UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

15-Acetil hidrato de tajixantona, un nuevo metabolito secundario de *Emericella* 25379.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ

MÉXICO, D. F. **2009**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Química**, que a través de las experiencias con profesores y compañeros, me dieron la oportunidad de formarme como profesional. Gracias UNAM.

A la **Dra. Rachel Mata Essayag**, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por las valiosas enseñanzas que recibí en todo momento y por el apoyo otorgado en la realización del presente trabajo. Gracias.

Al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por el financiamiento otorgado a través del proyecto CONACyT-45814-Q.

Al SNI (Sistema Nacional de Investigadores), por el apoyo económico otorgado para la realización de esta tesis de licenciatura.

Al **M. en C. Mario Alberto Figueroa Saldívar**, por la paciencia mostrada durante la elaboración de este trabajo y por los sabios consejos brindados, tanto personales como académicos. Muchas gracias Mario, eres un ejemplo a seguir.

A la M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz, por los valiosos consejos aportados, para hacer que este trabajo se enriqueciera más y por el interés mostrado en la realización de este proyecto.

Al **Q. Gustavo Garduño Sánchez**, por brindarme su apoyo en todo momento, por enseñarme que la docencia es algo más que transmitir conocimientos y sobre todo por haberme enseñado el método más eficiente para adquirir conocimientos. Muchas gracias Profe, estoy en deuda con usted.

Al personal técnico de la USAI, Instituto de Química y BRUKER (UAM), por el registro de los espectros utilizados en este trabajo.

A los miembros del jurado, por las revisiones y observaciones hechas sobre el escrito, valiosas críticas que sirvieron para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio 124, Araceli, Krutzcaya, Martha, Viridiana, Lupita, Magda, Sol, Abraham, Fernando y Paquito, que gracias a la amistad brindada y a las experiencias compartidas, mi estancia en el laboratorio se hizo muy agradable. Muchas gracias chicos.

A mis compañeros y amigos de la Facultad, Gabo, Yaya, Baruch, Ara, Jazmin, Ernesto, **Karla**, Oscar, Claudia y Alejando, gracias por las aventuras vividas, por las experiencias compartidas y sobre todo por estar conmigo, en las buenas, en las malas y en las peores. Gracias por su valiosa amistad.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Cuadros	iii
Lista de Abreviaturas	v
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Uso de los herbicidas como medio de protección de los cultivos de importancia económica y sus principales inconvenientes.	1
1.2 Antecedentes sobre el género *Emericella*.	5
1.3 Antecedentes del hongo *Emericella* 25379.	9
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	12
3. PARTE EXPERIMENTAL	14
3.1 Material fúngico.	14
3.2 Fermentación de *Emericella* 25379.	14
3.3 Obtención del extracto orgánico a partir del micelio y medio de cultivo de *Emericella* 25379.	14
3.4 Procedimientos generales.	15
3.4.1 Análisis cromatográficos.	15
3.4.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	15
3.5 Estudio químico de *Emericella* 25379.	16
3.6 Aislamiento de la shamixantona (**1**) a partir de la fracción primaria F_4.	16
3.7 Aislamiento del hidrato de tajixantona (**4**) y 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**) a partir de la fracción primaria F_9.	17

ÍNDICE (Continuación)

Página

3.8 Ensayos biológicos. 17

3.8.1 Determinación del efecto fitotóxico del compuesto **6.** 17

3.8.2 Evaluación del efecto del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**) sobre la actividad de la enzima PDE1 dependiente de CaM. 17

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 19

4.1 Caracterización de la shamixantona (**1**) e hidrato de tajixantona (**4**). 19

4.2 Caracterización del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**). 20

4.3 Determinación del potencial fitotóxico del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**). 33

4.4 Determinación del efecto antagonista del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**) sobre la CaM. 34

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES 36

6. BIBLIOGRAFÍA 37

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Herbicidas de origen sintético utilizados en las prácticas agrícolas.	1
2	*Emericella* 25379.	10
3	Metabolitos aislados de *Emericella* 25379.	11
4	Espectro en el infrarrojo del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).	22
5	Espectro de masas del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).	23
6	Espectro de RMN-^{1}H del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6.**)	26
7	Espectro de RMN-^{13}C del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6.**)	27
8	Espectro bidimensional HSQC del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).	28
9	Correlaciones ^{1}H-^{1}H observadas en el espectro TOCSY del compuesto **6.**	29
10	Propuesta de biosíntesis para el 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Algunos herbicidas de origen sintético que han generado resistencia a su efecto en diversos tipos de malezas.	3
2	Situación actual de algunos herbicidas de origen sintético.	4
3	Moléculas fitotóxicas de origen natural utilizadas como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos herbicidas.	5
4	Compuestos biodinámicos aislados y caracterizados de diferentes especies del género *Emericella*.	6
5	Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto orgánico de *Emericella* 25379.	16
6	Metabolitos secundarios aislados de las fracciones F_4 y F_9 del extracto orgánico de *Emericella* 25379.	20

LISTA DE CUADROS (Continuación)

7	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **6.**	21
8	Datos de RMN-^{1}H de los compuestos shamixantona (**1**), hidrato de tajixantona (**4**) y 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).	30
9	Datos de RMN-^{13}C de los compuestos shamixantona (**1**), hidrato de tajixantona (**4**) y 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).	31
10	Correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto **6**.	32
11	Efecto de los compuestos **1**, **4**, **6** y **CPZ** sobre el complejo enzimático Ca^{2+}-CaM-PDE1.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
α_D^{20}	Actividad óptica específica
°C	Grados Celsius
RMN-^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN-^{1}H	Resonancia magnética nuclear protónica
2,4,5-T	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
4,6-D-*o*-C	Ácido 4,6-dinitro-*o*-cresol
AcOEt	Acetato de etilo
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
sa	Singulete ancho
ASB	Albúmica sérica bovina
CaM	Calmodulina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CH_2Cl_2	Diclorometano
CI_{50}	Concentración inhibitoria media
CPZ	Clorpromazina
d	Doblete
dd	Doble de dobles
EE	Error estándar
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuación)

Abreviatura	**Significado**
CoA	Acetil coenzima A
eV	Electronvolts
g	Gramos
g/mol	Gramos por mol
Hex	Hexano
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
L	Litros
m/z	Relación masa/carga
M^+	Ión molecular
MCPA	Ácido 2-metil-4-fenoxiacético
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
p.f	Punto de fusión
PDE1	Fosfodiesterasa dependiente de calmodulina.

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuación)

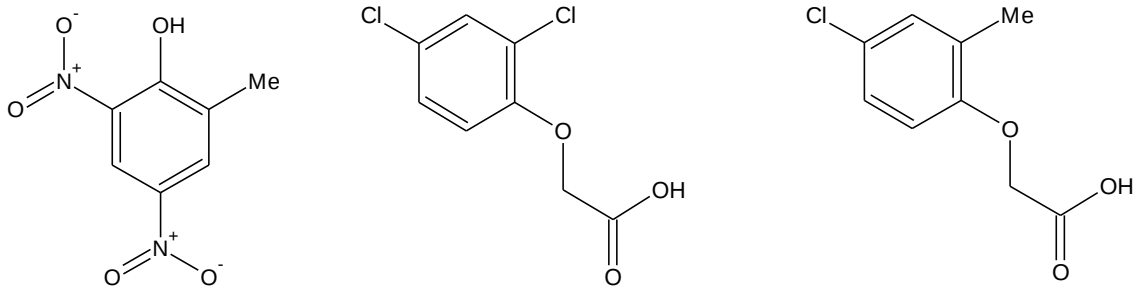
Abreviatura	**Significado**
ppm	Partes por millón
s	Singulete
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Espectroscopía de correlación total
δ	Desplazamiento químico
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
Pi	Fosfato inorgánico
UV	Ultravioleta

1. ANTECEDENTES

1.1 Uso de los herbicidas como medio de protección de los cultivos de importancia económica y sus principales inconvenientes.

La agricultura ha enfrentado muchos problemas a lo largo de su historia, destacándose, los provocados por las plantas que crecen de manera indeseable en campos o jardines y que interfieren con el crecimiento y calidad de los cultivos. Estas plantas se denominan “malezas” y provocan grandes pérdidas en los cultivos de importancia económica, problemas de salud humana y hasta pueden provocar grandes incendios. Asimismo, sirven como refugio de algunos insectos y otros organismos patógenos (Singh *et al.,* 2003).

Para el control de las malezas se han utilizado diversas técnicas que incluyen las de tipo manual (rotación de cultivos, policultura, anegación, entre otras) y el empleo de herbicidas. Desde el descubrimiento del 4,6-dinitro-*o*-cresol y de los ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA; **Figura 1**), en el siglo pasado, el uso de éstos agentes se ha incrementado de manera importante, ya que con su aplicación la producción de cultivos ha sido más abundante y redituable (Singh *et al.,* 2003).



4,6-dinitro-*o*-cresol **2,4-D** **MCPA**

Figura 1. Primeros herbicidas de origen sintético utilizados en las prácticas agrícolas.

Sin embargo, el manejo inadecuado de los agentes herbicidas sintéticos ha ocasionado el desarrollo de malezas resistentes, con el consecuente incremento en los costos de producción de los cultivos relevantes para la alimentación humana (Singh *et al.,* 2003).

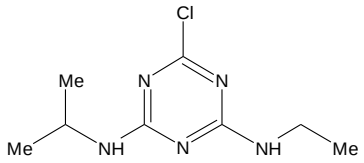
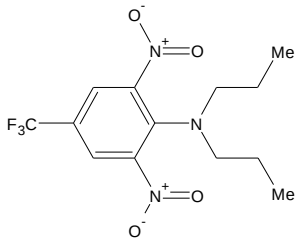
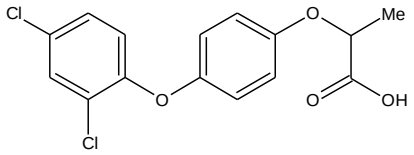
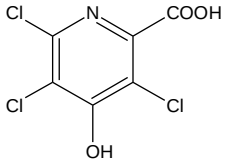
La resistencia de las malas hierbas a la acción de los agentes herbicidas se define como su habilidad para sobrevivir a la aplicación de éstos a concentraciones que normalmente les son letales. Se estima que hoy en día existen más de 300 biotipos de malas hierbas resistentes a los herbicidas de mayor uso (**Cuadro 1**). Los mecanismos de resistencia de las malezas se clasifican en dos tipos: los de exclusión y aquellos conferidos por el sitio de acción (Dekker y Duke, 1995). Los primeros son una consecuencia de la absorción, eliminación o metabolismo del herbicida. Así, algunos biotipos resistentes de malezas producen exceso de ceras y reducen el área foliar, impidiendo la absorción de los herbicidas. En otras especies, las moléculas del herbicida son retenidas en diferentes estructuras celulares especializadas como las glándulas ricas en lípidos. Otro mecanismo de exclusión implica la modificación molecular de los agentes herbicidas vía reacciones de reducción, oxidación y/o conjugación con moléculas hidrofílicas como el glutatión (Dekker y Duke, 1995; Stegink y Vaughn, 1988). El segundo tipo de resistencia se debe a cambios específicos a nivel molecular, ya sea por la disminución de las interacciones entre las proteínas blanco y las moléculas de los herbicidas, o bien por la sobrexpresión del sitio de acción y la consecuente necesidad de aplicar una mayor cantidad del herbicida para lograr el efecto deseado (Eberlein *et al*., 1999).

Una estrategia exitosa para evitar el desarrollo de resistencia en las malezas consiste en aplicar dos o más herbicidas con blancos de acción diferentes. Esta técnica es eficiente cuando uno de los sitios de acción es el responsable de la resistencia (Heap *et al*., 2006).

Además de los problemas de resistencia antes mencionados, los herbicidas de uso común han provocado graves perturbaciones toxicológicas en el ser humano (carcinogénesis, teratogénesis, mutagénesis, problemas reproductivos o endócrinos, etc.), animales y problemas ambientales debido a sus altos índices de acumulación. Por estas razónes, el uso de algunos herbicidas está sujeto a restricciones o ha sido prohibido por completo. En el **Cuadro 2** se

muestran algunos ejemplos selectos de herbicidas de uso restringido o que han sido retirados del mercado en México (DFO, 1991).

Cuadro 1. Algunos herbicidas de origen sintético que han generado resistencia a su efecto en diversos tipos de malezas.

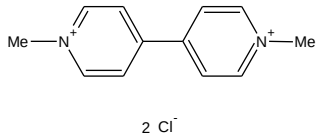
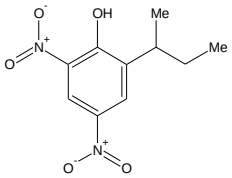
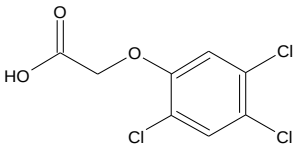
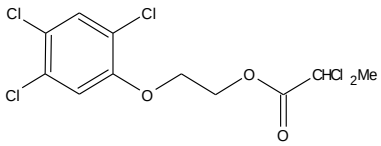
Molécula	Nombre	Año de introducción/Año de reporte de resistencia
	**atrazina**	1958/1968 (Le Baron, 1991)
	**trifluralin**	1963/1973 (Le Baron, 1991)
	**diocloflop**	1977/1982 (Le Baron, 1991)
	**picloram**	1963/1988 (Le Baron, 1991)

El afán por erradicar las prácticas agrícolas tradicionales y los problemas ocasionados por los herbicidas de origen sintético ha motivado la búsqueda de nuevas tácticas para el control de las malezas. Actualmente, se siguen cuatro estrategias generales para el descubrimiento de nuevos herbicidas:

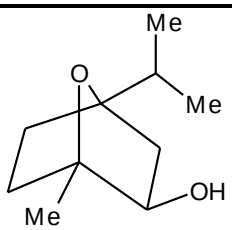
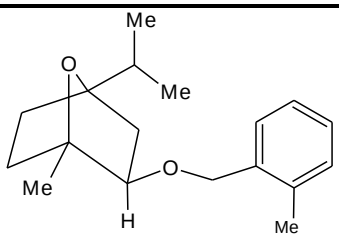
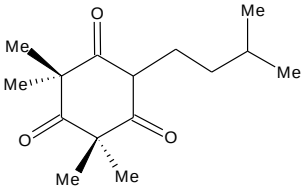
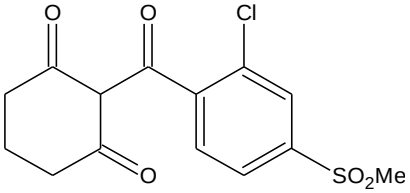
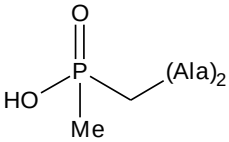
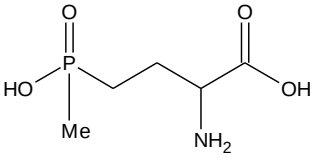
1. Síntesis de nuevos productos,
2. Optimización molecular de agentes herbicidas conocidos,
3. Diseño biorracional mediante el estudio de las interacciones planta-planta y/o planta-microorganismo y,
4. Obtención de nuevos productos a partir de fuentes naturales diversas.

Cabe destacar que el desarrollo de las técnicas analíticas de separación y caracterización de productos químicos, así como de la biotecnología, han contribuido de manera importante a la búsqueda de nuevos productos naturales útiles para el desarrollo de moléculas con potencial fitotóxico. Los herbicidas de origen natural presentan algunas ventajas sobre los de origen sintético ya que son biodegradables, tienen índices de acumulación bajos y sus sitios de acción son a menudo más específicos (Duke *et al.,* 2002). En el **Cuadro 3** se muestran algunos ejemplos selectos de fitotoxinas de origen natural obtenidos de plantas y/o microorganismos que han servido como prototipo para el desarrollo de agentes herbicidas (Macias *et al*., 2008).

Cuadro 2. Situación actual de algunos herbicidas de origen sintético.

Molécula	Nombre	Situación
	**paraquat**	restringido (DOF, 1991)
	**dinoseb**	prohibido (DOF, 1991)
	**2,4,5-T**	prohibido (DOF, 1991)
	**erbón**	prohibido (DOF, 1991)

Cuadro 3. Moléculas fitotóxicas de origen natural utilizadas como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos herbicidas.

Origen	Género	Molécula prototipo	Molécula comercial
Vegetal	*Eucalyptus*	 **1,8-cineol**	 **cinmetilina**
	Callistemon	 **leptospermona**	 **sulcotriona**
Microbiano	*Streptomyces*	 **bialafos**	 **fosfinotricina**

1.2 Antecedentes sobre el género *Emericella.*

El género *Emericella* representa el estado de reproducción sexual de *Aspergillus*; sus especies presentan una tasa de crecimiento rápida, el color de sus colonias es variable (verde, amarillo, gris o purpura) y la textura es generalmente, aterciopelada. La mayoría de las especies de éste género se reproducen con gran facilidad en regiones tropicales y subtropicales; algunas se han aislado del suelo, otras de plantas (hongos endofíticos) y un grupo más reducido de ambientes marinos.

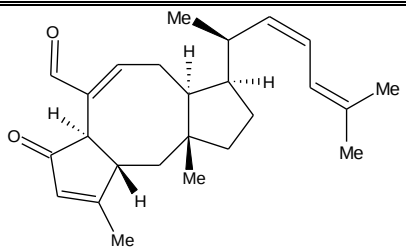
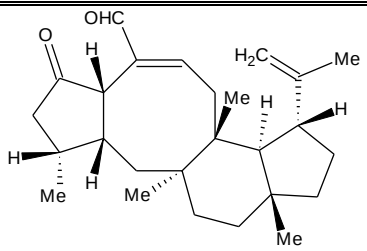
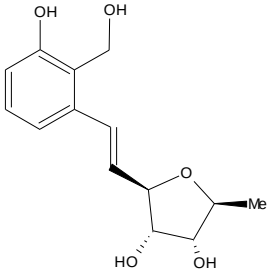
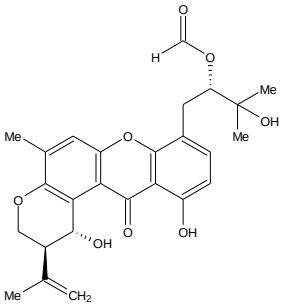
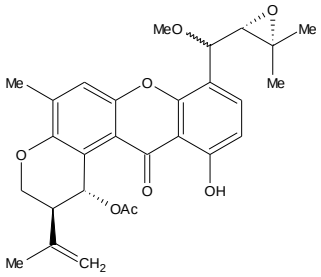
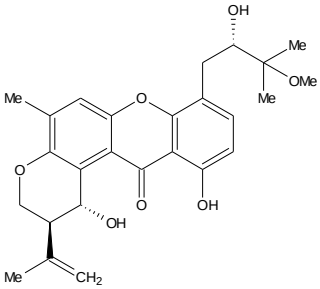
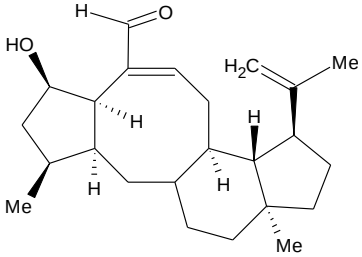
Emericella incluye varias especies de considerable interés económico ya que algunas producen penicilina, aflatoxinas o una gran variedad de metabolitos bioactivos estructuralmente interesantes y novedosos (**Cuadro 4**; Frisvad *et al*., 2004). Algunos ejemplos son los péptidos de

Emericella rugulosa; los policétidos prenilados de *Emericella nidulans*; los sesterpenoides con esqueletos policíclicos inusuales; así como quinonas y xantonas preniladas obtenidas de *Emericella variecolor*; los alcaloides indolditerpenoides de *Emericella striata* y *Emericella purpurea*, entre otros (**Cuadro 4**).

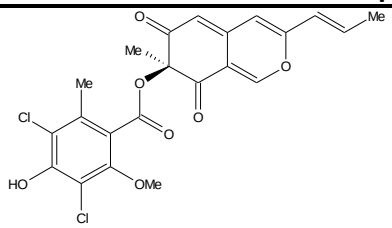
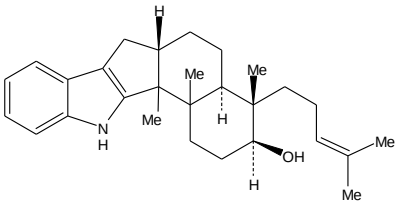
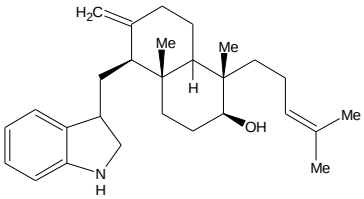
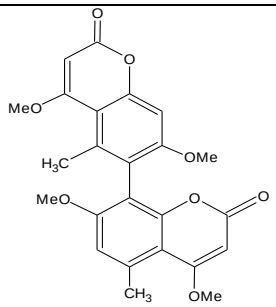
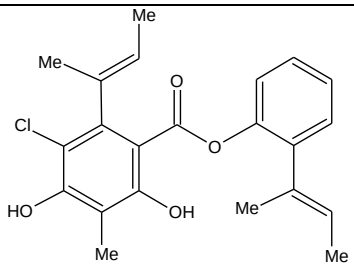
Cuadro 4. Compuestos biodinámicos aislados y caracterizados de diferentes especies del género *Emericella.*

Especie	Compuestos
E. rugulosa	**ciclo-(L-isoleucina-L-prolina)** (Trigos *et al.*, 2005)
E. nidulans	**agurosina G** (Kralj *et al.*, 2006) **agurosina H** (Kralj *et al.*, 2006)
E. quadrilineata	**EQ-6** **(4*S*,4a*R*,9a*R*)-4a-carbometoxi-1,4,4a,9a-tetrahidro-4,8- dihidroxi-6-metilxantona** **9-hidroximicroperfuranona** (Haruhiru *et al.*, 2005)

Cuadro 4. Compuestos biodinámicos aislados y caracterizados de diferentes especies del género *Emericella* (continuación).

Especie	Compuestos
E. variecolor	  **6-epi-ofiobolina G** (Wei *et al.*, 2004) **variecolina** (Otto *et al.*, 1991)   **varitriol** **varixantona** (Malmstrom *et al.*, 2002)   **14-metoxitajixantona-25-acetato** **tajixantona metanoato** (Surachai *et al.*, 2005)
E. aurantiobrunnea	 **emerecolina A** (Yoganathan *et al.*, 2004)

Cuadro 4. Compuestos biodinámicos aislados y caracterizados de diferentes especies del género *Emericella* (continuación).

Especie	Compuestos
E. falconensis	 **azopilona** (Itabashi *et al.*, 1993)  **emindol SB** (Nozawa *et al.*, 1988)
E. striata	 **emindol SA** (Nozawa *et al.*, 1988)
E. desertorum	 **desertorina C** (Nozawa *et al.*, 1987)
E. unguis	 **guisinol** (Nielsen *et al.*, 1999)

Cuadro 4. Compuestos biodinámicos aislados y caracterizados de diferentes especies del género *Emericella* (continuación).

Especie	Compuestos
E. purpurea	**emindol PA** **emindol PC** (Tomoo *et al.*, 2006)
E. venezuelensis	**aflatoxina B_1** **esterigmatocistina** (Frisvad *et al.*, 2004)

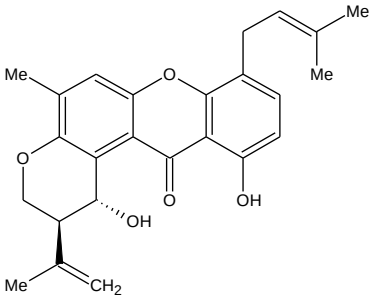
1.3 Antecedentes del hongo *Emericella* 25379.

El hongo *Emericella* 25379 (**Figura 2**), se aisló de un coral obtenido en las islas Marietas, Nayarit, México y fue recientemente investigado por Figueroa y colaboradores (2008), como parte de un programa encaminado al descubrimiento de nuevos compuestos de origen fúngico con potencial fitotóxico. Esta investigación permitió aislar y caracterizar cinco xantonas (**1**-**5**; **Figura 3**).

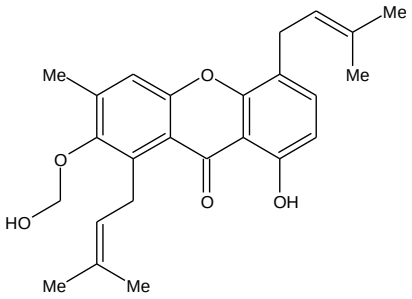
Los metabolitos **1**-**5** inhiben la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y las propiedades moduladoras de la proteína calmodulina (CaM). Este último hallazgo es relevante debido a que la CaM es una proteína reguladora dependiente de Ca^{2+} que modula numerosos eventos celulares por interacción con un gran número de enzimas blanco, ya sea en plantas o animales. Las proteínas y canales iónicos regulados por la CaM incluyen varias cinasas, fosfodiesterasas, fosfatasas, canales de calcio dependientes de voltaje y receptores de trifosfato de inositol (IP_3). Las interacciones Ca^{2+}-CaM-proteína blanco están involucradas en un gran número de procesos celulares, entre los que destacan, la regulación del metabolismo de lípidos, procesos de división y proliferación celular, entre otros (Toutenhoofd y Strehler, 2000).

Figura 2. *Emericella* 25379.

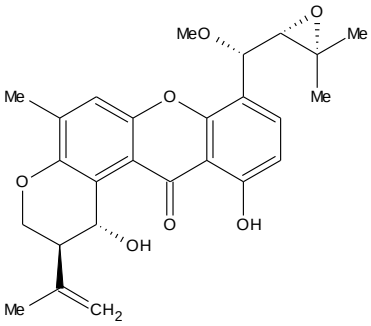
Estudios recientes han demostrado que algunos compuestos que inhiben las propiedades moduladoras de la CaM presentan actividad herbicida; esto puede ser debido a que a que dicha proteína regula algunos procesos involucrados en el crecimiento vegetal (Pérez-Vásquez *et al.,* 2008).



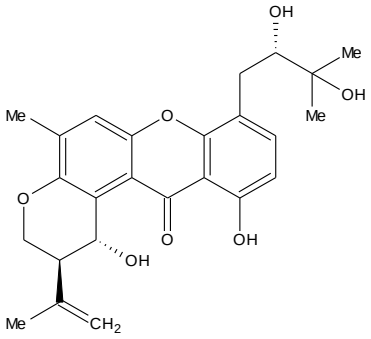
shamixantona (1)



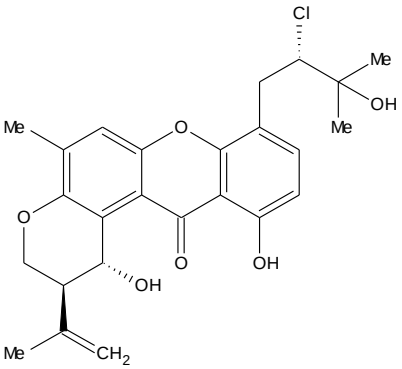
emericellina (2)



14-metoxi tajixantona (3)



hidrato de tajixantona (4)



hidrato de 15-clorotajixantona (5)

Figura 3. Metabolitos aislados de la especie fúngica *Emericella* 25379.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO

La agricultura es una actividad indispensable para satisfacer las necesidades alimenticias de la creciente población mundial, razón por la que ésta actividad ha evolucionado significativamente y hoy en día constituye una de las industrias más relevantes a nivel mundial. Sin embargo, la agricultura altamente industrializada ha causado severos problemas ambientales. Por otro lado, esta actividad enfrenta distintos problemas como la proliferación de malas hierbas, la aparición de biotipos de malezas resistentes a los herbicidas de uso común, la contaminación de ríos y lagos por elementos presentes en fertilizantes y agentes biocidas, la transformación de ecosistemas naturales, la erosión de terrenos, entre otros (Sing *et al.,* 2003). Estos problemas han ocasionado el agotamiento de suelos cultivables, haciendo evidente la búsqueda de nuevas técnicas efectivas para mejorar la producción agrícola. De la misma manera se deben buscar alternativas para disminuir el impacto ambiental negativo que ha tenido sobre la agricultura el uso indiscriminado de agentes herbicidas.

Debido a los problemas ocasionados por el uso de herbicidas de origen sintético, la industria agroquímica ha mostrado un renovado interés en la búsqueda de nuevos agentes con potencial fitotóxico, en especial de aquellos de origen natural. En éste contexto, los metabolitos secundarios obtenidos de microorganismos (hongos o actinomicetos) representan una fuente invaluable de moléculas con estructuras novedosas, que pueden ser utilizadas como prototipo para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas (Duke *et al*., 2002; Singh *et al.*, 2003; Sexena *et al*., 2001). Por estas razones es que actualmente, en la Facultad de Química de la UNAM, existe un programa multidisciplinario encaminado a la búsqueda de moléculas con potencial fitotóxico aisladas a partir de especies fúngicas selectas. De tal manera que el objetivo principal del presente trabajo consiste en continuar con el descubrimiento de compuestos fitotóxicos novedosos a partir del organismo fúngico *Emericella* 25379, que sean de utilidad como moléculas prototipo para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables con mecanismos de acción novedosos.

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

1. Cultivar en mediana escala la especie fúngica *Emericella 25379*, con la finalidad de generar la biomasa y medio de cultivo necesarios para la obtención de compuestos fitotóxicos adicionales.
2. Obtener el extracto orgánico a partir del micelio y medio de cultivo.
3. Reducir la complejidad química del extracto empleando métodos cromatográficos convencionales con la finalidad de aislar y caracterizar al menos un metabolito secundario fitotóxico adicional del extracto fúngico.
4. Evaluar la actividad fitotóxica de los metabolitos secundarios aislados.
5. Determinar el efecto de los compuestos sobre la actividad de la enzima monitora PDE1, con la finalidad de establecer si estos afectan la actividad moduladora de la CaM.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material Fúngico.

Emericella 25379 se aisló a partir de un coral recolectado en las islas Marietas, localizadas en el Estado de Nayarit, México, en Enero de 2007. La identificación de la especie estuvo a cargo de la Dra. María del Carmen González (Instituto de Biología, UNAM). Una muestra de referencia (No. 25379) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

3.2 Fermentación de *Emericella* 25379.

El cultivo en mediana escala (42 L) de *Emericella* 25379 se realizó utilizando el medio líquido Czapek utilizando las mismas condiciones experimentales previamente descritas por Figueroa y colaboradores (2008): condiciones estáticas de crecimiento y 30 días de fermentación a temperatura ambiente.

3.3 Obtención del extracto orgánico del micelio y medio de cultivo de *Emericella* 25379.

Una vez finalizado el proceso de fermentación, el micelio (biomasa) y el medio de crecimiento se separaron por medio de una filtración simple a través de gasa estéril. El extracto orgánico del micelio se preparó mediante un proceso de maceración, utilizando CH_2Cl_2 como disolvente de extracción. Por otra parte, el extracto orgánico obtenido a partir del medio de crecimiento se obtuvo mediante un proceso de partición utilizando CH_2Cl_2 como disolvente de extracción. Las soluciones resultantes se filtraron sobre sulfato de sodio anhidro y, posteriormente, se eliminó el disolvente orgánico a presión reducida. Los extractos orgánicos obtenidos (micelio y medio de crecimiento) fueron reunidos con base en su similitud cromatográfica, obteniéndose 11.0 g de un residuo de color café.

3.4 Procedimientos generales.

3.4.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítica o preparativa se realizaron sobre placas de aluminio y/o de vidrio, respectivamente, recubiertas con gel de sílice 60 F_{254} Merck® [tamaño de partícula 3.5-7.0 ASTM y de 0.25 mm de espesor] y mediante el empleo de diversos sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó con lámpara de luz UV a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm). Como agente cromógeno se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal. La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck® [tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM] de acuerdo a las técnicas convencionales.

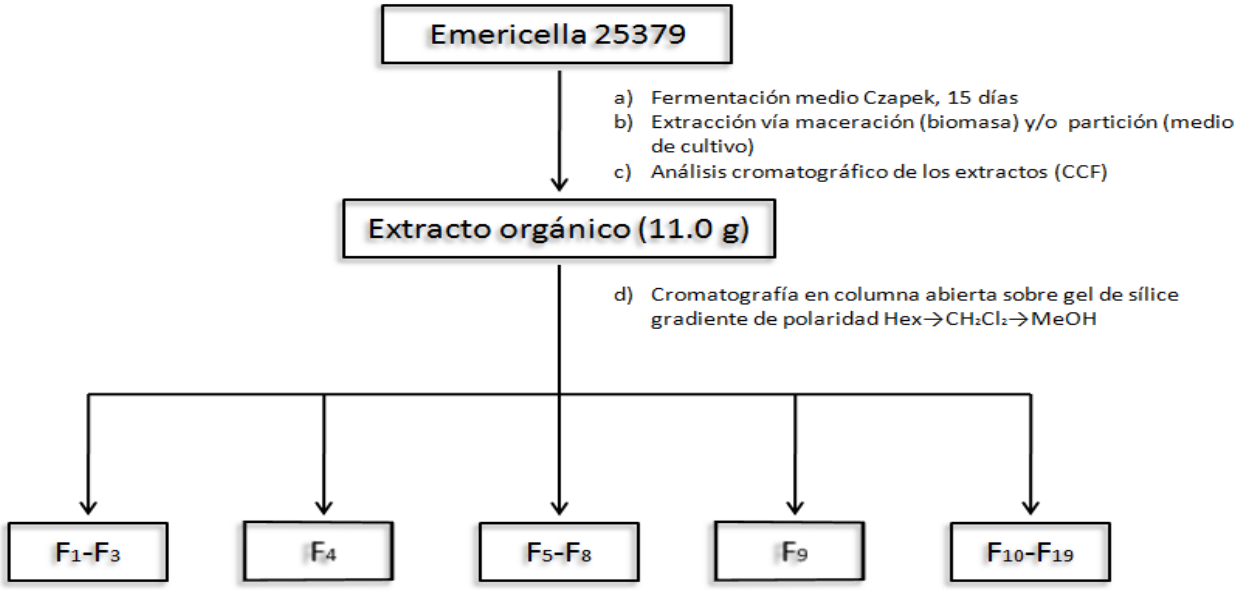
3.4.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. Las rotaciones ópticas se obtuvieron en un polarímetro digital DIP 360, marca JASCO. Los espectros en el IR (pastilla de KBr y película) se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Modelo 599-B, marca Perkin-Elmer. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-^{1}H, 300 o 500 MHz) y de carbono 13 (RMN-^{13}C, 125 MHz) se registraron en un aparato Unity-Plus, marca Varian o en un aparato HDX500, marca Bruker, utilizando $CDCl_3$ como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico (EM-IE) se obtuvieron mediante un espectrómetro de masas HP 5890 (serie II), por introducción directa a 70 eV y un barrido de 33 a 800 unidades de masa-carga (*m/z*) por segundo. El registro de los espectros se realizó en la Facultad de Química, en el Instituto de Química ambos de la UNAM y en la UAM Iztapalapa.

3.5 Estudio químico de *Emericella* 25379.

El extracto seco (11.0 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento preliminar mediante una CCA, empleando una columna de vidrio empacada con gel de sílice (485 g) y un gradiente de elución de diferente polaridad (Hex→CH_2Cl_2→MeOH). Este proceso generó un conjunto de 19 fracciones primarias (F_1-F_{19}). En el **Cuadro 5** se resume el proceso de extracción y fraccionamiento primario.

Cuadro 5. Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto orgánico de *Emericella* 25379.



3.6 Aislamiento de la shamixantona (1) a partir de la fracción primaria F_4.

La fracción primaria F_4 (377.6 mg) se recromatografió mediante una CCA (85 g de gel de sílice, gradiente de elución Hex→AcOEt). El proceso anterior generó siete fracciones secundarias ($F_{4\text{-I}}$-$F_{4\text{-VII}}$). La resolución de la fracción secundaria $F_{4\text{-IV}}$ (91.3 mg), mediante una CCF preparativa, permitió la obtención de 9.1 mg de un sólido amarillo con punto de fusión de 140-142 °C. Éste producto se identificó como la shamixantona (**1**).

3.7 Aislamiento del hidrato de tajixantona (4) y 15-acetil hidrato de tajixantona (6) a partir de la fracción primaria F_9.

El hidrato de tajixantona (**4**; 7.0 mg) y el 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**; 4.0 mg) fueron aislados a partir de la fracción primaria F_9 (130.0 mg) mediante sucesivas CCF de tipo preparativa. Los productos se obtuvieron como sólidos amarillos, con puntos de fusión de 194-196 °C y 206-208 °C, respectivamente.

3.8 Ensayos Biológicos.

3.8.1 Determinación del efecto fitotóxico del compuesto 6.

La determinación del potencial fitotóxico del producto **6** se realizó mediante su evaluación sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, empleando el método de la caja de Petri (Anaya *et al.*, 1990). El ensayo biológico se realizó en cajas de Petri que contenían discos de papel filtro de 10 cm de diámetro. Las muestras a evaluar se disolvieron en CH_2Cl_2 y se prepararon las diluciones correspondientes para llegar a las concentraciones finales de 1, 10, 50, 75 y 100 ppm. Posteriormente, 1 mL de cada una de las diluciones preparadas se vertió sobre cada caja de Petri y se permitió la evaporación completa del disolvente. A continuación, se vertieron sobre cada caja 3 mL de agua y se inició el proceso de germinación de 15 semillas de la especie de prueba mediante la incubación a 28 °C durante 24 horas. La actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de la radícula y contando el número de semillas que germinaron después del periodo de incubación. Como control positivo del ensayo se utilizó a la tricolorina A a las concentraciones de 1, 10, 100 y 500 ppm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.8.2 Evaluación del efecto del 15-acetil hidrato de tajixantona (6) sobre la actividad de la enzima PDE1 dependiente de CaM.

Preparación del medio de reacción: 0.015 unidades de PDE1, 0.083 μg de CaM, ambas de cerebro bovino, 0.3 unidades de 5´-nucleotidasa de *Crotalux atrox* y 30 nM de albúmina sérica

bovina (ASB) se incubaron durante 1 hora a 30 °C en 3.2 mL de Buffer de reacción. Todos los reactivos se obtuvieron de SIGMA (Rivero-Cruz *et al.,* 2007).

Procedimiento: El ensayo se realizó en placas de ELISA de 96 pozos (250 μL de capacidad). Para cada muestra de prueba se prepararon diferentes diluciones seriadas para obtener las concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 13, 20, 32, 50 y 65 μM. Posteriormente, se agregaron 10 μL de las diluciones antes mencionadas y 40 μL del medio de reacción a los pozos de la placa. A continuación, la placa se incubó a 30 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el periodo de incubación se depositaron 10 μL de una solución 10.8 μM de AMPc en intervalos de 10 segundos hasta completar 15 minutos de reacción a temperatura ambiente. En seguida se adicionó a cada pozo 190 μL de una solución de verde de malaquita para interrumpir la reacción. La cantidad de fosfato inorgánico (Pi) liberado por la hidrólisis del AMPc se cuantificó mediante un método espectrofotocolorimétrico a 700 nm; las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro marca BioRad modelo 660. La actividad de la enzima se calculó de manera indirecta al interpolar la densidad óptica de las muestras en una curva estándar preparada con fosfato monobásico de potasio en un rango de concentraciones entre 0.1 y 3.5 nM. Para cada muestra se realizaron seis réplicas independientes. Como control positivo se utilizó la clorpromazina (CPZ). Los resultados se expresan como la media de al menos seis experimentos ± el error estándar (EE). La concentración inhibitoria 50 (CI_{50}, concentración a la cual se inhibe el 50 % de la actividad de la enzima) se determinó mediante un análisis no lineal con el programa Origin 7.0 (Originlab Corporation; Rivero-Cruz *et al.,* 2007).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

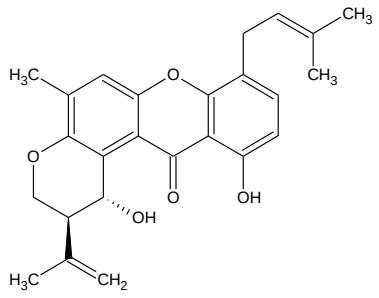
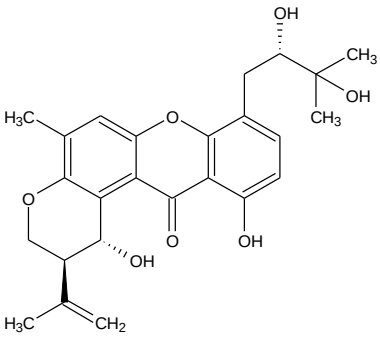
La presente reinvestigación del hongo *Emericella* 25379 se realizó con la finalidad de obtener a los compuestos minoritarios análogos de la shamixantona (**1**) y del hidrato de tajixantona (**4**), dos xantonas fitotóxicas, inhibidoras de la proteína CaM aisladas por Figueroa y colaboradores (2008). Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la estrategia metodológica que se resume a continuación:

1. En primer lugar se realizó la fermentación en mediana escala del hongo *Emericella* 25379.
2. Posteriormente, se obtuvo el extracto orgánico a partir del micelio y medio de cultivo y se fraccionó con la finalidad de separar y purificar algún constituyente minoritario diferente a los obtenidos previamente. Este proceso permitió aislar un compuesto novedoso y dos reportados previamente por Figueroa y colaboradores (2008), la shamixantona (**1**) y del hidrato de tajixantona (**4**).
3. Una vez caracterizados los metabolitos aislados se evaluaron para determinar su potencial fitotóxico.
4. Por último, se determinó el efecto del compuesto novedoso sobre la proteína PDE1 dependiente de CaM.

4.1 Caracterización de la shamixantona (1) y del hidrato de tajixantona (4).

La shamixantona (**1**) y el hidrato de tajixantona (**4**) se aislaron por métodos cromatográficos convencionales y su caracterización se realizó por comparación de sus espectros de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C con los de muestras auténticas de referencia. En el **Cuadro 6** se presentan las estructuras químicas y los rendimientos de estos metabolitos.

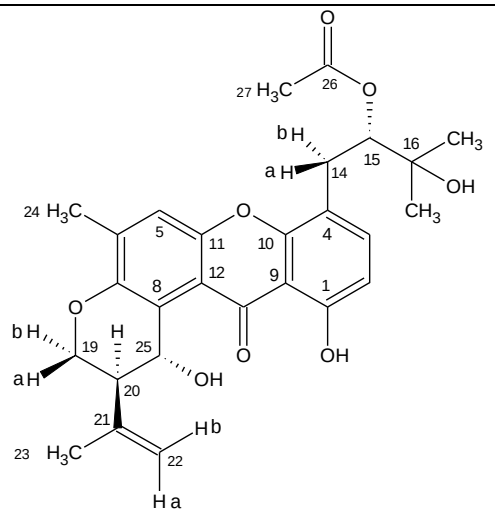
Cuadro 6. Metabolitos secundarios aislados de las fracciones F_4 y F_9 del extracto orgánico de *Emericella* 25379.

Compuesto	Cantidad obtenida	Propiedades físicas registradas
 **shamixantona (1)**	9.1 mg	polvo amarillo p.f 140-142 °C
 **hidrato de tajixantona (4)**	7.0 mg	sólido cristalino amarillo p.f 194-196 °C

4.2 Caracterización del producto 15-acetil hidrato de tajixantona (6).

El tercer compuesto (**6**) se aisló y purificó también mediante métodos cromatográficos y fue caracterizado como 15-acetil hidrato de tajixantona (**6,** 4.0 mg), un análogo novedoso del hidrato de tajixantona (**4**). Este producto se obtuvo como un polvo amarillo con punto de fusión de 206-208 °C. Su caracterización se realizó mediante diversas técnicas espectroscópicas (IR, polarimetría y RMN uni y bidimensional) y espectrometría de masas (EM-IE). En la **Cuadro 7** se resumen los resultados obtenidos de los análisis espectroscópicos y constantes físicas.

Cuadro 7. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **6**.



Fórmula molecular	$C_{27}H_{30}O_8$
Peso molecular	482.5 g/mol
Punto de fusión	206-208 °C
$[\alpha]^{20}_{D}$	-36 °
IR_{max} (KBr) cm^{-1}	3421, 2925, 1734, 1742, 1602, 1575, 1475, 1243, 989, 896, 823.
EM *m/z* (Int. Rel.)	482 [M^+,(5)], 467 (3), 439 (5), 422 (10), 333 (100).

El espectro en el IR del compuesto **6** (**Figura 4**) presenta, entre otras, bandas de absorción características para grupos hidroxilo quelatados (3421 cm^{-1}), carbonilo de éster (1734 cm^{-1}) y carbonilo de cetona conjugada (1642 cm^{-1}).

El espectro de masas en su modalidad de impacto electrónico (**Figura 5**), muestra el ión molecular [M^+] en una relación *m/z* de 482 que corresponde a una fórmula molecular de $C_{27}H_{30}O_8$, la cual permite un máximo de 13 insaturaciones. El espectro de masas, además, presenta el pico base en *m/z* 333 y tres picos característicos de la pérdida de un fragmento de acetato [M^+-15, M^+-43 y M^+-60]. Esta última información, en conjunto con la aportada por el espectro en el infrarrojo, confirmó la presencia de un grupo acetato en la molécula.

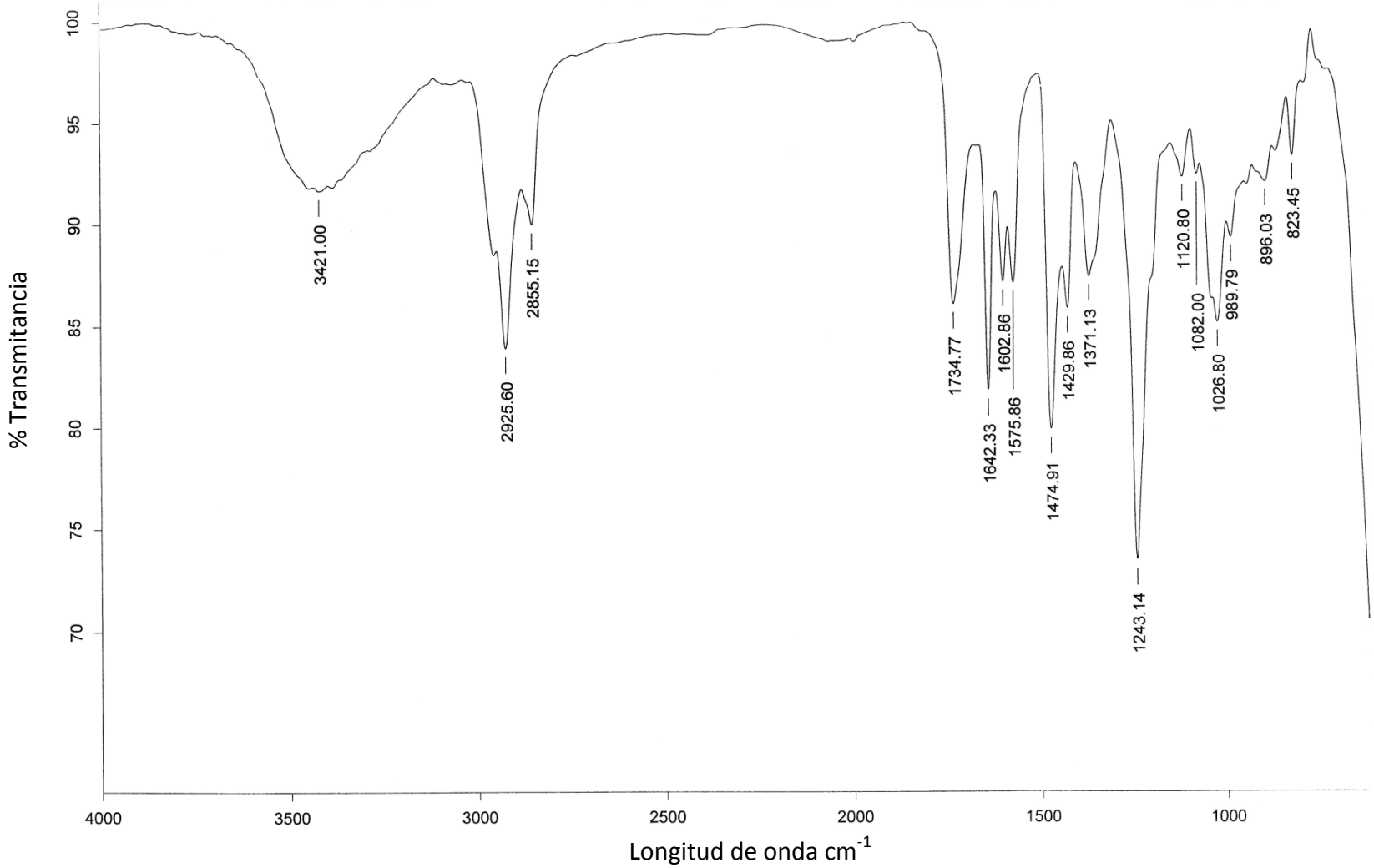


Figura 4. Espectro en el infrarrojo del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).

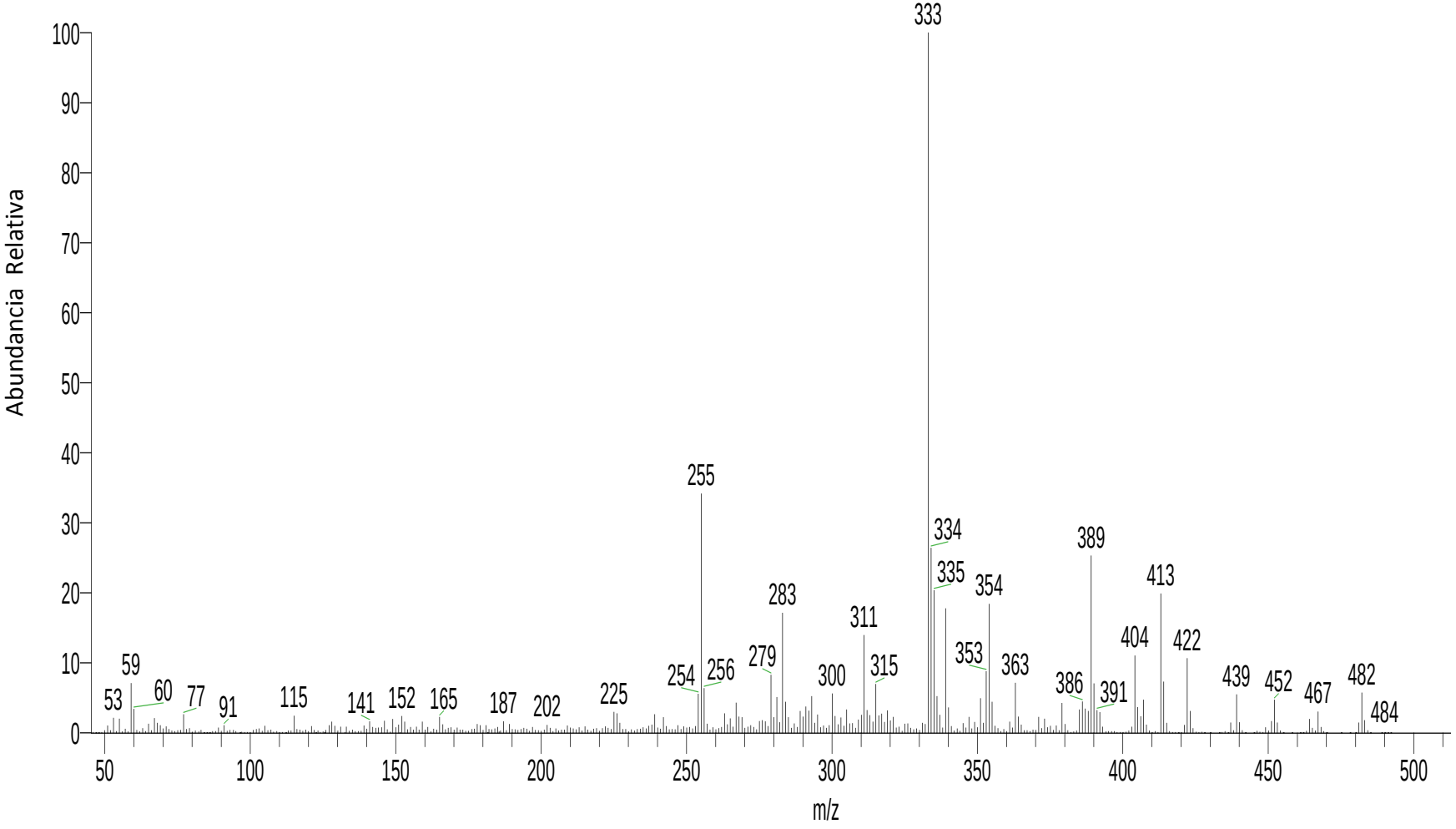


Figura 5. Espectro de masas del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).

El análisis detallado de los espectros de RMN-^{1}H (**Figura 6**, **Cuadro 8**), RMN-^{13}C (**Figura 7**, **Cuadro 9**) y HSQC (**Figura 8**) permitió establecer que el producto natural aislado pertenece a la categoría de las xantonas preniladas (Surachai *et al.,* 2005).

A continuación se indican las características más relevantes observadas en los espectros de RMN del compuesto **6**.

1) En δ_H 12.56 se observa un singulete asignable a un protón de un grupo hidroxilo; el desplazamiento químico de éste sugiere que se encuentra quelatado con el grupo carbonilo de la xantona. La presencia del grupo carbonilo se confirmó mediante la presencia de una señal en δ_C 184.4 en el espectro de RMN-^{13}C.
2) En δ_H 7.42 y 6.72 se observan dos señales múltiples, asignables a los hidrógenos H-2 y H-3 del núcleo dibenzo-γ-pireno. Estas señales mostraron una clara correlación con las absorciones en δ_C 109.6 y 137.8 observadas en el espectro bidimensional HSQC.
3) En δ_H 7.27 se observa un singulete asignable al protón H-5 de la xantona. Este protón muestra una correlación con la señal observada en δ_C 119.1 asignable al carbono C-5.
4) En δ_H 5.41 y 4.96 se aprecian las señales correspondientes al hidrógeno H-25 y al protón del hidroxilo en C-25.
5) En δ_H 4.80 y 4.57 se observan dos dobletes asignables a los hidrógenos vinílicos H-22a y H-22b, respectivamente. Estas señales muestran una correlación con el carbono en δ_C 112.2 en el espectro HSQC.
6) En δ_H 4.43 (dd) y 4.35 (dd) se aprecian dos señales asignables a los protones H-19a y H-19b, respectivamente, y correlacionan con la señal en δ_C 64.5 (C-19).
7) En δ_H 3.35 y 2.90 se observan dos señales múltiples (dd) que integran para un protón, las cuales muestran una clara correlación con la señal en δ_C 29.6 (C-14) y son asignables a los protones H-14a y H-14b.

8) En δ_H 2.73 (H-20) se observa una señal que integra para un hidrógeno y es asignable al hidrógeno soportado por el carbono C-20 (δ_C 44.9).
9) En δ_H 2.36-2.37 se aprecia una señal que corresponde a los protones CH_3-24 y OH-16, esto se dedujo mediante la integración para 4 hidrógenos de esta banda de absorción, además, de que esta señal muestra una clara correlación con la absorción en δ_C 17.4 en el espectro HSQC.
10) Finalmente, en δ_H 1.87, 1.85, 1.38 y 1.34 se observan las señales asignables a los metilos CH_3-27, CH_3-23, CH_3-18 y CH_3-17, respectivamente. Estas absorciones muestran una clara correlación con las señales en δ_C 20.7, 22.5, 26.9 y 25.2 en el espectro de RMN-^{13}C.

En resumen, en el espectro de RMN-^{13}C del compuesto **6** (**Cuadro 9** y **Figura 7**), se aprecian señales para 27 átomos de carbono, las cuales, de acuerdo con el análisis del espectro HSQC, corresponden a 13 carbonos cuaternarios, seis metinos, tres metilenos y cinco metilos. Cabe mencionar que los espectros de RMN del compuesto **6** (**Cuadros 8** y **9** y **Figuras 6** y **7**) fueron muy similares a los de **4**, difiriendo únicamente en las señales correspondientes a C-15 de la cadena isoprenoide en C-4 del núcleo xantona. Ésta señal se encuentra paramagnéticamente desplazada en el espectro de RMN-^{1}H del producto **6**. Asimismo, los espectros del producto **4** no presentaron las señales características del residuo de acetato presente en **6**. Cabe mencionar que la estructura del producto **6** fue ensamblada tomando como referencia las estructuras de la shamixantona (**1**), hidrato de tajixantona (**4**) y varixantona (Joan M. *et al*., 2001). De manera adicional, el análisis de los espectros bidimensionales HMBC y TOCSY permitió corroborar la distribución correcta de los sustituyentes en la molécula. En la **Figura 9** se muestran las correlaciones más importantes observadas en el espectro TOCSY. En el **Cuadro 10** se presentan las correlaciones más importantes observadas en el espectro HMBC.

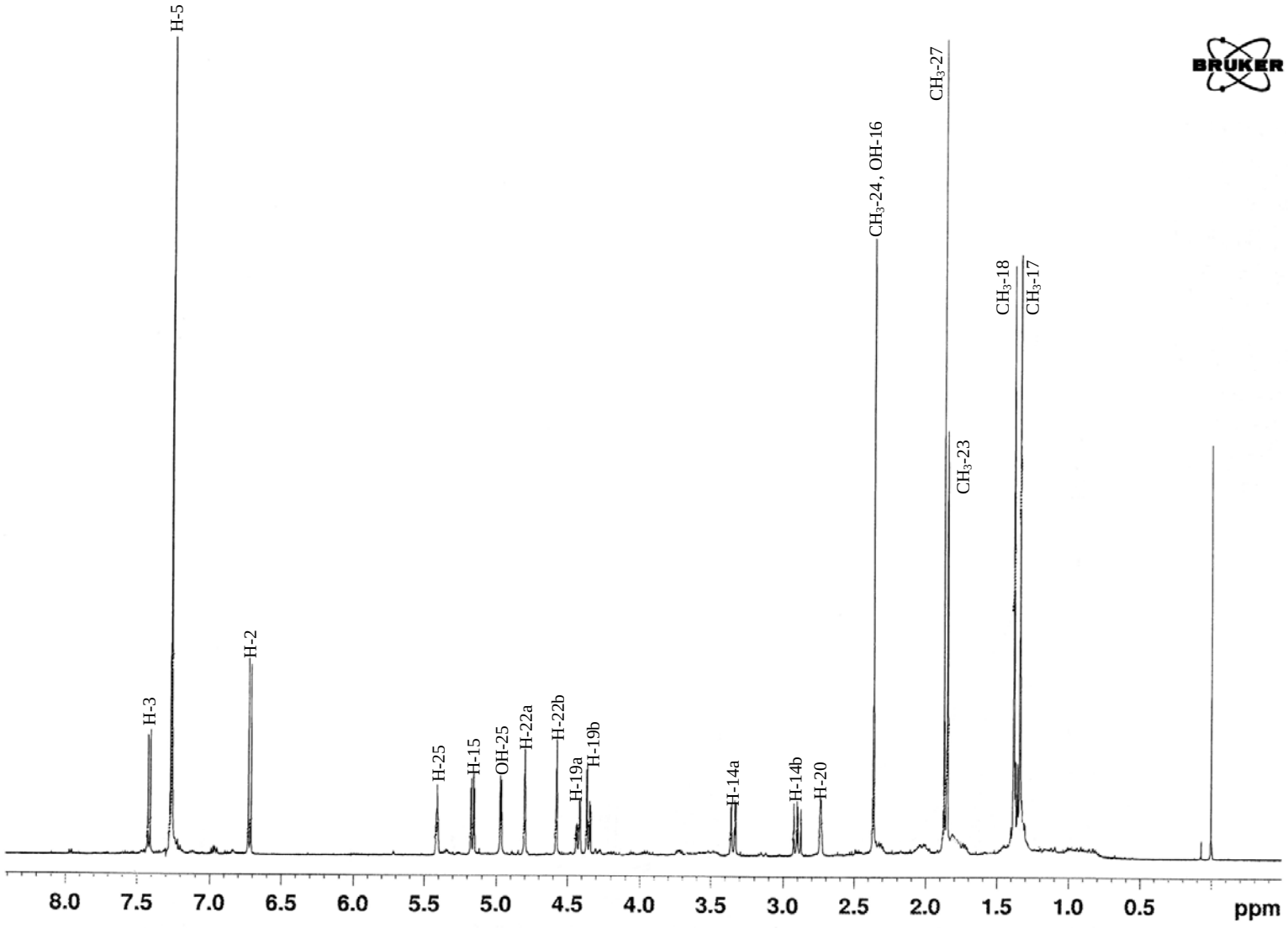


Figura 6. Espectro de RMN-^{1}H del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).

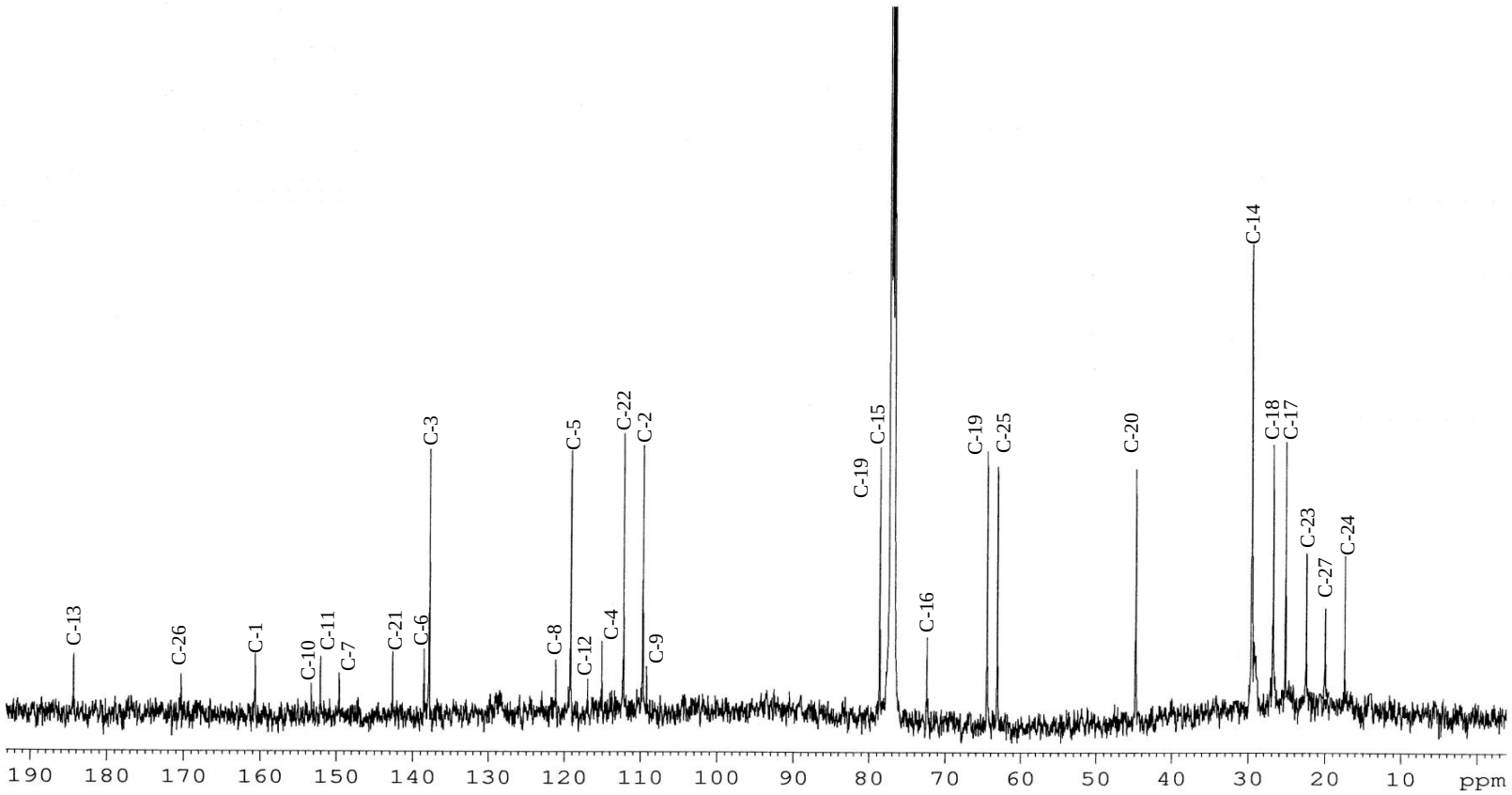


Figura 7. Espectro de RMN-^{13}C del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).

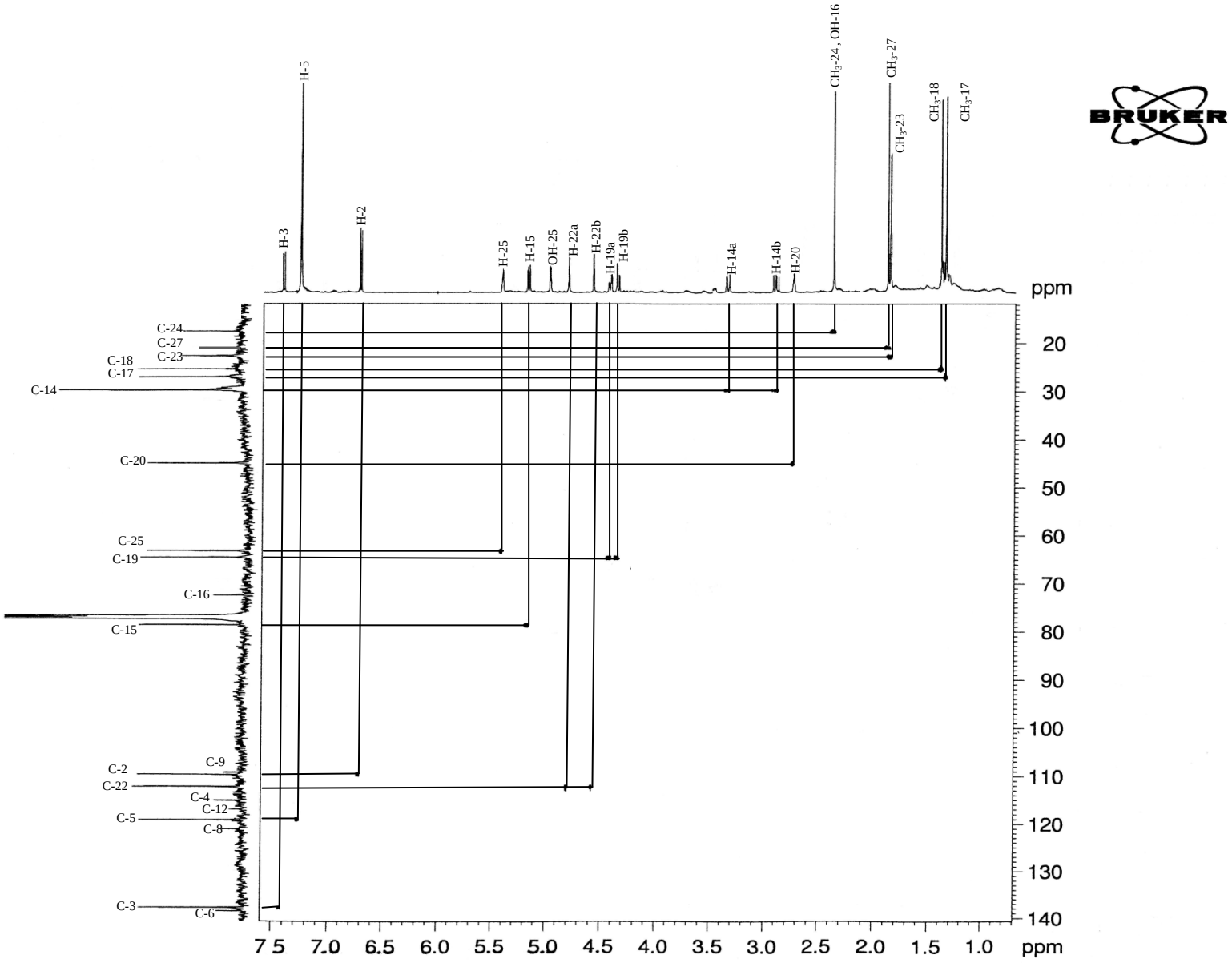


Figura 8. Espectro bidimensional HSQC del 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).

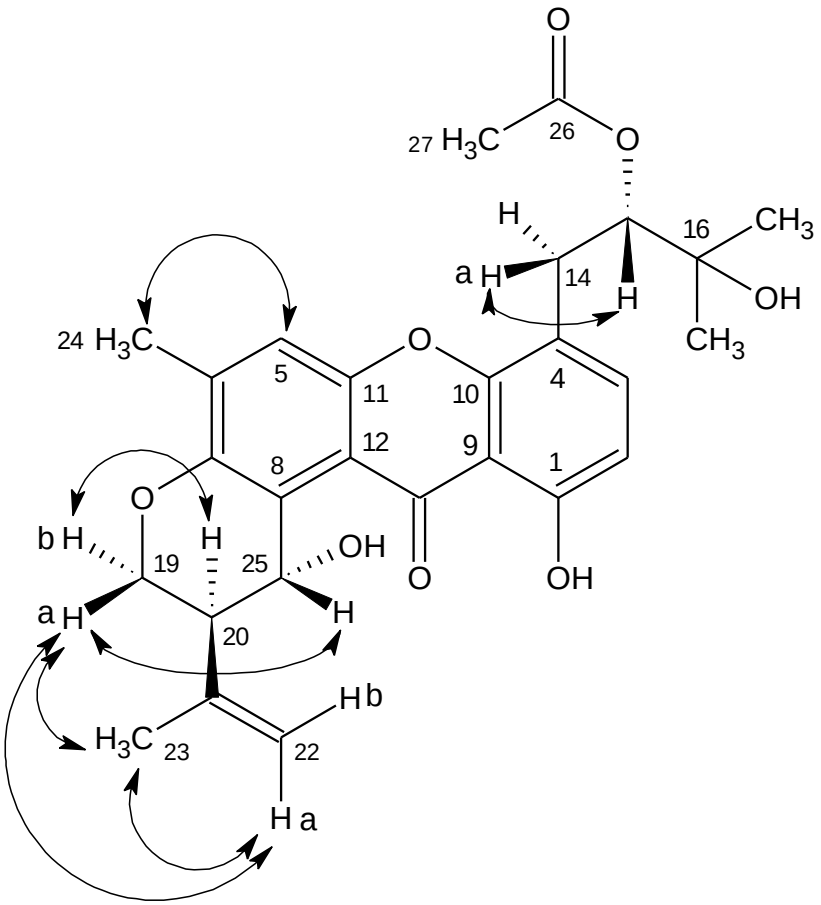


Figura 9. Correlaciones ^{1}H-^{1}H observadas en el espectro TOCSY del compuesto **6.**

Cuadro 8. Datos de RMN-^{1}H de los compuestos shamixantona (**1**), hidrato de tajixantona (**4**) y 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).

	1	**4**	**6**
Posición	δ_H, integración, multiplicidad, *J* (Hz)		
OH-1	12.60 (1H, s)	12.54 (1H,s)	12.56 (1H, s)
H-2	6.74 (1H, d, *J* = 8.4 Hz)	6.72 (1H, d, *J* = 8.4 Hz)	6.72 (1H, d, *J* = 8.0 Hz)
H-3	7.44 (1H, d, *J* = 8.4 Hz)	7.49 (1H, d, *J* = 8.4 Hz)	7.42 (1H, d, *J* = 8.0 Hz)
H-5	7.30 (1H, s)	7.19 (1H, s)	7.27 (1H, s)
H-14a	3.49 (1H, d, *J* = 5.5 Hz)	3.16 (1H, dd, *J* = 1.2, 14.0 Hz)	3.35 (1H, dd, *J* = 14.0, 3.0)
H-14b	3.50 (1H, d, *J* = 6.0 Hz)	2.63 (1H, dd, 10.8, *J* = 14.0 Hz)	2.90 (1H, dd, *J* = 14.25, 10.0 Hz)
H-15	5.31 (1H, dd, *J* = 7.2, 7.6 Hz)	3.70 (1H, d, *J* = 10.8 Hz)	5.16 (1H, dd, *J* = 10.5, 3.0 Hz)
OH-15	-	2.44 (1H, s)	-
OH-16	-	2.37 (1H, s)	2.37 (1H, s)
CH_3-17	1.75 (3H, s)	1.34 (3H, s)	1.34 (3H, s)
CH_3-18	1.79 (3H, s)	1.38 (3H, s)	1.38 (3H, s)
H-19a	4.43 (1H, dd, *J* = 2.8, 11.2 Hz)	4.41 (1H, dd, *J* = 2.0, 10.8 Hz)	4.43 (1H, dd, *J* =10.5, 3.25 Hz)
H-19b	4.34 (1H, dd, *J* = 2.8, 10.8 Hz)	4.31 (1H, dd, *J* = 2.8, 10.8 Hz)	4.35 (1H, dd, *J* = 11.0, 3.0 Hz)
H-20	2.73 (1H, s)	2.69 (1H, s)	2.73 (1H, sa)
H-22a	4.80 (1H, s)	4.77 (1H, s)	4.80 (1H, s)
H-22b	4.58 (1H, s)	4.53 (1H, s)	4.57 (1H, s)
CH_3-23	1.85 (3H, s)	1.82 (3H, s)	1.85 (3H, s)
CH_3-24	2.36 (3H, s)	2.28 (3H, s)	2.36 (3H,s)
H-25	5.41 (1H, s)	5.34 (1H, s)	5.41 (1H, s)
OH-25	5.09 (1H, s)	4.98 (1H, d, *J* = 4.0 Hz)	4.96 (1H, d, *J* = 4.0 Hz)
CH_3-27	-	-	1.87 (3H, s)

Cuadro 9. Datos de RMN-^{13}C de los compuestos shamixantona (**1**), hidrato de tajixantona (**4**) y 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).

Posición	1	4	6
	δ_C		
C-1	159.7	160.3	160.6
C-2	109.8	109.9	109.6
C-3	136.6	138.3	137.8
C-4	109.2	109.2	109.1
C-5	119.4	119.1	119.1
C-6	138.4	138.5	138.5
C-7	149.4	149.5	149.5
C-8	120.8	120.8	121.1
C-9	118.9	116.4	115.1
C-10	152.8	153.1	153.2
C-11	152.3	151.9	152.0
C-12	116.7	116.8	116.9
C-13	184.5	184.3	184.1
C-14	27.5	32.0	29.6
C-15	121.7	77.7	78.6
C-16	133.3	72.9	72.4
C-17	25.8	26.5	26.9
C-18	17.9	23.6	25.2
C-19	64.6	64.5	64.5
C-20	44.9	44.8	44.9
C-21	142.6	142.5	142.6
C-22	112.3	112.3	112.2
C-23	22.6	22.6	22.5
C-24	17.5	17.4	17.4
C-25	63.2	63.2	63.1
C-26	-	-	170.2
C-27	-	-	20.7

Cuadro 10. Correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto **6**.

Posición	Correlación
C-1	H-3
C-3	H-14b
C-4	H-14a, H-14b, H-2
C-5	CH_3-24
C-6	CH_3-24
C-7	H-5
C-9	H-2
C-10	H-2, H-3
C-11	H-5
C-12	H-5
C-14	H-3, CH_3-18
C-15	H-14, CH_3-17 , CH_3-18
C-16	CH_3-17 , CH_3-18
C-17	CH_3-18
C-18	CH_3-17
C-20	H-22a, H-22b, CH_3-23 , OH-25
C-21	CH_3-23
C-22	CH_3-23
C-23	H-22a, H-22b
C-24	H-5
C-25	H-19a, OH-25
C-26	CH_3-27

El conjunto de evidencias presentadas permitieron concluir que el producto **6** corresponde al derivado acaetilado en C-15 del hidrato de tajixantona, un producto novedoso. La configuración absoluta del grupo acetato en C-15 se asume igual que la del hidrato de tajixantona (**4**) con base en consideraciones biogenéticas y en los resultados obtenidos a partir de la transformación química del compuesto **4** en el **6.** El tratamiento del hidrato de tajixantona (**4**) con un exceso de anhídrido acético y piridina generó dos derivados de acuerdo a los análisis por cromatografía en capa delgada. El compuesto acetilado mayoritario, purificado mediante CCF preparativa, resultó idéntico al producto natural **6** en todos sus aspectos, incluyendo la rotación óptica.

4.3 Determinación del potencial fitotóxico del 15-acetil hidrato de tajixantona (6).

El producto 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**) se evaluó para determinar su potencial fitotóxico sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus* mediante el método en caja de Petri (Anaya *et al.,* 1990). El metabolito inhibió el crecimiento de las semillas de prueba de manera dependiente de la concentración. La CI_{50} calculada fue de 427.5 ppm (8.8×10^{-4} M). El efecto fue menor al demostrado por la tricolorina A (3.61×10^{-5}; Pereda Miranda *et al.*, 1993), potente agente fitotóxico aislado de *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae), pero de magnitud similar a la de la mayoría de los productos naturales con propiedades fitotóxicas significativas (Sexena *et al*., 2001, Duke *et al*., 2002).

4.4 Determinación del efecto antagonista del 15-acetil hidrato de tajixantona (6) sobre la CaM.

El bioensayo se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Sharma y Wang (1979) con algunas modificaciones realizadas por Rivero-Cruz y colaboradores (2007). En el **Cuadro 11** se muestran los resultados obtenidos y se puede observar que el compuesto **6** inhibe la actividad del complejo enzimático Ca^{2+}-CaM-PDE1. El efecto de **6** fue mayor al de la CPZ y los compuestos análogos **1** y **4** descritos por Figueroa y colaboradores (2008)**.**

Cuadro 11. Efecto de los compuestos **1**, **4**, **6** y **CPZ** sobre el complejo enzimático Ca^{2+}-CaM-PDE1.

Compuesto	CI_{50} (μM) ± EE	Potencia Relativa
1	29.16 ± 6.39	0.25
4	5.62 ± 1.25	1.30
6	3.79 ± 0.53	1.91
CPZ	7.26 ± 1.60	1.0

La potencia relativa se calculó con la fórmula CI_{50} CPZ (μM) / CI_{50} compuesto (μM).

Los resultados de este ensayo indican *a priori*, que la presencia de los átomos de oxígeno en las posiciones C-15 y C-16 de la molécula es importante para una mejor interacción de los metabolitos analizados con la proteína CaM, ya que el análogo no oxigenado en estas posiciones (compuesto **1**) presentó una menor actividad. Posiblemente la presencia de estos grupos permiten al ligando una mejor interacción con la región hidrofóbica de la proteína, misma a la que usualmente se unen los inhibidores de CaM. Esta región queda expuesta toda vez que el Ca^{2+} se une a la CaM nativa permitiendo así su interacción con la enzimas blanco moduladas por la proteína.(Martinez-Luis *et al.*, 2007).

Por otro lado, el presente trabajo corrobora que *Emericella* 25379 biosintetiza metabolitos del tipo xantona preniladas, al igual que *Emericella variecolor* (Surachai *et al*., 2005). Estos resultados, en conjunto con los obtenidos por Figueroa y colaboradores (2008), permiten proponer que el 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**) se biosintetiza de acuerdo con la secuencia de reacciones mostradas en la **Figura 10**. Esta propuesta de biogénesis es apoyada por la coexistencia de los productos **1**, **4** y **6** en el extracto orgánico obtenido a partir del micelio y medio de cultivo de *Emericella* 25379.

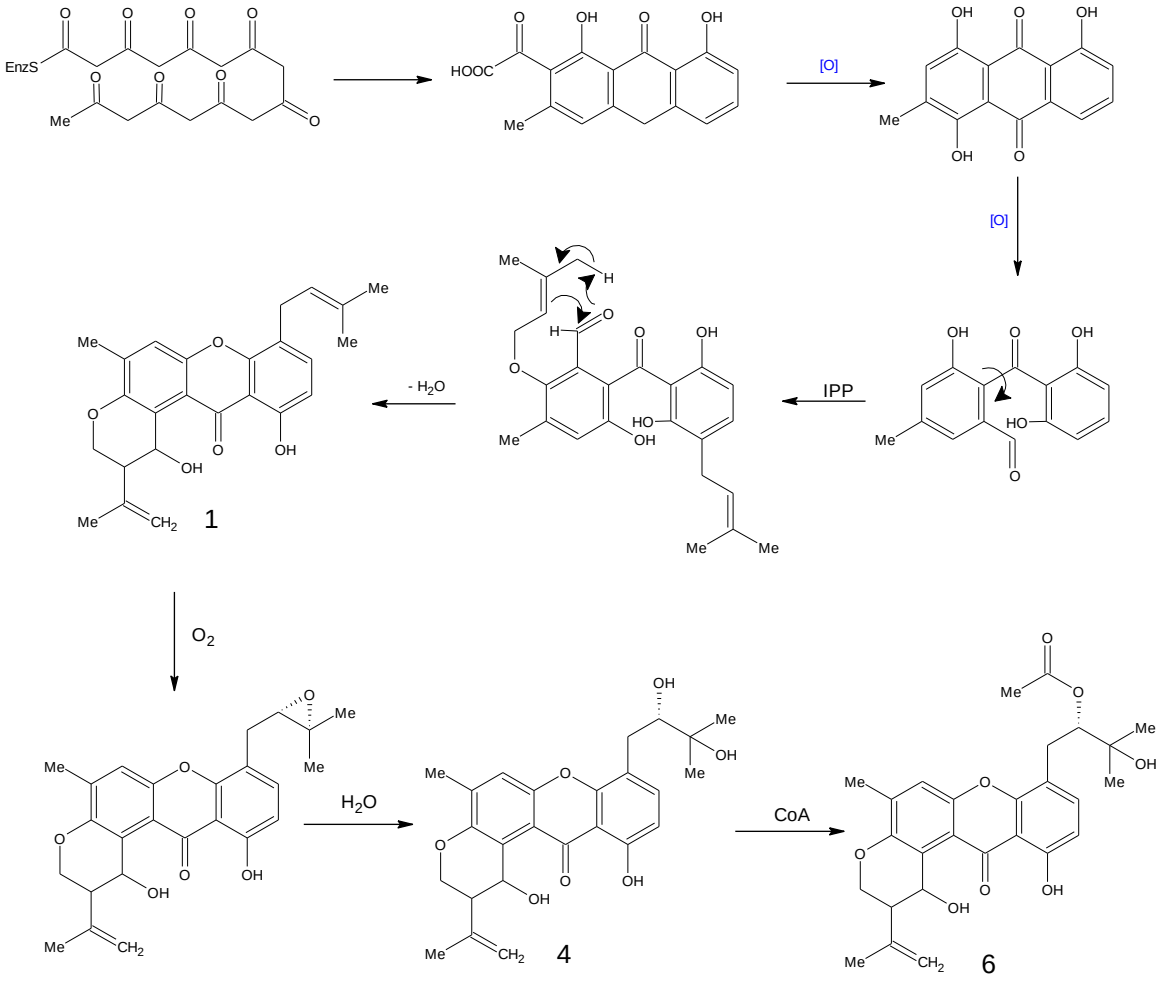


Figura 10. Propuesta de biosíntesis para el compuestol 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- La reinvestigación de la especie fúngica *Emericella* 25379, cultivada durante 30 días, a temperatura ambiente y en condiciones estáticas, permitió el aislamiento del compuesto novedoso caracterizado como 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**).

- El 15-acetil hidrato de tajixantona (**6**) inhibió moderadamente la germinación y el crecimiento radicular de la especie *Amarathus hypochondriacus.* El efecto fue menor al del compuesto de referencia (Tricolorina A), sin embargo, se encuentra dentro del rango de actividad de los productos naturales con propiedades fitotóxicas significativas.

- El compuesto **6** inhibe la activación del complejo Ca^{2+}-CaM-PDE1 de manera dependiente de la concentración. Éste hallazgo sugiere que la fitotoxicidad de los análogos del hidrato de tajixantona (**4**) puede estar relacionado con un efecto sobre la proteína reguladora CaM, un blanco de acción poco usual.

- El análisis preliminar de la relación estructura-actividad de éste tipo de metabolitos sugiere que la presencia de átomos de oxígeno en las posiciones 15 y 16 de las moléculas confieren a éstas mayor actividad antagonista de la CaM.

- Finalmente, el presente trabajo constituye una aportación adicional al conocimiento de la especie fúngica *Emericella* 25379, al esclarecimiento del posible mecanismo de acción de los compuestos del tipo xantona, así como al conocimiento en el campo de los productos naturales con propiedades fitotóxicas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed S., Bardshiri E., McIntyre S., Simpson J.T. (1992). Biosintetic studies on Tajixanthone and Shamixanthone, Poliketido Hemiterpenoid metabolites of *Aspergillus variecolor. Australian Journal Chemistry*, **45**, 249-274.

- Anaya A.L., Calera M.R., Mata R., Pereda-Miranda R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Iphomea tricolor* (Convulvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **7**, 2145-2152.

- Au T.K., Chick W.S.H., Leung P.C. (2000). The biology of ophiobiolins. *Life Science*, **67**, 733-742.

- Dekker J., Duke O.S. (1995). Herbicide resistant field crop. *Advances in Agronomy,* **54**, 69-116.

- Diario Oficial de la Federación, Enero 1991.

- Duke S.O., Dayan F.E., Rimando A.M., Scharder K.K., Aliotta G., Olivia A., Romagni J.G. (2001). Chemicals from nature weed management. *Weed Science*, **50**, 238-151.

- Duke S.O., Dayan F.E., Rimando, A.M. (2001). Natural Products as source of herbicides: current stratus. *Weed Research*, **40**, 99-111.

- Duke S.O., Romagni J.G., Dayan, F.E. (2002). Natural products as source of new mechanism of herbicidal action. *Crop Protection*, **19**, 583-589.

- Duke S.O., Dayan, F.E., Baerson S.R., Romagni J.G., Agarwal A., Olivia, A. (2003). Natural phytotoxins with potential for development in weed managment strategies. *Chemistry an crop protection.*, Wiley VHC. Germany, pp. 143-154.

- Eberlein C.V., Guettieri M.J., Berger P.H., Fellman J.K., Mallory-Smith C.A., Thill D.C., Bearg R.J., Belkmap W.R. (1999). Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor reseistence. *Weed Science*, **47**, 383-392.

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

- Figueroa M., González M.C., Rodriguez-Sotres R., Sosa-Peinado A., González-Andrade M., Cerda-García-Rojas C.M., Mata R. (2008). Calmodulin inhibitors from *Emericella* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry,* en prensa, doi:10.1016/j.bmc.2008.10.079.

- 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 Ca^{2+} and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptosporangium vulgare*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**, 3003-3009.

- Frisvad J.C., Samson R.A. (2004). *Emericella venezuelensis*, a New Species With Stellate Ascospores Producing Sterigmatocystin and Aflatoxin B_1. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**, 672-680.

- Fujimoto H., Asai T., Kim J., Ishabashi M. (2006). Nine Constituents Including Six Xanthone-Related Compounds Isolated from Two Ascomycetes, *Gelasinospora santi-florii* and *Emericella quadrilineata*, Found in a Screening Study Focused on Immunomodulatory Activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **54**, 550—553.

- Heap I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. (2008), disponible en www.weedscience.com

- Itabashi T., Nozawa K., Nakajima S., Kawai K. (1993). A new azaphilone, falconensin H, from *Emericella falconensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **41**, 2040-2041.

- Joan M., Christopersen C., Barrero A., Oltra J., Justicia J., Rosales A. (2001). Bioactive Metabolites from a Marine-Derived Strain of the Fungus *Emericella variecolor*. *Journal of Natural Products*, **65**, 364-367.

- Kralj A., Kehraus S., Krick A., Eguereva E., Kelter G., Maurer M., Wortmann A., Fiebig H.H., Koenig G.M. (2006). Arugosins G and H: prenylated polyketides from the marine-derived fungus *Emericella nidulans* var. *acristata*. *Journal of Natural Products*, **69**, 995-1000.

- LeBaron H.M. (1991). Distribution and seriousness of herbicide resistant weed infestations world wide. En: *Herbicide Resistance in Weeds and Crop* (Z.C. Casely, G.W. Cussans and R.K. Atkin eds.). Butterwarth Henemann, Oxford. pp. 27-55.

- Macías F., Oliveros-Bastidas A., Marin D., Carrera C., Chinchilla N., Molinillo J. (2008). Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *The Phytochemical Society of Europe*, **7**, 179-194.

- Macias M., Gamboa A., Ulloa M., Toscano R.A., Mata R. (2001). Phytotoxic naphtopyranone derivatives from the coprofilus fungus *Guanomyces polythrix. Phytochemistry*, **58**, 751-758.

- Macias M., Hernández B.E., Jiménez M., González M., Glen A., Hanlin R., Hernámdez S., Saucedo A., Muria J., Anaya A. (2007). Naphtoquinone spiroketal with allelochemical activity from the new discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae. Phytochemistry*, **69**, 1185-1196.

- Martínez-Luis S., Pérez-Vásquez A., Mata R. (2007). Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry*, **68**, 1882-1903.

- Martínez-Luis S. (2007). *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmich, una fuente novedosa de fitotoxinas antagonistas de la proteína calmodulina. Tesis Doctorado, Facultad de Química UNAM.

- Mata R., Bye R., Linares E., Macias M., Revero-Cruz I., Pérez O., Timmermann N. (2003). Phytotoxic compunds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **64***,* 285-291.

- Matsuda Y., Koso A., Isao K., Hiroshi K. (1987). K-259-2, a new inhibitor of Ca^{2+} and calmodulin-dependet cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Micromonospora olivasterospora*. *The Journal of Antibiotics,* **40**, 1092-1100.

- Nielsen J., Nielsen P.H., Frisvad J.C. (1998). Fungal depside, guisinol, from a marine derived strain of *Emericella unguis*. *Phytochemistry*, **50**, 263-265.

- Nozawa K., Seyea H., Nakajima S. Udagawa S., Kawai K. (1987). Studies on fungal products. Part 10. Isolation and structures of novel bicoumarins, desertorins A, B, and C, from *Emericella desertorum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* I: *Organic and Bioorganic Chemistry*, **8**, 1735-1738.

- Nozawa K., Yuyama M., Nakajima S., Kawai K., Udagawa S. (1988). Studies on fungal products. Part 19. Isolation and structure of a novel indoloditerpene, emindole SA, from *Emericella striata*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* I: *Organic and Bioorganic Chemistry*, **8**, 2155-2160.

- Nozawa K., Nakajima S., Kawai K., Udagawa S. (1988). Studies on fungal products. Part 21. Isolation and structures of indoloditerpenes, possible biosynthetic intermediates to the tremorgenic mycotoxin, paxilline, from *Emericella striata*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* I: *Organic and Bioorganic Chemistry*, **9**, 2607-2610.

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

- Pereda-Miranda R., Mata R., Anaya A.L., Wickramaratne D.B., Pezzuto J.M., Kinghorm A.D. (1993). Tricolorin A, major phytogrowth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products*, **56**, 571-582.

- Pérez-Vázquez A., Linares E., Bye R., Cerda-García-Rojas C.M., Mata R. (2008). Phytotoxic activity and conformational analysis of thymol analogs from *Hofmeisteria schaffneri*. *Phytochemistry*, **69**, 1339-1347.

- Rivero-Cruz B.E., Rivero-Cruz I., Rodríguez-Sotres R., Mata R. (2007). Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry*, **68**, 1147-1155.

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

- Satoshi N., Yuzuru M., Kazuyuki I., Hiroshi K. (1986). K-252b, c and d, Potent Inhibitors of Protein Kinase C from microbial origin. *The Journal of Antibiotics,* **39**, 1066-1071.

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

- Sharma R.K., Wang J.H. (1979). Preparation and assay of the Ca^{2+}-dependent modulator protein. En: Greengard, P., Robinson, G.A. (eds.), Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vol. 10. Raven Press, New York, pp. 187-198.

- Singh H.P., Daizy R.B., Kohli R.K. (2003). Allelopathic Interactions and Allelochemicals: New Possibilities for Susteinable Weed Management. *Critical Reviews in Plant Science*, **22**, 239-311.

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

- Stegink S.J., Vaughn K.C. (1988). Norflurazon (SAN-9789) reduced abscisic acid levels in cotton seedlings: A glandless isoline is more sensitive than its glanded counterpart. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, **31**, 269-275.

- Surachai P., Jatupol L., Nattaya N., Sophon R., Prakitsin S., Jittra P., Ek S., Songchan P., Amorn P. (2006). Cytotoxic Avtivity of Four Xanthones from *Emericella variecolor,* an Endophytic Fungus Isolated from *Corton oblongifolius*. *Archives of Pharmaceutical Research*, **29**, 140-144.

- Tharayil-Santhakumar, Mechanism of Herbicides Resistence. En: Weeds, Plant & Soil Science, University of Massachusetss, Amherst, MA 01003. (2008). Disponible en www.weedscience.com.

- Tomoo H., Takeshi I., Nao K., Shun-ichi U., Ken-ichi K. (2006). Three New Types of Indoloditerpenes, Emindole PA-PC, from *Emericella purpurea.* Revision of the Structure of Emindole PA., *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **54**, 185-187.

- 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.

- Trigos A., Martínez L.C., López-Reyes E.E., (2005). Diketopiperazines from cultures of the fungus *Emericella rugulosa*. *Micología Aplicada International*, **17,** 1-4.

- Yoganathan K., Rossant C., Glover R., Cao S., Vittal J., Ng S., Huang Y., Buss A., Butler M. (2004). Inhibition of the Human Chemokine Receptor CCR5 by Variecolin and Variecolol and Isolation of Four New Variecolin Analogues, Emericolins A-D, from *Emericella aurantiobrunnea*. *Journal of Natural Products*, **67**, 1681-1684.

- Wei H., Itoh T., Kinoshita M., Nakai Y., Kurotaki M., Kobayashi M. (2004). Cytotoxic sesterterpenes, 6-epi-ophiobolin G and 6-epi-ophiobolin N, from marine derived fungus *Emericella variecolor* GF10. *Tetrahedron*, **60**, 6015-6019.

- Wei H., Masahiro K., Naoyuki K., Shunji A., Motomasa K. (2005). Shimalactones A, a novel polyketide, from marine-derived fungus *Emericella variecolor* GF10. *Tetrahedron*, **61**, 8054-8058.

- Wei H., Itoh T., Kotoku N., Kobayashi M. (2006), Shimalactones, neuritogenic polyketides from a marine-derived fungus *Emericella variecolor* GF10. *Heterocycles*, **68**, 111-123.