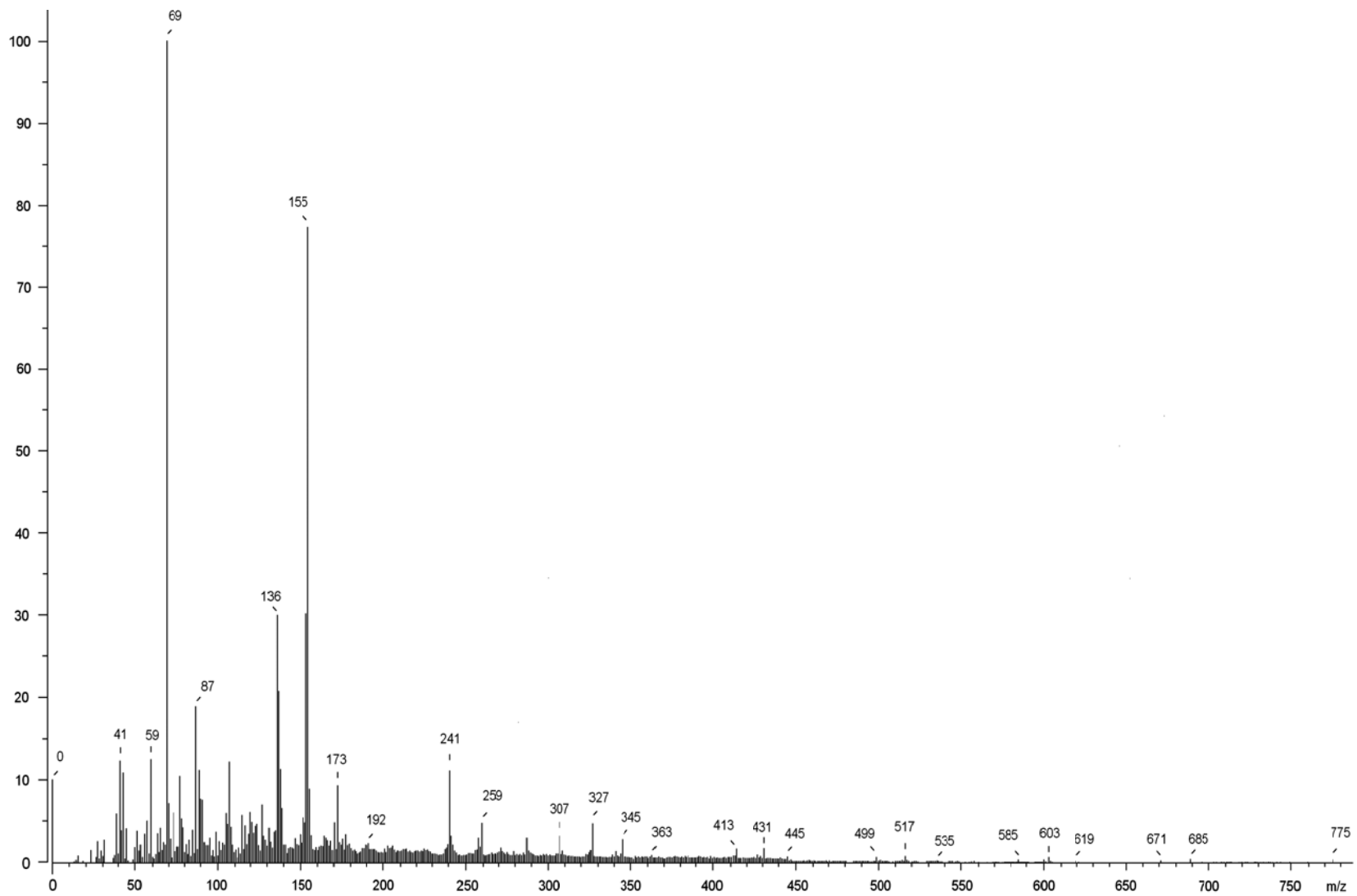
6.4 Aislamiento del metabolito mayoritario de la especie fúngica *Neorollandina mexicana* (cultivo N).

Durante el estudio de *N. mexicana* no fue posible aislar principio activo alguno. Aparentemente, el compuesto o los compuestos activos se descomponen durante el proceso de aislamiento. Esta especulación se basa en el hecho de que las subfracciones derivadas de la fracción activa incrementaban su complejidad a medida que se purificaban. De manera adicional, las cantidades de las fracciones eran muy pequeñas. Sin embargo, del extracto activo se logró purificar un polímero constituido de 4 unidades del ácido 3-hidroxi-butírico (**VII**).

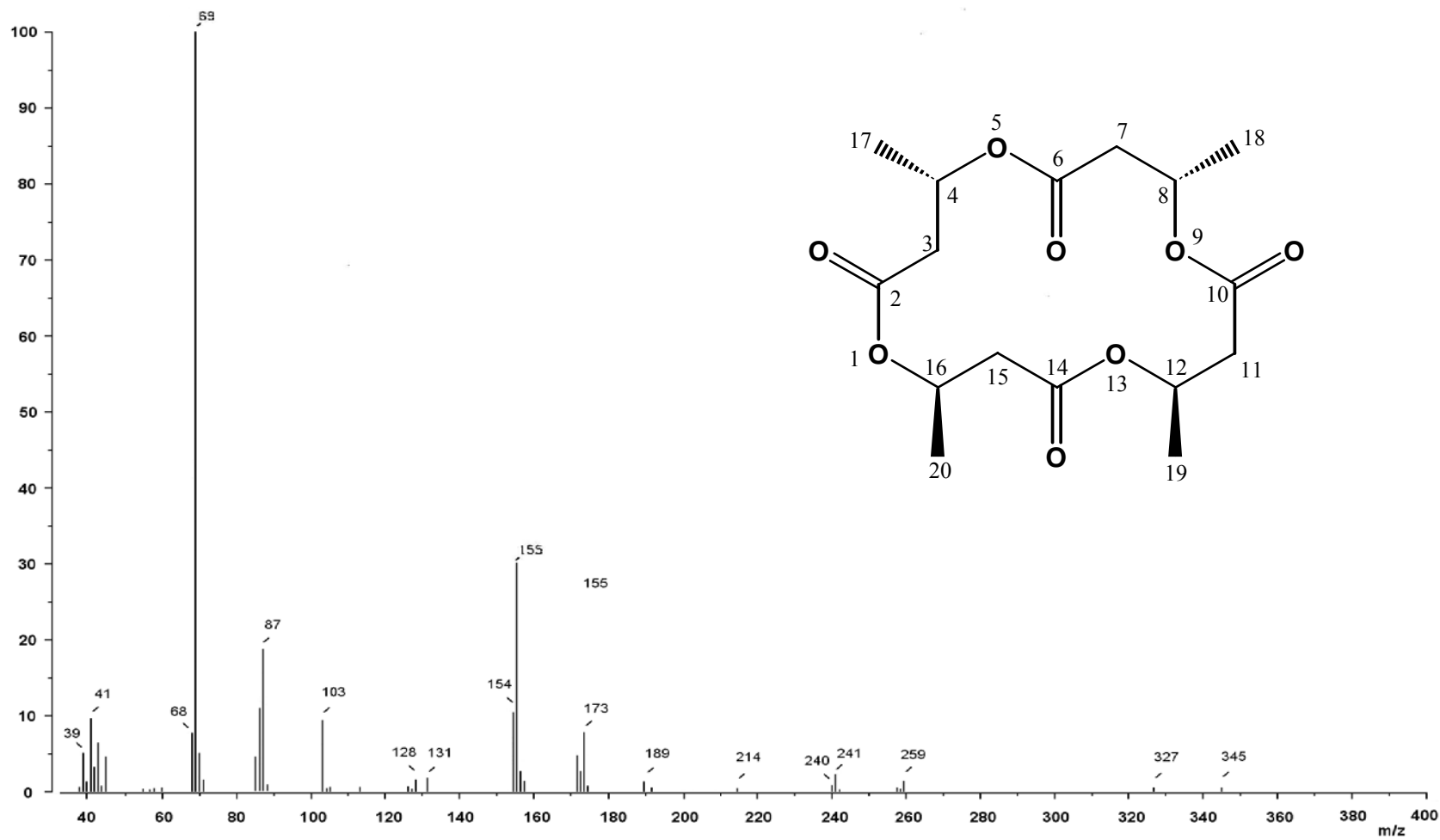
El producto **VII** se purificó de una mezcla de polímeros mediante un proceso de cromatografía en columna. La única evidencia química de la existencia de esta mezcla polimérica se obtuvo mediante un análisis del espectro de masas modalidad FAB⁺ donde se observaron varios iones pseudomoleculares en 775, 689, 603, 517, 431, 345, 259, 173 (Espectro 5).

El metabolito **VII** se obtuvo como un sólido incoloro, ópticamente inactivo y soluble en cloroformo. Su caracterización se realizó mediante el análisis de sus espectros de RMN, masas e IR (Tabla 18 y 19). A continuación, se resumen los aspectos más importantes de la elucidación estructural del compuesto **VII**.

Su fórmula molecular se determinó como C₁₆H₂₄O₈ mediante espectrometría de masas de alta resolución. A partir de esta fórmula fue posible calcular un índice de insaturación de cinco. El espectro de masas modalidad FAB⁺, reveló que el compuesto está constituido por cuatro unidades del ácido 3-hidroxi-butírico ya que se observaron tres pérdidas consecutivas de 86 unidades de masa a partir del ión pseudomolecular en una m/z de 345 uma (Espectro 6). El espectro en el IR de este compuesto demostró la presencia de bandas de absorción asociadas con la presencia de un grupo carbonilo de éster en 1719 cm⁻¹ (Tabla 18).

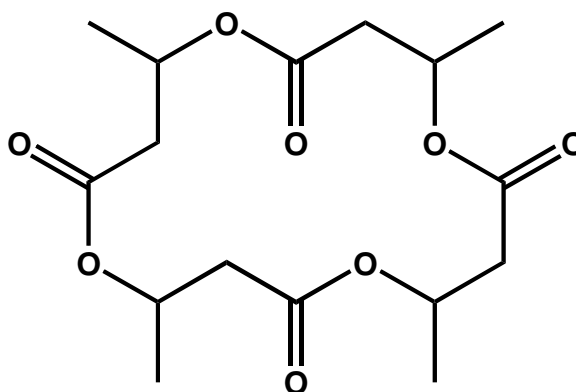


Espectro 5. Espectro de masas modalidad FAB negativo de la mezcla de polímeros de *N. mexicana*.



Espectro 6. Espectro de masas modalidad FAB negativo de la 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.

Tabla 18. Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto VII.



4,8,12,16-Tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetróna (VII)

Punto de fusión	187-189 °C
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₂₄ O ₈
Peso molecular	344
IR (ν_{max})	2973,2932, 2872, 1719, 1456, 1377 cm ⁻¹
FAB⁺ m/z (intensidad relativa)	345 (1), 327 (1), 259 (1.5), 241 (2.5), 173 (8), 155 (35), 154 (10.5), 128 (1.3), 103 (9.5), 87 (19), 69 (100), 41 (10)
[α]_D^t	0 (c = 1, CHCl ₃)

El espectro de RMN de ^{13}C (Tabla 19) es extremadamente sencillo y presentó cuatro señales atribuibles a un carbono cuaternario (carbonilo), un metino, un metileno y un metilo. En el espectro de RMN ^1H se observa la señal de un protón desprotegido en δ_{H} 5.26 (sextuplete, 6, 6.3, 12.3, H-4, 8, 12 y 16) que correlaciona en el espectro HSQC con el carbono en δ_{C} 67.6, en tanto que en el espectro COSY (Espectro 7) con un metileno [δ_{H} 2.61 (ddd, 5.7, 7.5, 15.6, H-2, 6, 10 y 14); δ_{C} 40.8 (C-3, 7, 11 y 15)] y un grupo metilo [δ_{H} 1.27 (d, 6.3); δ_{C} 19.7 (CH₃-17, 18, 19 y 20)]. Todo ello condujo al fragmento 3-hidroxi-butirato.

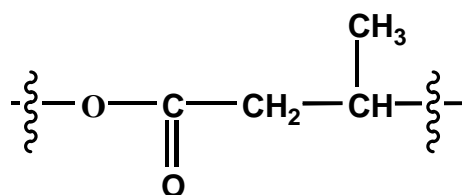
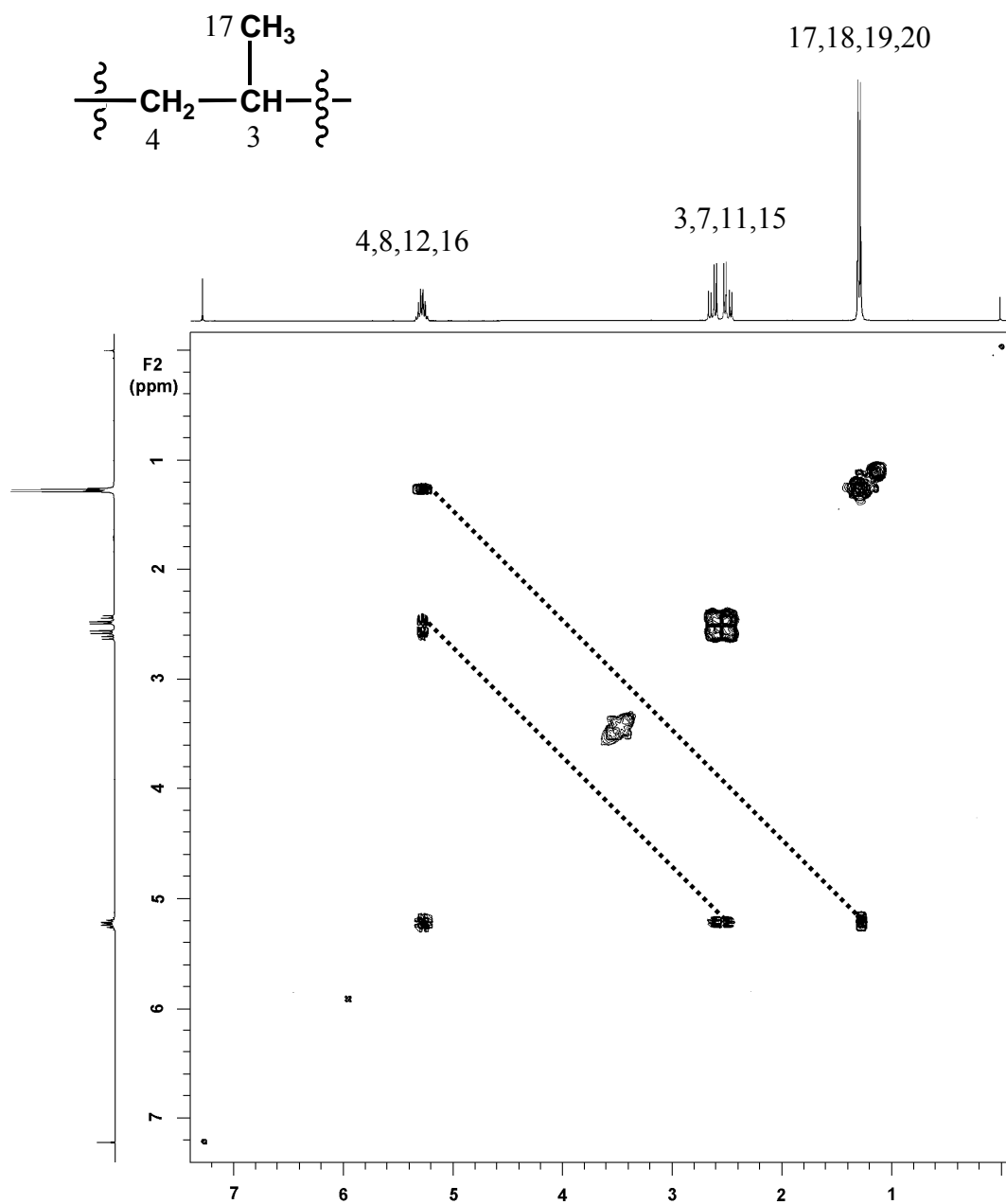


Tabla 19. Datos de RMN del compuesto **VII** (CD₃OD) ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz).

Posición	^{13}C (δ)	δ_{H} (J_{HH} IN HZ)	DEPT
17, 18, 19, 20	19.758	1.275 d, (6.3)	CH ₃
3, 7, 11, 15	40.783	2.610 ddd, (5.7, 7.5, 15.6)	CH ₂
4, 8, 12, 16	67.602	5.259 sext, (6, 6.3, 12.3)	CH
2, 6, 10, 14	169.128		C

Las constantes de acoplamiento se encuentran entre paréntesis y se expresan en Hz.



Espectro 7. Espectro de RMN- ^{13}C de la 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.

Como la molécula está constituida por cuatro unidades de 3-hidroxi-butirato, cuatro de los cinco grados de insaturación fueron atribuidos a los grupos carbonilo [δ_c 169.1 (C-2, 6, 10 y 14), uno por unidad]; el último grado de insaturación se atribuyó al anillo de mediano tamaño formado por cuatro esterificaciones sucesivas entre el hidroxilo en C-4 y el grupo carbonilo de las cuatro unidades de 3-hidroxi-butirato. El valor de la rotación indicó que el compuesto presenta un plano de simetría consistente con una estructura de tipo meso. Con base en todas estas evidencias el compuesto **VII** se caracterizó como *4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona* (**VII**), un nuevo producto natural.

En 1998, Bachmann y Seebach reportaron la síntesis del compuesto meso *4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona* (**VII**) con configuración absoluta R, R, S, S (Figura 12). Este compuesto tiene una rotación óptica de 0. Mediante la comparación de la rotación óptica obtenida experimentalmente del compuesto **VII**, con la reportada podemos deducir que la configuración absoluta del compuesto **VII** es R, R, S, S (Figura 12B).

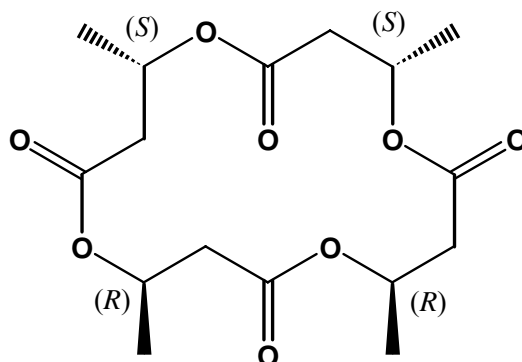


Figura 12. *(4R,8R,12S,16S)-4,8,12,16-Tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.*

Un estudio microscópico detallado de la forma de las ascosporas de *N. mexicana* reveló que este hongo posee una forma oblicua esferoidal única y distintiva, una pared suave y con depósitos circulares de un material grueso y con apariencia poco común (Figura 13). El análisis de este material celular por espectrometría de masas indicó que se trataba de la mezcla de polímeros obtenido del estudio del extracto orgánico.

Una especie relacionada a *N. mexicana*, clasificada inicialmente como *Gymnascella hyalinospora*, presenta también el mismo depósito de material polimérico en la pared celular (Figura 14), sin embargo, difiere de *N. mexicana* en que el tamaño de sus ascosporas es mayor ($2.2-2.5 \times 2.5-3.3 \mu\text{m}$). Este material resultó idéntico en todos sus aspectos al aislado de *N. mexicana*. Un cultivo en pequeña escala de la especie *Gymnascella hyalinospora* permitió el aislamiento de un polímero idéntico a **VII**.

Este hallazgo fue de utilidad para la reclasificación taxonómica correcta de *Gymnascella hyalinospora*. La presencia del material polimérico aunado a las evidencias morfológicas y de secuenciación de la fracción 18S del ARN ribosomal de la misma permitieron reclasificar a esta última especie y el agrupamiento de las dos en un nuevo género denominado *Neorollandina*.

El compuesto VII pertenece entonces al tipo de los polihidroxitiratos (PHB), productos naturales aislados previamente de bacterias, levaduras, plantas y membranas de eucariontes. Sin embargo, su presencia en hongos no tiene precedentes.

Los PHBs son sintetizados y acumulados como fuente de carbono y energía en numerosas bacterias (Anderson y Daves, 1990). En las membranas de las mitocondrias y los microsomas de eucariontes se han encontrado asociados con fósforo inorgánico y probablemente tengan un papel importante en la regulación de las concentraciones de calcio intracelular, y por lo tanto en la señalización mediada por calcio (Reusch y Sadoff, 1988; Reusch, 1989; Sang, 1996).

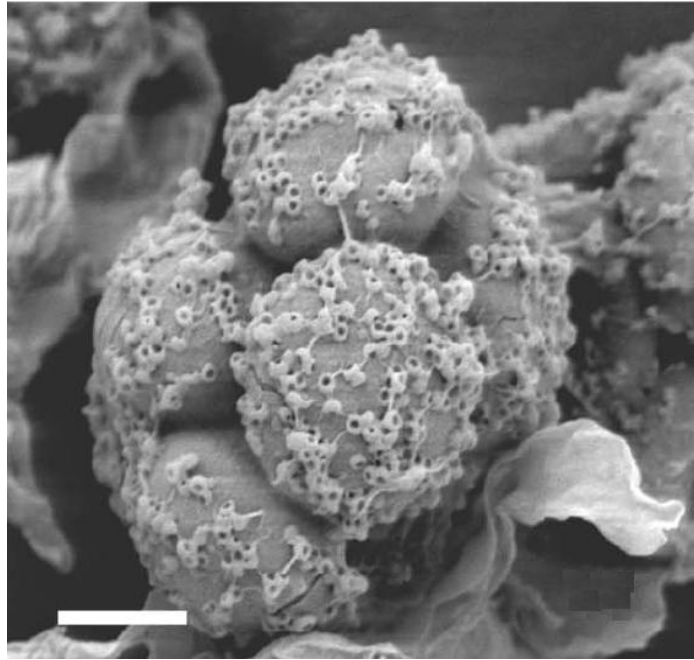


Figura 13. Vista microscópica de las ascosporas de *N. mexicana*.

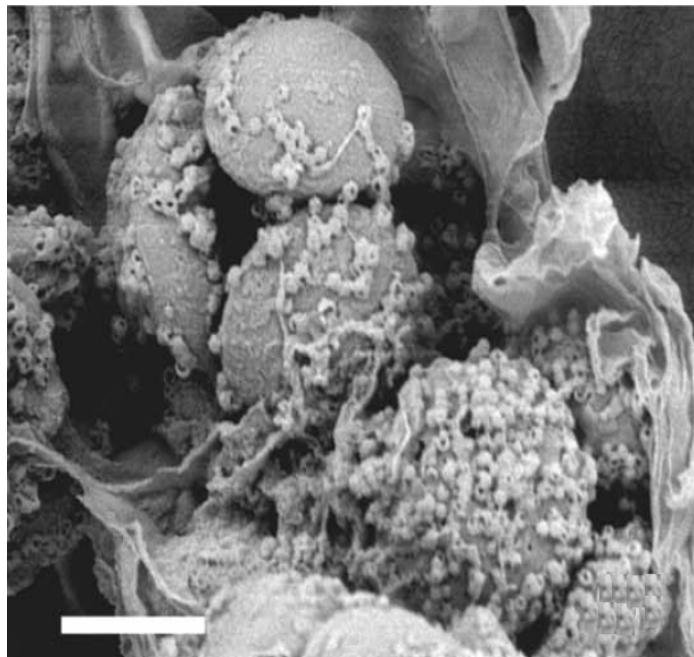


Figura 14. Vista microscópica de las ascosporas de *N. hylianospora*.

Los PHBs son sintetizados por los microorganismos que crecen en condiciones desfavorables como la falta de nitrógeno, fósforo, magnesio y oxígeno. En caso de un exceso de fuentes de carbono los organismos suelen acumular estos polímeros para su protección y posterior uso en caso de deficiencia de nutrientes. (Safak et al., 2002). Es posible que la presencia de PHBs en las especies *Neorollandina* les confiera una protección durante los periodos de inanición en las regiones intermareales de la playa, además de garantizarles una fuente de carbono.

El contenido de PHBs en la especie *N. mexicana* (~10 %) es más alto que el de algunas bacterias salvajes (Reusch y Sadoff, 1983) que hoy día se fermentan a nivel industrial. Los PHB's son uno de los plásticos más importantes utilizados en la industria contemporánea ya que son biodegradables y por lo tanto benignos para la naturaleza. Por este motivo *N. mexicana* es una nueva fuente importante de este tipo de compuestos.

6.5 Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos derivados del estudio químico biodirigido de la especie *M. aurantiaca*.

De acuerdo a la estrategia metodológica planteada en la presente investigación se efectuaron los ensayos biológicos apropiados para determinar el potencial fitotóxico de los compuestos aislados. Estas evaluaciones consistieron en determinar el efecto de los compuestos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus*.

La determinación del efecto de los compuestos **II**, **III** y **IV** se realizó de acuerdo con la metodología descrita en la sección experimental (inciso 5.2.1) y utilizando como semilla de prueba *A. hypochondriacus*. Como control positivo se utilizó el herbicida comercial 2,4-D (Tabla 20).

Tabla 20. Efecto del extracto y los compuestos **II**, **III** y **IV** sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.

Compuesto	CI ₅₀	CI ₅₀ 's del 2, 4-D ^a
Extracto	195 ppm	-
Compuesto II	0.37 µM	0.18 µM
Compuesto III	3.86 µM	18.0 µM
Compuesto IV	6.57 µM	18.0 µM
Clorpromazina	6.0 µM	4.0 µM

^a control positivo

Los resultados obtenidos de este estudio indicaron que los compuestos **II**, **III** y **IV** inhibieron 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 la Tabla 20 y como se observa en los mismos, los compuesto **II** y **III** fueron 4.6 y 2.7 veces más potentes que el control positivo (2,4-D).

De manera adicional, se evaluó el efecto fitotóxico de la clorpromazina (antagonista de la calmodulina); el efecto de la fenotiazina resultó comparable al de la malbranqueamida pero menor que el de los compuestos **II** y **IV** (Tabla 20, Figura 15).

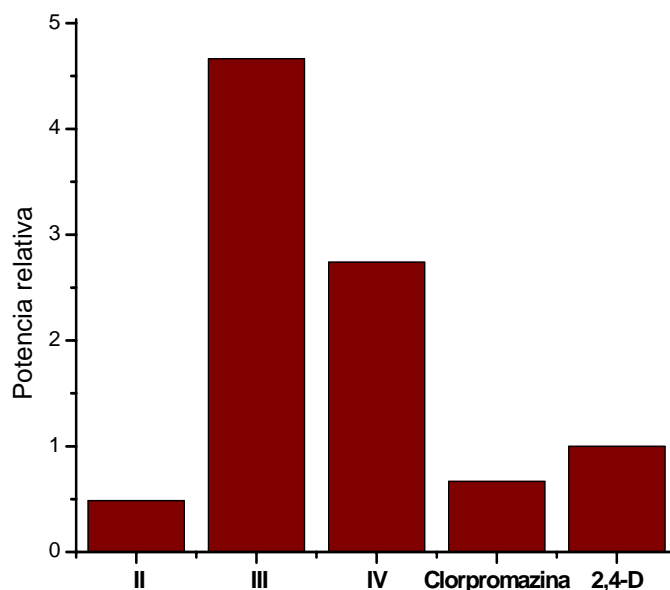


Figura 15. Potencia relativa de las fitotoxinas aisladas de *M. aurantiaca* y la clorpromazina con respecto al 2,4-D.

El ácido penicílico se aisló previamente como la fitotoxina mayoritaria de los cultivos de las especies fúngicas *Penicillium cyclopium* y *Penicillium canescens*. En el mismo estudio, se comprobó que la micotoxina inhibe la germinación de maíz *in vitro*. El porcentaje de inhibición de la germinación fue directamente proporcional a la concentración de ácido penicílico utilizado. El crecimiento de las raíces se redujo en un 50% a la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ (Keromnes y Thouvenot, 1985).

Este compuesto también es antimicrobiano, contra bacterias gram positivas y negativas, anti VIH, antifúngico, citotóxico, carcinogénico y teratogénico. Los últimos tres efectos impidieron su desarrollo como agente herbicida (Keromnes y Thouvenot, 1985; Kang y Kim, 2004).

6.6 Evaluación de las propiedades inhibitorias de la proteína calmodulina de los compuestos derivados del estudio químico biodirigido de la especie *M. aurantiaca*.

Con la finalidad de conocer el posible modo de acción a nivel molecular de los principios fitotóxicos de *M. aurantiaca* se decidió explorar su efecto sobre el complejo Ca^{2+} - Calmodulina (CaM).

La propuesta de la calmodulina vegetal como blanco de acción molecular para el desarrollo de nuevos agentes con potencial herbicida está basada en las siguientes razones:

1) En las plantas superiores, la calmodulina es un elemento fundamental en la vía de transducción de señales del Ca^{2+} durante su crecimiento y desarrollo. Ciertamente, más de 50 enzimas y canales iónicos son regulados por CaM en plantas, algunas de las cuales son importantes para su desarrollo. Varias de estas enzimas son exclusivas de plantas. Otras proteínas, que no son exclusivas de plantas, son reguladas por CaM únicamente en plantas. Un tercer grupo de proteínas son regulados por CaM en todo tipo de organismos (Bouche et al., 2005). En los primeros dos casos, estas enzimas podría ser blancos específicos de herbicidas.

2) Algunos herbicidas potenciales como la ofiobolina A, aislada de varias especies de hongos de los géneros *Bipolares* y *Drechslera*, ejercen su efecto fitotóxico mediante su interacción con CaM, inhibiendo su habilidad de activar a sus enzimas efectoras (Au et al., 2000; Evidente et al., 2006).

3) Finalmente, a diferencia de los animales, las plantas superiores expresan múltiples isoformas divergentes de CaM, algunas de las cuales (SCaM-4 y SCaM-5) comparten un 78% de identidad estructural con la CaM de mamíferos (Bouche et al., 2005). La existencia de estas isoformas vegetales plantea la pregunta de que si dichas isoformas realizan una regulación diferencial de las enzimas blanco de la CaM (Lee et al., 2000;

Bouché et al., 2005; Yamniuk y Vogel, 2005). Si este es el caso, estas isoformas podrían constituir blancos de acción, específicos y novedosos, de algunos inhibidores del crecimiento vegetal con potencial herbicida.

En el presente trabajo, el efecto de los compuestos fitotóxicos activos sobre la proteína CaM se determinó mediante un método enzimático *in vitro*; como enzima monitora se utilizó la PDE1 de cerebro de bovino. La actividad de la PDE1 en presencia de CaM se analizó de acuerdo con la metodología descrita por Sharma y Wang (1979), descrita en la parte experimental (inciso 5.2.3). Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de los compuestos **II** y **IV** sobre la actividad de la PDE1 se muestran en la Tabla 21. El compuesto **II** inhibe la actividad del complejo PDE1-CaM-Ca²⁺ de manera comparable a la clorpromazina, un antagonista muy bien caracterizado de la CaM. El compuesto **IV** es dos veces más potente que la clorpromazina. En ambos casos el efecto fue dependiente de la concentración.

Tabla 21. Efecto de los compuestos **II** y **IV** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	Potencia relativa
II	3.65 μM	0.75
IV	10.2 μM	1.80

Los valores representan el promedio de doce réplicas ± EEM; n =6; p< 0.05

La potencia se calculó con la fórmula: CI₅₀ (μM) clorpromazina/ CI₅₀ (μM) compuesto.

Durante el curso de los ensayos, se encontró que el compuesto **II** presentaba un ligero efecto reproducible sobre la actividad basal de la PDE1 en la presencia de albúmina sérica bovina (BSA). Sin embargo, éste último no puede ser fisiológicamente significativo, ya que por debajo de 200 μM no se observó efecto alguno. En las Figuras 16 y 17 se ilustran las curvas concentración-respuesta de los compuesto **II** y **IV**.

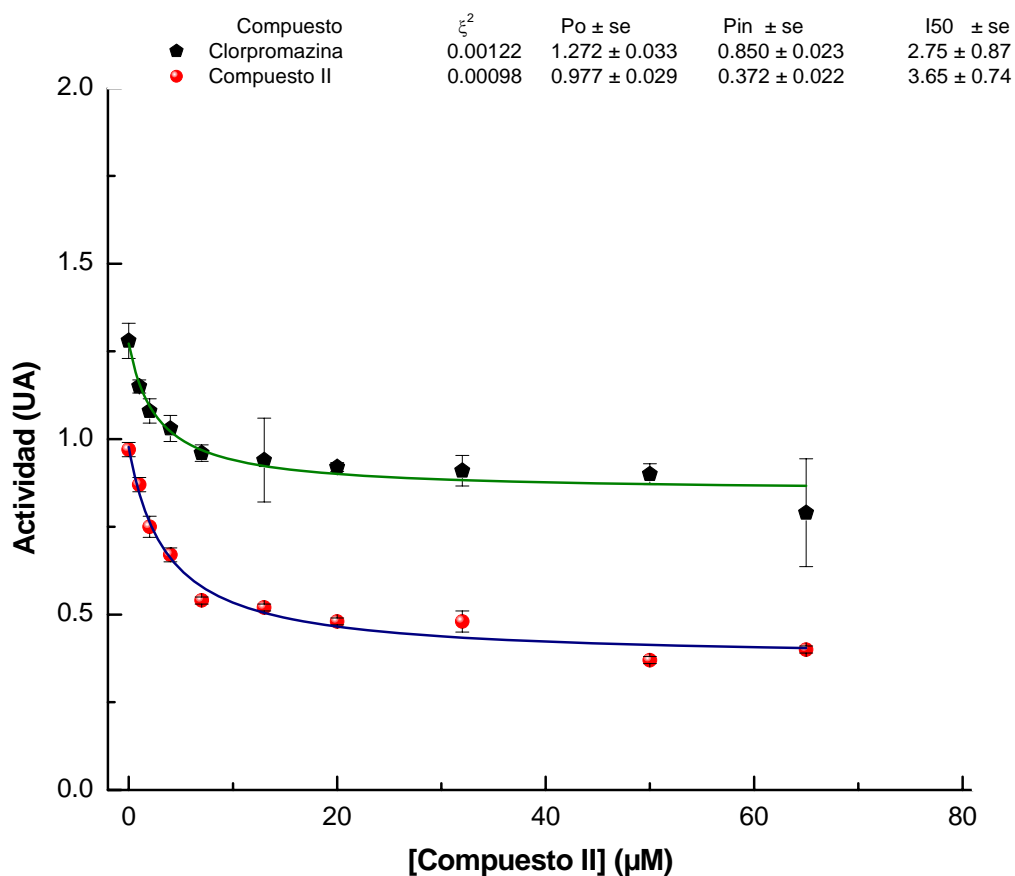


Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones del compuesto **II** (●) y de la clorpromazina (■) sobre la actividad del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1.

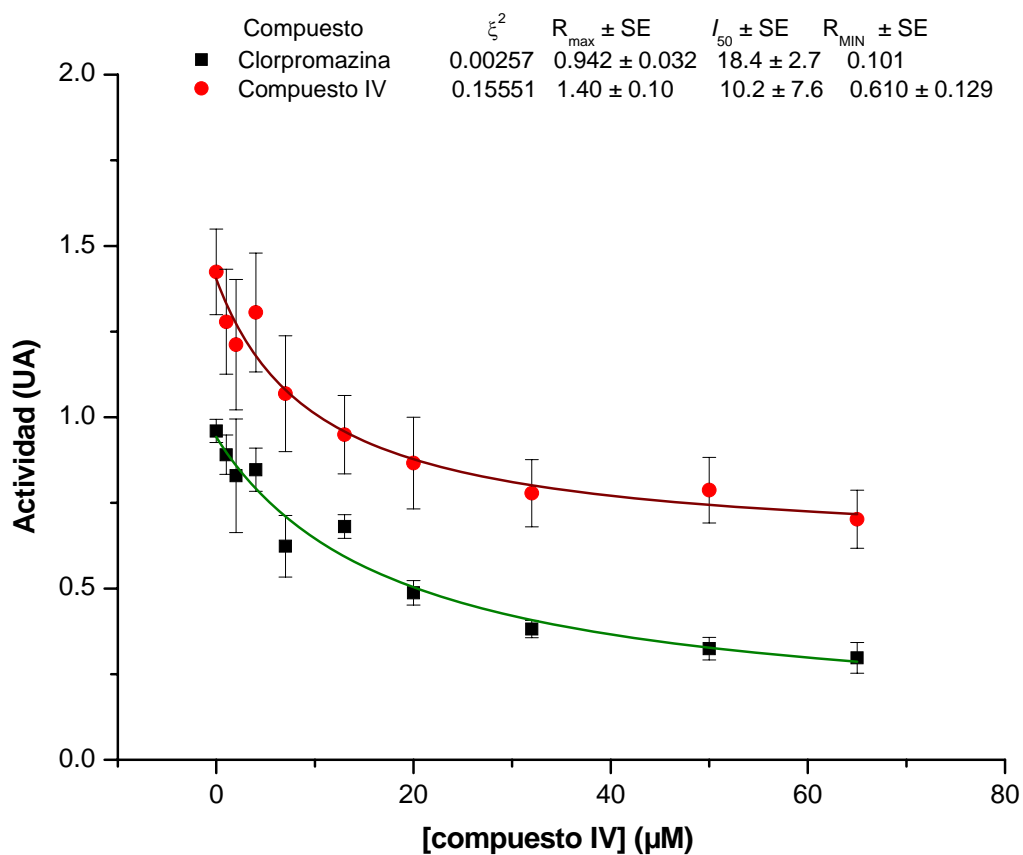


Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones del compuesto **IV** (●) y de la clorpromazina (■) sobre la actividad del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1.

Para determinar la naturaleza de la inhibición del compuesto **II** se realizó un análisis cinético para determinar la constante de inhibición K_i , usando diferentes cantidades de CaM, en la presencia de diferentes concentraciones del compuesto **II** y en ausencia de BSA. La albúmina se eliminó con la finalidad de reducir, aunque no completamente, el efecto del compuesto **II** sobre la actividad basal de la PDE1 (Figura 18).

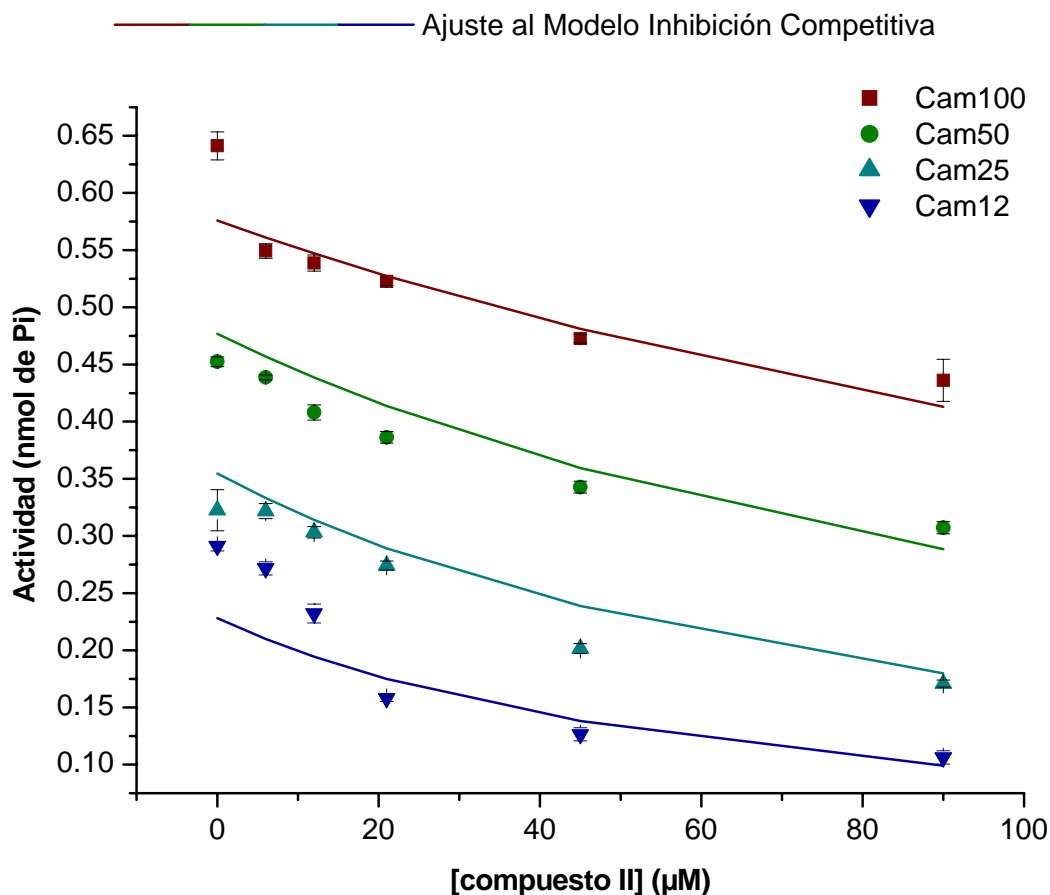


Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones del compuesto **IV** sobre la actividad del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1 en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina (■, 100, ◆ 50, ▲, 25, ▼ y 12 ng).

El resultado fue analizado mediante la gráfica de Dixon (1953). En este análisis, en el eje vertical se coloca el recíproco de la actividad de la PDE1 en presencia del complejo Ca^{2+} -CaM y distintas concentraciones del compuesto **II**; en el eje horizontal se colocan las concentraciones del compuesto **II** (Figura 19). El resultado de este experimento ($K_i = 47.4 \mu\text{M}$) revela notoriamente que el compuesto **II** actúa como un antagonista competitivo de la CaM, compitiendo con la CaM por la formación del complejo activo CaM-PDE1.

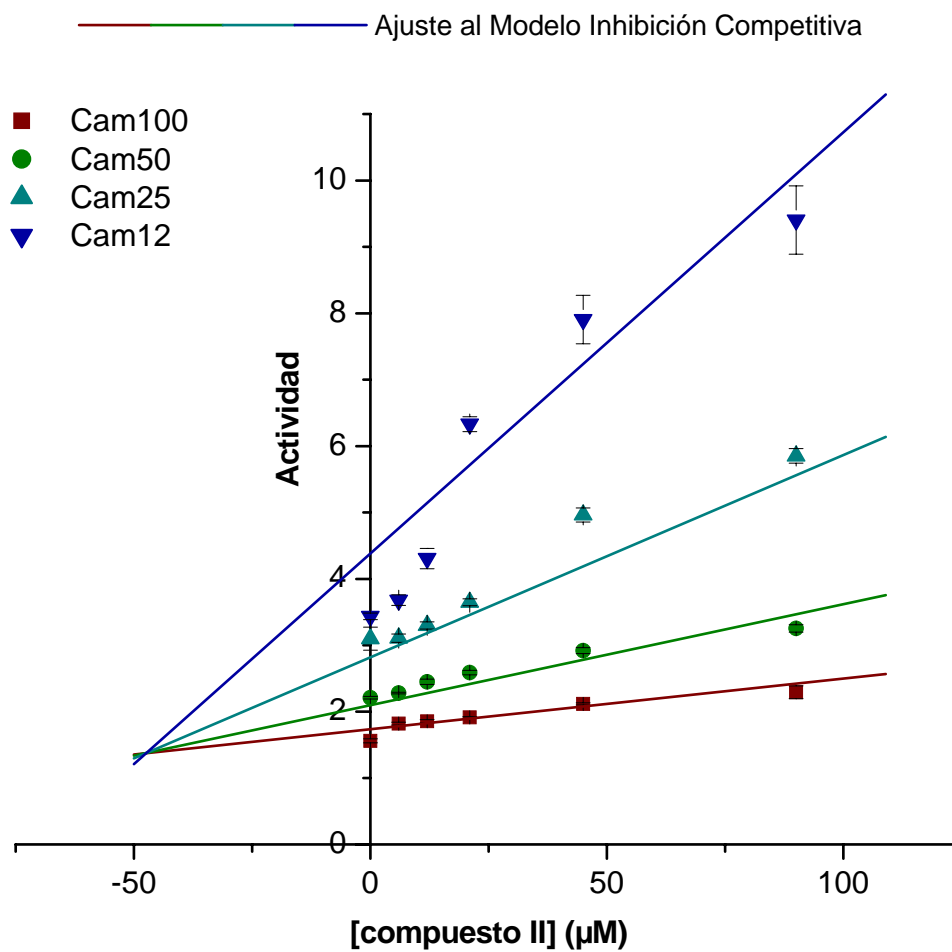


Figura 19. Actividad de la enzima PDE1 dependiente de CaM con concentraciones constantes de AMPc y CaCl_2 . Las concentraciones de CaM fueron 12.5 (\blacktriangledown), 25 (\blacktriangle), 50 (\bullet) y 100 (\blacksquare) nM, y la concentración de compuesto 2 fue variada.

6.7 Efecto antibrasinoesteroideal de la malbranqueamida y la clorpromazina.

Los métodos más utilizados para la detección de los efectos biológicos de los brasinoesteroides son el bioensayo del desenrollamiento de las hojas de trigo (Wada et al., 1985; Takatsuto, 1994) y el de la medición de la inclinación de la lámina en arroz (Wada et al., 1981, 1984; Takeno y Pharis, 1982; Kim et al., 1990). En estas dos plantas se han caracterizado muy bien los efectos biológicos de los brasinoesteroides, y en particular de la brasinólida. Sin embargo, en el modelo de crecimiento radicular de semillas de amaranto no hay estudios que describan el efecto de estas hormonas.

Al evaluar el efecto de la brasinólida sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* utilizando el método de la caja de Petri se observó un aumento significativo de la longitud de las radículas, en comparación con las muestras sin tratamiento (Figura 20). Este hallazgo permite proponer el uso del amaranto y la respuesta de crecimiento radicular en esta especie para estudiar el efecto antibrasinoesteroideal de fitotoxinas.

En la Figura 20 se observa que a las concentraciones de 0.0694 μM (C2) y 0.0069 μM (C3) hay un aumento de aproximadamente un 30% en el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus*; en todas las concentraciones evaluadas de brasinólida existió un incremento del crecimiento radicular. Como a la concentración de 0.0694 μM se observó una estimulación apropiada del crecimiento radicular, se decidió analizar a esta concentración si la malbranqueamida o la clorpromazina (compuestos fitotóxicos) revierten el efecto provocado por la hormona.

Al realizar el ensayo de antagonismo con la malbranqueamida se observó que este compuesto anuló el efecto promotor de la germinación provocado por la brasinólida de manera dependiente de la concentración (Figura 21).

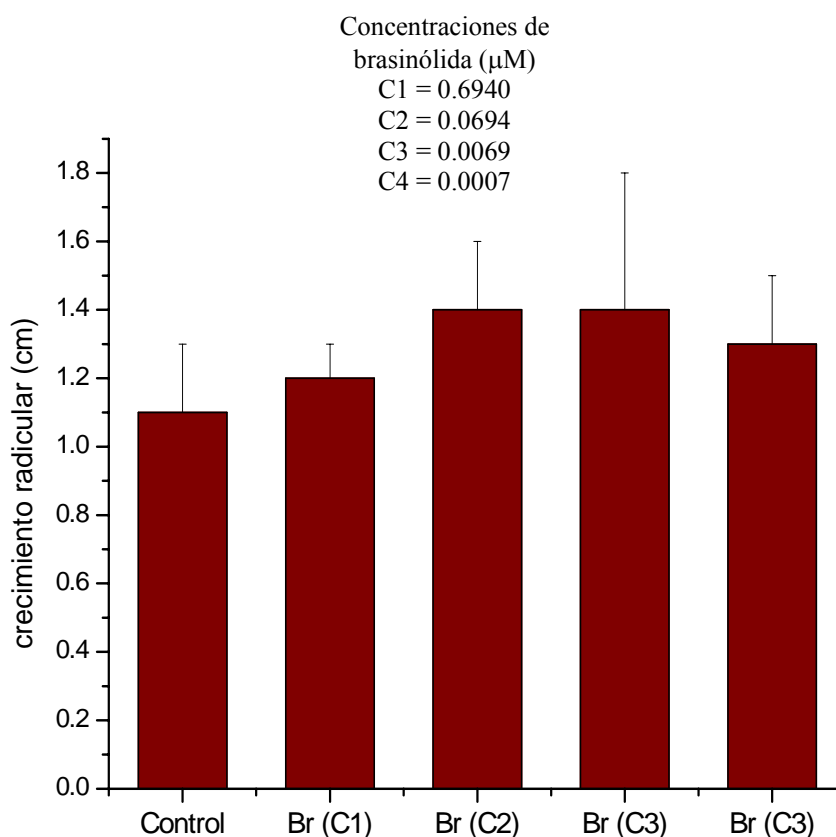


Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de la brassinólida sobre el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus*.

La malbranqueamida a concentraciones de 281.45 y 28.14 μM inhibe hasta en un 50% el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus* con respecto al control. Sin embargo, al evaluar el crecimiento radicular en presencia tanto de la brassinólida como de distintas concentraciones de la malbranqueamida se observa que a la concentración de 281.45 μM la malbranqueamida nulifica por completo el efecto de crecimiento radicular causado por la brassinólida. A la concentración de 0.28 μM el efecto de la brassinólida predomina sobre el efecto del alcaloide, es decir prevalece la estimulación del crecimiento radicular provocado por la brassinólida.

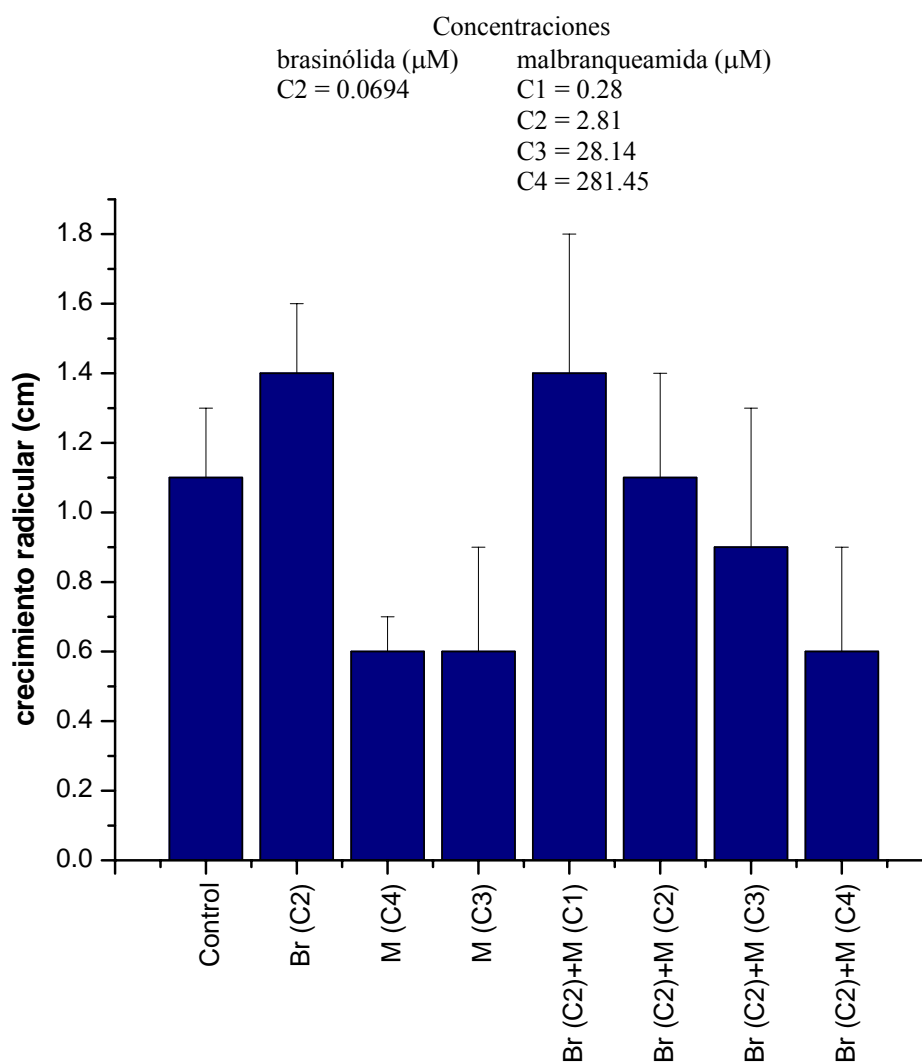


Figura 21. Efecto antibrasinoesteroidal de diferentes concentraciones de malbranqueamida en semillas de *A. hypochondriacus*.

La malbranqueamida a concentraciones de 281.45 y 28.14 μM inhibe hasta en un 50% el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus* con respecto al control. Sin embargo, al evaluar el crecimiento radicular en presencia tanto de la brasinólida como de distintas concentraciones de la malbranqueamida se observa que a la concentración de

281.45 μM la malbrancheamida nulifica por completo el efecto de crecimiento radicular causado por la brasinólida. A la concentración de 0.28 μM el efecto de la brasinólida predomina sobre la acción del alcaloide, es decir prevalece la estimulación del crecimiento radicular provocado por la brasinólida.

El efecto antibrasinoesteroidal de la malbrancheamida se corroboró utilizando el bioensayo del desenrollamiento de las hojas de trigo (Wada et al., 1985; Takatsuto, 1994). Este procedimiento es uno de los más aceptados y utilizados para evaluar el efecto de los brasinoesteroides en esta planta (desenrollamiento de las hojas).

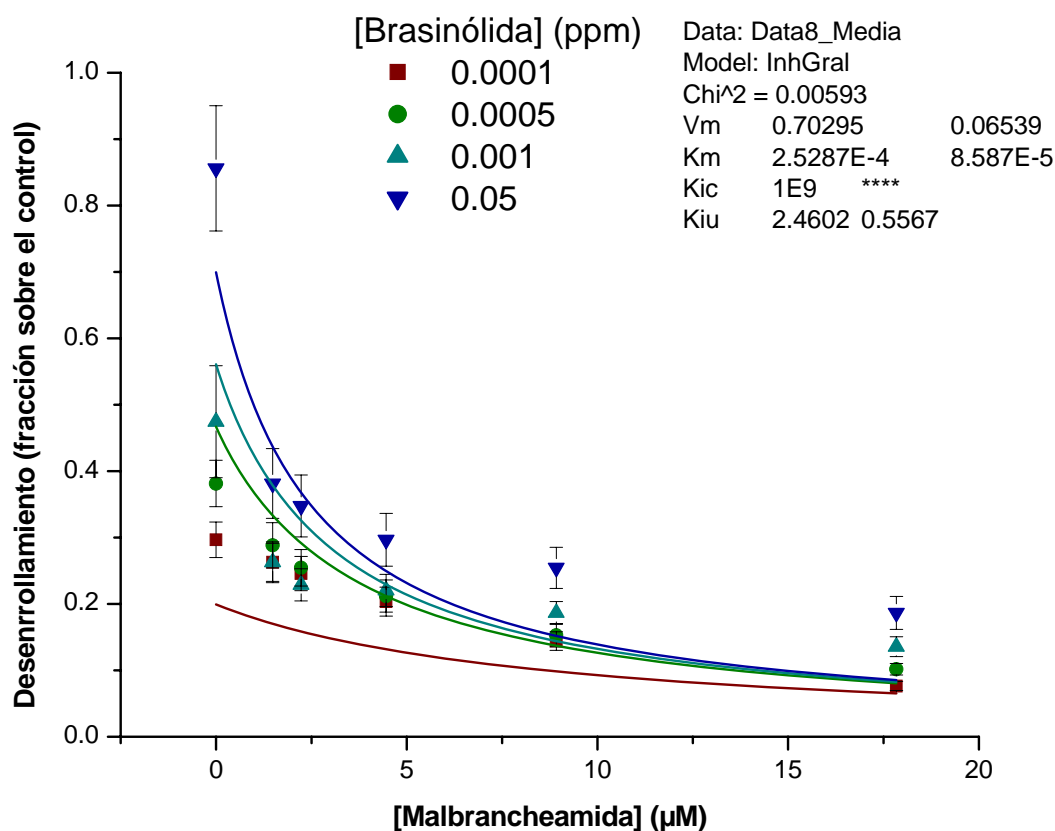


Figura 22. Efecto de diferentes concentraciones del compuesto **II** sobre el desenrollamiento de las hojas de trigo en presencia de diferentes concentraciones de brasinólida.

El valor calculado de la constante de inhibición de la malbranqueamida del efecto de desenrollamiento de las hojas de trigo provocado por la brasinólida fue de 2.46 μM . El efecto se ajustó muy bien a un modelo de inhibición acompetitivo (Figura 22), es decir, la malbranqueamida sólo inhibe el efecto biológico cuando el brasinoesteroide se encuentra unido a su receptor.

En el caso de la clorpromazina, aparentemente también exhibe un efecto antagonista (Figura 23), pero mucho menor. En este caso, el error en cada grupo de experimentos resultó muy grande y el efecto no fue dependiente de la concentración.

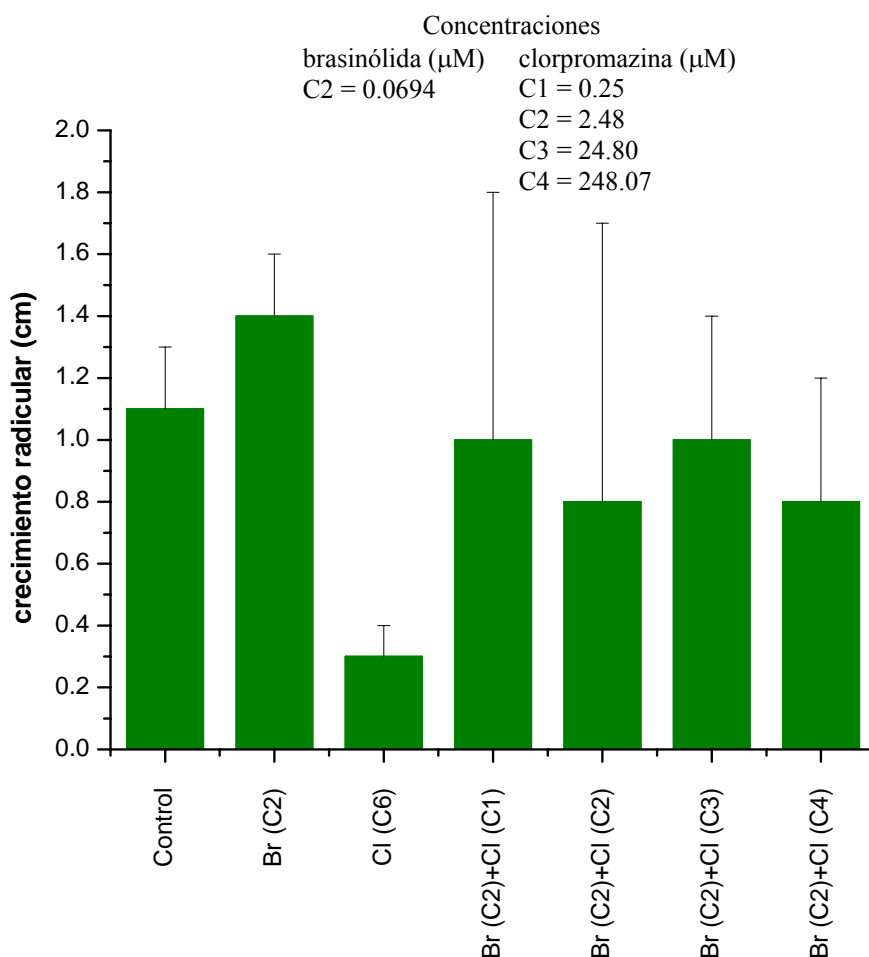


Figura 23. Efecto antibrasinoesteroidal de diferentes concentraciones de clorpromazina en semillas de *A. hypochondriacus*.

Por último, se evaluó el efecto del herbicida comercial 2,4-D en este mismo sistema encontrándose que el herbicida antagoniza totalmente el efecto de la brasinólida. El efecto fue dependiente de la concentración (Figura 24).

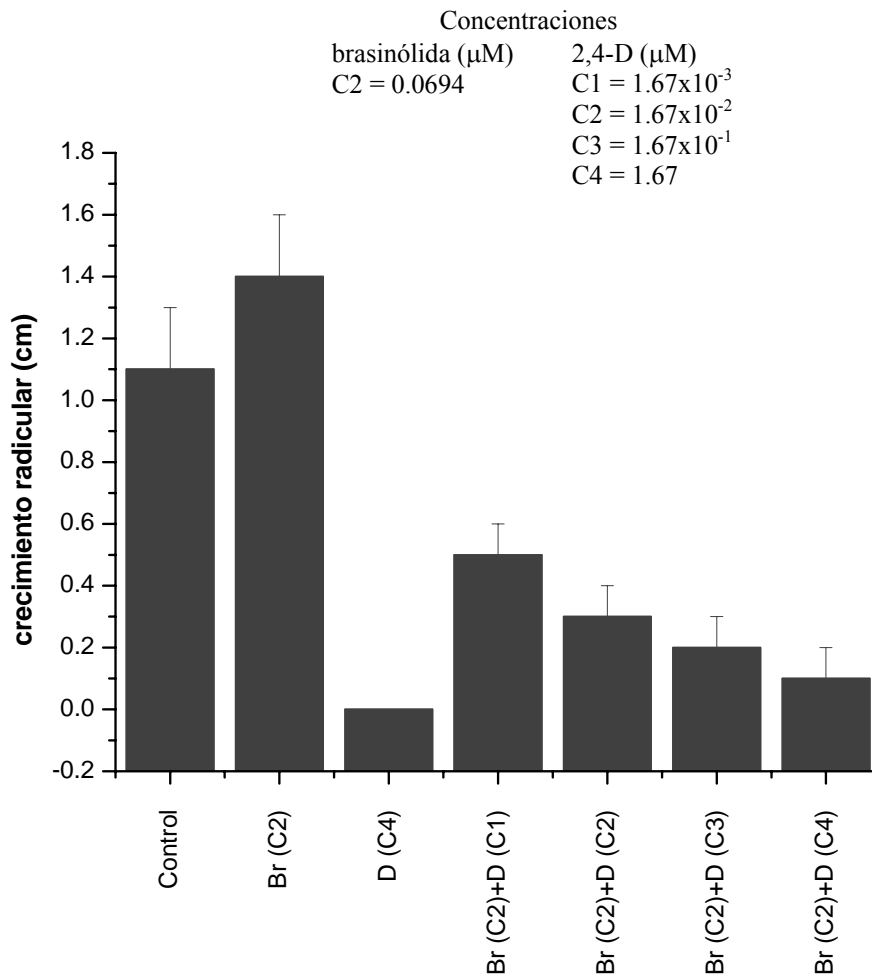


Figura 24. Efecto antibrasinoesteroide de diferentes concentraciones del 2,4-D en semillas de *A. hypochondriacus*.

7. CONCLUSIONES.

1) Los resultados globales de la presente investigación permiten comprobar la hipótesis de trabajo. De tal forma que el bioensayo de la caja de Petri fue de utilidad para detectar nuevas fuentes biológicas adecuadas para la obtención de fitotoxinas. En este caso particular la aplicación de este ensayo permitió la selección exitosa de la especie *M. aurantiaca* como una fuente de compuestos fitotóxicos.

2) La aplicación de la estrategia convencional para la obtención de compuestos fitotóxicos a partir de *M. aurantiaca* permitió la obtención de dos fitotoxinas potentes y novedosas: la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida (**IV**) y la malbranqueamida (**II**). Su elucidación estructural se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos convencionales y de difracción de rayos X.

3) La proteína reguladora calmodulina puede constituir un posible blanco de acción de las fitotoxinas **II** y **IV** *in vivo*, ya que ambas inhiben la activación de la enzima PDE1 dependiente de calmodulina. El efecto fue dependiente de la concentración. Mediante un análisis cinético pertinente se comprobó que la malbranqueamida es un antagonista competitivo de esta proteína. Como el estudio funcional aplicado estuvo limitado al empleo de la PDE1, la extrapolación de estos resultados a otras enzimas reguladas por CaM debe realizarse con cautela.

4) La presente investigación permitió también establecer un procedimiento para evaluar el efecto antibrasinoesteroide de fitotoxinas, utilizando el ensayo de la caja de Petri. Este método es económico, rápido y fácil de realizar, y se puede utilizar como un indicador adicional del efecto antibrasinoesteroide de muchas fitotoxinas. La aplicación de este método permitió comprobar que la malbranqueamida y la clorpromazina inhiben el efecto inductor del crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*

promovido por los brasinoesteroides. El efecto antinobrasinoesteroide de la malbranqueamida se corroboró al evaluarla en el bioensayo del desenrollamiento de las hojas de trigo. Un análisis cinético realizado en este mismo ensayo permitió comprobar que la malbranqueamida es un inhibidor acompetitivo de la brasinólida. La malbranqueamida es el primer producto natural con un efecto antibrasinoesteroide que se describe. Este hallazgo es relevante para el futuro desarrollo de agentes herbicidas con un mecanismo de acción específico a nivel de este blanco de acción. Asimismo, las propiedades antiCaM y antibrasinoesteroide demostrado por este compuesto lo hacen una herramienta de investigación valiosa para el estudio de los procesos fisiológicos mediados por la calmodulina y los brasinoesteroides.

5) La especie fúngica *M. aurantiaca* es muy sensible a los cambios de algunas condiciones de fermentación, principalmente a la luz y la temperatura. En la oscuridad y a 25 °C el hongo produce sesquiterpenoides y pequeños policetidos, pero a 32 °C y ciclos de luz de día normal (12 horas luz-12 horas oscuridad), el hongo produce alcaloides.

6) *Neorollandina mexicana* constituye una fuente novedosa de PHB's, polímeros de interés comercial. Aparentemente, este producto constituye un marcador taxonómico de un nuevo grupo de especies de la familia Gymnoascaceae.

7) El presente trabajo doctoral constituye una aportación a los estudios de bioprospección en México.

8. PERSPECTIVAS.

1) Establecer el perfil de toxicidad potencial de la malbraqueamida y del eremofilano IV.

2) Determinar el efecto pos y pre emergente de las fitotoxinas **II** y **IV** sobre distintas especies de plantas nocivas y de interés agrícola.

3) Analizar el efecto de los productos naturales **II** y **IV** sobre las propiedades moduladoras enzimáticas de la CaM utilizando otras enzimas blanco de la CaM, en particular, de aquellas enzimas exclusivamente moduladas por CaM en plantas.

4) Realizar los estudios conducentes a la determinación del sitio de unión de los compuestos **II** y **IV** a la CaM

9. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Adam, G., Marquardt, V. (1986). Brassinosteroids. *Phytochemistry* **25**, 1787-1799.
- ❖ Altieri, M.A. (1988). The impact, uses, and ecological role of weeds in agroecosystems. In M.A. Altieri y M.Z. Liebman (eds.), *Weed management in agroecosystems: Ecological approaches*. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc. pp. 1-6.
- ❖ Anaya, A.L., Calera, M.R., Mata, R., Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology* **7**, 2145-2152.
- ❖ Anderson, J.A., Daves, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbial Reviews* **54**, 450-472.
- ❖ Au, T.K., Chick, W.S.H., Leung, P.C. (2000). The biology of ophiobolins. *Life Sciences* **67**, 733-742.
- ❖ Bachmann, B.M., Seebach, D. (1998). Synthesis and structure of linear and cyclic oligomers of 3-hydroxybutanoic acid with specific sequences of (R)- and (S)-configurations. *Helvetica Chimica Acta* **81**, 2430-2461.
- ❖ Bajguz, A., Tretyn, A. (2003). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **62**, 1027–1046.
- ❖ Bajguz, A. (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry, en prensa*.

- ❖ Beckie, H.J. (2006). Herbicide-resistant weeds: Management tactics and practices. *Weed Technology* **20**, 793-814.
- ❖ Birch, A.J., Wright, J.J. (1970). Studies in relation to biosynthesis-XLII. The structural elucidation and some aspects of the biosynthesis of the brevianamides A and E. *Tetrahedron* **26**, 2329-2344.
- ❖ Birch, A.J., Russell, R.A. (1972). Studies in relation to biosynthesis-XLIV. Structural elucidation brevianamides B, C, D and F. *Tetrahedron* **28**, 2999-3008.
- ❖ Black, D.J., Tran, Q-K., Persechini, A. (2004). Monitoring the total available calmodulin concentration in intact cells over the physiological range in free Ca²⁺. *Cellular Calcium* **35**, 415-425.
- ❖ Blanchflower, S. E., Banks, R. M., Everett, J. R., Manger, B. R., Reading, C. (1991). New paraherquamide antibiotics with anthelmintic activity. *Journal of Antibiotics* **44**, 492-497.
- ❖ Blanchflower, S. E., Banks, R. M., Everett, J. R., Reading, C. (1993a). Further novel metabolites of the paraherquamide family. *Journal of Antibiotics* **46**, 1355-1363.
- ❖ Blanchflower, S. E., Banks, R. M., Everett, J. R., Reading, C. (1993b). Further novel metabolites of the paraherquamide family. *Journal of Antibiotics* **46**, 1355-1363.
- ❖ Boswell-Smith, V., Spina, D., Page, C.P. (2006). Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* **147**, Suppl 1: S252-S257.

- ❖ Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W.A., Fromm, H. (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 435-466.
- ❖ Chin, D., Means, A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology* **10**, 322-328.
- ❖ Chiung, Y.M., Fujita, T., Nakagawa, M., Nozaki, H., Chen, G.Y., Chen, Z.C., Nakayama, M. (1993). A novel quinone antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54. *Journal of Antibiotics* **46**, 1819-1826.
- ❖ Coetzer, J. (1974). The Structure and Absolute Configuration of 5-Bromobrevianamide A. *Acta Crystallographica B* **30**, 2254-2256.
- ❖ Cole, D., Pallett, K., Rodgers, M. (2000). Discovering new modes of action for herbicides and the impact of genomics. *Pesticide Outlook*, 223-229.
- ❖ Craven, C.J., Whitehead, B., Jones, S.K.A., Thulin, E., Blackburn, G.M., Waltho, J.P. (1996). Complexes formed between calmodulin and the antagonists J-8 and TFP in solution. *Biochemistry* **35**, 10287-10299.
- ❖ Daye, S., Wenqiang, T., Ligeng, M. (2001). Extracellular calmodulin: A polypeptide signal in plants?. *Science in China, Series C: Life Sciences* **44**, 449-460.
- ❖ Dilika, F., Bremner, P.D., Meyer, J.J.M. (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumscision rites. *Fitoterapia* **71**, 450-452.
- ❖ Dixon, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constant. *Biochemical Journal* **55**, 170-171.

- ❖ Domingo, L. R., Zaragoza, R. J. Williams, R. M. (2003). Studies on the biosynthesis of paraherquamide A and VM99955. A theoretical study of intramolecular Diels-Alder cycloaddition. *Journal of Organic Chemistry* **68**, 2895-2902.

- ❖ Duke, S.O., Dayan F.E., Rimando A.M., Schrader K.K., Aliotta G., Oliva A., Romagni J.G. (2002). Chemicals from nature for weed management. *Weed Science* **50**, 138–151.

- ❖ Evidente, A., Andolfi, A., Cimmino, A., Vurro, M., Fracchiolla, M., Charudattan, R. (2006). Herbicidal Potential of Ophiobolins Produced by *Drechslera gigantean*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1779-1783.

- ❖ Flack, H.D. (1983). On Enantiomorph-Polarity Estimation. *Acta Crystallographica A* **39**, 876-881.

- ❖ Goto, J., Matsuda, Y., Asano, K., Kawamoto, I., Yasuzawa, T., Shirahata, K., Sano, H., Kase, H. (1987). K-254-I (genistein), a new inhibitor of Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptosporangium vulgare*. *Agricultural and Biological Chemistry* **51**, 3003-3009.

- ❖ Harmat, V., Bocskei, Z., Naray-Szabo, G., Bata, I., Csutor, A.S., Hermecz, I., Aranyi, P., Szabo, B., Liliom, K., Vertessy, B.G., Ovadi. J. (2000). A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies. *Journal of Molecular Biology* **297**, 747-755.

- ❖ Haubrick, L.L., Assmann, S.L. (2006). Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant, Cell and Environment* **29**, 446–457.

- ❖ Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. **Marzo, 2007**. Available www.weedscience.com
- ❖ Hegemann, L., Van Rooijen, L.A.A., Traber, J., Schmidt, B.H. (1991). Polymyxin B is a selective and potent antagonist of calmodulin. *European Journal of Pharmacology* **207**, 17-22.
- ❖ Hernandez-Romero, Y., Acevedo, L., Sánchez, M.D., Shier, W.T., Abbas, H.K., Mata, R. (2005). Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 6276-6280.
- ❖ Hoff, H., Drautz, H., Fiedler, H.P., Zaehner, H., Schultz, J.E., Keller-Schierlein, W., Philipps, S., Ritzau, M., Zeeck, A. (1992). Metabolic products of microorganisms. 261. Obscurolides, a novel class of phosphodiesterase inhibitors from *Streptomyces*. I. Production, isolation, structural elucidation and biological activity of obscurolides A1 to A4. *Journal of Antibiotics* **45**, 1096-1107.
- ❖ Hoagland, R.E. (2001). Microbial allelochemicals and pathogens as bioherbicidal agents. *Weed Technology* **15**, 835-857.
- ❖ Horgen, P.A., Nakagawa, C.H., Irwin, R.T. (1984). Production of monoclonal antibodies to a steroid plant growth regulator. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **62**, 715-721.
- ❖ Hosoe, T., Iizuka, T., Komai, S-I., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., Fukushima, K., Kawai, K-I. (2005). 4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry* **66**, 2776-2779.

- ❖ Ichimura, M., Eiki, R., Osawa, K., Nakanishi, S., Kase, H. (1996). KS-505a, an isoform-selective inhibitor of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemical Journal* **316**, 311-316.
- ❖ Jenniskens, L.H.D., Groot, A. (1998). Enantioselective synthesis of R(-)-ligularenolide and the progesterone receptor ligand R(-)-PF1092C starting from S-(+)-carvone. *Tetrahedron* **54**, 5617–5622.
- ❖ Kang, S.W., Kim, S.W. (2004). New antifungal activity of penicillic acid against *Phytophthora* species. *Biotechnology Letters* **26**, 695–698.
- ❖ Kase, H., Iwahashi, K., Matsuda, Y. (1986). K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *Journal of Antibiotics* **39**, 1059-1065.
- ❖ Keromnes, J., and Thouvenot, D. (1985). Role of penicillic acid in the phytotoxicity of *Penicillium cyclopium* and *Penicillium canescens* to the germination of corn seeds. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 660–663.
- ❖ Kim, S.K., Abe, H., Little, C.H.A., Pharis, R.N. (1990). Identification of two brassinosteroids from the cambial region of Scots pine (*Pinus silvestris*) by gas chromatography/mass spectrometry, after detection using a dwarf rice lamina inclination bioassay. *Plant Physiology* **94**, 1709-1713.
- ❖ Kohli, R.K., Batish, D.R., Singh, H.P. (2006). Weeds and their management: Rational and approaches. In: Singh, H.P., Batish, D.R., y Kohli, R.K. (eds.), Handbook of sustainable weed management. Food Products Press, Binghamton, NY, pp. 1-19.
- ❖ Kortvely, E., Gulya, K. (2004). Calmodulin, and various ways to regulate its activity. *Life Sciences* **74**, 1065–1070.

- ❖ Lee, S.H., Johnson, J.D., Walsh, M.P., Van Lierop, J.E., Sutherland, C., Xu, A., Snedden, W.A., Kosk-Kosicka, D., Fromm, H., Narayanan, N., Cho, M.J. (2000). Differential regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca²⁺ concentration. *Biochemical Journal* **350**, 299-306.

- ❖ Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., Tipton, C.L. (1984). Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 2742-2747.

- ❖ Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., Tipton, C.L. (1985). Role of calmodulin inhibition in the mode of action of ophiobolin A. *Plant Physiology* **77**, 303-308.

- ❖ Li, J. (2005). Brassinosteroid signaling: from receptor kinases to transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 526–531.

- ❖ Liebman, M. (2001). Weed management: A need for ecological approaches. In M. Liebman, C.L. Mohler, and C.P. Staver (eds.), *Ecological management of agricultural weeds*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 1-39.

- ❖ Liesch, J. M., Wichmann, C. F. (1990). Novel antinematodal and antiparasitic agents from *penicillium charlesii* II. Structure determination of paraherquamides B, C, D, E, F, and G. *Journal of Antibiotics* **43**, 1380-1386.

- ❖ Macabeo, A.P.G., Krohn, K., Gehle, D., Read, R.W., Brophy, J.J., Cordell, G.A., Franzblau, S.G., Aguinaldo, A.M. (2005). Indole alkaloids from the leaves of Philippine *Alstonia scholaris*. *Phytochemistry* **66**, 1158-1162.

- ❖ Macías, F., Castellano, D., Molinillo, J. (2000). Search for a standar phytotoxic bioassays for allelochemicals. Selection of standar target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2512-2521.

- ❖ Macías, M., Ulloa, M., Gamboa, A., Mata, R. (2000). Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Journal of Natural Products* **63**, 757-761.
- ❖ Macías, M., Ulloa, M., Gamboa, A., Toscano, R.A., Mata, R. (2001). Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry* **58**, 751-758.
- ❖ Mandava, N.B. (1988). Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 23-52.
- ❖ Mata, R., Bye, R., Linares, E., Macias, M., Rivero-Cruz, I., Perez, O., Timmermann, B. (2003). Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* **64**, 285-291.
- ❖ Mata, R., Gamboa, A., Macias, M., Santillan, S., Ulloa, M., Gonzalez, M.C. (2003). Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulin-dependent activity of the enzymes cAMP phosphodiesterase and NAD-kinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4559-4562.
- ❖ Matsuda, Y., Asano, K., Kawamoto, I. (1987). K-259-2, a new inhibitor of Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Micromonospora olivasterospora*. *Journal of Antibiotics* **40**, 1092-1100.
- ❖ Matsuda, Y., Kase, H. (1987). KS-619-1, a new inhibitor of calcium and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptomyces californicus*. *Journal of Antibiotics* **40**, 1104-1110.

- ❖ Matsuda, Y., Asano, K., Kawamoto, I., Yasuzawa, T., Shirahata, K., Sano, H., Kase, H. (1988). K-251 compounds, inhibitors of Ca^{2+} and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptovercillium album*. *Agricultural and Biological Chemistry* **52**, 3211-3213.

- ❖ Matsuda, Y., Nakanishi, S., Nagasawa, K., Kase, H. (1990). Inhibition by new anthraquinone compounds, K-259-2 and KS-619-1 of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemical Pharmacology* **39**, 841-849.

- ❖ Molnar, A., Liliom, K., Orosz, F., Vertessy, B. G., and Ovadi, J. (1995). Anti-calmodulin potency of indole alkaloids *in vitro* systems. *European Journal of Pharmacology, Molecular Pharmacology Section* **291**, 73-82.

- ❖ Nakanishi, S., Matsuda, Y., Iwahashi, K., Kase, H. (1986). K-252b, c and d, potent inhibitors of protein kinase C from microbial origin. *Journal of Antibiotics* **39**, 1066-1071.

- ❖ Nakanishi, S., Katsuhiko, A., Kawamoto, I., Kase, H. (1990a). KS-501 and KS-502, a new inhibitors of Ca^{2+} and calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase from *Sporothrix* sp. *Journal of Antibiotics* **42**, 1049-1055.

- ❖ Nakanishi, S., Kuroda, K., Osawa, K., and Kase, H. (1990b). Calmodulin antagonistic action of KS-504a, a novel metabolite of the fungus *Mollisia ventosa*. *Agricultural and Biological Chemistry* **54**, 2697-2702.

- ❖ Nakanishi, S., Osawa, K., Saito, Y., Kawamoto, I., Kuroda, K., Kase, H. (1992). KS-505a, a novel inhibitor of bovine brain Ca^{2+} and calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase from *Streptomyces argenteolus*. *Journal of Antibiotics* **45**, 341-346.

- ❖ Nakanishi, S., Kita, K., Uosaki, Y., Yoshida, M., Saitoh, Y., Mihara, A., Kawamoto, I., Matsuda, Y. (1994). MS-282a and MS-282b, new inhibitors of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces tauricus* ATCC 27470. *Journal of Antibiotics* **47**, 855-861.

- ❖ Odom, A., Del Poeta, M., Perfect, J., Heitman, J. (1997). The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685, 818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 156–161.

- ❖ Ondeyka, J. G., Goegelman, R. T., Schaeffer, J. M., Kelemen, L., Zitano, L. (1990). Novel antinematodal and antiparasitic agents from *Penicillium charlesii*. I. Fermentation, isolation and biological activity. *Journal of Antibiotics* **43**, 1375-1379.

- ❖ Orosz, F., Christova, T.V., Ovadi, J. (1988). Functional *in vitro* test of calmodulin antagonism: Effect of drugs on interaction between calmodulin and glycolytic enzymes. *Molecular Pharmacology* **33**, 678- 682.

- ❖ Orosz, F., Telegdi, M., Liliom, K., Solti, M., Korbonits, D., Ovadi, J. (1990). Dissimilar mechanisms of action of anticalmodulin drugs: Quantitative analysis. *Molecular Pharmacology* **38**, 910- 916.

- ❖ Ovadi, J. (1989). Effects of drugs on calmodulin-mediated enzymatic actions. In: Jucker, E. (ed.), *Progress in Drug Research*, Vol. 33. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 353-395.

- ❖ Pala, I., Srinivasan, A., Vig, P.V.S., Desai, D. (1999). Modulation of calmodulin and protein kinase C activities by *Penicillium* mycotoxins. *International Journal of Toxicology* **18**, 91-96.

- ❖ Perez-Vasquez, A., Reyes, A., Linares, E., Bye, R., Mata, R. (2005). Phytotoxic agents from *Hofmeisteria schaffneri*: Isolation and synthesis of 2'-(2"-hydroxy-4"-methylphenyl)-2'-oxoethyl acetate. *Journal of Natural Products* **68**, 959-962.

- ❖ Pohland, A.E., Schuller, P.L., Steyn, P.S. (1982). Physicochemical data for some selected mycotoxins. *Pure Applied Chemistry* **54**, 2220-2284.

- ❖ Polonsky, J., Merrien, M-A., Prange, T., Pascard, C. (1980). Isolation and structure (X-ray analysis) of marcfortine A, a new alkaloid from *Penicillium roqueforti*. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* 601-602.

- ❖ Prange, T., Billion, M-A., Vuilhorgne, M., Pascard, C., Polonsky, J., Moreau, S. (1981). Structures of marcfortine B and C (X-ray analysis), alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *Tetrahedron Letters* **22**, 1977-1980.

- ❖ Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E., Hosttetmann, K. (1994). A antifungal test in phytochemical investigations: Comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human phatogenic fungi. *Planta Medica* **60**, 41-44.

- ❖ Reusch, R.N., Sadoff, H.L. (1983). D-(-)-Poly- β -hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria. *Journal of Bacteriology* **156**, 778-788

- ❖ Reusch, R.N., Sadoff, H.L. (1988). Putative structure and functions of a poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 4176-4180.

- ❖ Reusch, R.N. (1989). Poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **191**, 377-381.

- ❖ Ritzau, M., Philipps, S., Zeeck, A. (1993). Metabolic products of microorganisms. 268. Obscurolides, a novel class of phosphodiesterase inhibitors from *Streptomyces*. II. Minor components belonging to the obscurolide B to D series. *Journal of Antibiotics* **46**, 1625-1628.

- ❖ Rivero-Cruz, J.F., García-Aguirre, G., Cerda-Garcia-Rojas, C.M., Mata, R. (2000). Conformation behavior and absolute stereostructure of two phytotoxic nonenolides from the fungus *Phoma herbarum*. *Tetrahedron* **56**, 5337-5344.

- ❖ Rivero-Cruz, J.F., Macias, M., Cerda-Garcia-Rojas, C.M., Mata, R. (2003). A new phytotoxic nonenolide from *Phoma herbarum*. *Journal of Natural Products* **66**, 511-514.

- ❖ Safak, S., Mercan, N., Aslim, B., Beyatli, Y. (2002). A study on the production of poly-beta-hydroxybutyrate by some eukaryotic microorganisms. *Turkish Elect. Journal of Biotechnology Suppl*, 11-17.

- ❖ Saito, M., Matsuura, I., Okazaki, H. (1979). Tf-26Vx, an antibiotic produced by a thermophilic fungus. *Journal of Antibiotics* **32**, 1210-1212.

- ❖ Sang, Y.L. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 1-14.

- ❖ Saxena, S., Pandey, A.K. (2001). Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 395-403.

- ❖ Schlagenhauser, C.D., Arteca, R.N., Philips, A.T. (1991). Induction of anti-brassinosteroids antibodies. *Journal of Plant Physiology* **138**, 404-410.
- ❖ Schlegel, B., Haenel, F., Gollmick, F.A., Saluz, H-P., Graefe, U. (2003a). New quinones and hydroquinones from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286 and HKI 296 and interaction with Tax/CREB expression system in yeast. *Journal of Antibiotics* **56**, 917-922.
- ❖ Schlegel, B., Haertl, A., Gollmick, F.A. y Graefe, U. (2003b). 7-Methoxy-2,3-dimethylbenzofuran-5-ol, a new antioxidant from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286. *Journal of Antibiotics* **56**, 792-794.
- ❖ Sharma, R.K., Wang, J.H. (1979). Preparation and assay of the Ca²⁺-dependent modulator protein. In: Greengard, P., Robinson, G.A. (eds.), *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Vol. 10. Raven Press, New York, pp 187-198.
- ❖ Sharma, R.K., Wang, J.H., Wu, Z. (1997). Mechanisms of inhibition of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase by dihydropyridine calcium antagonists. *Journal of Neurochemistry* **69**, 845-850.
- ❖ Sharma, B., Deo, S.K., Bachas, L.G., Daunert, S. (2005). Competitive binding assay using fluorescence resonance energy transfer for the identification of calmodulin antagonists. *Bioconjugate Chemistry* **16**, 1257-1263.
- ❖ Shaw, W.C. (1988). Integrated weed management systems technology for agroecosystem management. In N.B. Mandava (Ed.), *Handbook of natural pesticides:Methods*, Volume 1, *Theory, protection and detection*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. pp. 123-129.

- ❖ Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., MacManus, S.M., Nahar, L., Thoo-Lin P.K., Sarker, S.D. (2005). Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. *Tetrahedron* **61**, 9001–9006.

- ❖ Sigler, L., Carmichael, J.W. (1976). Taxonomy of *Malbranchea* and some other Hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon* **4**, 349–488.

- ❖ Silverstein, R. M., Clayton, B. G., Morrill, C. T. (1991) Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons, New York Inc., pp. 36.

- ❖ Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: New possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**, 239-311.

- ❖ Smith, F.R., Korn, E.D. (1968). 7-Dehydrostigmasterol and ergosterol: The major sterols of an amoeba. *Journal of lipid research* **9**, 405-408.

- ❖ Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography. Academic Press Inc., p. 478.

- ❖ Stocking C., Williams R.W. (2003), Chemistry and biology of biosynthetic Diels-Alder reactions, *Angewandte Chemie, International Edition in English* **42**, 3078-3115

- ❖ Sugie, Y., Hirai, H., Inagaki, T., Ishiguro, M., Kim, Y-J., Kojima, Y., Sakakibara, T., Sakemi, S., Sugiura, A., Suzuki, Y., Brennan, L., Duignan, J., Huang, L. H., Sutcliffe, J., Kojima, N. (2001). A new antibiotic CJ-17,665 from *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Antibiotics* **54**, 911-916.

- ❖ Tabata, Y., Hatsu, M., Kurata, Y., Miyajima, K., Tani, M., Sasaki, T., Kodama, Y., Tsuruoka, T., Omoto, S. (1997). PF1092A, B and C, New nonsteroidal progesterone receptor ligands produced by *Penicillium oblatum*. *Journal of Antibiotics* **50**, 309–313.
- ❖ Takatsuto, S. (1994). Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas-chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **658**, 3-15.
- ❖ Takeno, K., Pharis, R.P. (1982). Brassinolide-induced bending of the lamina of dwarf rice seedlings: an auxin mediated phenomenon. *Plant and Cell Physiology* **23**, 1275-1281.
- ❖ Taylor, P.E., Spuck, K., Smith, P.M., Sasse, J.M., Yokota, T., Griffiths, P.G., Cameron, D. W. (1993). Detection of brassinosteroids in pollen of *Lolium perenne* by immunocytochemistry. *Planta* (Heidelberg) **189**, 91-100.
- ❖ Touchstone, J.C. (1992). Practice of thin layer chromatography. 3ra. Ed. John Wiley & Sons Inc., New York. pp. 169.
- ❖ Toutenhoofd, S.L., Strehler, E.E. (2000). The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: Multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools?. *Cell Calcium* **28**, 83–96.
- ❖ Valencia-Islas, N.A., Paul, R.N., Shier, W.T., Mata, R., Abbas, H.K. (2002). Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed (*Lemna paucicostata*) frond and root tissues. *Phytochemistry* **61**, 141–148.

-
- ❖ Valencia-Islas, N., Abbas, H., Bye, R., Toscazo, R.A., Mata, R. (2002). Phytotoxic compounds from *Prionosciadium watsoni*. *Journal of Natural Products* **65**, 828-834.

 - ❖ Vertessy, B.G., Ramat, V., Böcskei, Z., Náray-Szabó, G., Orosz, F., Ovádi, J. (1998). Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: Crystallographic and spectroscopic studies. *Biochemistry* **37**, 15300-15310.

 - ❖ Wada, K., Kondo, H., Marumo, S. (1985). A simple bioassay for brassinosteroids: a wheat leaf-unrolling test. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 2249-2251.

 - ❖ Wada, K., Marumo, S., Ikekawa, N., Morisaki, M., Mori, K. (1981). Brassinolide and homobrassinolide promotion of lamina inclination of rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* **22**, 323-326.

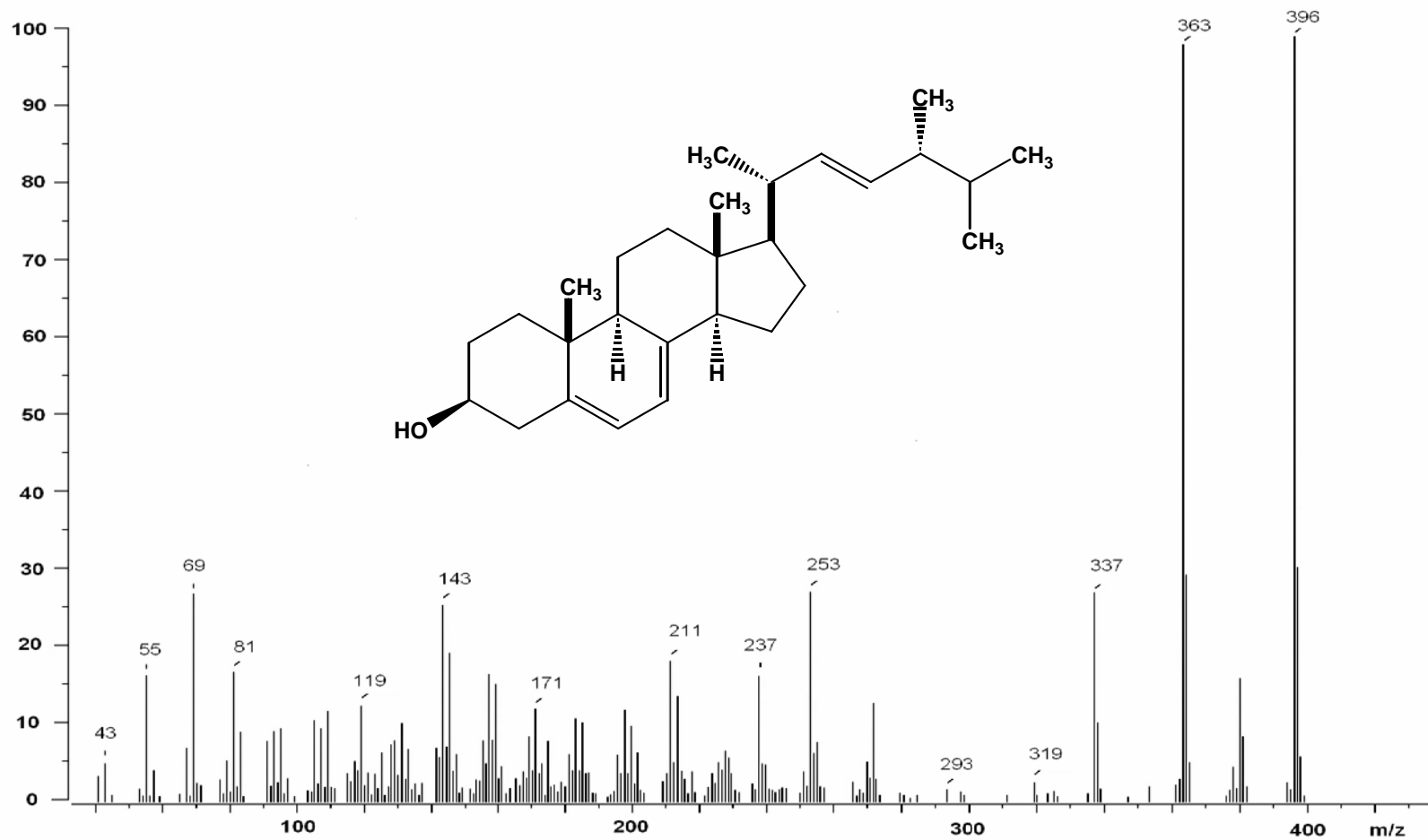
 - ❖ Waser, P., Rueping, M., Seebach, D. (2001). On the solution structure of PHB: Preparation and NMR analysis of isotopically labeled Oligo[(*R*)-3-hydroxybutanoic acids] (OHBs). *Helvetica Chimica Acta* **84**, 1821-1845.

 - ❖ Williams, R. M., Sanz-Cervera, J. F., Stocking, E. (2000). Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from Tryptophan. En: Topics in current chemistry. Volume on biosynthesis-terpenes and alkaloids, Leeper, F., Vederas, J. C., (eds.), Springer, Berlin, Vol. **209**, pp 97-173.

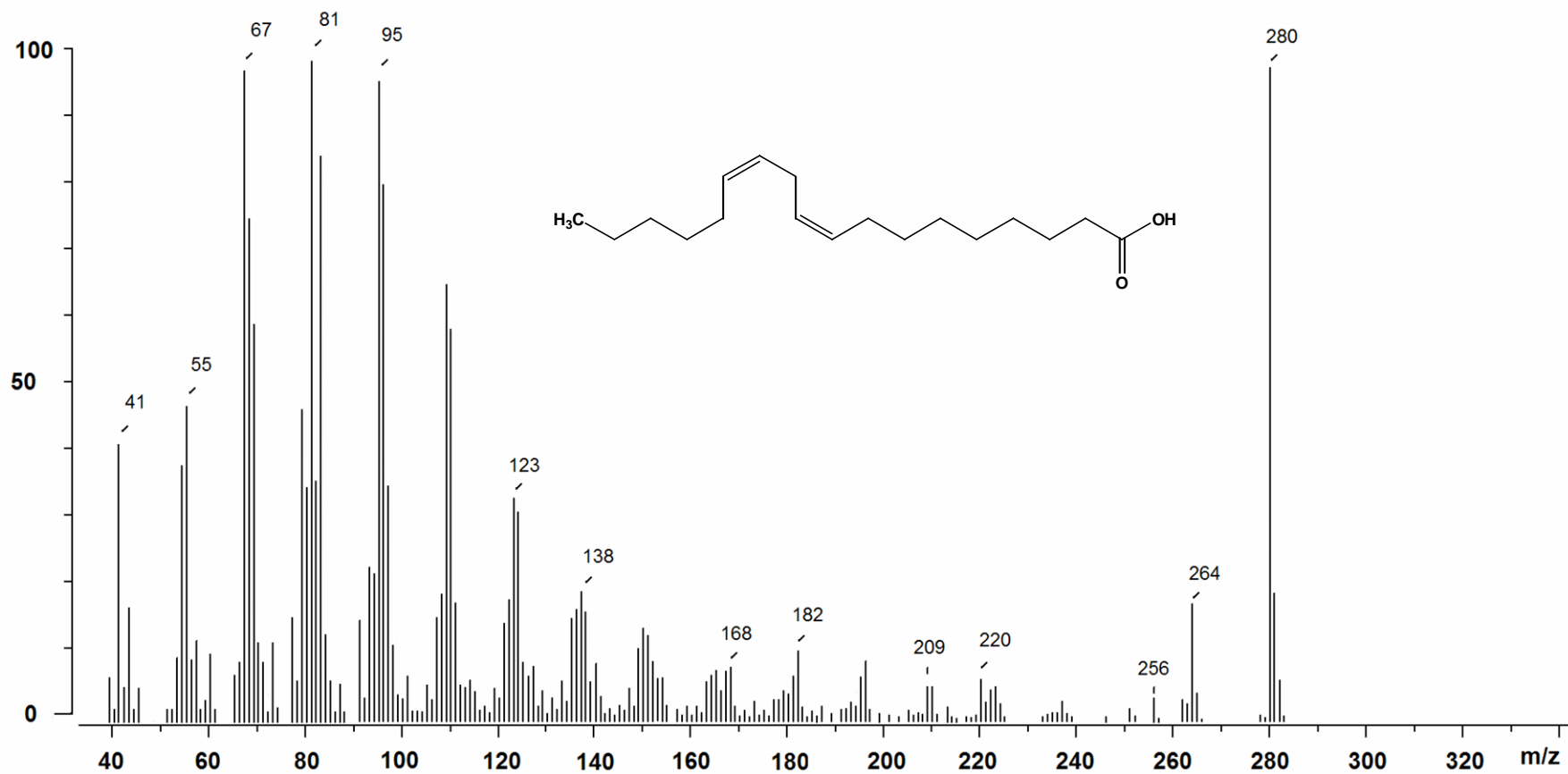
 - ❖ Yamada, T., Iwamoto, C., Yamagaki, N., Yamanouchi, T., Minoura, K., Yamori, T., Uehara, Y., Andoh, T., Umemura, K., Numata, A., Nasahara, T. (2002). Leptosins M-N1, cytotoxic metabolites from a *Leptosphaeria* species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities. *Tetrahedron* **58**, 479-487.

- ❖ Yamazaki, M.; Okuyama, E.; Kobayashi, M.; Inoue, H. (1981). The Structure of Paraherquamide, a Toxic Metabolite from *Penicillium Paraherquei*. *Tetrahedron Letters* **22**, 135-136.
- ❖ Yamniuk, A.P., Vogel, H.J. (2005). Structural investigation into the differential target enzyme regulation displayed by plant calmodulin isoforms. *Biochemistry* **44**, 3101-3111.
- ❖ Yasuzawa, T., Yoshida, M., Shirahata, K., Sano, H. (1987). Structure of a novel calcium and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor KS-619-1. *Journal of Antibiotics* **40**, 1111-1114.
- ❖ Yasuzawa, T., Saitoh, Y., Sano, H. (1990). Structures of KS-501 and KS-502, the new inhibitors of calcium and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Journal of Antibiotics* **43**, 336-343.
- ❖ Yokota, T., Watanabe, S., Ojino, Y., Yamaguchi, I., Takahashi, N. (1990). Radioimmunoassay for brassinosteroids and its use for comparative analysis of brassinosteroids in stems and seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Growth Regulation* **9**, 151-160.
- ❖ Zimdahl, R.L. (1999). *Fundamentals of weed science*. San Diego, CA: Academic Press, Inc. p. 1993.
- ❖ Zhou, Y., Li, Y., Wang, Z., Ou, Y., Zhou, X. (1994). ¹H NMR and spin-labeled EPR studies on the interaction of calmodulin with jujuboside A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **202**, 148-154.

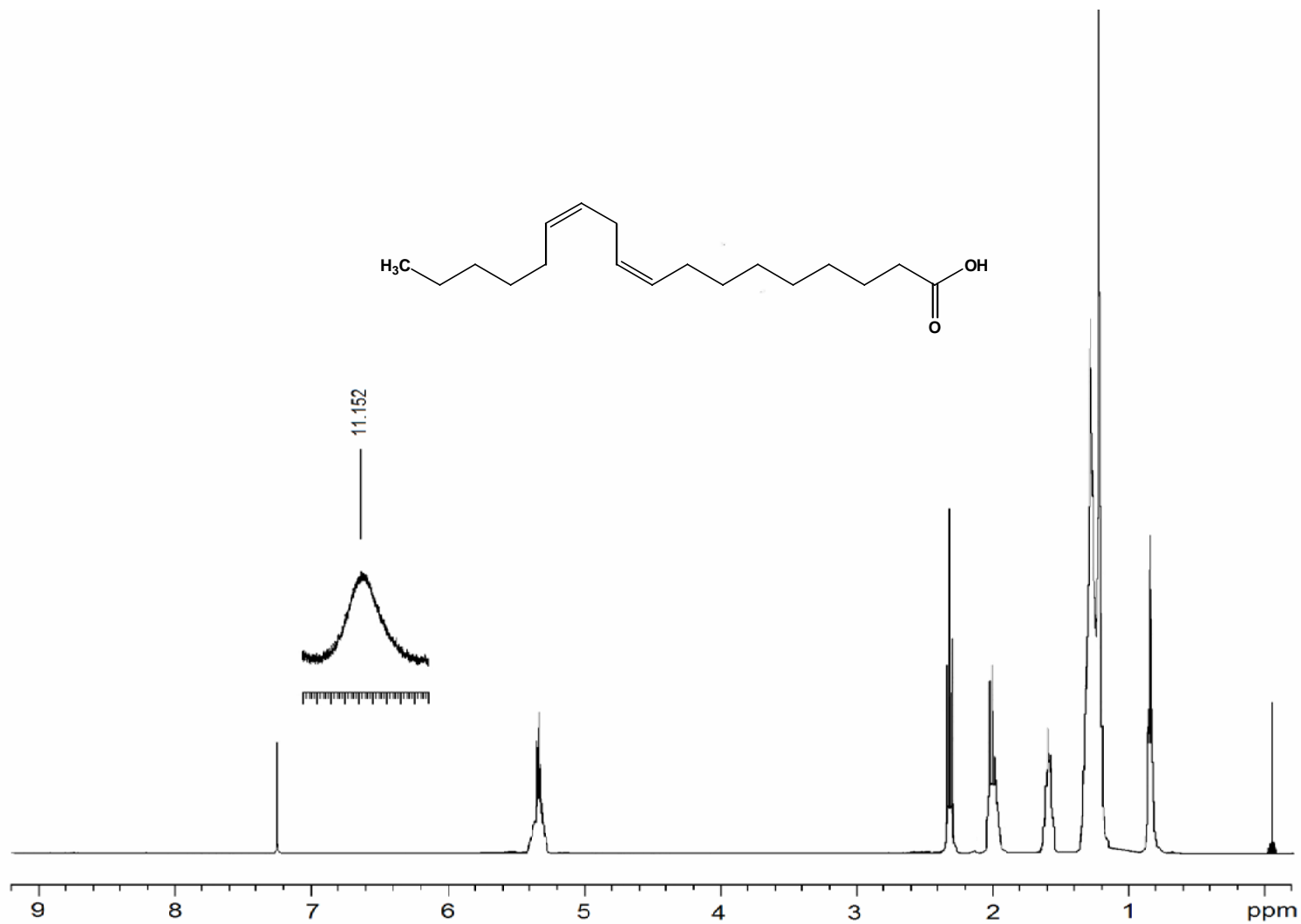
APENDICE 1 ESPECTROS



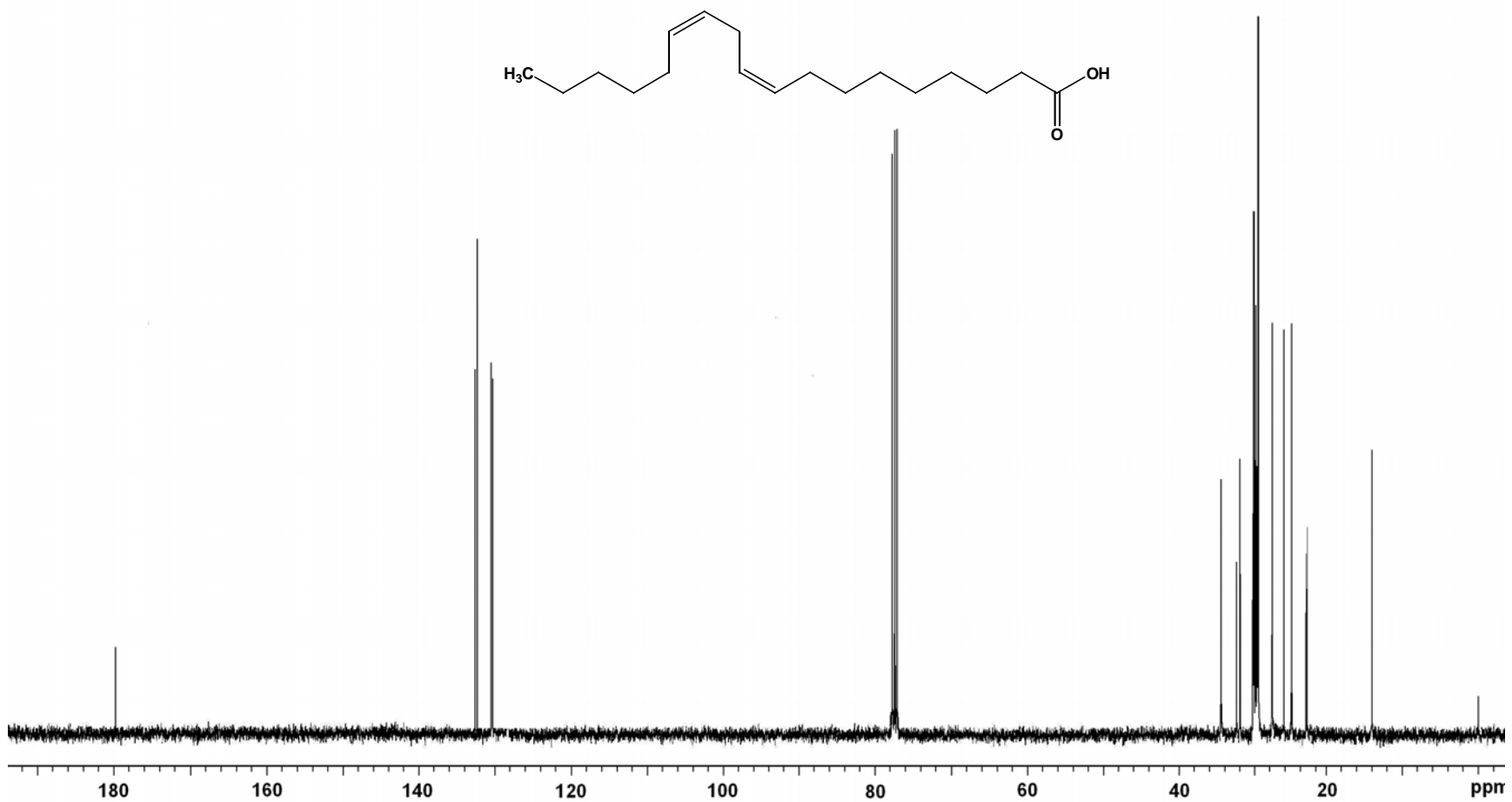
Espectro 8. Espectro de masas modalidad impacto electrónico del ergosterol.



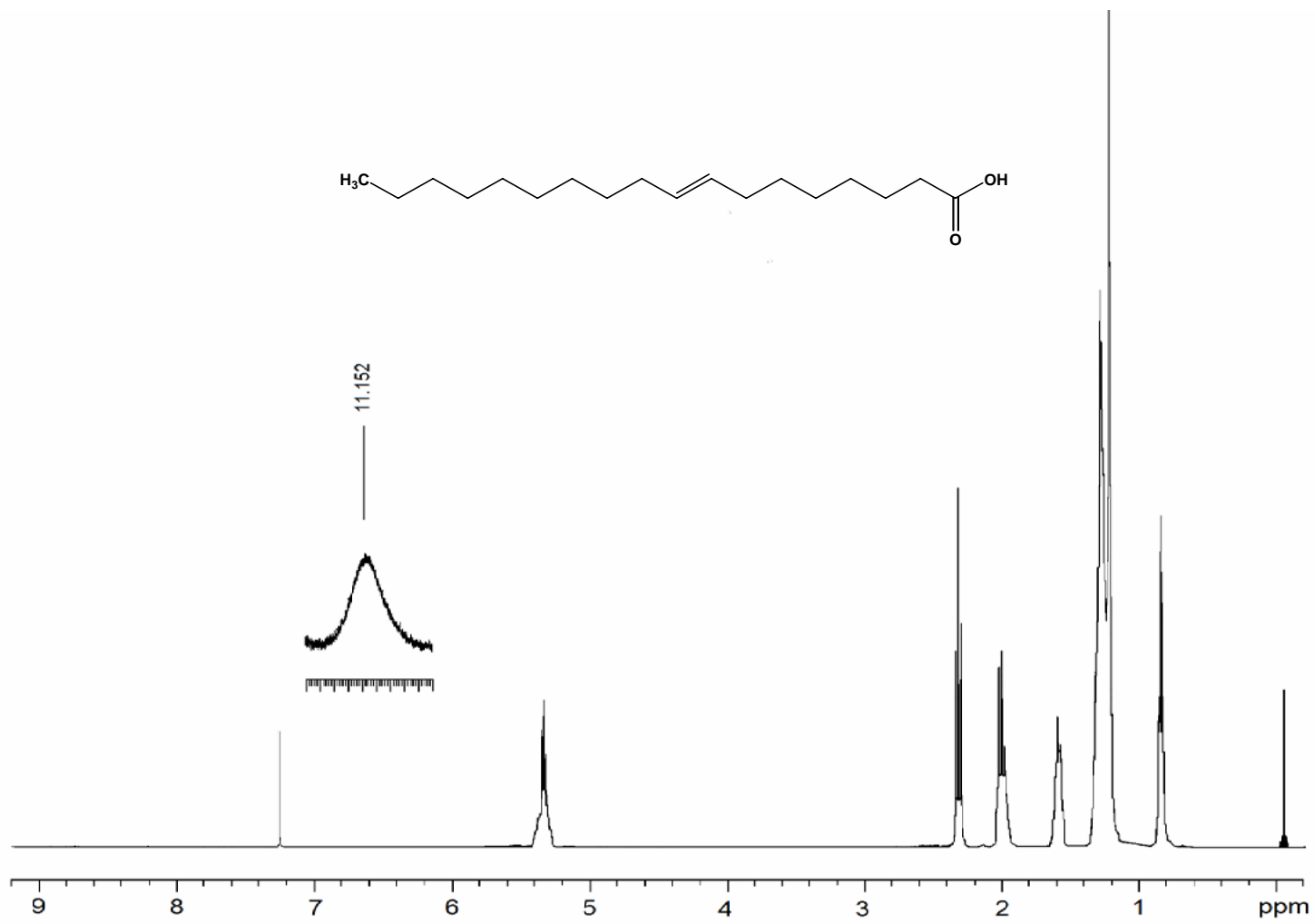
Espectro 9. Espectro de masas modalidad impacto electrónico del ácido linoleico.



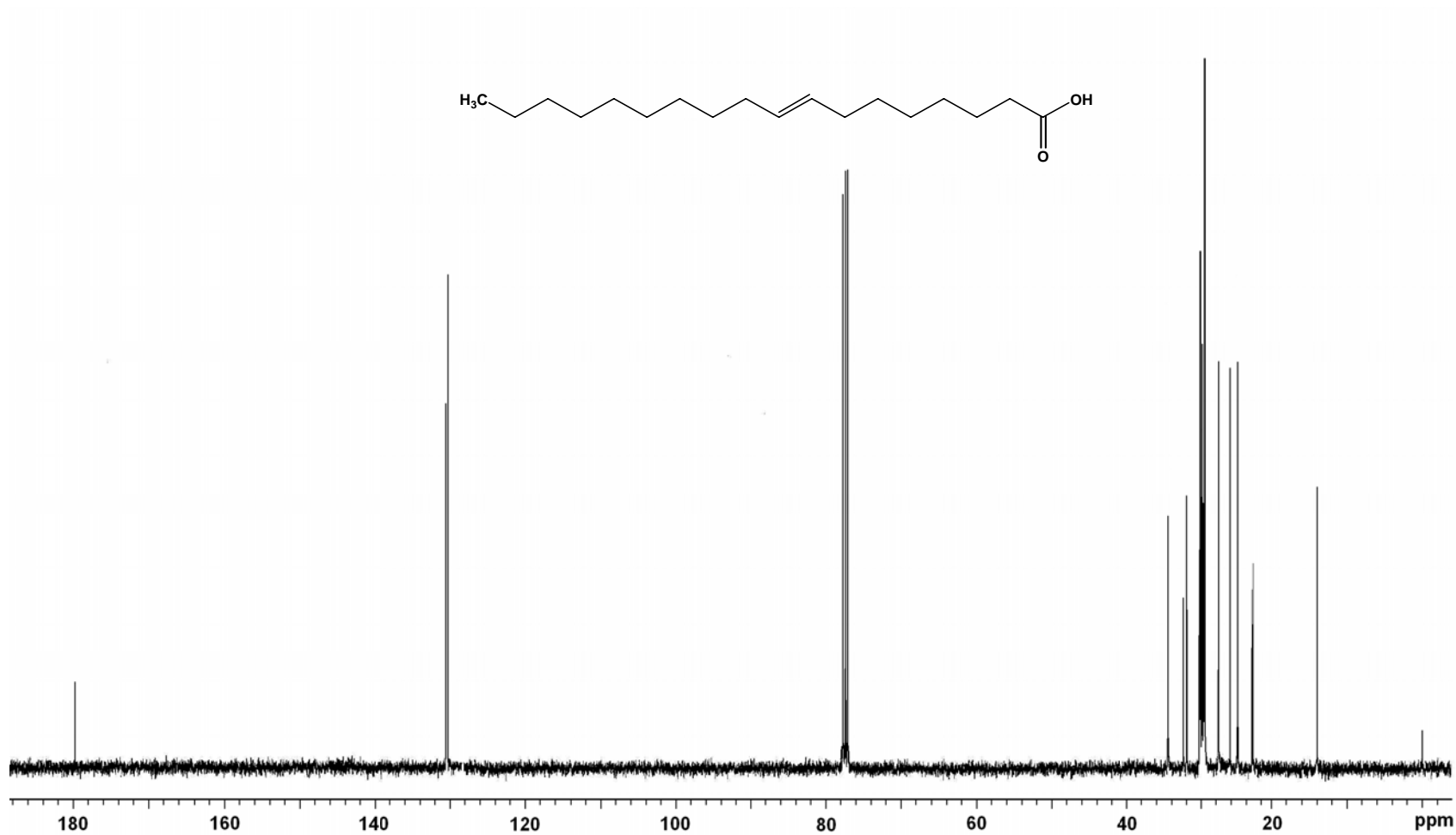
Espectro 10. Espectro de RMN-¹H del ácido linoléico.



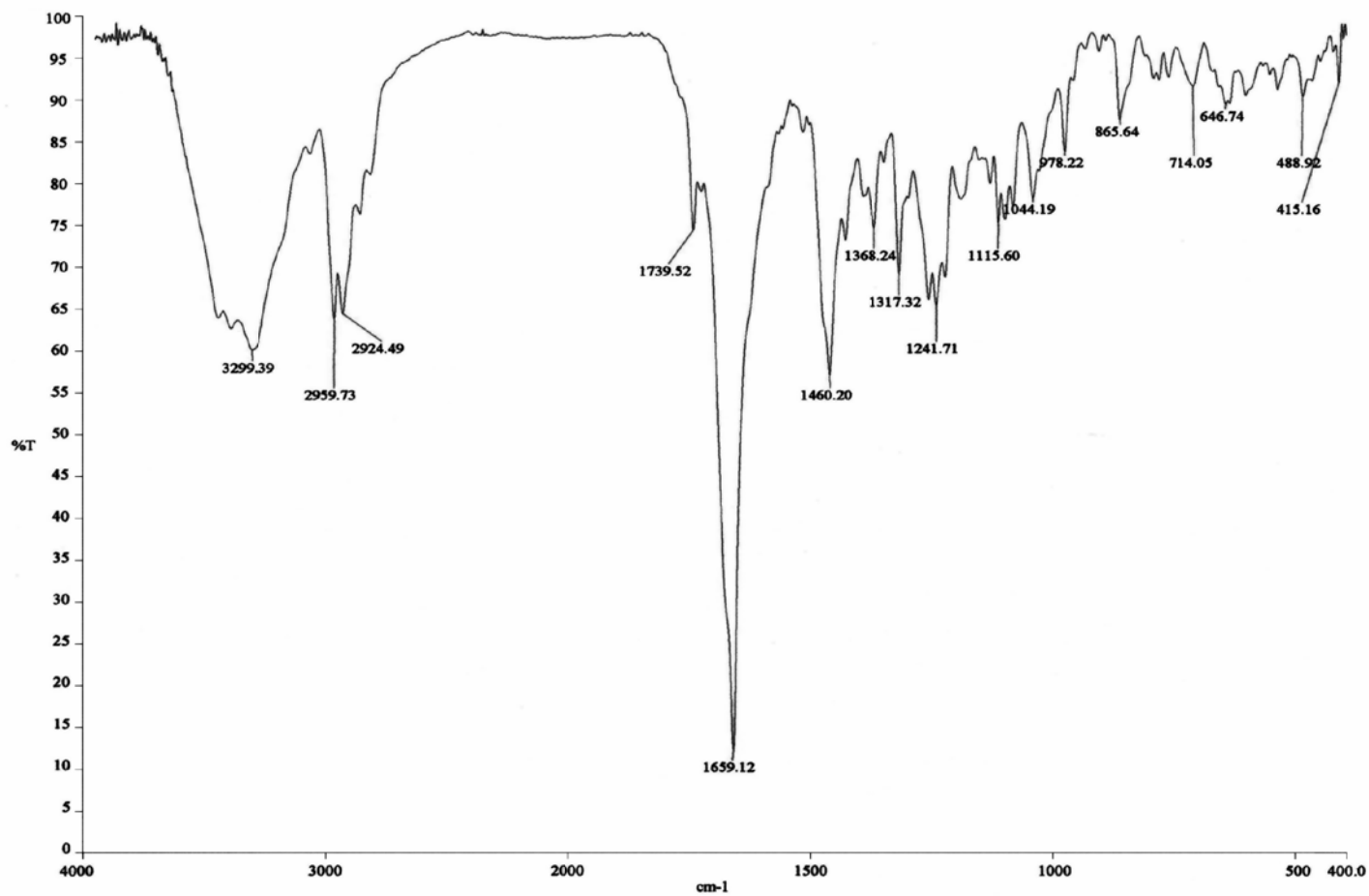
Espectro 11. Espectro de RMN-¹³C del ácido linoléico.



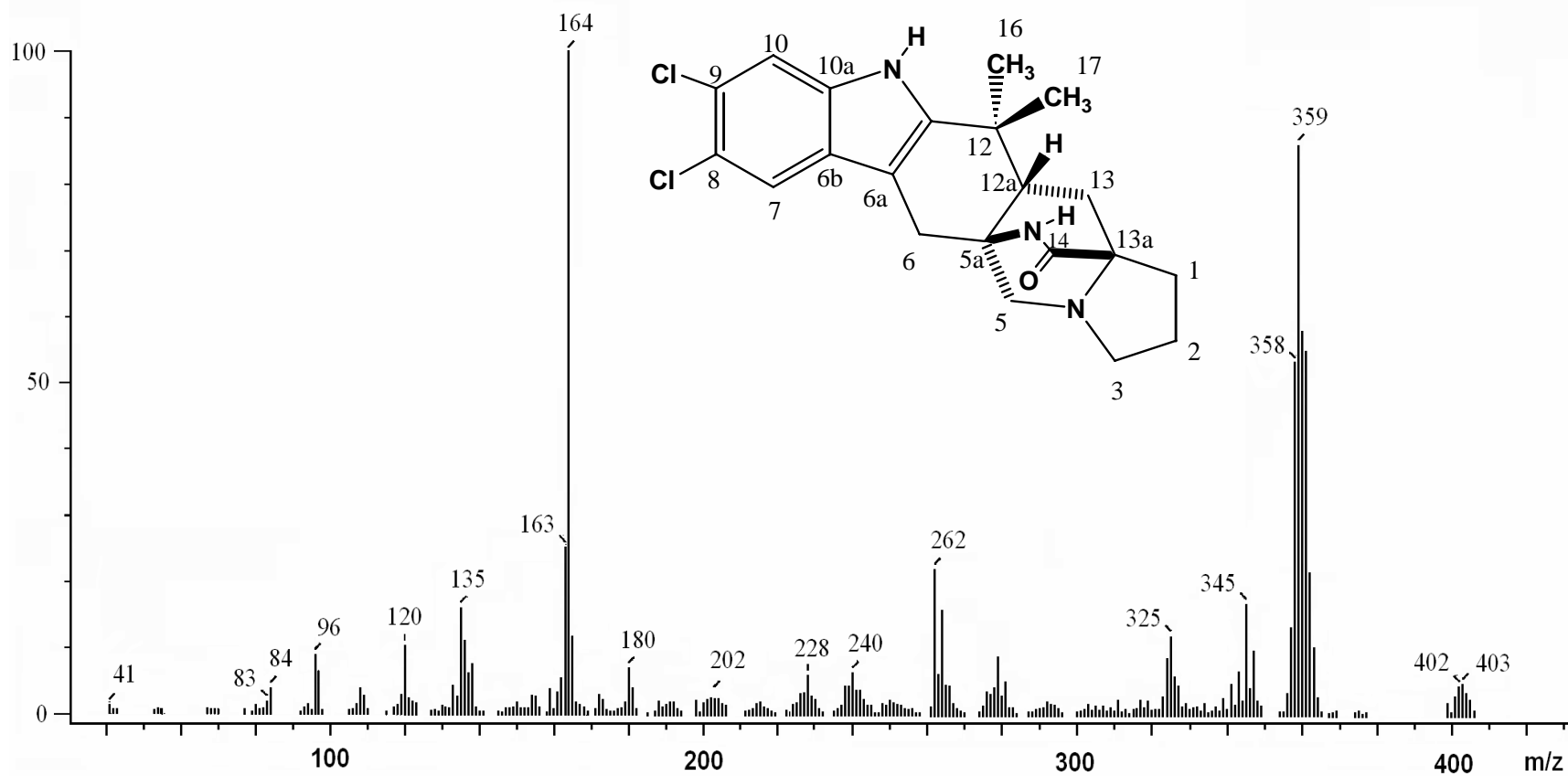
Espectro 12. Espectro de RMN- ^1H del ácido oléico.



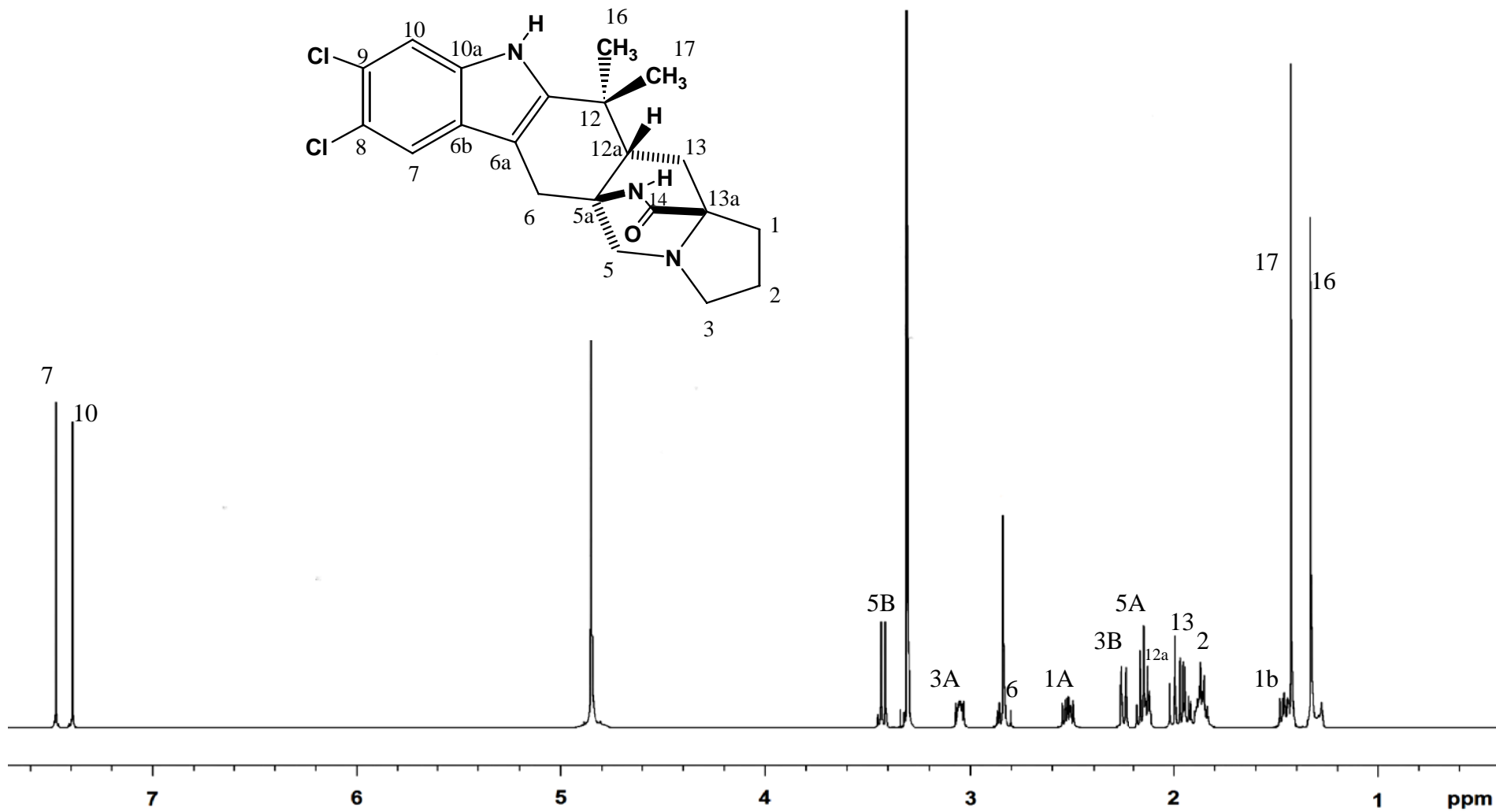
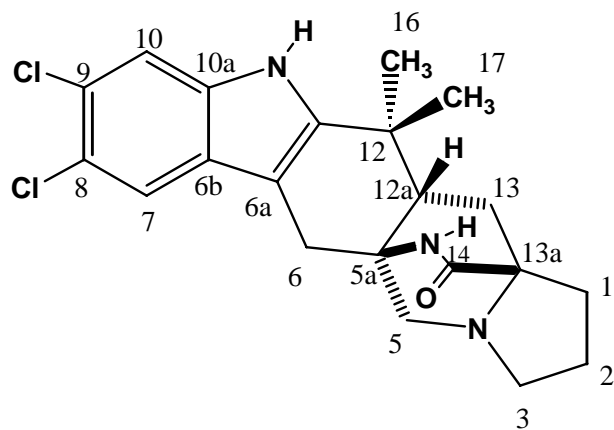
Espectro 13. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido oléico.



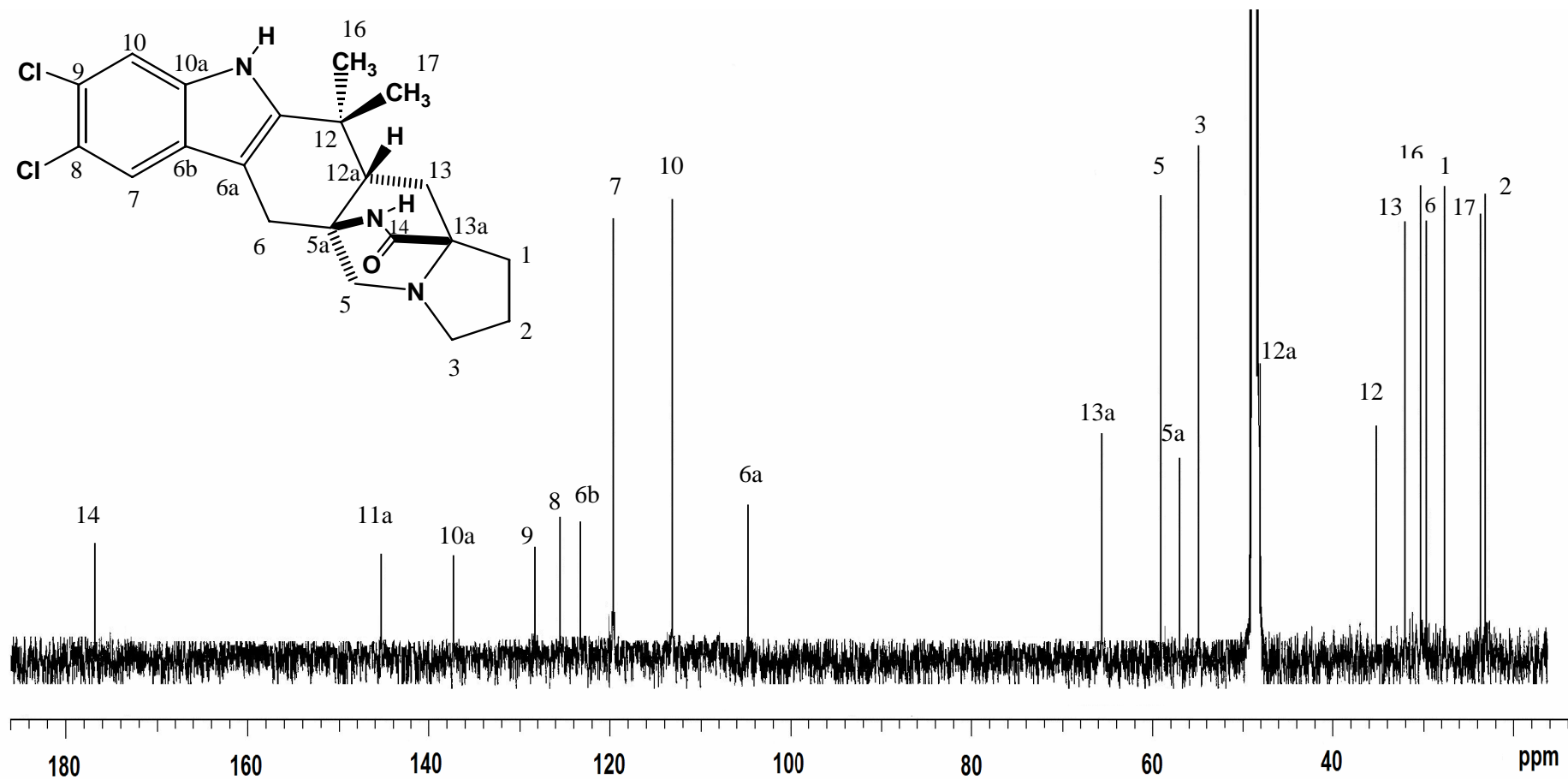
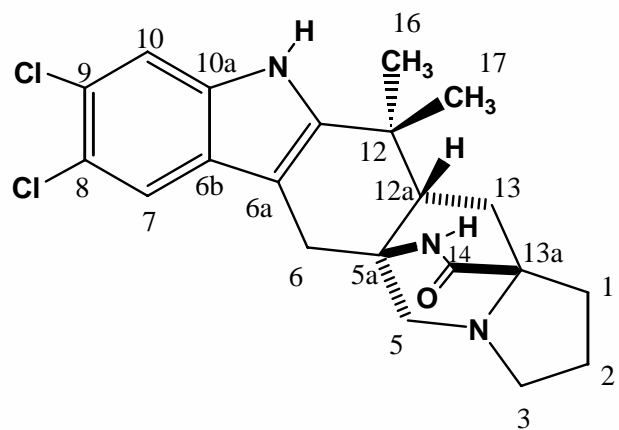
Espectro 14. Espectro de IR de la malbranqueamida.



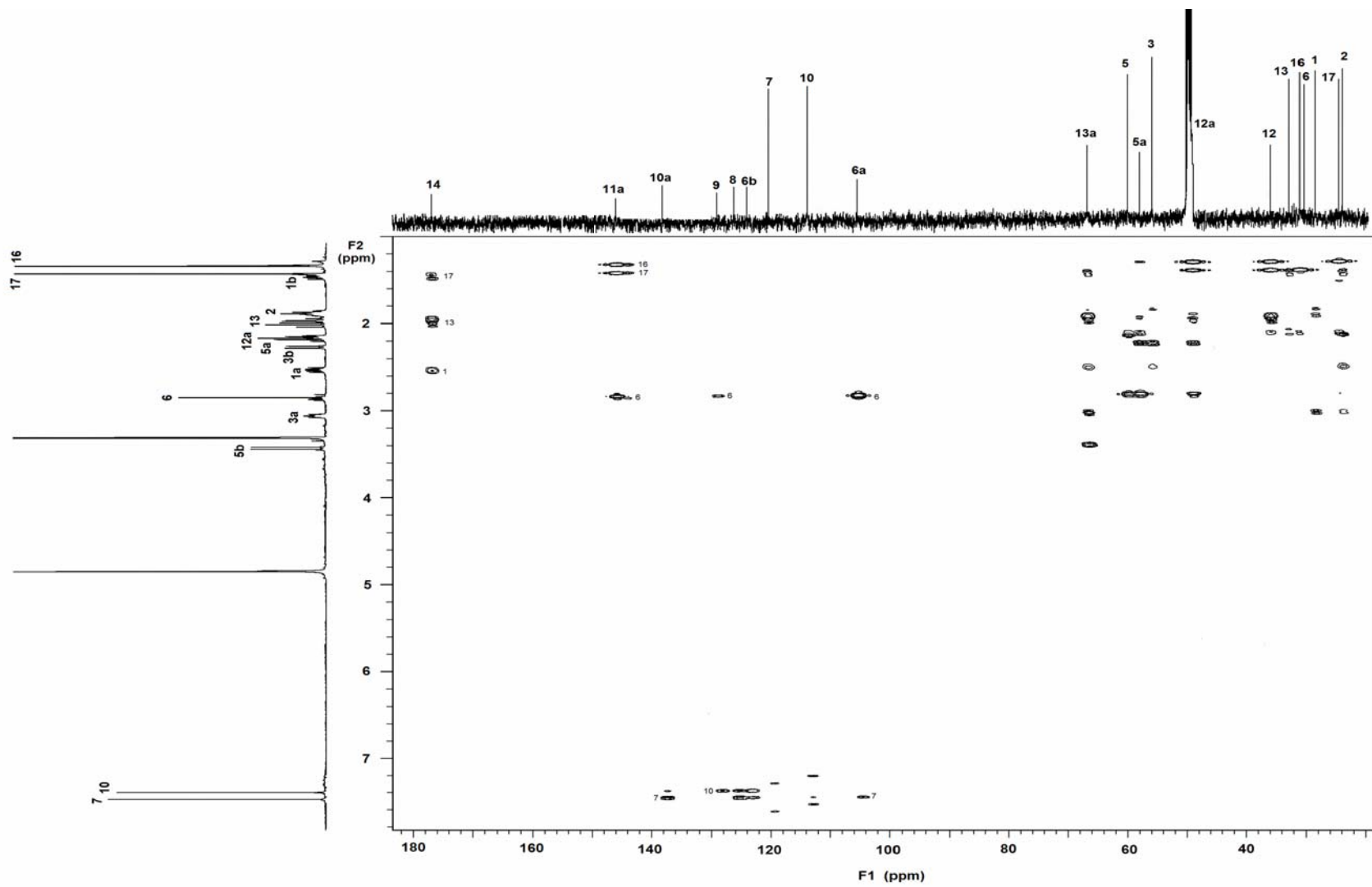
Espectro 15. Espectro de masas modalidad impacto electrónico de la malbranqueamida.



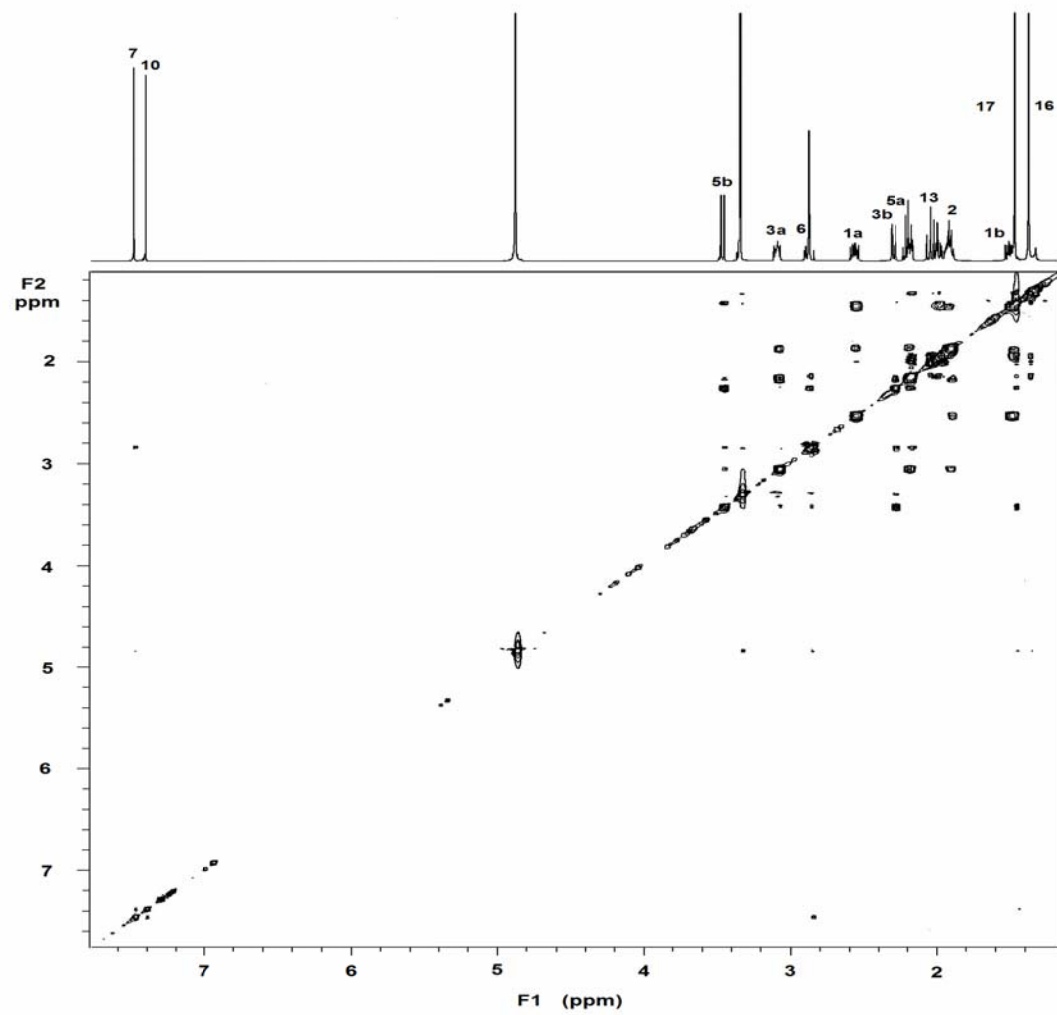
Espectro 16. Espectro de RMN-¹H de la malbranqueamida.



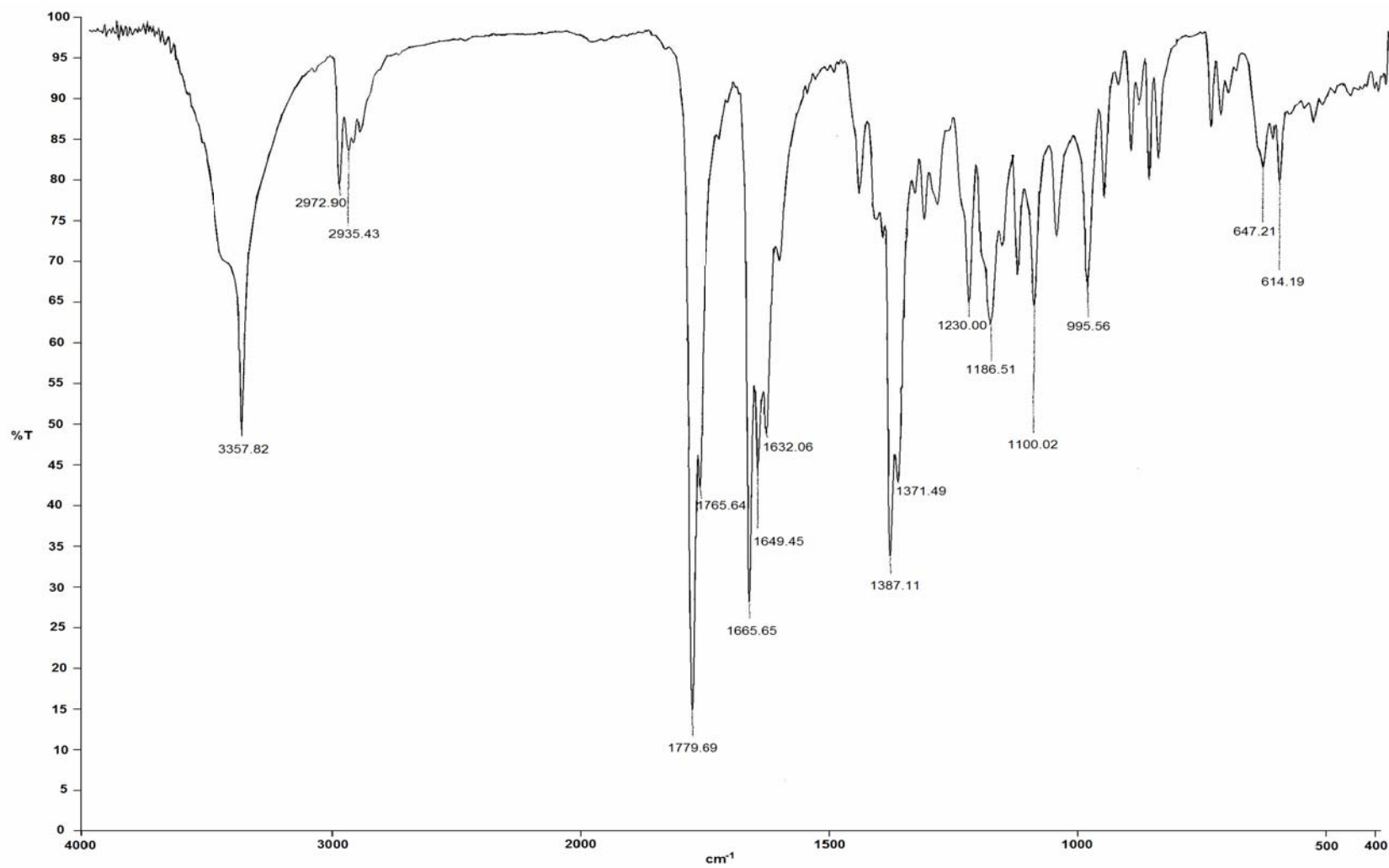
Espectro 17. Espectro de RMN-¹³C de la malbranqueamida.



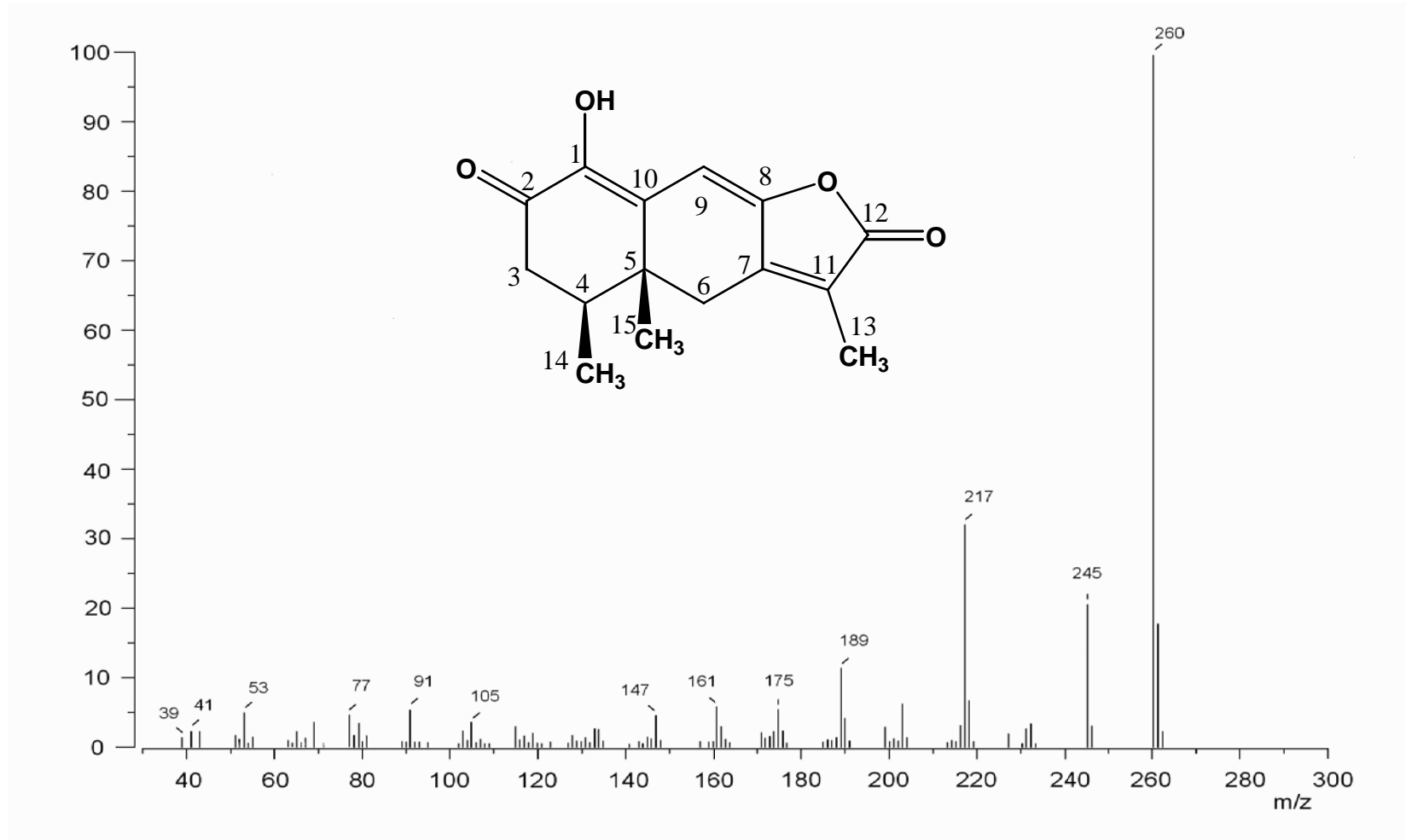
Espectro 18. Espectro bidimensional HMBC de la malbranqueamida.



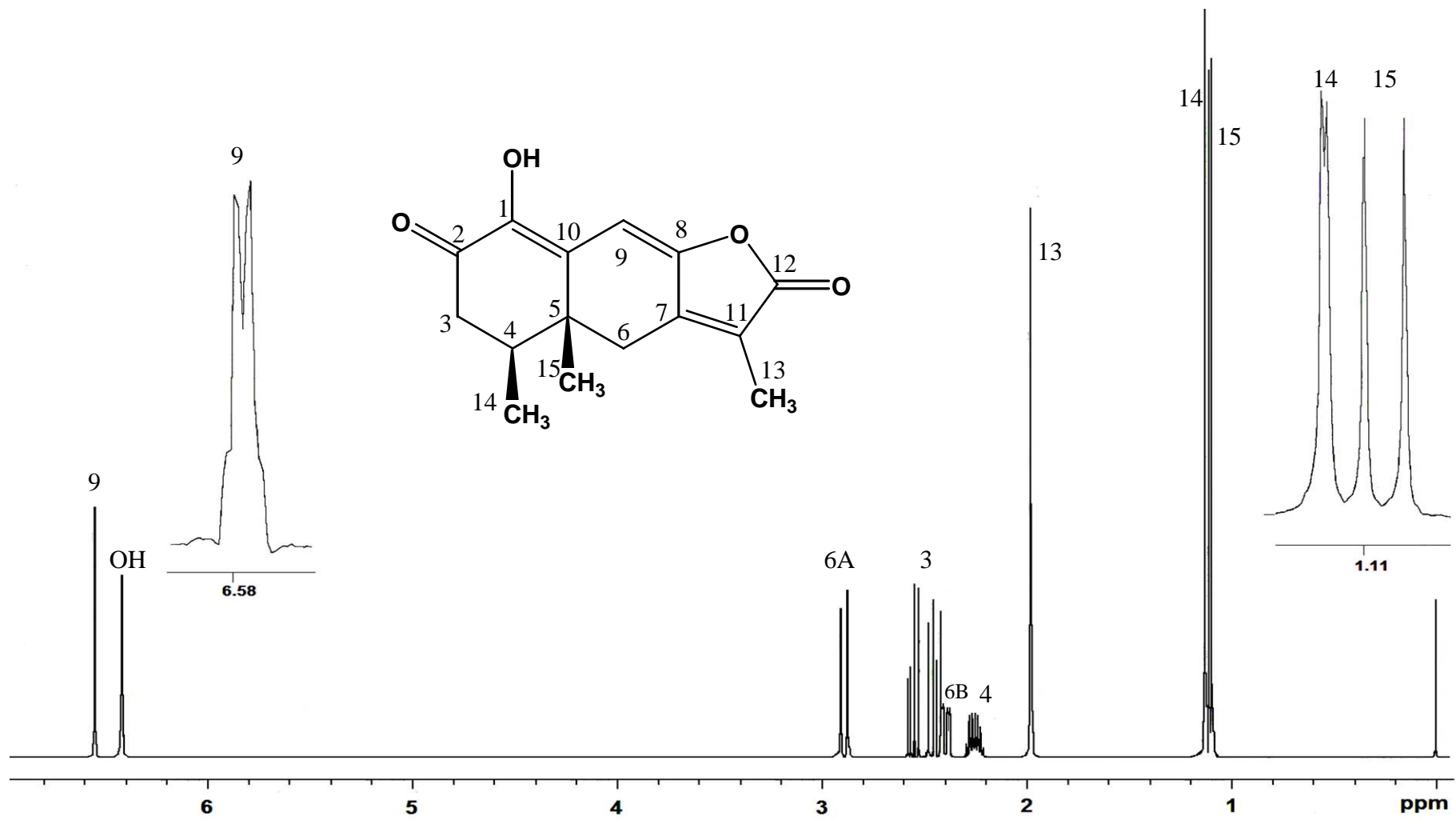
Espectro 19. Espectro bidimensional NOESY de la malbrancheamida.



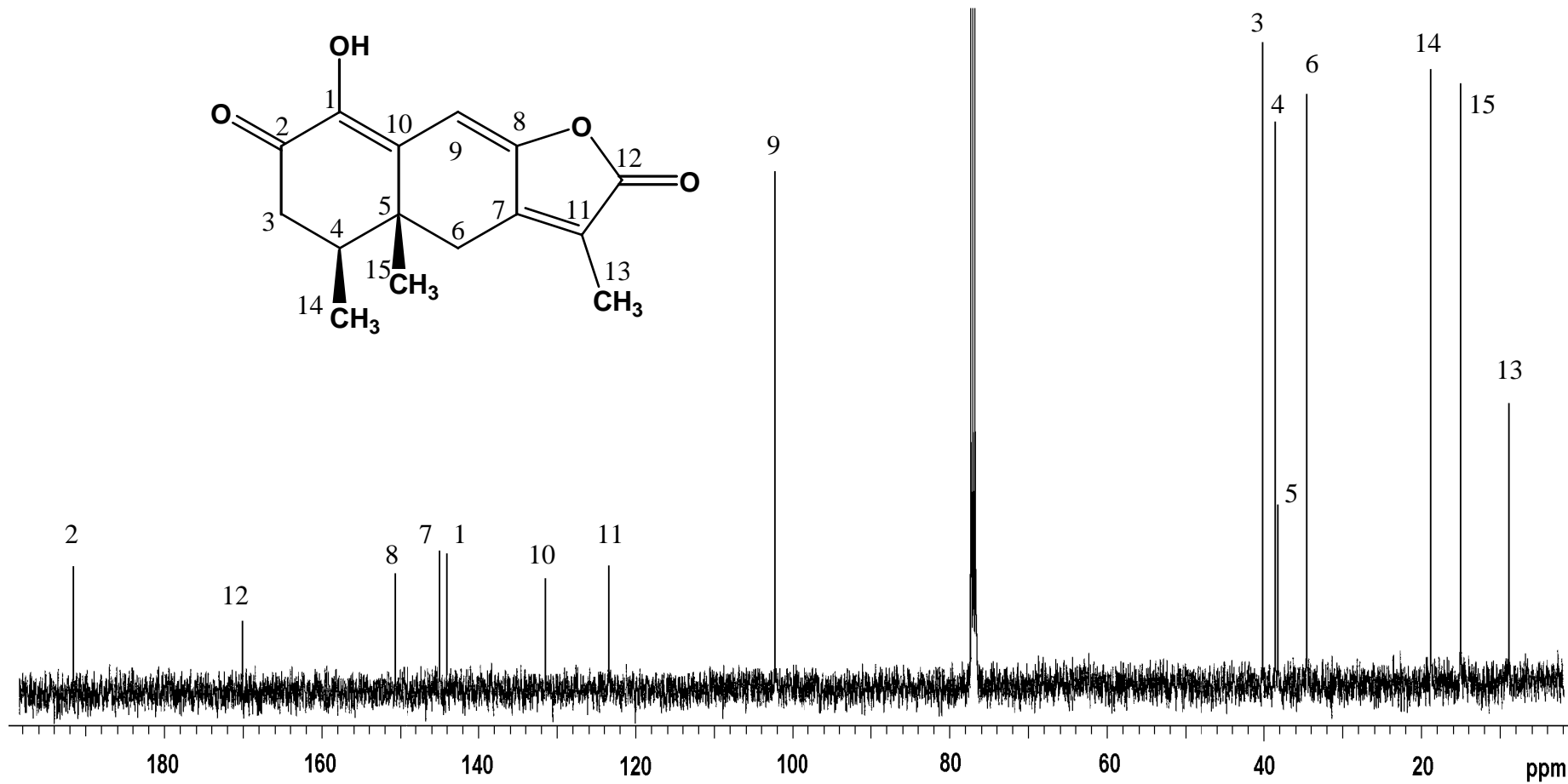
Espectro 20. Espectro de IR de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida.



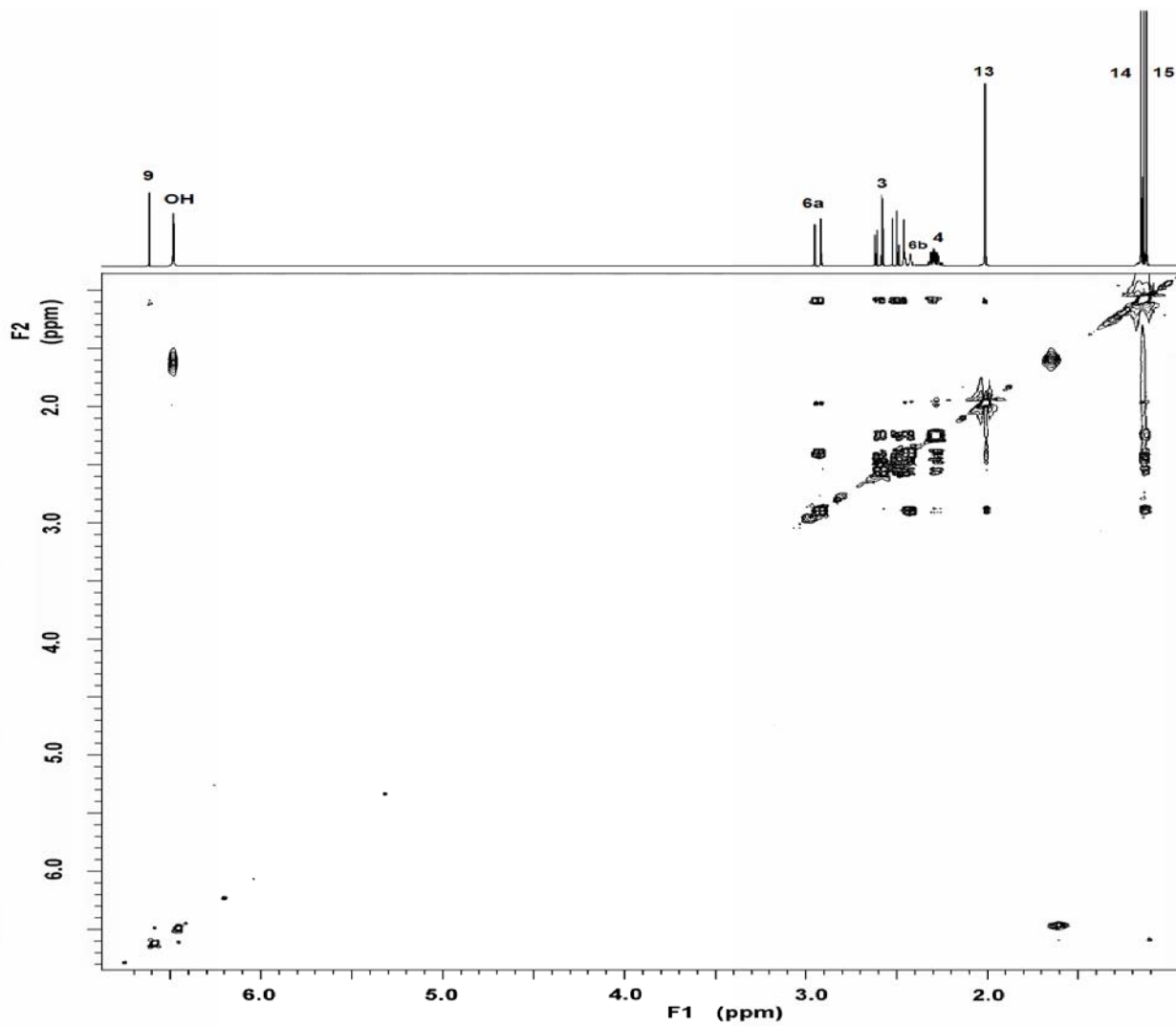
Espectro 21. Espectro de masas modalidad impacto electrónico de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida.



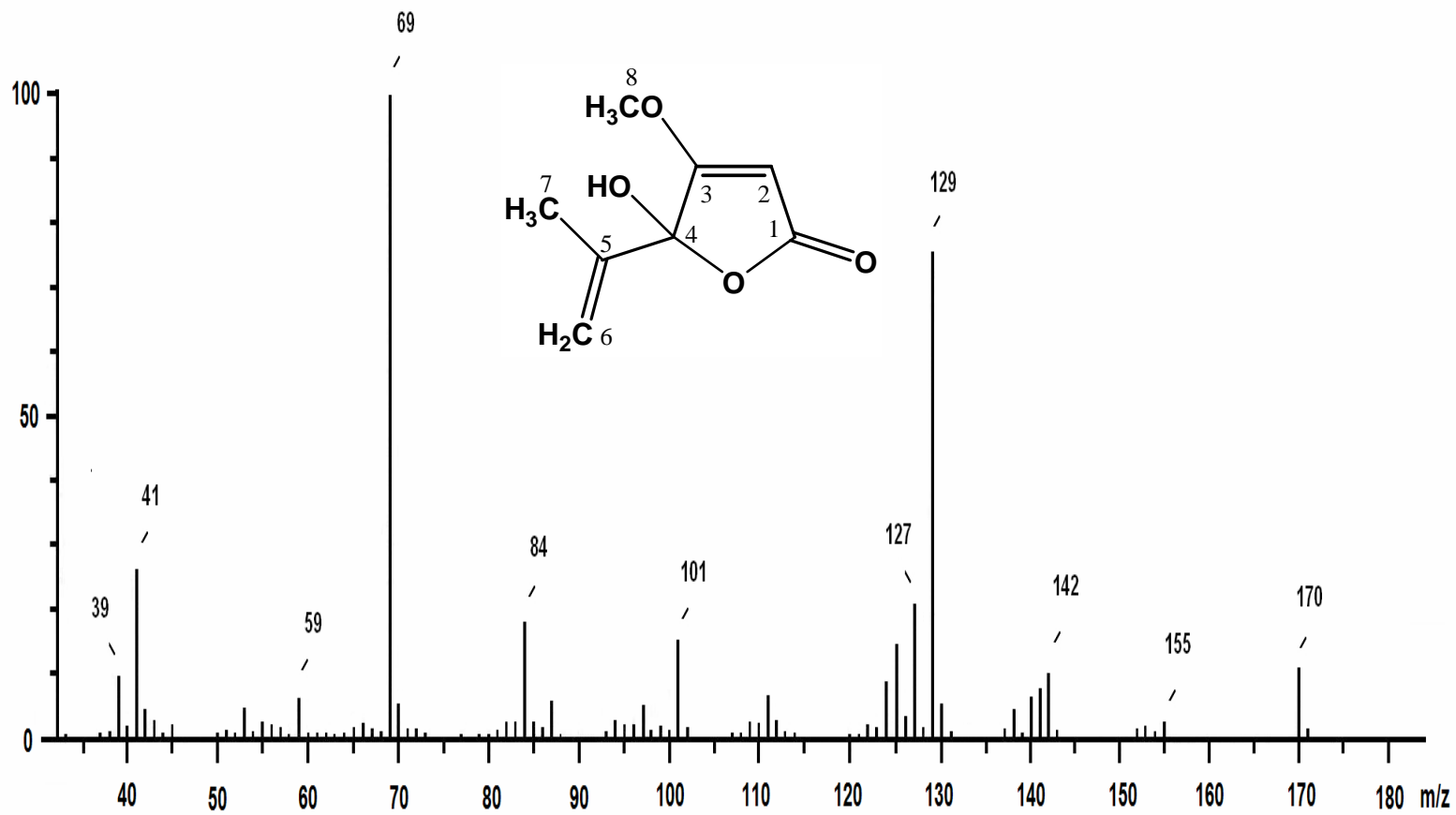
Espectro 22. Espectro de RMN-¹H de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida.



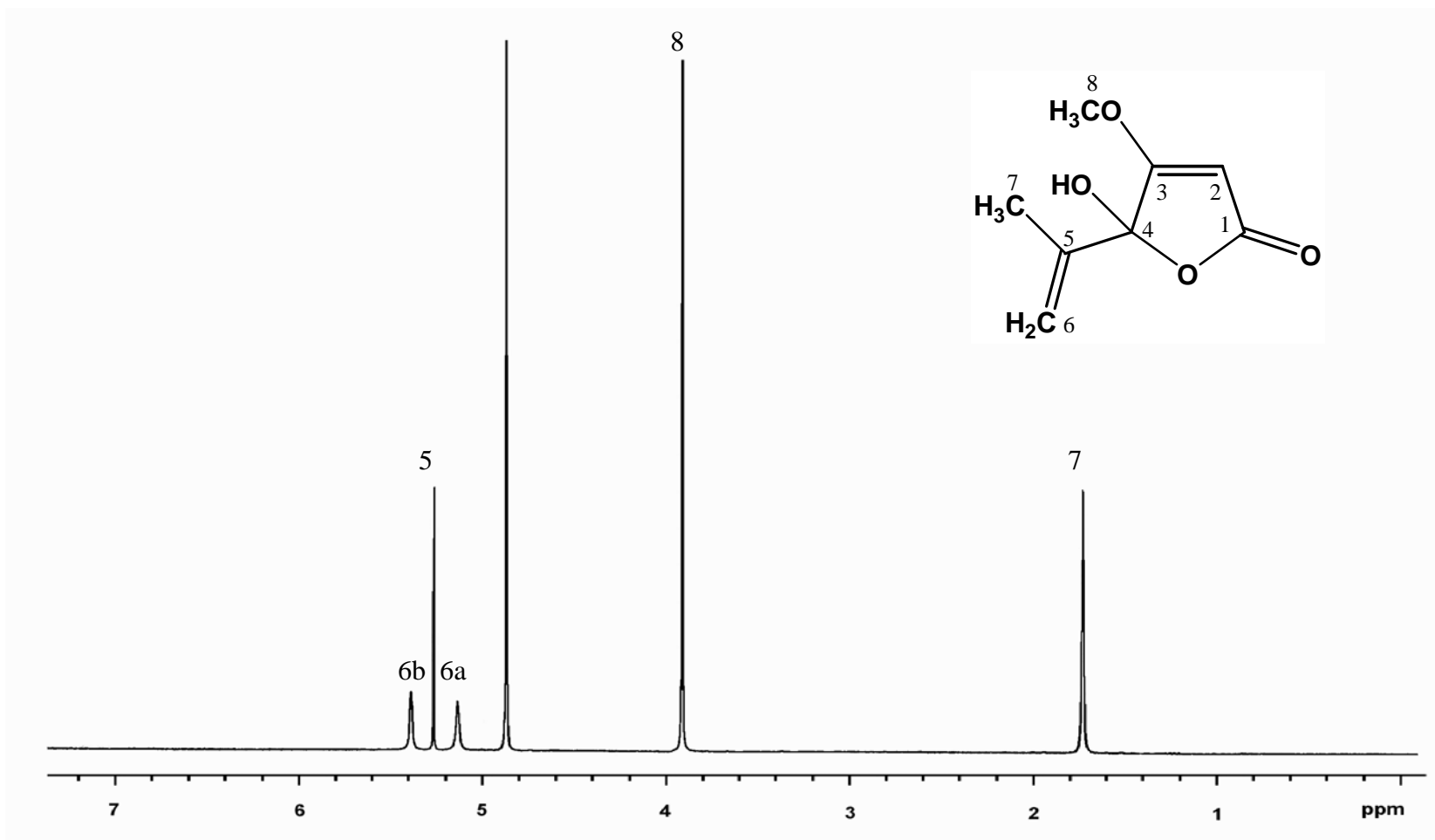
Espectro 23. Espectro de RMN-¹³C de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida.



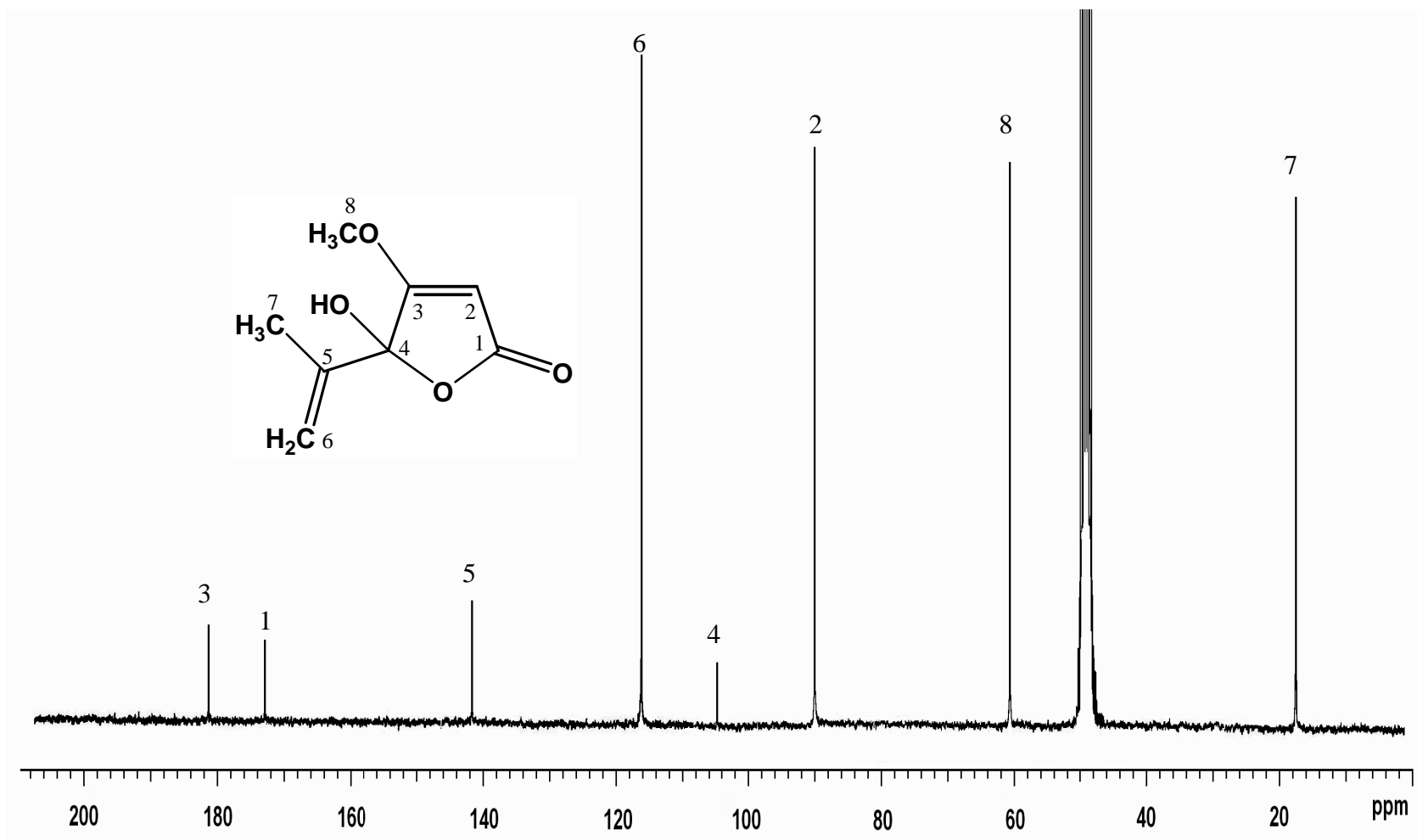
Espectro 24. Espectro bidimensional NOESY de la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida.



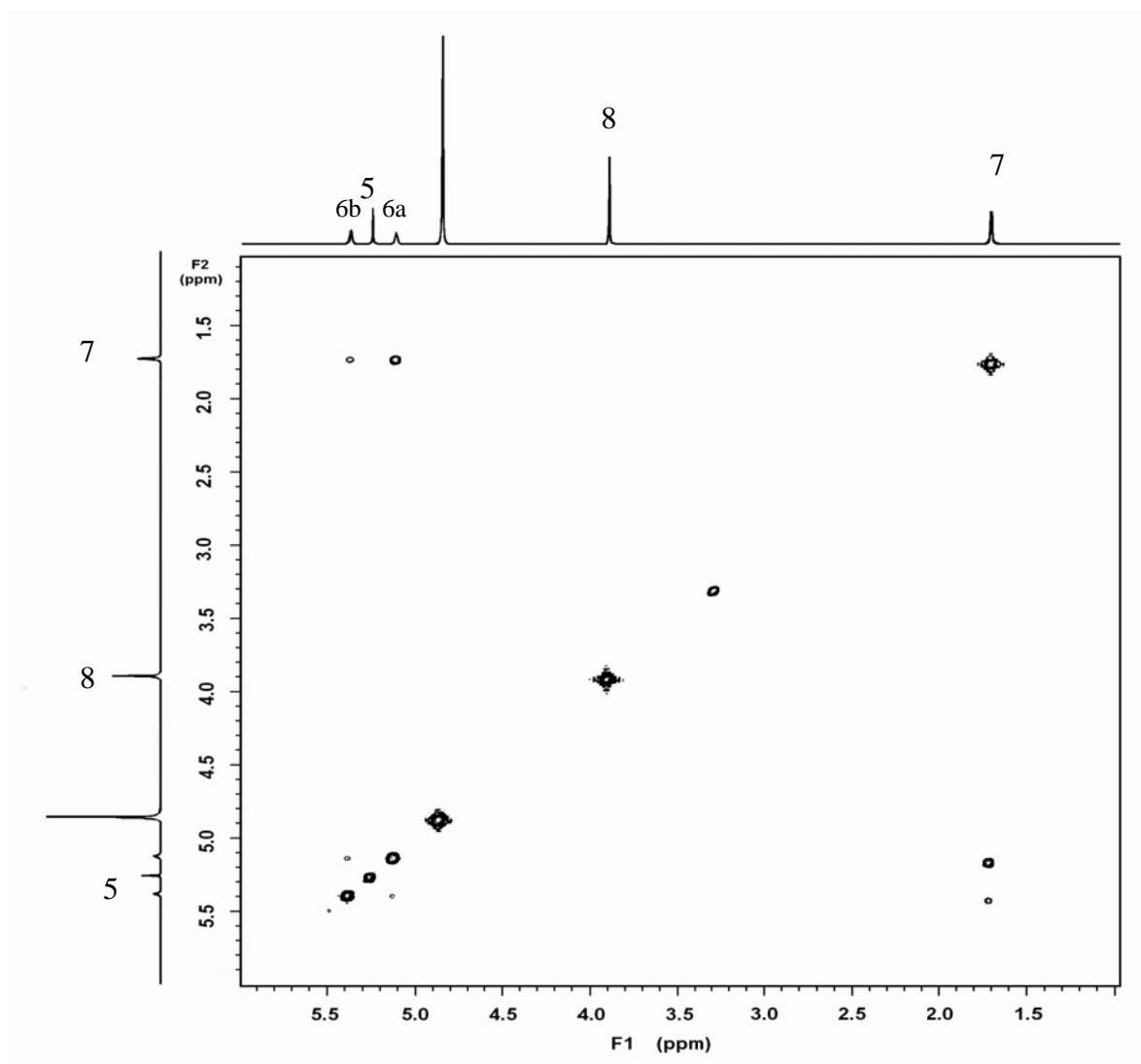
Espectro 25. Espectro de masas modalidad impacto electrónico del ácido penicílico.



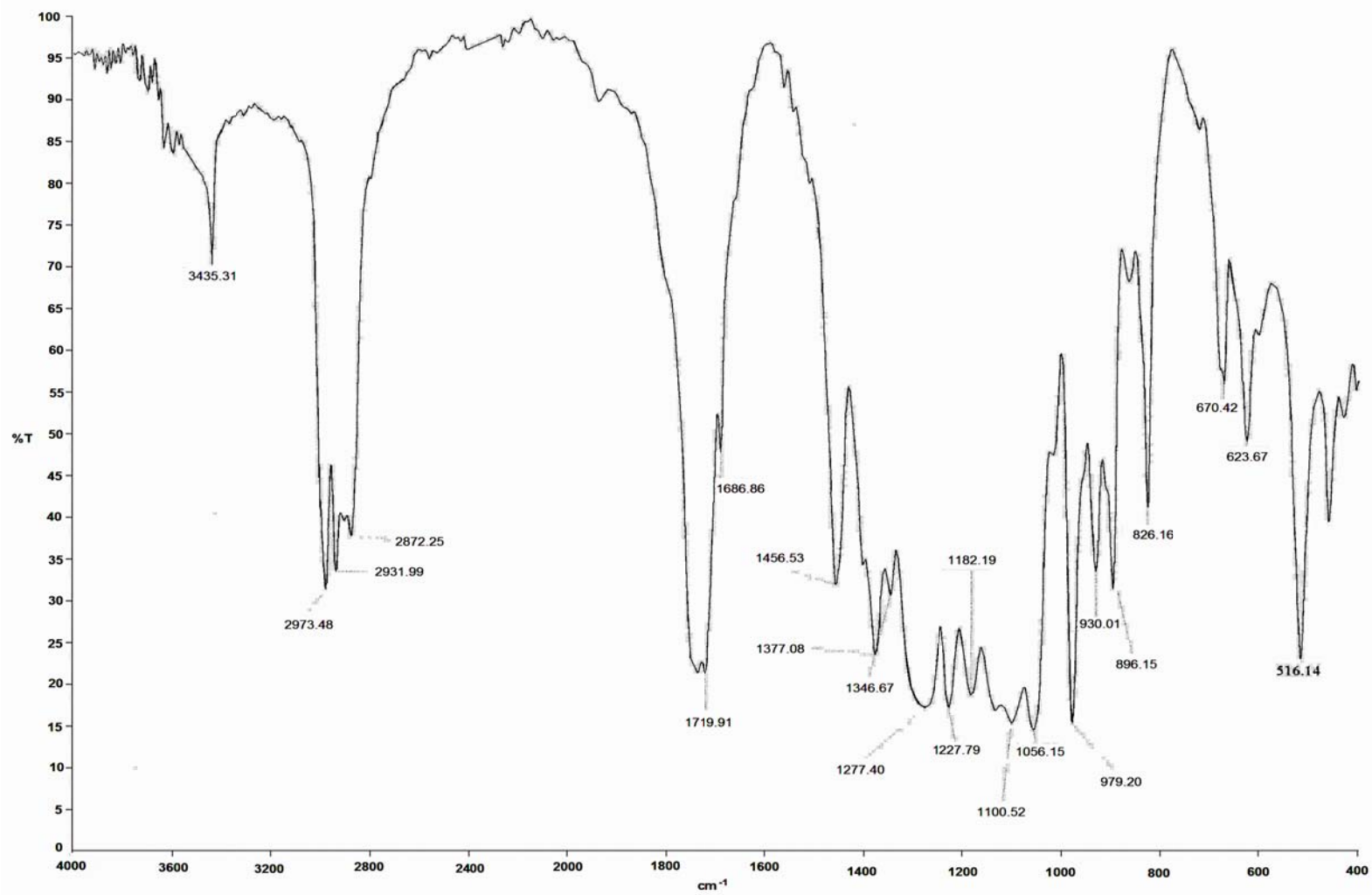
Espectro 26. Espectro de RMN- ^1H del ácido penicílico.



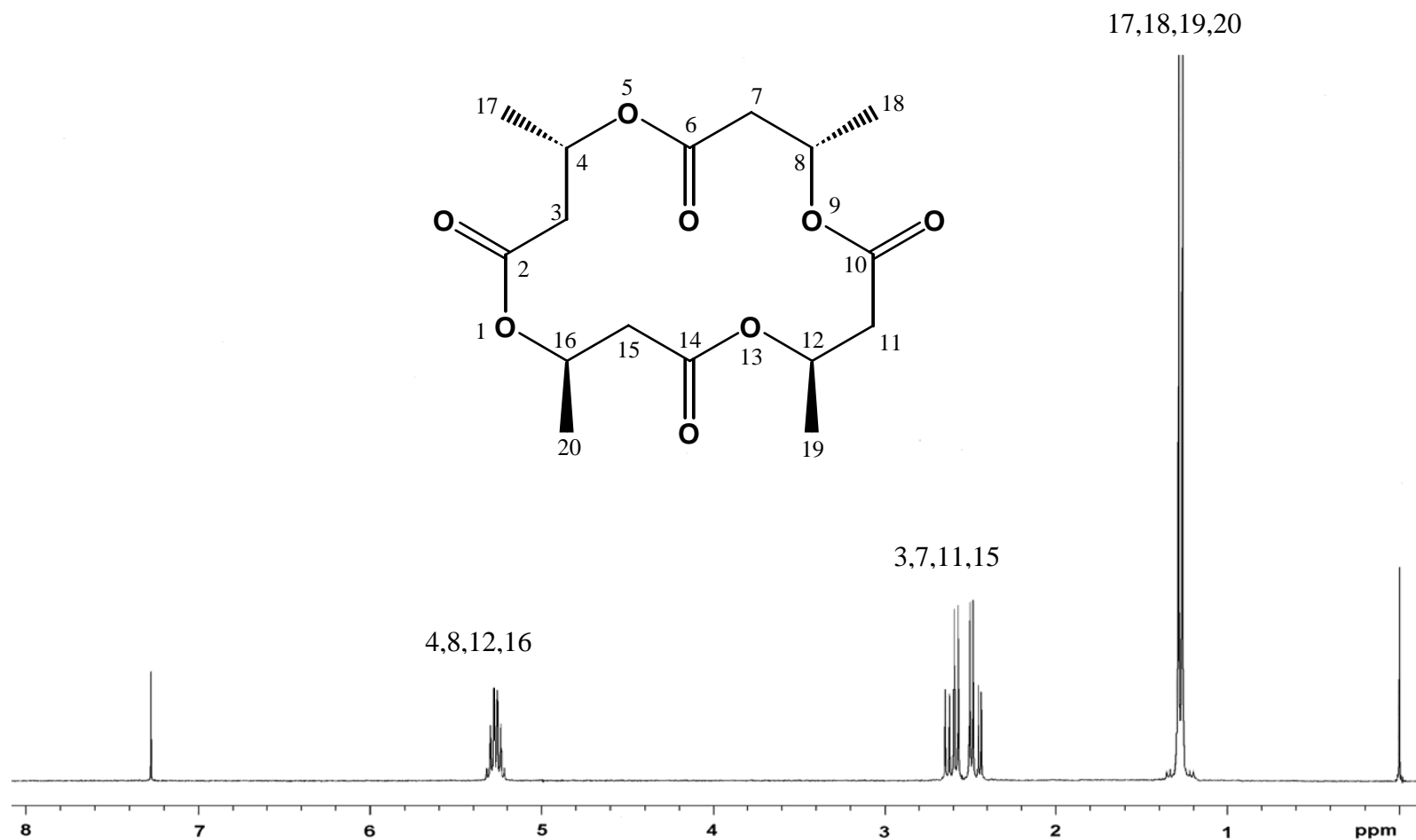
Espectro 27. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido penicílico.



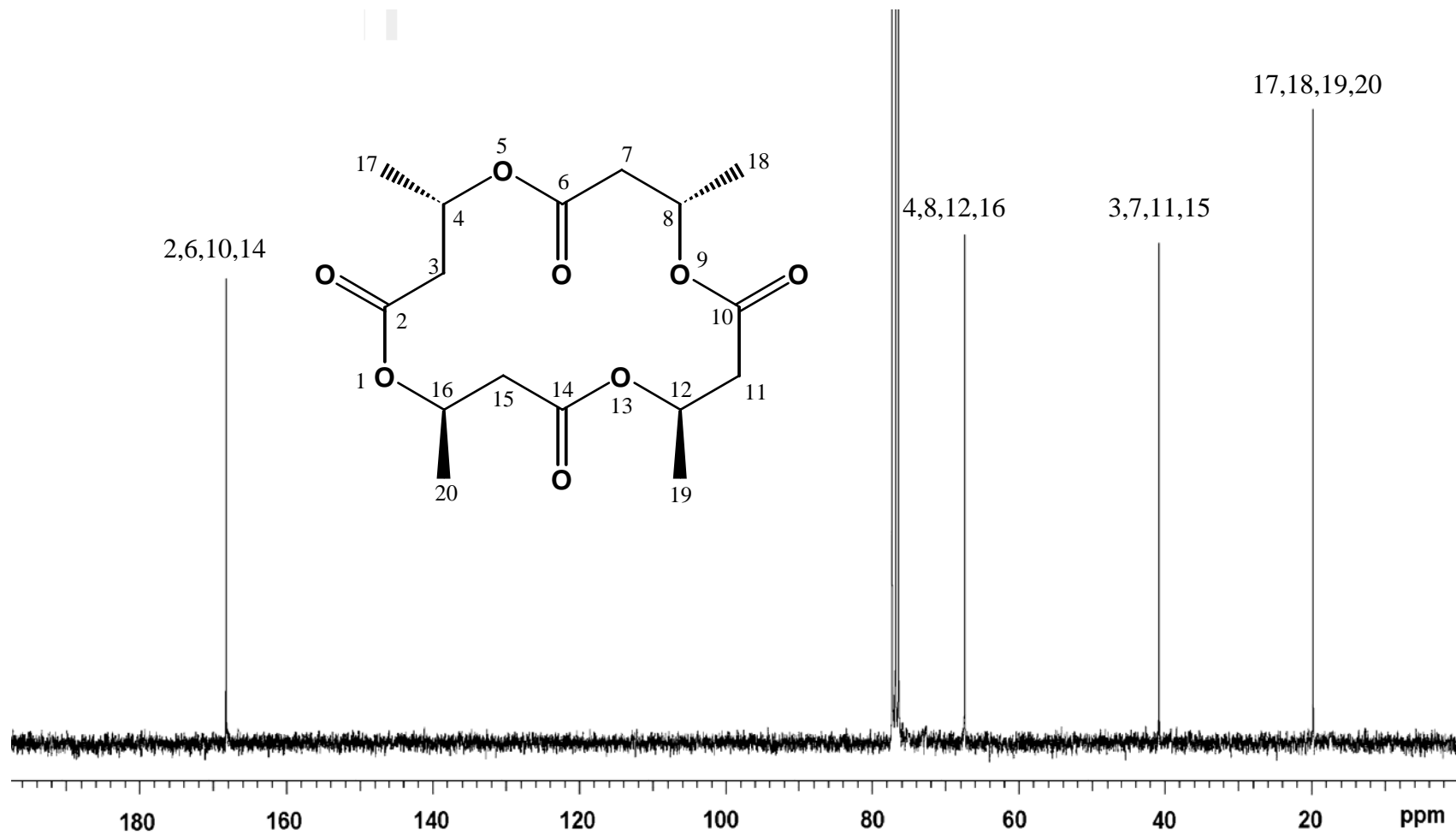
Espectro 28. Espectro bidimensional COSY del ácido penicílico.



Espectro 29. Espectro de IR de la mezcla de polímeros *aislada de N. mexicana*



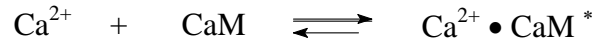
Espectro 30. Espectro de RMN-¹H de la 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.



Espectro 31. Espectro de RMN- ^{13}C de la 4,8,12,16-tetrametil-1,5,9,13-tetraoxaciclohexadecan-2,6,10,14-tetrona.

APENDICE 2
ESQUEMAS
SUPLEMENTARIOS

Mecanismo de activación de la PDE1 por la CaM.



Representación esquemática de la determinación del efecto de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de CaM.

