



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**TEMA DE TESIS**

**AISLAMIENTO, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO  
ANTAGONISTA SOBRE LA CALMODULINA DE ALGUNAS XANTONAS DE *EMERICELLA*  
25379.**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ



TUTORA: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG AÑO: 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada  
Vocal: Dr. Rafael Castillo Bocanegra  
Vocal: Dr. José Ignacio Regla Contreras  
Vocal: M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez  
Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz

### **Lugar donde se realizó la tesis:**

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

---

Q.F.B. José Alberto Rivera Chávez  
Sustentante

---

Dra. Rachel Mata Essayag  
Tutora

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad U.N.A.M., que a través de su programa de maestría me permitió ampliar mi formación académica y profesional.

Al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo otorgado a través de mi beca de maestría.

Al CONACyT por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo (Proyecto: CONACyT 99395).

A la Dra. María del Carmen González Villaseñor por proporcionar el material fúngico utilizado para la realización de este proyecto y por su valiosa asesoría en todo momento.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez y a la M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz, por el asesoramiento técnico brindado para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Martin González Andrade a quien agradezco todo el tiempo invertido en la realización de este proyecto, así como los consejos y conocimientos que depositó en mí, introduciéndome en el mundo de la química computacional. Gracias Martin.

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

Finalmente, quiero agradecer a la Dra. Rachel Mata Essayag por permitirme seguir perteneciendo a su grupo de trabajo, por la paciencia mostrada y por las valiosas enseñanzas y consejos que ha sabido expresar y que han servido para ampliar mis horizontes personales y profesionales. Gracias.

## ÍNDICE

	Página
<b>ÍNDICE</b>	i
<b>Lista de Figuras</b>	iii
<b>Lista de Espectros</b>	iv
<b>Lista de Tablas</b>	iv
<b>Lista de Abreviaturas</b>	vi
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>1. Introducción</b>	4
1.1 Productos naturales (PN) bioactivos de origen microbiano	4
1.2 Productos naturales bioactivos derivados de microorganismos marinos	10
<b>2. Antecedentes</b>	22
2.1 Señalización mediada por Ca <sup>2+</sup> y calmodulina (CaM)	22
2.2 Productos naturales y sintéticos inhibidores de la CaM	25
2.3 Técnicas experimentales utilizadas para la detección y caracterización de la interacción ligante-CaM	28
2.4 Antecedentes sobre el género <i>Emericella</i>	31
2.5 Antecedentes del hongo <i>Emericella</i> 25379	46
<b>3. Justificación y objetivos</b>	50
<b>4. Parte experimental</b>	52
4.1 Material fúngico	52
4.2 Análisis cromatográficos	52
4.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	53
4.4 Fermentación de la especie fúngica <i>Emericella</i> 25379	54
4.5 Estudio químico del hongo <i>Emericella</i> 25379	54
4.5.1 Obtención del extracto orgánico del micelio y medio de cultivo de <i>Emericella</i> 25379	54

4.5.2	Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>Emericella</i> 25379	54
4.5.3	Aislamiento, purificación e identificación de la emericellina ( <b>142</b> ) a partir de la fracción primaria F <sub>4</sub>	55
4.5.4	Aislamiento, purificación y elucidación estructural del acetato de variecoxantona A ( <b>148</b> ) a partir de la fracción F <sub>5</sub>	55
4.5.5	Aislamiento, purificación e identificación de la tajixantona ( <b>147</b> ) y la 14-metoxitajixantona ( <b>143</b> ) a partir de la fracción primaria F <sub>7</sub>	56
4.5.6	Separación, purificación e identificación del 15-acetil hidrato de tajixantona ( <b>145</b> ) y 16-clorotajixantona ( <b>146</b> ) a partir de la fracción primaria F <sub>9</sub>	57
4.5.7	Separación, purificación e identificación del hidrato de tajixantona ( <b>23</b> ) a partir de la fracción primaria F <sub>11</sub>	58
4.6	Ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor <i>hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR</i>	59
4.7	Cálculos de acoplamiento molecular	60
4.7.1	Preparación de las estructuras para los cálculos	60
4.7.2	Optimización geométrica	60
4.7.3	Acoplamiento molecular (AM)	60
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	62
5.1	Obtención de metabolitos tipo xantona a partir de <i>Emericella</i> 25379	62
5.2	Elucidación estructural de los productos obtenidos	63
5.2.1	Elucidación estructural del acetato de variecoxantona A ( <b>148</b> )	63
5.2.2	Elucidación estructural de la 16-clorotajixantona ( <b>146</b> )	70
5.2.3	Elucidación estructural de la tajixantona ( <b>147</b> )	71
5.3	Determinación de la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona ( <b>23</b> ) con la CaM	77
5.3.1	Ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor <i>hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR</i>	77
5.4	Estudios de acoplamiento molecular (AM)	82
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	97
<b>7.</b>	<b>Perspectivas</b>	99
<b>8.</b>	<b>Bibliografía</b>	100

## Lista de Figuras

Figura		Página
1	Diferentes conformaciones de la CaM a) apo CaM, b) holo CaM, c-i) complejos Ca <sup>2+</sup> -CaM-ONS, canal de K <sup>+</sup> , MKIIa, MKK, péptido blanco de la bomba de Ca <sup>2+</sup> , toxina del ántrax y MLCK, respectivamente. Modificado de Vetter y Leclerc 2003.	24
2	Compuestos sintéticos inhibidores de la CaM.	25
3	Productos naturales selectos con propiedades antagonistas sobre la CaM.	27
4	Modelo molecular de las mutaciones de los residuos 39 y 91 y la unión del bimanio. En dorado se observan los cuatro iones Ca <sup>2+</sup> , en azul los dominios globulares -N y -C terminales, así como la región hidrofóbica que los une, en bastones verdes el componente transductor de señales ( <i>mBBr</i> ) y en bastones naranjas el inhibidor <b>CPZ</b> .	30
5	<i>Emericella</i> 25379.	46
6	Modelo propuesto por AM para la interacción del compuesto <b>23</b> con la CaM, en bastones azules se muestra el inhibidor clásico <b>TFP</b> , en bastones naranjas el hidrato de tajixantona ( <b>23</b> ) y en morado la superficie de la CaM.	49
7	A) Coral blando ( <i>Pacifigorgia rutilia</i> ), B) <i>Emericella</i> 25379.	52
8	Metabolitos novedosos de <i>Emericella</i> 25379.	63
9	Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el acetato de variecoxantona A ( <b>148</b> ).	65
10	Correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC para la 16-clorotajixantona ( <b>146</b> ).	70
11	Principales fragmentaciones de la tajixantona ( <b>147</b> ).	75
12	Espectros de fluorescencia y curvas de titulación del biosensor <i>hCaM L39C-mBBr/V91C-mBBr</i> con los ligantes a) hidrato de tajixantona ( <b>23</b> ), b) 14-metoxitajixantona ( <b>143</b> ), c) tajixantona ( <b>147</b> ), d) 15-acetil hidrato de tajixantona (15-AHT, <b>145</b> ), e) emericellina ( <b>142</b> ), f) shamixantona ( <b>141</b> ), g) acetato de variecoxantona A ( <b>148</b> ), h) 16-clorotajixantona e i) clorpromazina ( <b>CPZ</b> ).	78
13	Densidad electrónica de los compuestos <b>23</b> , <b>145</b> , <b>143</b> y <b>147</b> , calculada y visualizada con Spartan '08.	82
14	Análisis de los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción con los ligantes ensayados. En el eje de las abscisas se representan los aminoácidos involucrados en las interacciones y, en el eje de las ordenadas el número de ligantes que interaccionan con éstos.	91
15	A) Sitio de unión a la CaM de los ligantes analizados. B) residuos de aminoácidos involucrados en la interacción. C) líneas rojas residuos de aminoácidos, bastones amarillos <b>23</b> , bastones naranjas <b>147</b> , bastones verdes inhibidor clásico <b>TFP</b> .	92
16	Modelo molecular construido para el sitio de unión del ligante <b>142</b> con la CaM. En líneas rojas se muestran los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción y en bastones amarillos <b>142</b> .	93

### Lista de Figuras (Continuación)

Figura		Página
17	Superposición de los compuestos <b>23</b> (bastones amarillos) y <b>145</b> (bastones naranjas) en el sitio de unión a la CaM (superficie verde; la línea punteada muestra el enlace de hidrógeno que se establece entre el OH-25 de los compuestos y la metionina 124 (Met 124).	94
18	Superposición de los compuestos <b>147</b> (bastones amarillos), <b>141</b> (bastones naranjas) y <b>148</b> (bastones rojos) en el sitio de unión a la CaM (superficie verde).	95
19	Superposición de los compuestos <b>146</b> (bastones amarillos) y <b>23</b> (bastones naranjas) en el sitio de unión a la CaM (superficie verde). Los bastones morados indican los residuos de Met-124 y Met-144 involucrados en la interacción de éstos compuestos; las líneas punteadas indican la formación de enlaces de hidrógeno.	95

### Lista de Espectros

Espectro		Página
1	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN del acetato de variecoxantona A ( <b>148</b> ).	67
2	Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN del acetato de variecoxantona A ( <b>148</b> ).	68
3	Espectro bidimensional HMBC del acetato de variecoxantona A ( <b>148</b> ).	69

### Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Metabolitos biodinámicos selectos aislados a partir de hongos marinos.	15
2	Condiciones utilizadas para la separación y purificación del acetato de variecoxantona A ( <b>148</b> ).	56
3	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para el acetato de variecoxantona A ( <b>148</b> ).	66
4	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para la 16-clorotajixantona ( <b>146</b> ).	73
5	Datos espectroscópicos de RMN de la 14-metoxitajixantona ( <b>143</b> ) y la tajixantona ( <b>147</b> ).	74
6	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para el hidrato de tajixantona ( <b>23</b> ), la emericellina ( <b>142</b> ) y el 15-acetil hidrato de tajixantona ( <b>145</b> ), compuestos aislados de <i>Emericella</i> 25379.	76



### Lista de Tablas (Continuación)

Tabla		Página
7	Resultados del ensayo de fluorescencia; cálculo de la constante de disociación ( $K_d$ ) y coeficiente de correlación cuadrático ( $R^2$ ) del ajuste para los compuestos <b>23</b> , <b>143</b> , <b>147</b> , <b>145</b> , <b>142</b> , <b>141</b> , <b>148</b> , <b>146</b> y <b>CPZ</b> .	80
8	Parámetros e información sobre la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona ( <b>23</b> ) y la CaM generados por acoplamiento molecular. Estructura optimizada del ligante y energía calculada en unidades arbitrarias (u.a), energía libre de unión (ELU), constante de inhibición estimada ( $K_i$ ), residuos involucrados en la interacción.	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADT	AutoDock Tools
AM	Acoplamiento molecular
AMPc	Adenosina monofostafa cíclico
AcOH	Ácido acético
°C	Grados Celsius
Cl <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CPZ	Clorpromazina
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
CaM	Calmodulina
CaMBP	Proteínas de unión a calmodulina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de dobles
ELU	Energía libre de unión
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
FDA	Administración de alimentos y fármacos
FRET	Resonancia de fluorescencia de transferencia de energía

g	Gramos
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
g/mol	Gramos por mol
Hex	Hexano
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
IMPDH	Inosina monofosfato deshidrogenasa
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
Kcal	Kilocalorias
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{ex}$	Longitud de onda de excitación
$K_d$	Constante de disociación
kDa	Kilodaltones
$K_i$	Constante de inhibición
L	Litros
LGA	Algoritmo Genético Lamarkiano
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
M <sup>+</sup>	Ión molecular
mBBr	Monobromobimano
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mL	Mililitros
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
nm	Nanómetros

nM	Nanomolar
NOS	Oxido nítrico sintasa
p.f.	Punto de fusión
PDB	Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank)
PDE-1	Fosfodiesterasa dependiente de calmodulina.
PN	Productos naturales
ppm	Partes por millón
$R^2$	Coefficiente de correlación cuadrático
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
TFP	Trifluoroperazina
TMS	Tetrametilsilano
$t_R$	Tiempo de retención
$\delta$	Desplazamiento químico
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar
UV	Ultravioleta

## Resumen

El presente trabajo describe el aislamiento e identificación química estructural de los análogos minoritarios del hidrato de tajixantona (**23**) presentes en la especie fúngica *Emericella* 25379 y, su caracterización como nuevos inhibidores de la proteína calmodulina (CaM). La CaM juega un papel importante en la transducción de señales intracelulares de calcio y por tanto regula un número importante de procesos fisiológicos.

Para la obtención de los metabolitos minoritarios se preparó un extracto orgánico a partir del micelio y medio de cultivo del hongo. Posteriormente, el extracto se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CCA) generando 11 fracciones primarias. La resolución de éstas por medio de la aplicación de distintas técnicas cromatográficas convencionales permitió el aislamiento de dos metabolitos nuevos caracterizados como 16-clorotajixantona (**146**), y acetato de variecoxantona A (**148**). También fue posible aislar y caracterizar los siguientes productos conocidos: hidrato de tajixantona (**23**), emericellina (**142**), 14-metoxitajixantona (**143**), 15-acetil hidrato de tajixantona (**145**) y tajixantona (**147**).

De acuerdo a los experimentos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM usando el biosensor fluorescente *hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR*, se determinó que todos los productos interaccionan directamente con la CaM; la magnitud de las constantes de disociación ( $K_d$ ) calculadas para los mismos se encuentra en el orden nanomolar; la  $K_d$  es un parámetro que indica el grado de afinidad de los productos por la proteína. Por lo que las xantonas de *Emericella* 25379 son excelentes ligantes de la CaM con una excelente afinidad. El análisis estructural de estas moléculas mostró una relación estructura-afinidad donde la ausencia del anillo pirano fusionado al núcleo xantona y la presencia de una cadena preñlica oxigenada con bajo potencial electrostático mejoran notablemente la afinidad de las xantonas por la CaM.

Por último, los estudios de acoplamiento molecular permitieron proponer que el hidrato de tajixantona (**23**) y sus análogos se unen a la proteína CaM en una región cercana a la de los inhibidores clásicos trifluoroperazina (**TFP**) y clorpromazina (**CPZ**).

## Abstract

This work describes the isolation, chemical characterization and anti-CaM inhibitor properties of several tajixanthone hydrate (**23**) analogs from the fungus *Emericella 25379*.

The organic extract prepared from the mycelium and culture medium of the fungi was fractionated by open column chromatography to yield 11 primary fractions. The application of several chromatographic techniques led to the isolation of two new prenylated xanthenes characterized as 16-chlorotajixanthone (**146**), and variecoxanthone A acetate (**148**), as well as five known products, namely tajixanthone hydrate (**23**), emericellin (**142**), 14-methoxytajixanthone (**143**), 15-acetyl tajixanthone hydrate (**145**) and tajixanthone (**147**).

Quenching fluorescence experiments using the novel fluorescent biosensor *hCaM* L39C-*mBBR*/V91C-*mBBR* indicated that **23**, **141**, **142**, **143**, **145**, **147** and **148** interacted with CaM. In all cases, the dissociation constant ( $K_d$ ) values were in the nanomolar range. These compounds differed in the presence or absence of a pyranic ring fused to the xanthone core, and a prenylated chain in C-4 with different oxidation level.

Docking studies were performed aiming to determine the probable binding site (pocket) of tajixanthone hydrate (**23**) and its analogues. To assess this interaction, 14 compounds (including the seven metabolites isolated in the present study, and seven reported in similar studies) were analyzed. The global (*in silico* and *in vitro*) results suggested that the analogues carrying an oxygenated substituent, possessing the less electrostatic potential at the prenylated chain and lacking the pyrane ring, displayed the best affinity for CaM. Furthermore, the binding site proposed through the docking studies for the tajixanthone hydrate (**23**) and analogues, was similar to that for the classic inhibitors trifluoroperazine (**TFP**) and chlorpromazine (**CPZ**).

# 1. Introducción

## 1.1 Productos naturales (PN) bioactivos de origen microbiano

Los productos naturales (PN) derivados de plantas, animales y microorganismos han jugado un papel importante en el tratamiento de diversos padecimientos desde el inicio de la medicina. De tal forma que la investigación química y farmacológica de estos productos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos es de gran interés. Debido a los avances en las técnicas para el aislamiento y caracterización de nuevos metabolitos secundarios, el número de compuestos descubiertos hasta el primer lustro del siglo XXI se aproxima al millón (Berdy *et al.*, 2005). De éstos, alrededor del 50-60% son de origen vegetal y, alrededor de un 5% se obtienen a partir de microorganismos. Cabe destacar que del total de PN reportados en la literatura, alrededor del 25% muestran alguna actividad biológica de los cuales aproximadamente el 10% se han aislados de microorganismos. La mayoría de estos productos (45%) provienen de actinomicetos, un 38% de hongos y, un 17% de bacterias (Berdy *et al.*, 2005). Muchas de estas sustancias han jugado un papel importante en la preservación de la salud y bienestar de la especie humana (Koehn y Guy, 2005; Demain y Sánchez, 2009). Así, desde el descubrimiento de la penicilina a principios de la década de los 40's en el siglo XX, los microorganismos se han convertido en una fuente invaluable de metabolitos biodinámicos, estructuralmente diversos y han contribuido al descubrimiento de una gran variedad de agentes antibióticos incluyendo, además de las penicilinas, a las cefalosporinas, aminoglicósidos y tetraciclinas, entre otros (Dewick, 2002). Así mismo, algunos otros poseen propiedades inmunosupresoras (ciclosporina y rapamicina), hipocolesterolemiantes (lovastatina, mevastatina), antihelmínticas (ivermectina), antidiabéticas (acarbose) y anticancerígenas (pentostatina y epirubicina) entre otras (Newman *et al.*, 2003; Butler *et al.*, 2005; Sneader *et al.*, 2005).

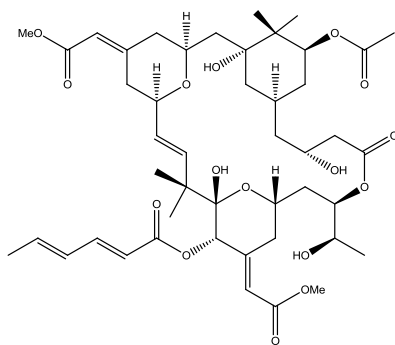
A continuación se describen algunos ejemplos de compuestos biodinámicos de origen microbiano que han sido aprobados por organismos internacionales de salud como la FDA entre los años de 2000 y 2005 para el tratamiento de diversas enfermedades.



La briostatina-1 (**1**, GPC Biotech<sup>®</sup>. Inc., 2003) es un policétido raro basado en un sistema de anillos tipo briopirano con propiedades antitumorales. Este producto se aisló por primera vez a partir de la especie *Bulgura neritina* pero, actualmente se sabe que el productor verdadero es la protobacteria *Candidatus endobogula sertula*, especie que establece una relación simbiote con el briozano *Bulgura neritina*.

El mecanismo de acción antitumoral del producto **1** se da a través de su interacción con los mismos receptores de los ésteres de forbol, un grupo de compuestos promotores de la proliferación de tumores, pero a diferencia de ellos, la briostatina-1 (**1**) inhibe el crecimiento de los mismos debido a que provoca un desequilibrio de las isoformas de la proteína cinasa C de las células tumorales, conduciendo así, a una inhibición en su crecimiento, alteraciones en la diferenciación y finalmente, a la muerte celular.

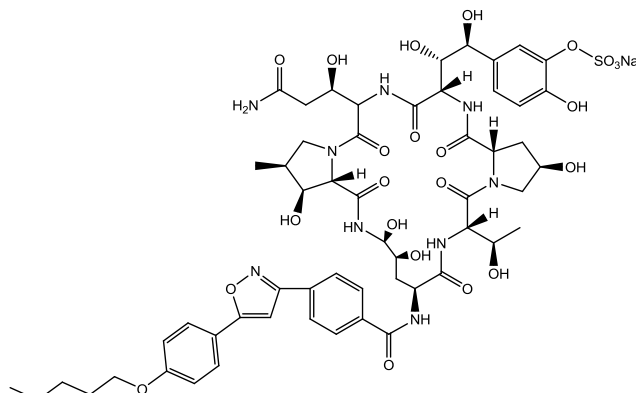
Cabe mencionar que el uso de la briostatina-1 (**1**) como agente antitumoral fue aprobado en 2003 por la FDA. El producto se usa en combinación con paclitaxel para el tratamiento del cáncer de esófago (Newman y Cragg, 2004; Young-Won, 2006).



briostatina-1 (**1**)

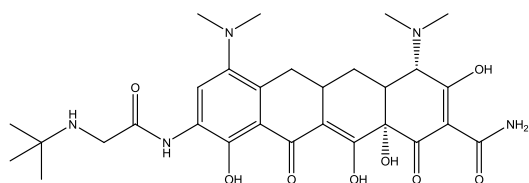
El micafunginato de sodio (**2**, Micamina<sup>®</sup>, Fujisawa, 2005) es un agente antifúngico aislado del hongo *Cleophoma empetri*. Este compuesto presenta una buena actividad biológica contra una amplia variedad de especies del género *Candida*, incluyendo algunas cepas resistentes. Este metabolito también inhibe la proliferación de algunas cepas del género *Aspergillus* debido a que es un antagonista de la enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glucano

sintetasa presente en una gran variedad de hongos (Jarvis *et al.*, 2004; Frattarelli *et al.*, 2004).



micafunginato de sodio (**2**)

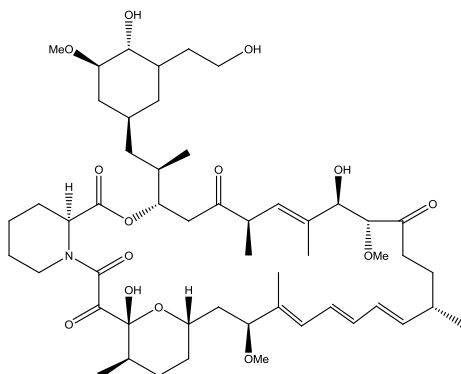
La tigeciclina (**3**, Tigacil<sup>®</sup>, Wyeth, 2005) es un antibacteriano semisintético derivado de la minociclina. Su potencia como antibacteriano es mayor que la de las tetraciclinas convencionales e inhibe el crecimiento de algunos microorganismos resistentes a éstas. El derivado se utiliza bajo la forma de solución inyectable a diferencia de las otras tetraciclinas comerciales (Zhanel *et al.*, 2004).



tigeciclina (**3**)

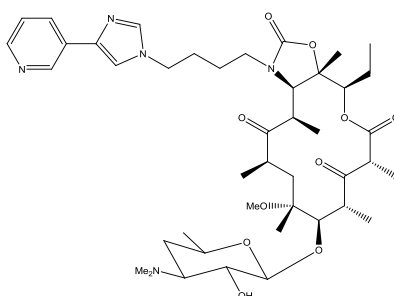
El everolimus (**4**, Certican<sup>®</sup>, Novartis, 2004) es un fármaco de administración oral derivado de la rapamicina aislada de *Streptomyces hygroscopicus*. Este producto presenta una actividad inmunosupresora gracias a su efecto inhibitorio de la producción de algunos factores de transferencia que modulan la proliferación de células hematopoyéticas

(células T y B) y no hematopoyéticas a través de la inhibición de la enzima cinasa p70 S6 que participa en la fase G<sub>1</sub>/S del ciclo de división celular (Chapman y Perri, 2004).



everolimus (4)

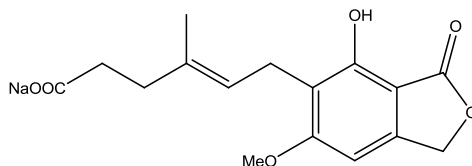
La telitromicina (5, Ketek<sup>®</sup>, Aventis, 2004) es una macrólida semisintética de 14 miembros como la eritomicina A obtenida a partir de *Saccharopolyspora erythraea*; este compuesto inhibe la síntesis de proteínas mediante su interacción con el sitio peptidiltransferasa de la subunidad ribosomal 50S, además, presenta una actividad antibacteriana significativa contra algunos patógenos del tracto respiratorio resistentes a otras macrólidas comerciales (Zhanet *et al.*, 2002).



telitromicina (5)

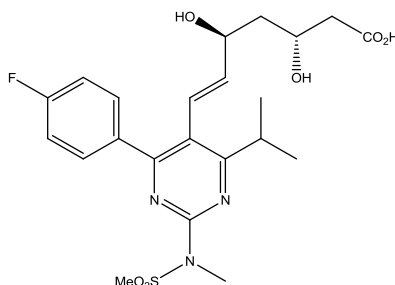
El micofenolato de sodio (6, Zavesca<sup>®</sup>, Actelion, 2003) aislado de *Penicillium brevicompactum* es un inhibidor reversible, no competitivo de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), encargada de la regulación de la síntesis *de novo*

de bases nitrogenadas como la guanina (Bardsley-Elliot *et al.*, 1999; Curran *et al.*, 2005), este compuesto se usa como agente inmunosupresor.



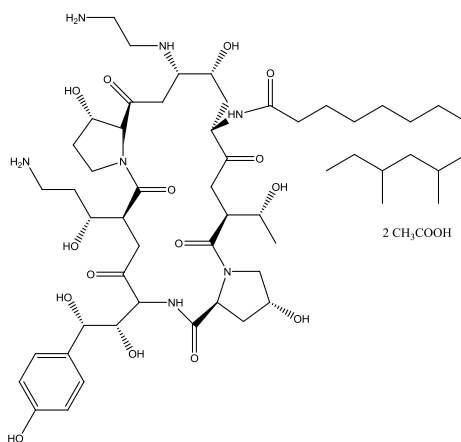
micofenolato de sodio (6)

El ácido rosuvastatínico (7, Crestor®, AstraZeneca, 2003) es un derivado de la mevastatina. Se aisló de *Penicillium citrinum* y *P. brevicompactum* e inhibe la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa involucrada en la biosíntesis de colesterol (Carswell *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2004). Este compuesto se utiliza con éxito como agente anti-hipercolesterolemia.



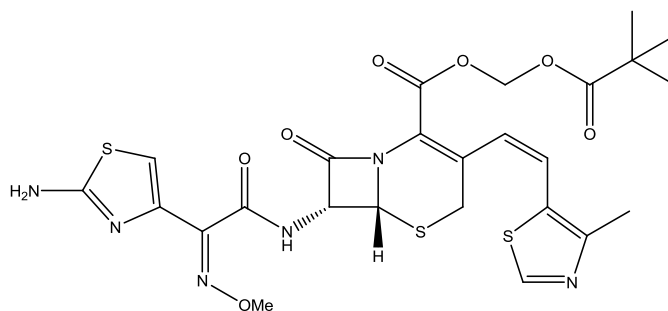
ácido rosuvastatínico (7)

El acetato de caspofungina aislado de *Glarea lozoyensis*, (8, Cansidas®, Merck, 2001) es un lipopéptido semisintético derivado de la neumocandina B<sub>0</sub> que inhibe la síntesis del β-(1,3)-D-glucano presente en una gran variedad de hongos como componente de la pared celular. Este efecto conduce a un desbalance osmótico y por lo tanto, a la muerte del microorganismo (Keating *et al.*, 2003; McCormack *et al.*, 2005).



acetato de caspofungina (8)

El cefditoren pivoxilo (9, Spectracef®, TAP, 2001) es un profármaco oral de algunas especies de *Cephalosporium*; este compuesto se hidroliza por acción de las esterasas intestinales convirtiéndose en el metabolito activo, el cefditoren que posee un núcleo estructural similar a las cefalosporinas. El compuesto es un antibiótico de amplio espectro contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos y fue aprobado en el año 2001 para el tratamiento de la bronquitis (Darkes *et al.*, 2002).

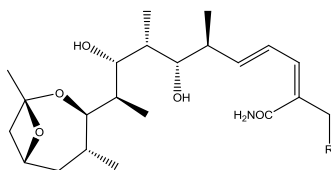


cefditoren (9)

## 1.2 Productos naturales bioactivos derivados de microorganismos marinos

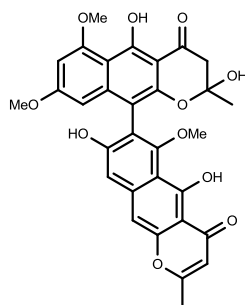
Los microorganismos aislados a partir de ambientes marinos (bacterias, hongos y microalgas) han sido menos estudiados que sus contrapartes terrestres. Sin embargo, en los últimos años han sido de gran interés como fuentes potenciales de moléculas bioactivas de posible uso terapéutico o como herramientas de investigación. En este contexto, el crecimiento en el estudio de la química de organismos marinos ha conducido al aislamiento de alrededor de 16,000 nuevas moléculas (Kosta, *et al.*, 2008), y algunas han presentado un notable potencial terapéutico de tal forma que encuentran en estudios preclínicos y clínicos (Haefner *et al.*, 2003; Newman y Cregg 2004, Simmons *et al.*, 2005, Saleem *et al.*, 2007). Algunos ejemplos selectos de estos metabolitos se resumen a continuación:

Los salincetales A y B (**10** y **11** respectivamente) son policétidos bicíclicos aislados del cultivo de *Salinospora arenicola* que inhiben la inducción de la enzima ornitina descarboxilasa, un blanco de acción de interés en el tratamiento de algunos tipos de neoplasias (Williams *et al.*, 2007).



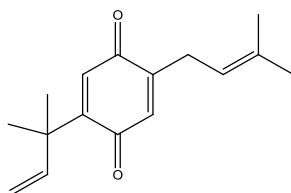
R = H, salincetal A (**10**); R = OH salincetal B (**11**)

La nigerasperona C (**12**), una nafto- $\gamma$ -pirona aislada de *Aspergillus niger*, presenta actividad antioxidante y antibacteriana inhibiendo la proliferación de algunas cepas de *Candida albicans* (Zhang *et al.*, 2007).



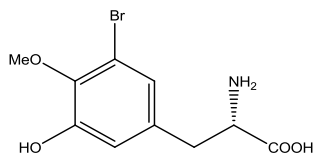
nigerasperona C (**12**)

A partir de algunas especies de algas pardas y rojas se han aislado compuestos meroterpenoides, además de una gran cantidad de polialcoholes halogenados. Así, por ejemplo, del alga café *Perithalia capillaris* se aisló la quinona prenilada **13** que disminuye la producción del radical superóxido en neutrófilos e inhibe la proliferación de la línea celular HL-60 (Laird, *et al.*, 2007).



2-(1,1-dimetil-2-propenil)-5-(3-metil-2-butenil)-1,4-benzoquinona (**13**)

El alga roja *Rhodomela confervoides* produce una amplia gama de bromofenoles entre los que destaca un derivado bromado de tirosina, con propiedades antioxidantes notables (Ma *et al.*, 2007).

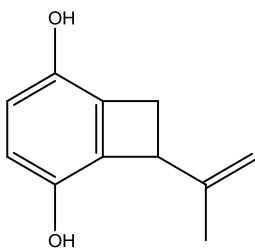


ácido 2-amino-3-(3-bromo-5-hydroxi-4-metoxifenil)propanoico (**14**)

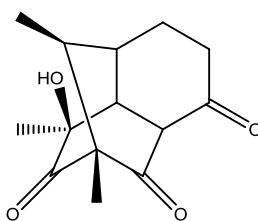
Aunque los primeros estudios sobre el metabolismo de los hongos se realizaron al término de la primera guerra mundial por Harold Reistrick, y continuaron durante las

siguientes cuatro décadas para generar una gran cantidad de metabolitos terapéuticamente útiles (Raistrick 1949; Liberra y Lindequist 1995; König y Wright 1996; König y Wright 1999; Mayer y Gustafson 2004), la química de los hongos marinos no floreció si no hasta principios de la década de los 90's. A partir de entonces y a la fecha se han descrito una gran variedad de productos aislados de hongos marinos que incluyen policétidos, terpenoides, alcaloides y péptidos (Saleem *et al.*, 2007).

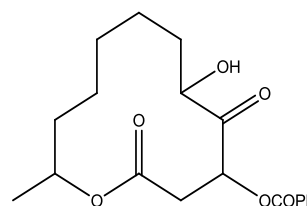
Dentro del grupo de los policétidos destaca el 7-isopropenilbicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-2,5-diol (**15**) un compuesto con notables propiedades antioxidantes (Abdel-Lateff, *et al.*, 2002). Otro policétido interesante es la penicilona A (**16**, Liu *et al.*, 2005) aislada del hongo *Penicillium terrestre* y que presenta una excelente actividad citotóxica contra las líneas celulares P338 y A-549. Otro ejemplo digno de mencionar es la macrólida de doce miembros esporiolida A (**17**, Tsukamoto *et al.*, 2004) que se obtuvo de un aislamiento de *Cladosporium* y presenta actividad citotóxica contra la línea celular L1210 (linfoma murino).



7-isopropenilbicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-2,5-diol (**15**)



penicilona A (**16**)

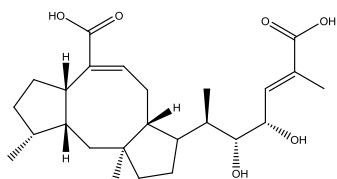


esporiolida A (**17**)

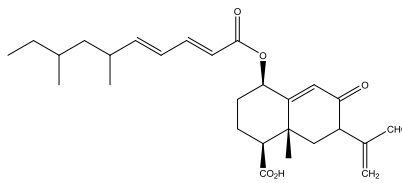
En el grupo de los terpenoides la variedad estructural es mucho menor en comparación con los policétidos. Sin embargo, dentro de las categorías de los sesterterpenoides y sesquiterpenoides con esqueletos carbonados novedosos se han caracterizado al ácido haloroselénico (**18**) obtenido del cultivo de *Halorosellinia oenica* BCC 5149. Este producto posee una actividad antibacteriana significativa (Chinworrungsee



*et al.*, 2001). Otro terpenoide interesante es el aremofilano 07H239-A (**19**), aislado de *Xylariaceous* sp., el cual demostró una actividad anticancerígena selectiva contra la línea celular CCFRCM (leucemia, McDonald *et al.*, 2004).

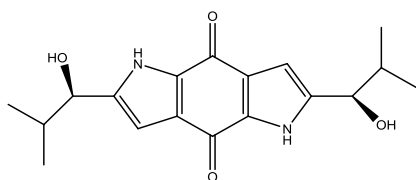


ácido haloroselénico (**18**)

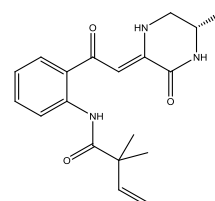


aremofilano 07H239-A (**19**)

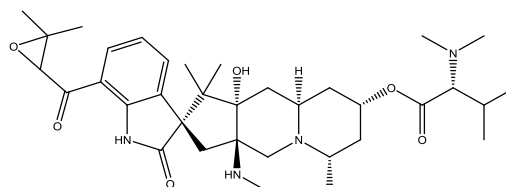
En el caso de los alcaloides la diversidad estructural y las actividades biológicas son variadas. Muchas de estas moléculas son candidatos idóneos para el desarrollo de nuevos fármacos; por ejemplo, la terrusinona (**20**) una dipirrolbenzoquinona derivada del hongo *Aspergillus terreus* es un potente protector contra la radiación UV-A (Lee *et al.*, 2003). La dicetopiperazina golmaenona (**21**) obtenida de un aislamiento de *Aspergillus* inhibe la formación de radicales libres (Li *et al.*, 2004). El alcaloide citrinadina (**22**) obtenido a partir del hongo *Penicillium citrinum* (Tsuda *et al.*, 2004) no posee actividades biológicas comprobadas, sin embargo, tiene una estructura pentacíclica poco usual y da fe de la diversidad estructural de los productos biosintetizados por hongos marinos.



terrusinona (**20**)



golmaenona (**21**)



citrinadina (**22**)

En la Tabla 1 se incluyen otros ejemplos de metabolitos biodinámicos aislados a partir de hongos de origen marino.

**Tabla 1.** Metabolitos biodinámicos selectos aislados a partir de hongos marinos.

<b>Especie fúngica</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencias</b>
<i>Penicillium rugulosum</i>	Pruguseno A1-A3 Prugoseno B1-B2 Pruguseno C1-C2	Antiinfectivo	Sufrin <i>et al.</i> , 2009 Lang <i>et al.</i> , 2007 Blunt <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Sorbisilactona A	Tratamiento de leucemia, anti-VIH	Bringmann <i>et al.</i> , 2007
<i>Myrothecium verrucaria</i>	3-hidroxiroridina E 13'-Acetil tricoverina Roridina A Roridina L-M Verucerina M Verucerina A Isororedina A Epiroridina E Tricoverina A-B	Antitumoral	Needham <i>et al.</i> , 1994

**Tabla 1.** Metabolitos biodinámicos selectos aislados a partir de hongos marinos. (Continuación).

<b>Especie fúngica</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencias</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Asperazina Malformina C Bicoumanigrina Aspernigrina B	Tratamiento de leucemia Antitumoral Anticancerígeno Neuroprotector	Cheng <i>et al.</i> , 1994; Varoglu <i>et al.</i> , 2000; Govek <i>et al.</i> , 2001; Hiort 2004 <i>et al.</i> , 2004; Speitling <i>et al.</i> , 2007
<i>Myrothecium</i> sp. JS9	Roridina D	Antifúngico	Xie <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium citrinum</i>	Isoclocitrinol A 22-acetil isoclocitrinol A	Antibacteriano	Amagata <i>et al.</i> , 2003
<i>Penicillium</i> sp.	Oxalina Grsiseofulvina Comunesina B-D	Antiproliferativo Antifúngico Antitumoral	Kolachana <i>et al.</i> , 1994; Koizumi <i>et al.</i> , 2004; Jadulco <i>et al.</i> , 2004
<i>Acremonium</i> sp.	Efraeptina E-F Efraeptina E $\alpha$ Efraeptina G-H RHM 1	Citotóxico, antibacteriano	Boot <i>et al.</i> , 2006; Boot <i>et al.</i> , 2007
<i>Trichoderma harzianum</i>	Tricodenona A-C	Citotóxico	Amagata <i>et al.</i> , 1998; Usami <i>et al.</i> , 2000; Bungi <i>et al.</i> , 2004

**Tabla 1.** Metabolitos biodinámicos selectos aislados a partir de hongos marinos. (Continuación).

<b>Especie fúngica</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencias</b>
<i>Gymnascella dankaliensis</i> OUPS-N134	Gimnostatina A-C Gimnostatina F-G Gimnostatina Q-R Gimnasterona A-D Dankastatina A-B Dankasterona A	Citotóxico, tratamiento de leucemia	Numata <i>et al.</i> , 1997; Amagata <i>et al.</i> , 1998; Amagata <i>et al.</i> , 1999; Mayer <i>et al.</i> , 1999; Amagata <i>et al.</i> , 2006; Amagata <i>et al.</i> , 2007; Amagata <i>et al.</i> , 2008
<i>Phoma</i> sp. Q60596	YM-202204	Antifúngico	Nagai <i>et al.</i> , 2002
<i>Fusarium oxysporum</i> DLFP2008005	Compuesto no identificado	Antibacteriano, antifúngico	Biabani <i>et al.</i> , 1998
<i>Cladosporium herbarum</i>	Ácido sumíkico	Antibacterial	Jadulco <i>et al.</i> , 2001
<i>Ulocladium botrylis</i> 193A4	Ulocladol 1-hidroxi-6-metil-8-(hidroximetil)- xantona	Antimicrobiano Antifúngico	Höller <i>et al.</i> , 1999; König <i>et al.</i> , 2005
<i>Curvularia lunata</i>	Lunatina Citoskirina A	Antibacteriano	Kim <i>et al.</i> , 1998; Jadulco <i>et al.</i> , 2002;
<i>Aspergillus insuetus</i>	Terretonina E-F	Inhibidor de la cadena respiratoria	López-Gresa <i>et al.</i> , 2009

**Tabla 1.** Metabolitos biodinámicos selectos aislados a partir de hongos marinos. (Continuación).

<b>Especie fúngica</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencias</b>
<i>Aspergillus versicolor</i>	Aspergilitina Felutamida C	Antibacterial Citotóxico	Lin <i>et al.</i> , 2002; Lee <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium cf. montanense</i>	Xestodecalactona B	Antifúngico	Edrada <i>et al.</i> , 2002; Thakur <i>et al.</i> , 2003
<i>Penicillium brocae</i>	Brocaenol A-C	Citotóxico	Ebel <i>et al.</i> , 2006
<i>Coniothyrium</i> sp. 193477	Cripto-sporiopsinol	Antibacteriano	Höller <i>et al.</i> , 1999
<i>Spicellum roseum</i> 193H15	Tricodermol	Anticancerígeno	Chatterjee <i>et al.</i> , 2004; Kralj <i>et al.</i> , 2007
<i>Penicillium auratiogriseum</i>	Fructigenina A Aurantiomida B-C (S)-2,4-dihidroxi-1-butil(4-hidroxi)-benzoato	Antitumoral Citotóxico Antitumoral	Xin <i>et al.</i> , 2005; Xin <i>et al.</i> , 2007
<i>Exophiala pisciphila</i> N110102	Exophilina A	Antibacterial	Doshida <i>et al.</i> , 1996
<i>Microsphaeropsis</i> sp. H5-50	Microsphaeropsisina (R)-melleina (3R,4S)- hidroximelleina (3R,4R)- hidroximelleina	Antifúngico Antimicrobiano Antimicrobiano Antimicrobiano	Höller <i>et al.</i> , 1999

**Tabla 1.** Metabolitos biodinámicos selectos aislados a partir de hongos marinos. **(Continuación).**

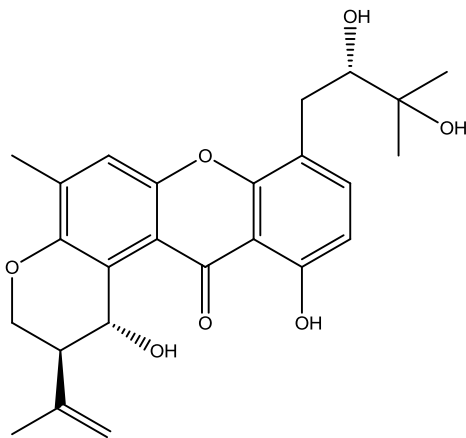
<b>Especie fúngica</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencias</b>
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	10-hidroxi-18-metoxil-betaenona	Inhibidor de la proteína cinasa C	Brauers <i>et al.</i> , 2000
<i>Metarrhizium</i> sp. 001103	Destruxina A Clorohidrina E	Antitumoral	Boot <i>et al.</i> , 2007
<i>Microascus longirostris</i> SF-73	Catstatina A-C	Inhibidor de la cisteína proteasa	Yu <i>et al.</i> , 1996
<i>Aspergillus ostianus</i> 01F313	8-cloro-9-hidroxi- 8,9-deoxiasperlactona Aspergilida A-C	Antibacteriano  Tratamiento de leucemia	Namikoshi <i>et al.</i> , 2003  Kito <i>et al.</i> , 2008
<i>Cryptosphaeria eunomia</i>	Diaporquina A-B	Antibacteriano	Yoshida <i>et al.</i> , 2007
<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	Modiolida A-B	Antifúngico	Tsuda <i>et al.</i> , 2003b
<i>Ascochyta salicorniae</i>	Ascosalipirrolidona A	Antifúngico	Osterhage <i>et al.</i> , 2000
<i>Keissleriella</i> sp. YS4108	3,6,8-trihidroxi-3-[3,5-dimetil-2-oxo-3(E)-heptenil]-2,3-dihidronaftalen-1(H)-ona	Antifúngico	Liu <i>et al.</i> , 2002

**Tabla 1.** Metabolitos biodinámicos selectos aislados a partir de hongos marinos. (Continuación).

<b>Especie fúngica</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencias</b>
<i>Trichoderma virens</i>	Tricodermamida A	Antibacteriano	Garo <i>et al.</i> , 2003
<i>Stilbella aciculosa</i>	Ácido fusídico	Antibacteriano	Kuznetsova <i>et al.</i> , 2001
<i>Aspergillus ochraceus</i>	CJ-17665	Antibacteriano	Sugie <i>et al.</i> , 2001
<i>Halocyphina villosa</i>	Sicaina	Antibacteriano	Li <i>et al.</i> , 2005
<i>Penicillium</i> sp.	7-deacetoxiyanotona A	Antibacteriano	Li <i>et al.</i> , 2003a
<i>Kirschsteiniothelia maritima</i>	Ascochital	Antibacteriano	Bugni <i>et al.</i> , 2004
<i>Fusarium</i> sp.	Eniatina B Neomanguicol B	Antibacteriano	Jiang <i>et al.</i> , 2004 Reener <i>et al.</i> , 1998
<i>Halorosellinia oceanica</i>	Ácido holorosellínico Fenil lactona	Antibacteriano	Chinworrungsee <i>et al.</i> , 2001; Chinworrungsee <i>et al.</i> , 2002
<i>Zopfiella latipes</i>	Zopfiellamidas A-B	Antifúngico	Daferner <i>et al.</i> , 2002
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	Microsphaeropsina	Antifúngico	Höller <i>et al.</i> , 1999



Con base en las consideraciones anteriores, surge el presente trabajo de investigación que tiene como objetivo continuar con el estudio del metabolismo del hongo marino *Emericella* 25379 para así descubrir nuevos inhibidores de la proteína calmodulina (CaM), involucrada en la regulación de las concentraciones de calcio intracelular (Figuroa *et al.*, 2009). Para ello se realizó el cultivo del hongo en un medio apropiado que permitiera la producción de compuestos análogos al hidrato de tajixantona (**23**), caracterizado en estudios previos realizados por Figuroa y colaboradores (2009) en nuestro laboratorio como un potente inhibidor de del complejo CaM-fosfodiesterasa del AMPc (PDE1). Para ello se realizaron ensayos enzimáticos funcionales. De manera adicional, en el presente trabajo se realizaron estudios conducentes a establecer el modo de interacción del complejo CaM-ligante aplicando diferentes técnicas, entre las que destacan los ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca y acoplamiento molecular.



hidrato de tajixantona (**23**)

## 2. Antecedentes

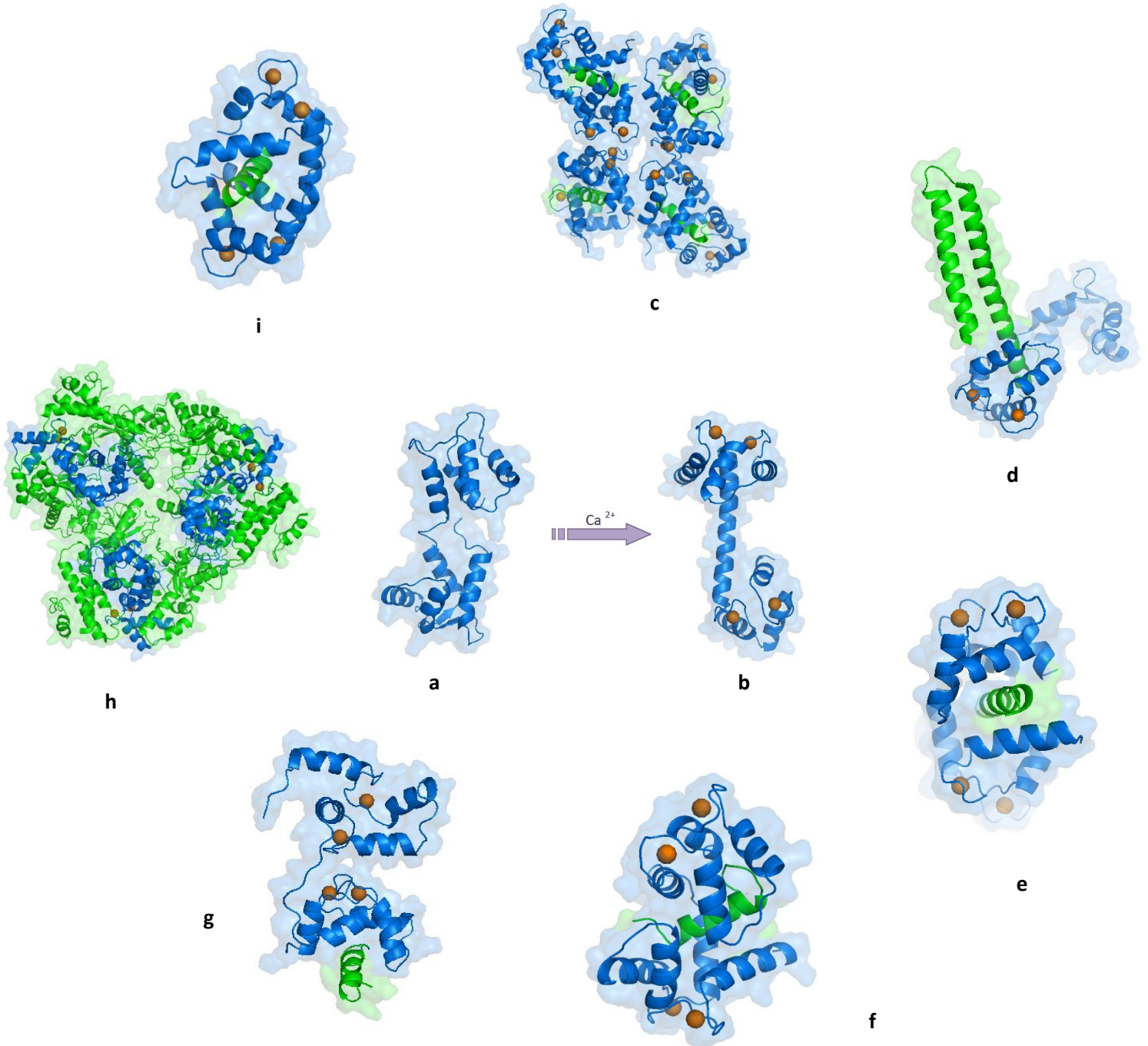
### 2.1 Señalización mediada por $\text{Ca}^{2+}$ y calmodulina (CaM)

El ión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) juega un papel muy importante en el metabolismo de organismos superiores y está involucrado en la regulación de muchos procesos celulares tales como la expresión de genes, liberación de neurotransmisores, contracción muscular y la supervivencia de las células. Numerosas rutas de señalización en plantas y animales dependen de este ión como segundo mensajero. La concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  está controlada y es generalmente baja ( $0.1 \mu\text{M}$ ), mientras que en el exterior de la célula esta concentración puede ser 10,000 veces mayor ( $1 \text{ mM}$ ). Varios estímulos, como cambios en la polarización de la membrana, pueden activar la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que residen en la membrana y, de esta manera promover el ingreso del catión al interior de la célula. De manera adicional, varios organelos funcionan como reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y pueden liberarlo (Berridge, 2003; Evenas *et al.*, 1998; Carafoli y Klee, 1999; Brini y Carafoli 2000; Carafoli 2002; Leclerc, 2003; Junker y Rief, 2009). El retículo sarcoplásmico y endoplásmico son los mayores reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero la mitocondria y el núcleo también participan activamente en la liberación del ión a través de los receptores de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) o el receptor de rianodina (Pozzan *et al.*, 1994; Horne y Meyer, 1997).

Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se deben regular, para ello existe una serie de sensores o proteínas específicas de unión al catión, probablemente, las más importantes son las que conservan el dominio EF ( $\alpha$ -hélice-asa- $\alpha$ -hélice) ya que participan en la modulación de la señalización del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en diversos procesos de transcripción, así como en la activación de varias enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . De estas proteínas quizás, la más relevante, es la calmodulina (CaM; Carafoli, 1987; Schwaller, 2005), una proteína altamente conservada, presente en animales, plantas, hongos y protistas (Cohen y Klee, 1988; Eldick y Watterson, 1998).

La calmodulina es una proteína pequeña (148 aminoácidos, aproximadamente 16 kDa; apo CaM) con dos dominios globulares (-C y -N terminales, unidos por una región relativamente flexible), capaz de unir cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  en los motivos EF (dos iones por dominio). Dada la interacción de la CaM con los iones  $\text{Ca}^{2+}$  se provoca un cambio en su estructura terciaria generando así el conformero extendido holo CaM. Con la generación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM se promueve la exposición de los sitios hidrofóbicos en ambos dominios de la CaM, permitiendo así, el enlace con sus proteínas blanco a través del reconocimiento de una secuencia específica (Junker y Rief, 2009). A la fecha se han descrito alrededor de 300 proteínas reguladas por la CaM, mismas que controlan importantes procesos celulares como la transcripción de genes, contracción muscular, liberación de neurotransmisores, metabolismo y crecimiento celular, entre otros. En la **Figura 1** se muestran las diferentes conformaciones de la CaM, así como una serie de complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-enzima blanco (Chin y Means, 2000).

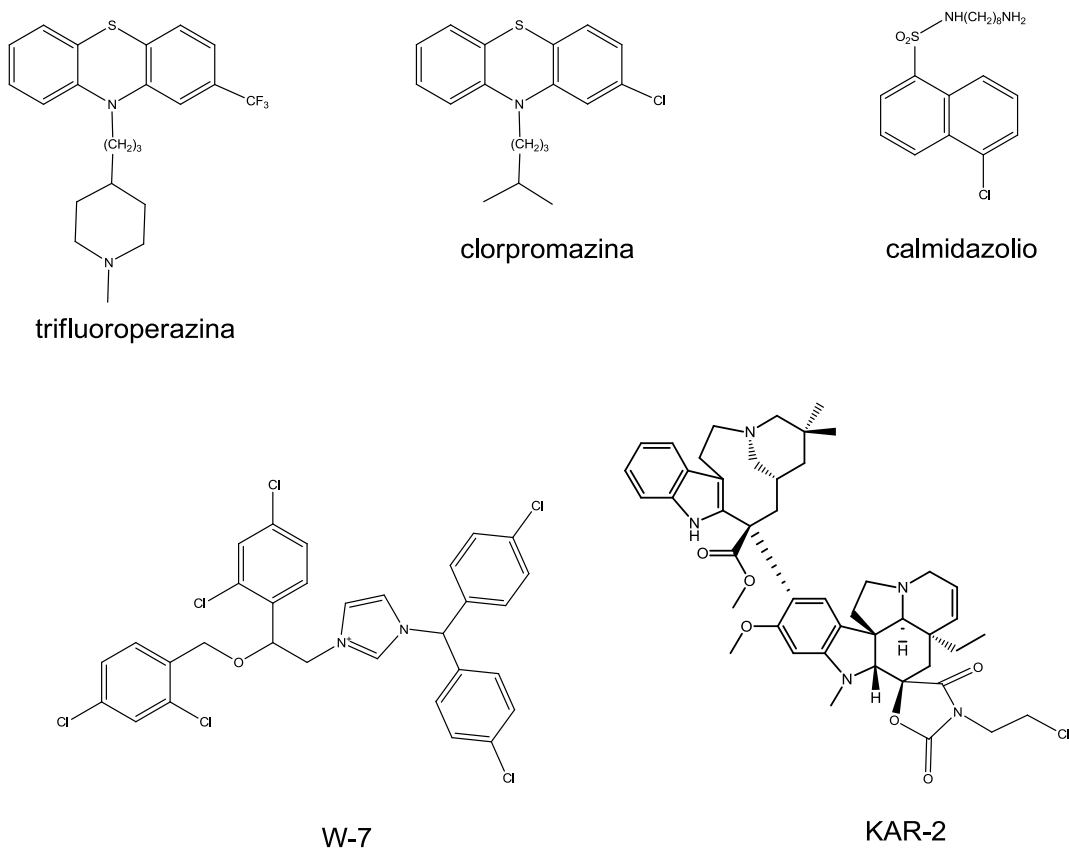
Las proteínas de unión a la CaM (CaMBP) constituyen un grupo diverso; se subdividen en aquellas dependientes de calcio y las independientes del mismo. Las proteínas dependientes de calcio incluyen las fosfodiesterasas y ciclasas involucradas en el metabolismo de nucleótidos cíclicos (fosfodiesterasa del AMPc, PDE-1; la adenilato ciclasa y la guanilato ciclasa), la óxido nítrico sintasa (ONS), las fosfatasa como la calcineurina; las proteínas del metabolismo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, la SR-ATPasa y la  $\text{IP}_3$  cinasa), algunas cinasas (la glicógeno cinasa, la cinasa I-III dependientes de CaM, la cinasa del factor 2 de elongación, la fosforilasa cinasa y la cinasa de cadena ligera de la miosina), las proteínas asociadas a microtubulos, las proteínas tipo espectrina y las proteínas asociadas a membrana como la neuromodulina. Por otro lado se encuentran las proteínas que participan en la expresión de genes y proliferación celular así como las proteínas de unión a CaM nucleares y endonucleasas dependientes de CaM entre otras (Sharma, 2003). En el grupo de las CaMBP independientes de calcio se destacan la glutamato descarboxilasa (enzima que cataliza la síntesis de GABA) y la miosina 1d involucrada en el movimiento intracelular, por mencionar algunas (O'Day, 2003).



**Figura 1.** Diferentes conformaciones de la CaM a) apo CaM, b) holo CaM, c-i) complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-ONS, canal de  $\text{K}^+$ , MKIIa, MKK, péptido blanco de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , toxina del ántrax y MLCK, respectivamente. Modificado de Vetter y Leclerc 2003.

## 2.2 Productos naturales y sintéticos inhibidores de la CaM

Debido a la importancia de la CaM como proteína moduladora de numerosas enzimas que regulan procesos celulares de importancia, hay un gran interés por la búsqueda de nuevos antagonistas de la CaM con un potencial para el desarrollo de nuevos fármacos. En este sentido cabe mencionar que muchos productos de uso terapéutico como los antipsicóticos clorpromazina (**CPZ**) y trifluoroperazina (**TFP**) y los antitumorales vincristina y KAR-2, por mencionar algunos, son inhibidores de la CaM. Por otro lado, se cuenta con diversas herramientas de investigación utilizadas para el estudio de aquellos procesos en los que se encuentra involucrada la proteína (CaM), algunos ejemplos son el compuesto W-7 y calmidazolio. En la **Figura 2** se muestran las estructuras de algunos inhibidores sintéticos y semisintéticos de la CaM.

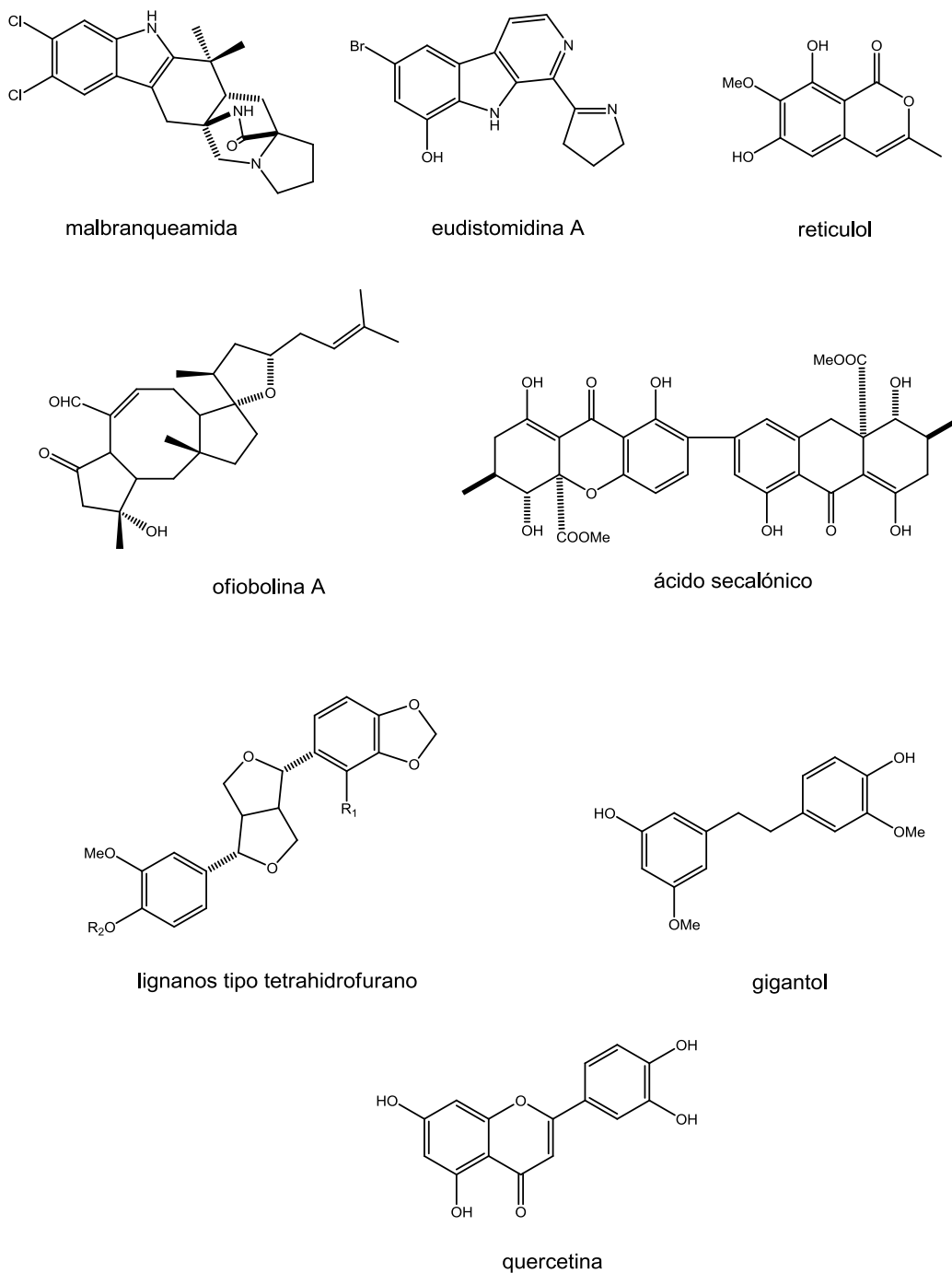


**Figura 2.** Compuestos sintéticos inhibidores de la CaM.

De acuerdo con una revisión reciente (Martínez-Luis *et al.*, 2007) numerosos productos naturales interactúan con la CaM, inhibiendo sus propiedades moduladoras. A continuación se mencionan algunos ejemplos selectos de estos productos. En el grupo de los alcaloides destacan el indolmonoterpenoide malbranqueamida aislado del hongo coprófilo *Malbranchea aurantiaca* y, la  $\beta$ -carbolina eudistomidina A obtenida de *Eudistoma glaucus*; ambos compuestos inhiben la actividad enzimática de la proteína PDE-1 aislada de cerebro de bovino (Kobayashi *et al.*, 1986 y 1990a). Más recientemente en nuestro grupo de trabajo se demostró mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y experimentos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca que la malbranqueamida interactúa directamente con la proteína (Figuroa *et al.*, 2010). En la categoría de los terpenoides, el sesterterpenoide ofiobolina A, es sin duda alguna el producto natural inhibidor de la CaM más ampliamente estudiado a la fecha (Leung *et al.*, 1984 y 1985; Au y Leung, 1998). Este metabolito inhibe las calmodulinas de maíz y de cerebro de bovino; la interacción de la ofiobolina A con la CaM se determinó inicialmente por medio de un ensayo enzimático funcional en el cual se utilizó a la PDE-1 como enzima monitora ( $CI_{50} = 9 \mu\text{M}$ ). Otro grupo importante de compuestos que presentan actividad antagonista sobre la CaM son las cumarinas y derivados de  $\gamma$ -pironas, entre las que destacan el reticulol aislado de *Streptoverticillium album* K251 y el ácido secalónico, obtenido de la especie *Penicillium oxalicum*; ambos metabolitos inhiben la activación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-PDE-1.

Entre los metabolitos derivados del ácido sikímico destacan los lignanos del tipo furofurano de *Leucophyllum ambiguum* que inhiben la activación de la enzima PDE-1, con valores de  $CI_{50}$  entre 5.6 y 14.4  $\mu\text{M}$ ; los estilbenoides constituyen otro grupo de antagonistas de la CaM; la gran mayoría de estos se han obtenido a partir de varias especies de orquídeas mexicanas, así por ejemplo, Hernández-Romero y colaboradores (2004) reportaron que el bibencilo gigantol potencia la acción relajante de la musculatura lisa mediada por **CPZ**, un inhibidor clásico de la CaM; de manera adicional este producto retarda la movilidad electroforética de la proteína durante el proceso de electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida. Finalmente, los flavonoides representan otro grupo importante de antagonistas de la CaM, entre los más representativos se encuentran

la quercetina, la genisteína y la naringenina, compuestos que inhiben la activación del complejo enzimático  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-PDE1 de manera dependiente de la concentración; en la **Figura 3** se muestran algunas de las estructuras de los ejemplos antes mencionados (Martínez-Luis *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Productos naturales selectos con propiedades antagonistas sobre la CaM.

### 2.3 Técnicas experimentales utilizadas para la detección y caracterización de la interacción ligante-CaM

Para detectar y caracterizar nuevos ligantes de la CaM se pueden utilizar diversos métodos *in vitro*, en los siguientes incisos se numeran los más utilizados con este propósito.

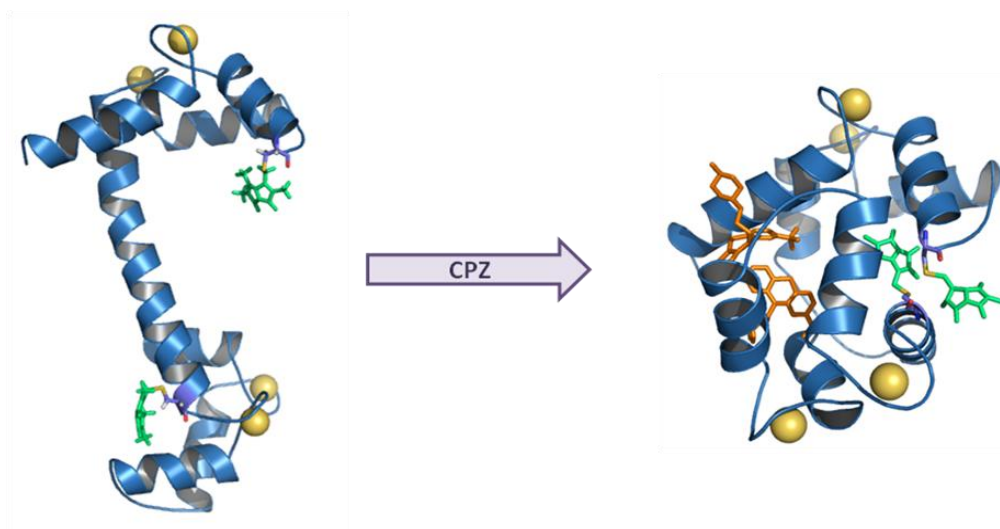
- I. Cromatografía de afinidad. Método específico que presenta diversas desventajas ya que es costoso y laborioso (Yurimoto *et al.*, 2009).
- II. Electroforesis nativa en gel. Permite medir el cambio en la movilidad electroforética de la CaM unida al ligante; esta técnica es relativamente simple y poco robusta (Charpentreau *et al.*, 2004).
- III. Espectroscopía UV. Mide los cambios conformacionales que afectan el ambiente de los residuos aromáticos de la CaM debido a su interacción con cualquier ligante (Crouch y Klee, 1980; Jaren *et al.*, 2000).
- IV. Espectroscopía diferencial UV-DC. Es una de las técnicas más sensibles para seguir los cambios conformacionales en las proteínas provocados por la unión de ligantes (Masino *et al.*, 2000; Horvath *et al.*, 2005).
- V. Resonancia de fluorescencia de transferencia de energía (FRET). FRET es una técnica que monitorea la distancia entre diferentes sondas fluorescentes unidas a la CaM, involucra la transferencia de energía de un estado excitado del donador al estado basal del aceptor. Este método se utiliza para monitorear los cambios conformacionales en la misma molécula, o durante la formación de un complejo ligante-CaM (Allen *et al.*, 2004; Gangopadhyay *et al.*, 2004).
- VI. Resonancia magnética nuclear (RMN) bidimensional heteronuclear. La RMN proporciona información estructural detallada sobre las interacciones ligante-proteína en solución. En esta técnica, la CaM marcada con  $^{15}\text{N}$  y/o  $^{13}\text{C}$  se titula con el ligante. Este método permite determinar el sitio de unión y



conformación de los ligantes, receptores y complejos (Chou *et al.*, 2000; Lalor *et al.*, 2003).

- VII. Cristalografía de rayos X. Constituye una poderosa herramienta para estudiar las estructuras de las proteínas y sus complejos, la técnica provee detalles de aproximación atómica de los complejos ligante-proteína y ofrece información detallada de su arreglo espacial e interacciones; sin embargo, la información obtenida a partir de un experimento de difracción de rayos X no siempre es la correcta ya que la proteína puede adoptar diferentes conformaciones en el cristal y en solución (Babu *et al.*, 1985, 1988; Okubo y Okada 1998, Vertessy *et al.*, 1998; Acharya y Lloyd, 2005).
- VIII. Métodos enzimáticos funcionales. Estos ensayos miden la inhibición de la actividad enzimática modulada por la CaM, siendo la PDE-1 la enzima monitora más ampliamente utilizada para este fin. Los métodos funcionales han constituido una herramienta importante para la búsqueda de antagonistas de la CaM (Sharma y Wang, 1979; Chock y Huang, 1984; Harmon *et al.*, 1984; Mata *et al.*, 2003).
- IX. Mutagénesis sitio-dirigida. Proporciona información sobre el sitio de unión de un ligante con la CaM (Odom *et al.*, 1997).
- X. Métodos computacionales. Permiten la caracterización de sitios de unión de ligantes a proteínas, especialmente ahora que se cuenta con bancos de datos con abundante información estructural sobre éstas. En el diseño de fármacos, la estrategia de acoplamiento molecular es ampliamente utilizada para optimizar la afinidad de unión ligante-receptor y está enfocada en la detección del sitio funcional de interacción (Gabdoulline y Wade, 2002; Ladbury y Williams, 2004).
- XI. Determinación de la fluorescencia extrínseca. La técnica utiliza poca cantidad de muestra ya que la respuesta es muy sensible a cambios conformacionales inducidos por la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-ligante (VanScyoc y Shea, 2001). La modalidad basada en biosensores de fluorescencia se fundamenta en

el uso de biomoléculas que transducen señales fluorescentes detectables cuando un ligante se une a la CaM, el método presenta varias ventajas ya que los biosensores son altamente específicos, de bajo costo, selectivos y con tiempos de análisis rápidos. Esta técnica permite correlacionar los cambios conformacionales provocados por la unión de un ligante con el cambio en la emisión de las proteínas marcadas (González-Andrade *et al.*, 2009). En este contexto, cabe señalar que en años recientes, el Dr. Martín González Andrade (Facultad de Química, UNAM) diseñó un biosensor fluorescente de la CaM el ***hCaM L39C-mBBr/V91C-mBBr***, en el que el componente biológico encargado del reconocimiento molecular es la proteína CaM y el componente transductor es el fluoróforo monobromobimano (*mBBr*). El biosensor fue obtenido a través de un proceso de mutagénesis dirigida, en el cual los aminoácidos Leu 39 y Val 91 de la CaM fueron reemplazados por residuos de cisteína (Cys) a las que posteriormente se les unió de manera covalente el fluoróforo *mBBr*. En la **Figura 4** se ilustra el modelo molecular del biosensor ***hCaM L39C-mBBr/V91C-mBBr***, el cual es útil para la búsqueda de antagonistas de la CaM.

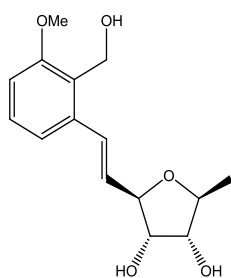


**Figura 4.** Modelo molecular de las mutaciones de los residuos 39 y 91 y la unión del bimano. En dorado, se observan los cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$ , en azul los dominios globulares –N y –C terminales, así como la región hidrofóbica que los une, en bastones verdes el componente transductor de señales (*mBBr*) y en bastones naranjas el inhibidor **CPZ**.

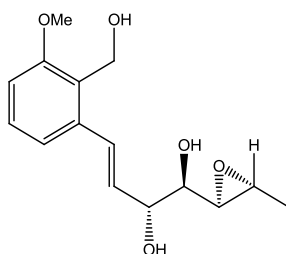
## 2.4 Antecedentes sobre el género *Emericella*

El género *Emericella* representa el estado de reproducción sexual de *Aspergillus* (Pitt *et al.*, 2000); sus especies presentan una tasa de crecimiento rápida, el color de sus colonias es variable (verde, amarillo, gris o púrpura) y la textura es generalmente aterciopelada. La mayoría de las especies de este género crecen con gran facilidad en regiones tropicales y subtropicales; algunas se han aislado de suelo, otras de plantas (hongos endófitos) y un grupo más reducido de ambientes marinos. Los estudios químicos realizados a algunas especies del género a la fecha, han permitido el aislamiento de una amplia variedad de compuestos bioactivos estructuralmente interesantes y novedosos (Frisvad *et al.*, 2004).

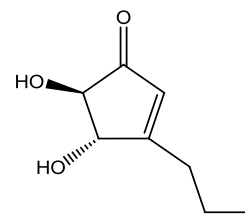
Probablemente, la especie que ha recibido la mayor atención desde el punto de vista químico es *E. varicolor* (anamorfo de *A. varicolor*. Syn. *A. stellatus*). Así, los estudios de diversos aislamientos de esta especie han permitido la obtención de una gran variedad de compuestos bioactivos. Por ejemplo, *E. varicolor* cepa M75-2 aislada a partir de una esponja recolectada en la bahía de Mochima (Sucre, Venezuela) condujo a la obtención de una serie de compuestos citotóxicos novedosos, el varietriol (**24**), el varioxireno (**25**) y la dihidroterreina (**26**). De esta misma cepa se aisló un compuesto de tipo xantona caracterizado con el nombre trivial varixantona (**27**), así como ergosterol (**28**), terreina (**29**) e hidrato de tajixantona (**23**, Malmstrom *et al.*, 2002).



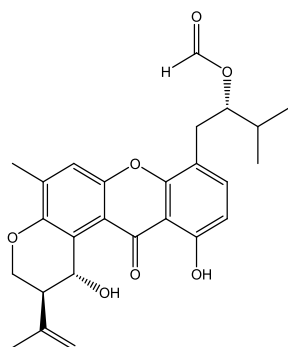
varietriol (**24**)



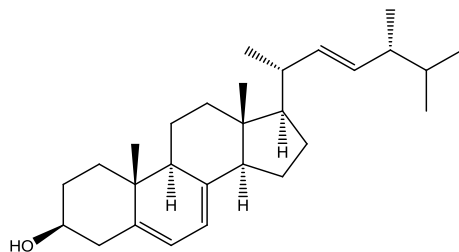
varioxireno (**25**)



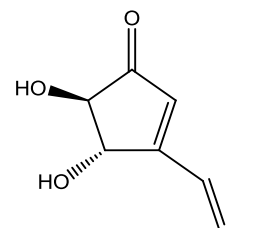
dihidroterreina (**26**)



varixantona (**27**)

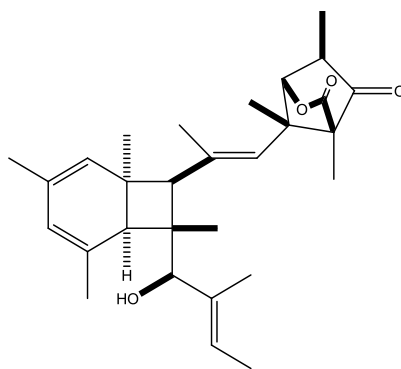


ergosterol (**28**)

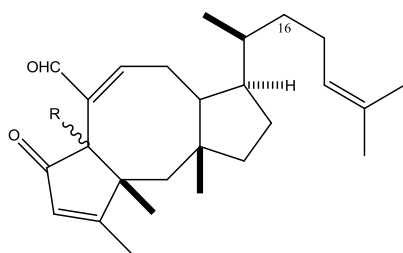


terreina (**29**)

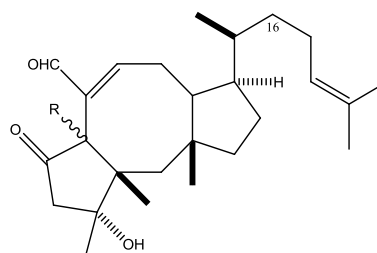
Otros compuestos aislados y caracterizados a partir de esta especie son la shimalactona A (**30**), un policétido constituido por un biciclo [4.2.0]octadieno y un oxabicyclo[2.2.1]heptano; los sesterterpenos de tipo ofiobolano 6-*epi*-ofiobolina G (**31**), ofiobolina G (**32**), 6-*epi*-ofiobolina N (**33**), ofiobolina H (**34**), 6-*epi*-ofiobolina C (**35**), ofiobolina C (**36**), 6-*epi*-ofiobolina K (**37**) y ofiobolina K (**38**). Los compuestos **31-38** tienen actividad citotóxica y se obtuvieron a partir de la cepa GF-10, aislada de los sedimentos recolectados en los mares de Japón (Wei *et al.*, 2004, 2005).



shimalactona A (**30**)

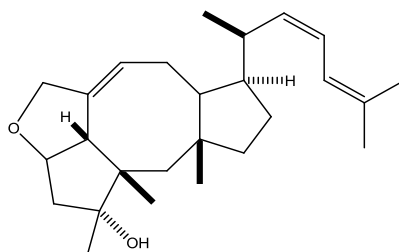


R =  $\alpha$ -H 16-*cis*-6-*epi*-ofiobolina G (**31**)



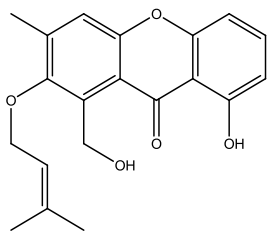
R =  $\alpha$ -H 6-*epi*-ofiobolina C (**35**)

R = $\beta$ -H	16- <i>cis</i> -ofiobolina G	(32)	R = $\beta$ -H	ofiobolina	(36)
R = $\alpha$ -H	6- <i>epi</i> -ofiobolina N	(33)	R = $\alpha$ -H	16- <i>cis</i> -6- <i>epi</i> -ofiobolina K	(37)
			R = $\beta$ -H	16- <i>cis</i> -ofiobolina K	(38)

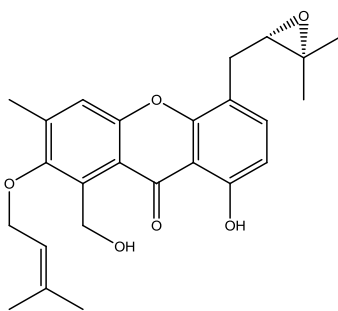


ofiobolina H (34)

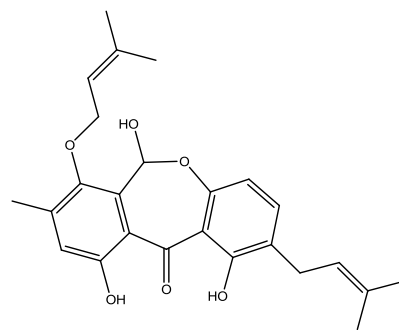
Además del hidrato de tajixantona (23), *E. varicolor* biosintetiza otras moléculas de este tipo entre las que destacan las variecoxantonas A y C (39 y 40), las arugosinas A-D (41-44), la tajixantona metanoato (45), la 14-hidroxitajixantona (46), la 14-metoxitajixantona-25-acetato (47), la 25-*O*-metil arugosina (48), y la isoemicellina (49). Por último otros metabolitos de tipo quinona como la evariquinona (50) y la 7-hidroxiemodina (51) y dépsidos C-glicosídicos como la estromemicina han sido aislados de esta especie (52; Chexal *et al.*, 1974; Bringmann *et al.*, 2003 y Pornpakakul, *et al.*, 2006).



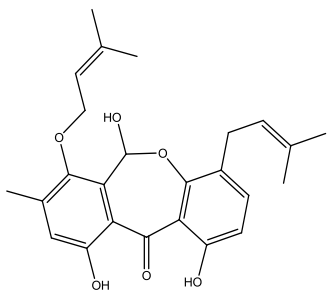
variecoxantona A (39)



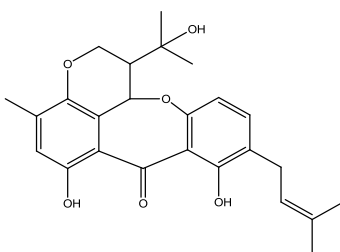
variecoxantona C (40)



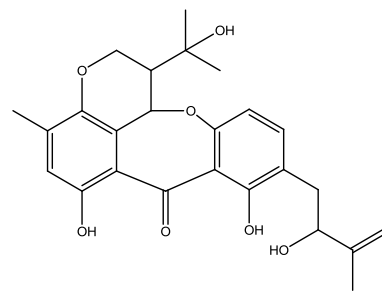
arugosina A (41)



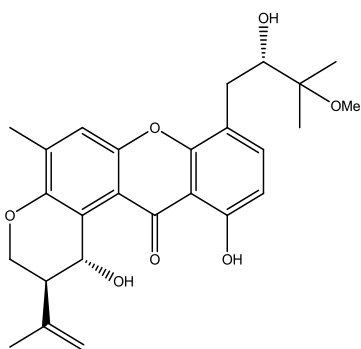
arugosina B (42)



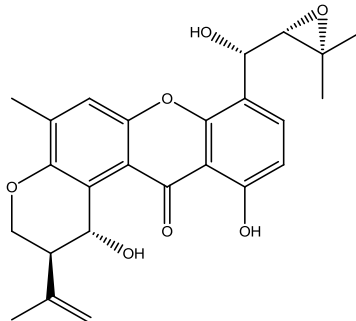
arugosina C (43)



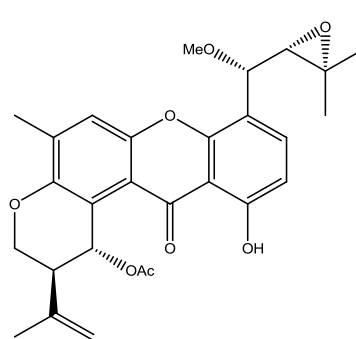
arugosina D (44)



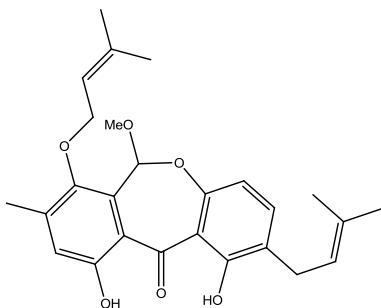
tajixantona metanoato (45)



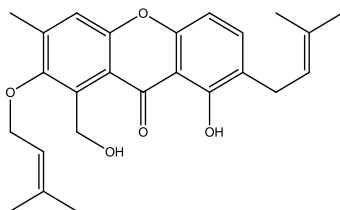
14-hidroxitajixantona (46)



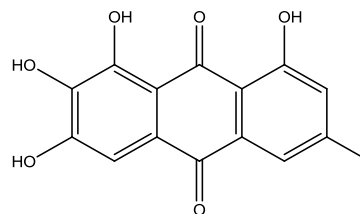
14-metoxitajixantona-25-acetato (47)



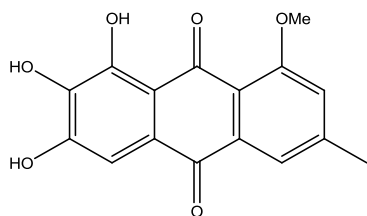
25-O-metil arugosina (48)



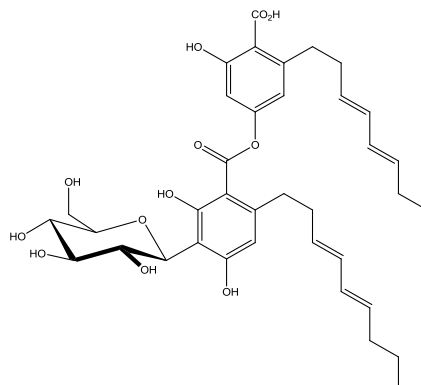
isoemicellina (49)



evariquinona (50)

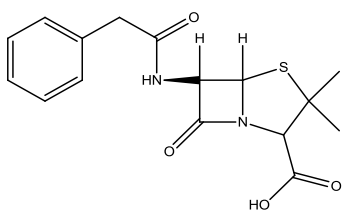


7-hidroxiemodina (51)

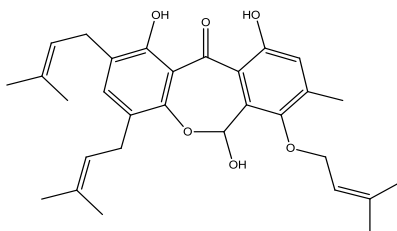


estromemicina (52)

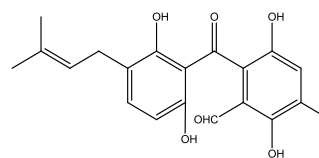
Los estudios químicos sobre *E. nidulans* condujeron al aislamiento de la penicilina G (53), los compuestos citotóxicos arugosinas G y H (54-55), la esterigmatocistina (56), el alcaloide indólico emindol DA (57) y la microperfuranona (58). Así mismo, de la especie *E. nidulans* var. *dentata* se caracterizaron los compuestos ED-1 y ED-2 (59 y 60 respectivamente; Fukuyama *et al.*, 1980; Kawahara *et al.*, 1994; Brakhage, 1997; Kralj *et al.*, 2006).



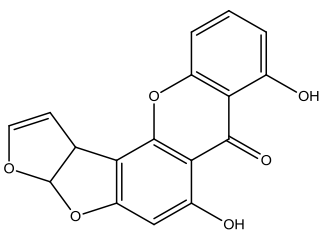
penicilina G (53)



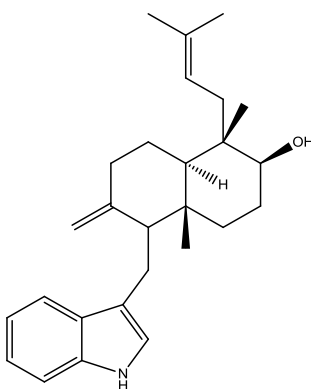
arugosinas G (54)



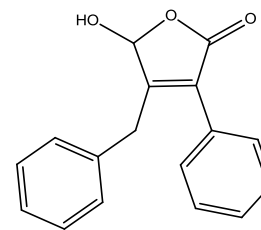
arugosina H (55)



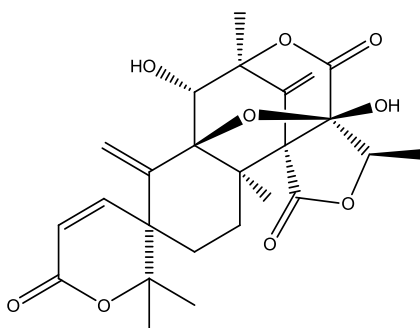
esterigmatocistina (56)



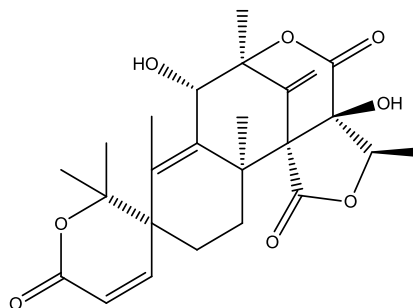
emindol DA (57)



microperfuranona (58)

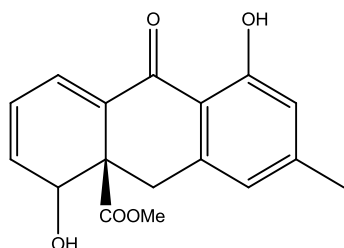


ED-1 (59)

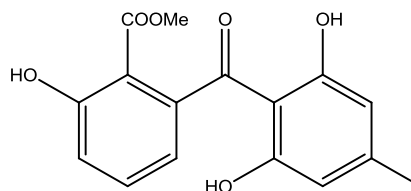


ED-2 (60)

Finalmente, *E. nidulans* produce la antrona nidulalina A (**61**) y el derivado de benzofenona, nidulalina B (**62**; Kawahara *et al.*, 1994).

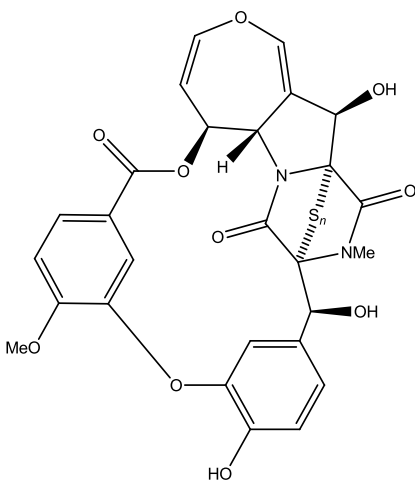


nidulalina A (**61**)

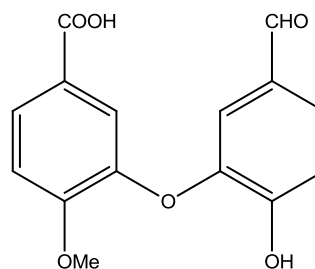


nidulalina B (**62**)

De la especie *E. striata* se han obtenido metabolitos con propiedades antifúngicas como la emestrina (**63**), la emestrina B (**64**), el ácido violéico (**65**) y compuestos con actividad tremorgénica como la ditiosecoemestrina (**66**), la paxilina (**67**), la deshidroxipaxilina (**68**) y la 1'-O-acetilpaxilina (**69**; Seya *et al.*, 1986; Nozawa *et al.*, 1987 y 1989).

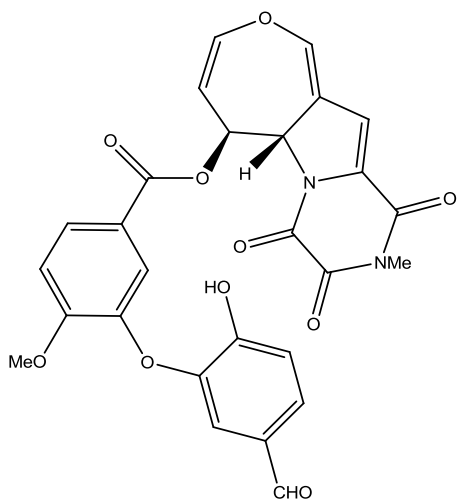


n = 2; emestrina (**63**)  
n = 3; emestrina B (**64**)

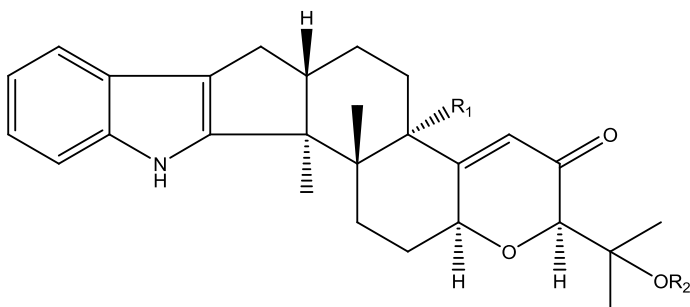


ácido violéico (**65**)





ditiosecoemestrina (**66**)



R1 = OH

R2 = H

paxilina (**67**)

R1 = H

R2 = H

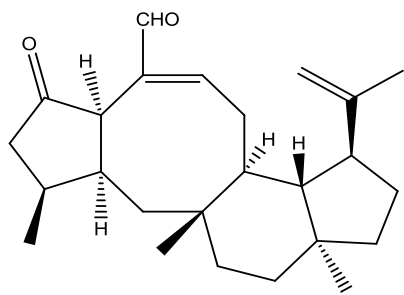
deshidroxipaxilina (**68**)

R1 = OH

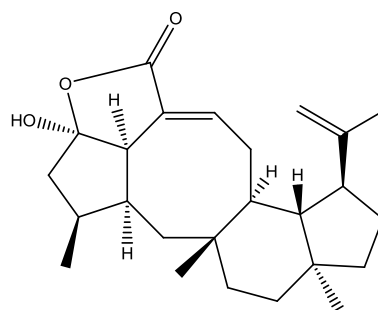
R2 = Ac

1'-O-acetilpaxilina (**69**)

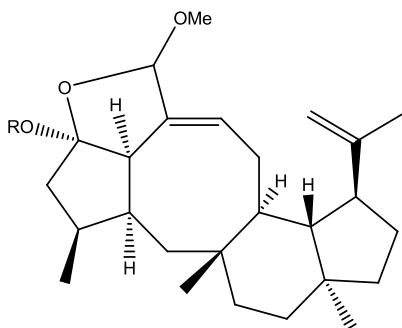
Los estudios químicos biodirigidos sobre *E. aurantiobrunnea* condujeron al aislamiento y caracterización de una gran variedad de compuestos de tipo sesterterpeno, entre los que destacan los inmunomoduladores variecolina (**70**) y variecolactona (**71**), los variecoacetales A-B (**72-73**) y la emeremofilina (**74**; Fujimoto *et al.*, 2000). De la cepa F31149 se aislaron el variecolol (**75**) y una serie de análogos identificados con los nombres triviales emericolinas A-D (**76-79**; Yoganathan *et al.*, 2004).



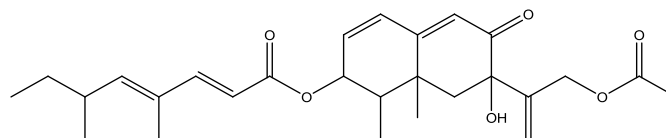
variecolina (**70**)



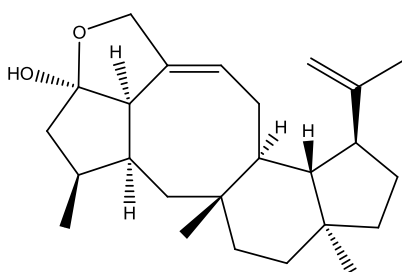
variecolactona (**71**)



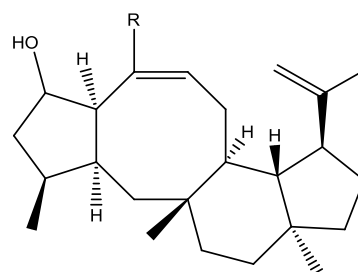
R = Me      variecoacetal A (**72**)  
 R = Et      variecoacetal B (**73**)



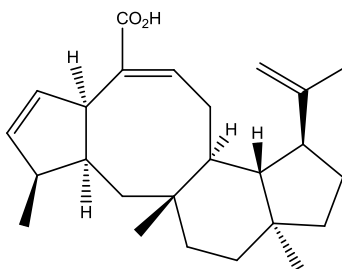
emeremofilina (**74**)



varicolol (**75**)



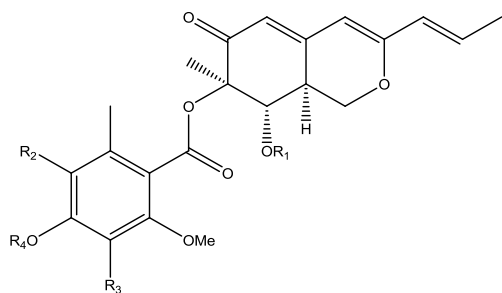
R = CHO      emericolina A (**76**)  
 R = CH<sub>2</sub>OH      emericolina B (**77**)  
 R = CH<sub>3</sub>      emericolina C (**78**)



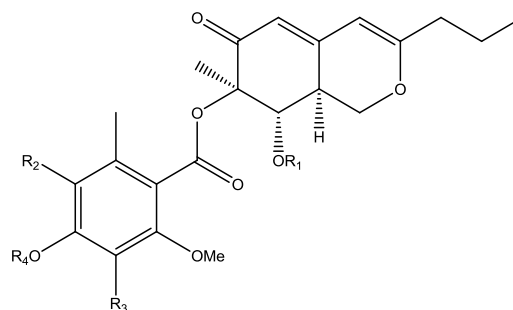
emicolina D (**79**)

Otra especie del género *Emericella* que ha sido estudiada desde el punto de vista químico es *E. falconensis*, la cual biosintetiza policétidos con actividad antiinflamatoria denominados falconensinas A-N (**80-93**), la monometildihidromitorrubrina (**94**), la mitorrubrina (**95**) y la monometilmitorrubrina (**96**; Ogasawara *et al.*, 1992, 1993, 1996 y 1998). Por otra parte, de la cepa NHL 2999 se aislaron y caracterizaron dos pigmentos

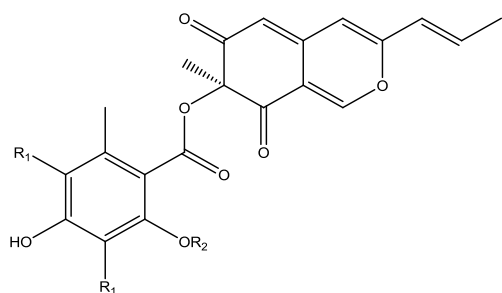
amarillos designados con los nombres triviales de falconensinas A y B (**97-98**; Ogasawara *et al.*, 1997).



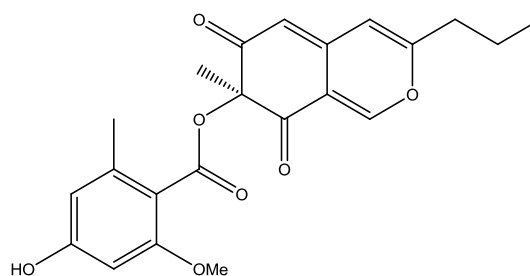
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
H	Cl	Cl	Me	falconensina A ( <b>80</b> )
Ac	Cl	Cl	Me	falconensina C ( <b>82</b> )
H	Cl	H	Me	falconensina E ( <b>84</b> )
H	H	H	Me	falconensina F ( <b>85</b> )
Ac	H	H	Me	falconensina G ( <b>86</b> )
H	H	H	H	falconensina I ( <b>88</b> )
H	Cl	H	H	falconensina K ( <b>90</b> )
H	H	Cl	Cl	falconensina M ( <b>92</b> )



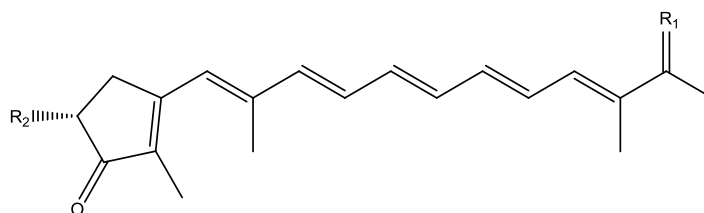
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
H	Cl	Cl	Me	falconensina B ( <b>81</b> )
Ac	Cl	Cl	Me	falconensina D ( <b>83</b> )
H	H	H	H	falconensina J ( <b>89</b> )
H	Cl	H	H	falconensina L ( <b>91</b> )
H	Cl	Cl	H	falconensina N ( <b>93</b> )



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
Cl	Me	falconensina H ( <b>87</b> )
H	Me	mitorrubrina ( <b>95</b> )
H	H	monometilmitorrubrina ( <b>96</b> )



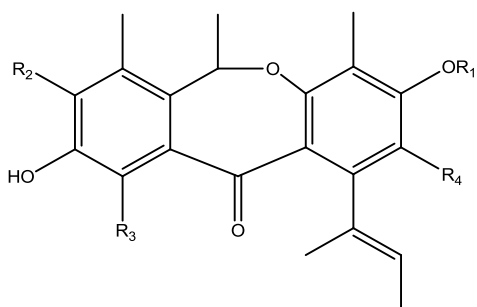
monometildidromitorrubrina (**94**)



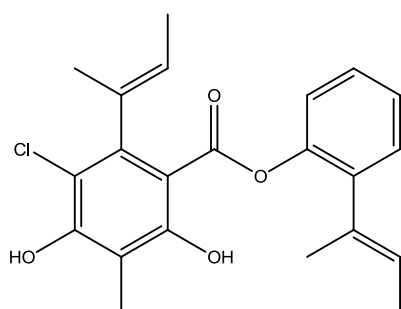
R<sub>1</sub> = O, R<sub>2</sub> = Me; falconensona A (**97**)

R<sub>1</sub> = O, R<sub>2</sub> = H; falconensona B (**98**)

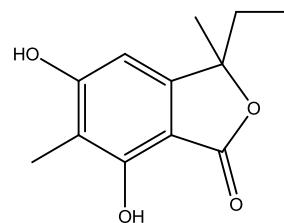
*Emericella unguis*, sintetiza una amplia variedad de metabolitos con actividad inhibidora sobre la enzima monoamino oxidasa (MAO), incluyendo la nidulina (**99**), la nornidulina (**100**), el 2-clorounginol (**101**), el unguinol (**102**), la 3-etil-5,7-dihidroxi-3,6-dimetilftalida (**103**; Kawahara *et al.*, 1988) y el guisineol (**104**). Este último posee además, actividad antibacteriana (Nielsen *et al.*, 1999). Por otra parte, de la cepa M87-2, aislada de la medusa *Stomolopus meliagris* en la península de Paria en Venezuela, se obtuvieron las unguisinas A, B y C (**105-107**), tres heptapéptidos cíclicos que contienen el aminoácido GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico) y que presentan actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas (Malmstrom 1999; Malmstrom *et al.*, 2002).



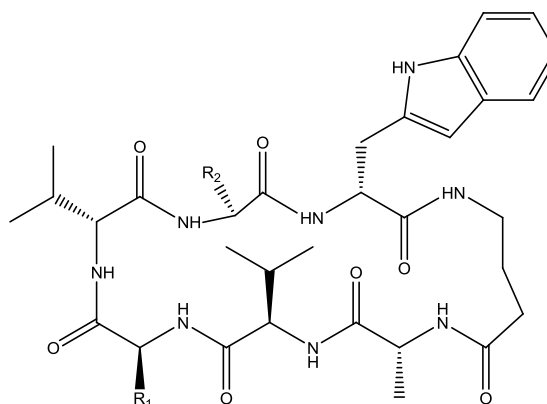
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
Me	Cl	Cl	Cl	nidulina ( <b>99</b> )
H	Cl	Cl	Cl	nornidulina ( <b>100</b> )
H	Cl	H	H	2-clorounginol ( <b>101</b> )
H	H	H	H	unguinol ( <b>102</b> )



guisineol (**104**)

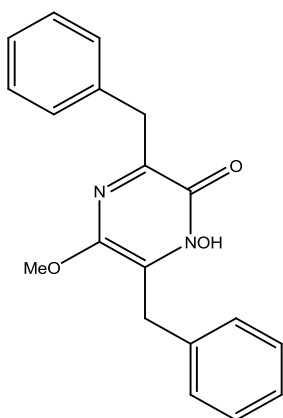


3-etil-5,7-dihidroxi-3,6-dimetilftalida (**103**)

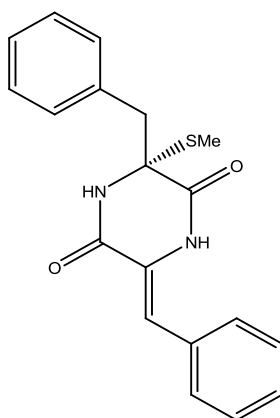


R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
Ph	Me	unguisina A ( <b>105</b> )
<i>i</i> -Pr	Me	unguisina B ( <b>106</b> )
Ph	CH <sub>2</sub> OH	unguisina C ( <b>107</b> )

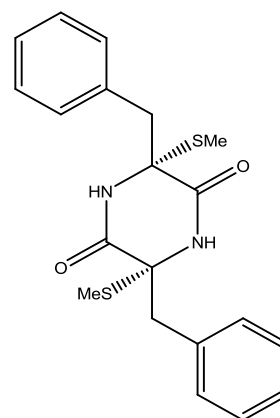
Los estudios químicos realizados sobre la especie *E. heterotallica* por Kawahara y colaboradores en 1988 permitieron el aislamiento de un compuesto derivado de la pirazinona, la emeheterona (**108**), dos análogos azufrados de dioxopiperazinas, las emetacinas A-B (**109-110**), dos compuestos de tipo dioxopiperazinas la (*S*)-3-bencil-6-[(*Z*)-bencilideno]-2,5-dioxopiperazina (**111**), la (3*S*,6*S*)-3,6-dibencil-2,5-dioxopiperazina (**112**) y la 3,6-di[(*Z*)-bencilideno]-2,5-dioxopiperazina (**113**; Kawahara *et al.*, 1988 y 1989).



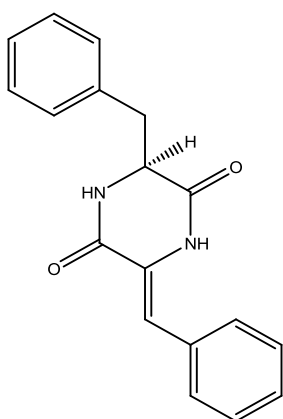
emeheterona (**108**)



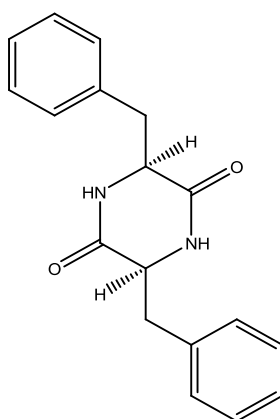
emetacina A (**109**)



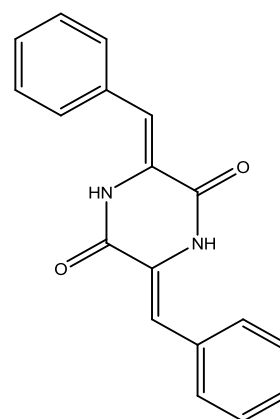
emetacina B (**109**)



(*S*)-3-bencil-6-[(*Z*)-bencilideno]-2,5-dioxopiperazina (**111**)

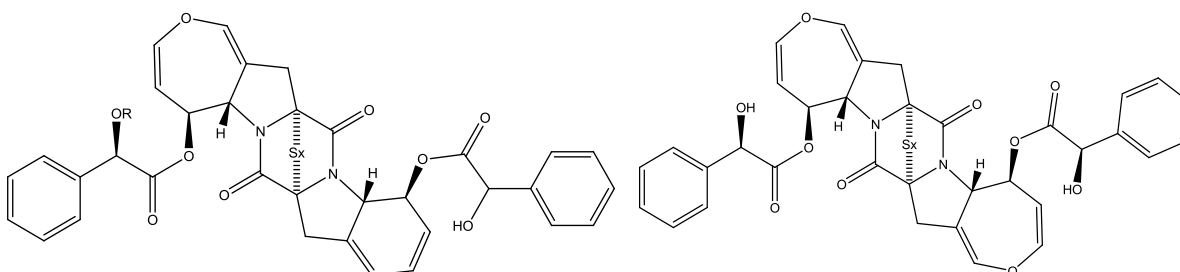


3,6-dibencil-2,5-dioxopiperazina (**112**)



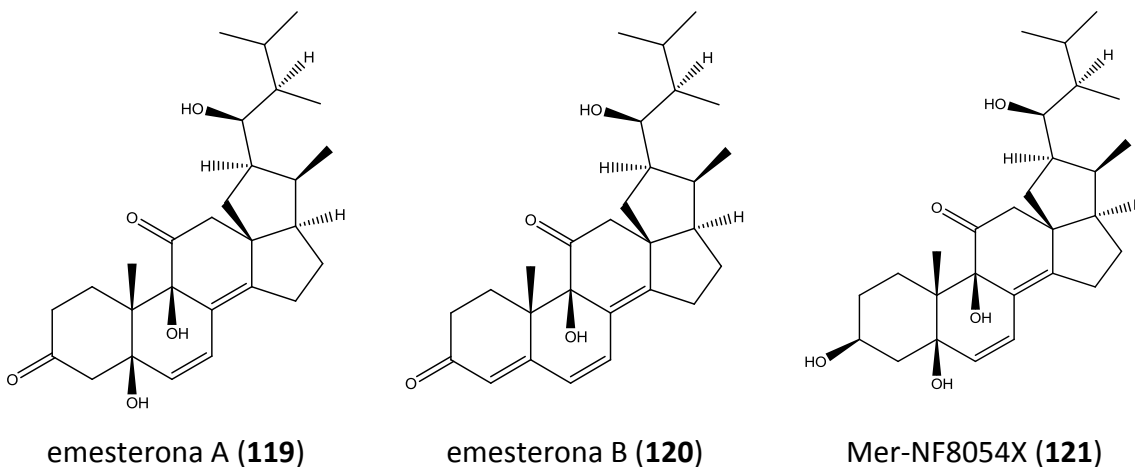
3,6-di[(*Z*)-bencilideno]-2,5-dioxopiperazina (**113**)

Otro grupo de compuestos aislados y caracterizados a partir de esta especie son las emetalicinas A-D (**114-117**) y el derivado monoacetilado de la emetalicina D (**118**), cinco epiditiodioxopiperazinas que inhiben la liberación de histamina (Kaeahara *et al.*, 1989 y 1990).

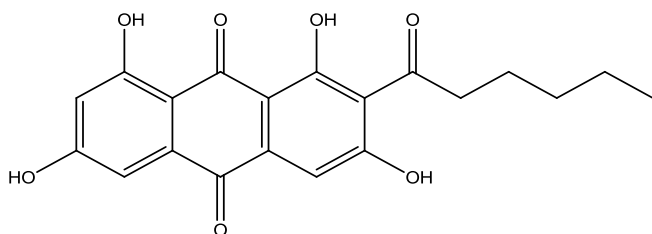


R	x		
H	2	emetalicina A ( <b>114</b> )	emetalicina B ( <b>115</b> )
H	4	emetalicina C ( <b>116</b> )	
H	3	emetalicina D ( <b>117</b> )	
Ac	3	Acetato de emetalicina D ( <b>118</b> )	

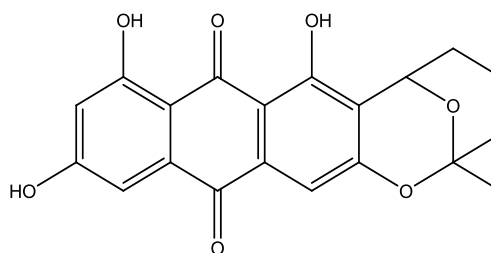
El estudio químico realizado a la cepa ATCC 16824 de *E. heterotallica* por Hosoe y colaboradores en 1998, permitió el aislamiento y caracterización de tres 18,22-cicloesteroles denominados emesteronas A y B (**119** y **120**) y Mer-NF8054X (**121**), compuestos con actividad antifúngica y citotóxica sobre varias líneas celulares (Hosoe *et al.*, 1998).



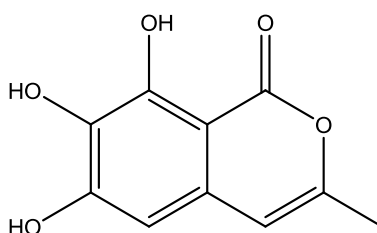
Las investigaciones enfocadas al estudio del metabolismo de la especie *E. navahoensis* condujeron a la obtención del ácido norsolorínico (**122**), la averufina (**123**) y la 6,7,8-trihidroxi-3-metilisocumarina (**124**) tres metabolitos con actividad inhibitoria sobre la MAO (Yamazaki *et al.*, 1988).



ácido norsolorínico (**122**)

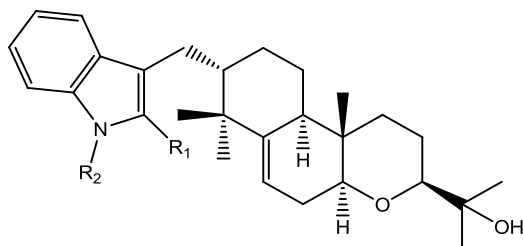


averufina (**123**)



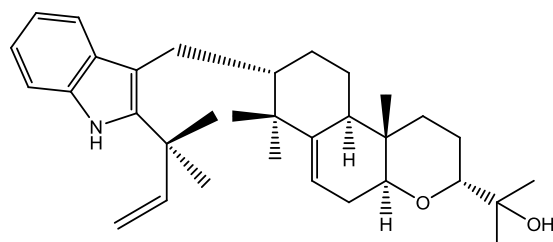
6,7,8-trihidroxi-3-metilisocumarina (**124**)

De la especie *E. purpurea* se han aislado compuestos del tipo indolmonoterpenoide, tal es el caso de los emindoles PA-PC (**125-127**; Hosoe *et al.*, 2006), y tres pigmentos denominados epurpurinas A-C (**128-130**; Takahashi *et al.*, 1996).

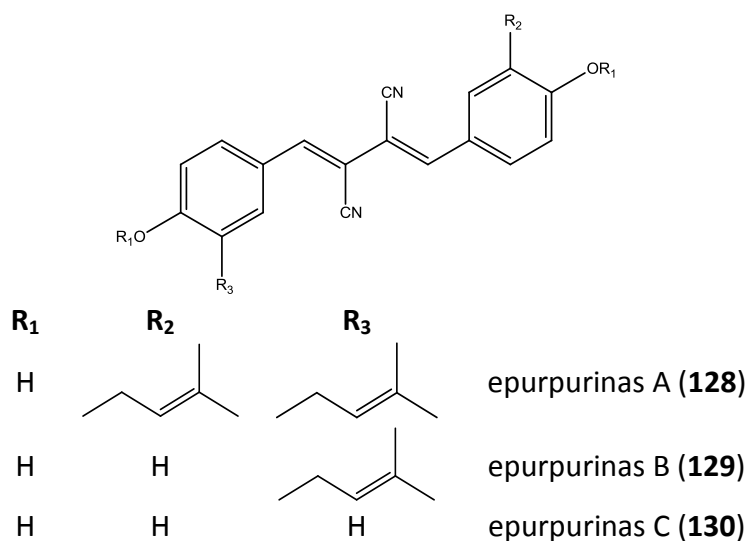


$R_1 = -C(CH_3)_2CHCH_2$  emindol PA (**125**)  
 $R_2 = H$

$R_1 = H$  emindol PB (**126**)  
 $R_2 = -C(CH_3)_2CHCH_2$

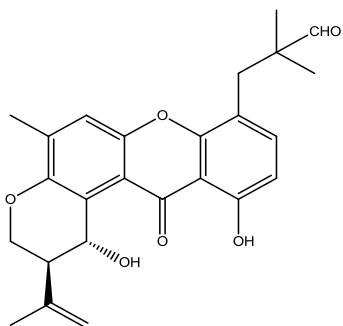


emindol PC (**127**)

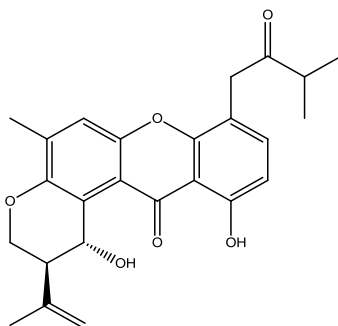


Moosophon y colaboradores en 2009 aislaron cuatro xantonas preniladas, las ruguloxantonas A-C (**131-133**) y etanoato de tajixantona (**134**), y un derivado del biciclo[3.3.1]nona-2,6-dieno, la rugulosa (**135**), de *E. rugulosa*. El compuesto **135** mostro actividades antimalárica y antimicobacteriana (Moosophon *et al.*, 2009). Finalmente, de *E. desertorum* y *E. venezuelensis* se obtuvieron las cumarinas desertorinas A-C (**136-138**; Nozawa *et al.*, 1987), la aflatoxina B<sub>1</sub> (**139**) y la esterigmatocistina (**140**); los dos últimos compuestos son potencialmente carcinogénicos (Frisvad *et al.*, 2004).

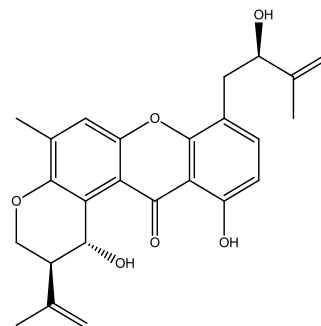




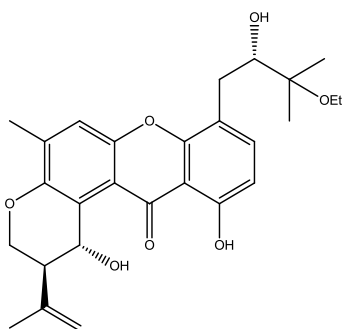
ruguloxantona A (131)



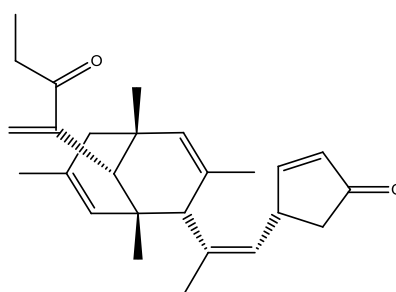
ruguloxantona B (132)



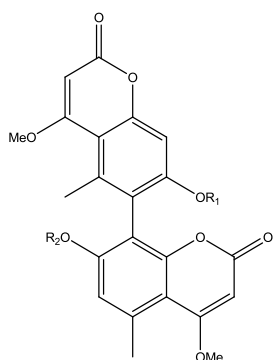
ruguloxantona C (133)



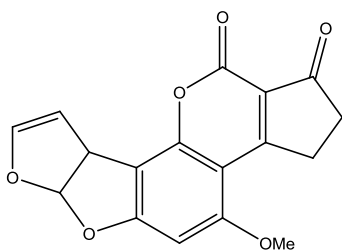
etanoato de tajixantona (134)



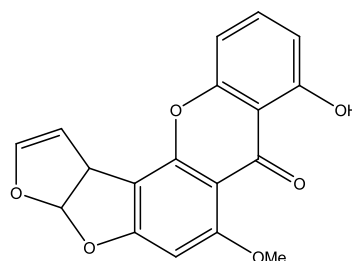
rugulosa (135)



<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	
H	H	desertorina A (136)
H	Me	desertorina B (137)
Me	Me	desertorina C (138)



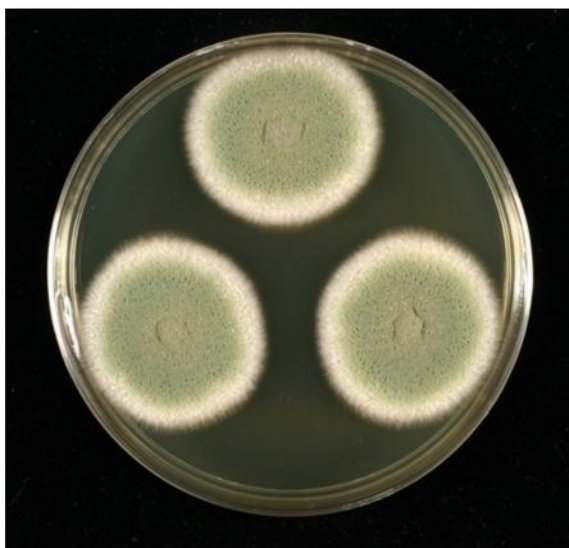
aflatoxina B<sub>1</sub> (139)



esterigmatocistina (140)

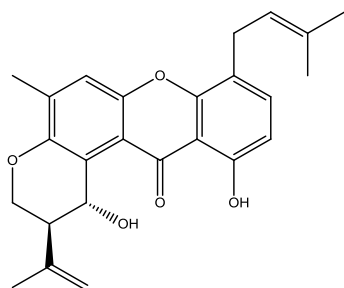
## 2.5 Antecedentes del hongo *Emericella* 25379

Debido a la gran diversidad estructural y propiedades farmacológicas que han mostrado los metabolitos aislados de algunas especies del género *Emericella*, recientemente, en nuestro grupo de trabajo se inició la investigación química del hongo *Emericella* 25379 (**Figura 5**), aislado de un coral obtenido en las islas Marietas, Nayarit, México. El trabajo se realizó en el marco de un programa encaminado al descubrimiento de nuevos compuestos naturales con propiedades antagonistas de la proteína calmodulina (CaM). Esta investigación permitió la obtención de una serie de xantonas preniladas caracterizadas como hidrato de tajixantona (**23**), shamixantona (**141**), emericellina (**142**), 14-metoxitajixantona (**143**) y 15(S)-clorotajixantona (**144**; Figueroa *et al.*, 2009). Posteriormente, la reinvestigación realizada sobre esta cepa en el año 2009 por Rivera Chávez, permitió el aislamiento del compuesto caracterizado como 15-acetil hidrato de tajixantona (**145**).

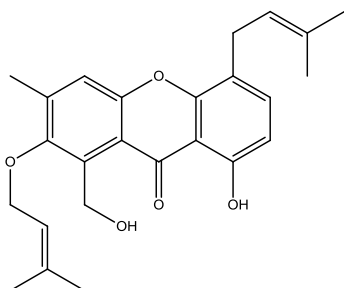


**Figura 5.** *Emericella* 25379.

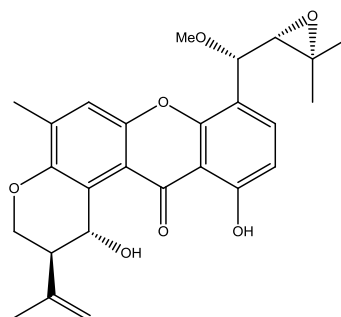
Los metabolitos **23**, **141-144** inhiben de manera significativa el crecimiento radicular de semillas de *Amarantus hypochondriacus*; su actividad es comparable a la de la tricolorina A ( $3.6 \times 10^{-5}$  M), oligosacarido aislado de *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae) con propiedades fitotóxicas notables (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Además, los compuestos **23** y **143** inhiben de manera dependiente de la concentración la actividad enzimática del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-PDE-1, de manera comparable a la **CPZ** (Figuroa, 2009). Por otra parte, los estudios de cinética enzimática indicaron que ambos compuestos actúan como antagonistas competitivos de la CaM, compitiendo con la enzima blanco por la formación del complejo activo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-PDE1. Los valores de  $K_i$  obtenidos para los compuestos **143** y **23** fueron de  $13.92 \pm 2.29$  y  $25.38 \pm 2.26$   $\mu\text{M}$ , respectivamente. Posteriormente, Figuroa determinó el efecto de los compuestos **23**, **141**, **143** y **144** sobre la movilidad electroforética de la proteína CaM en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizando electroforesis no desnaturante en gel de poliacrilamida (PAGE). Bajo estas condiciones, la interacción de cualquier compuesto con esta proteína ocasiona alteraciones en su conformación estructural, mismas que se ven reflejadas en cambios de su movilidad electroforética. Los efectos observados en esta evaluación permitieron concluir que los compuestos **23** y **143** interactúan con la CaM y posiblemente modifican sus propiedades reguladoras enzimáticas. Finalmente, como parte de un estudio complementario se realizó un estudio de acoplamiento molecular (AM) del compuesto **23** empleando la estructura cristalográfica de la CaM obtenida del Protein Data Bank (PDB, código 1a29). Este análisis confirmó que el hidrato de tajixantona (**23**) interacciona en el mismo sitio de unión que las fenotiazinas **TFP** y **CPZ** (Figura 6; Figuroa 2009).



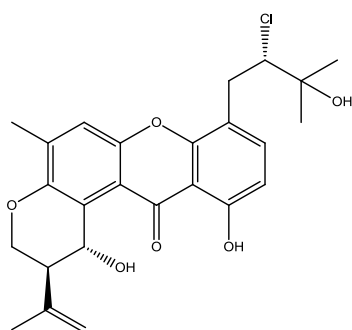
shamixantona (**141**)



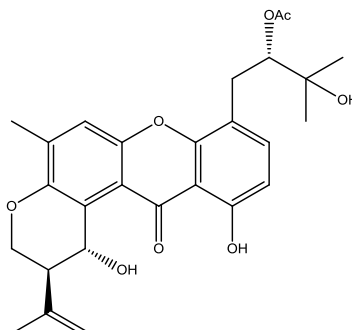
emericeлина (**142**)



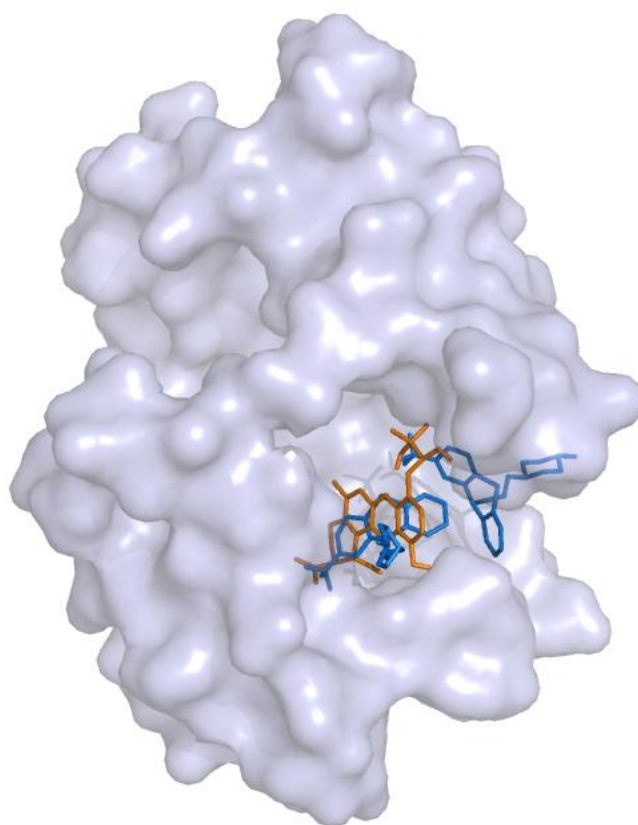
14-metoxitajixantona (**143**)



15(5)-clorotajixantona (**144**)



15-acetil hidrato de tajixantona (**145**)



**Figura 6.** Modelo propuesto por AM para la interacción del compuesto **23** con la CaM, en bastones azules se muestra el inhibidor clásico **TFP**, en bastones naranjas el hidrato de tajixantona (**23**) y en morado la superficie de la CaM.

### 3. Justificación y objetivos

La búsqueda de compuestos de origen natural que sirvan como prototipo estructural para el desarrollo de nuevos fármacos con un efecto antagónico sobre las propiedades moduladoras de la calmodulina (CaM) ha cobrado recientemente gran interés debido a la enorme variedad de procesos celulares que regula esta proteína. Así por ejemplo, muchos procesos de contracción muscular, transcripción genética, proliferación celular, división celular, fosforilaciones y desfosforilaciones protéicas, son regulados por la CaM. Por lo tanto, esta proteína constituye entonces un blanco molecular atractivo para el desarrollo de nuevos agentes espasmolíticos y antitumorales, entre otros (Pornpakakul, 2006). Por esta razón, nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a la búsqueda exhaustiva de metabolitos secundarios a partir de diversas especies de plantas y microorganismos. Estos estudios, han permitido el descubrimiento de nuevos agentes espasmolíticos de tipo bencil benzoatos y estilbenoides a partir de *Brickellia veronicifolia* y varias orquídeas mexicanas, respectivamente, los cuales mostraron una actividad antagonista sobre la proteína CaM en diversos ensayos.

Así mismo, el estudio de varias especies de hongos microscópicos ha conducido al descubrimiento de entidades químicas novedosas desde el punto de vista estructural y que inhiben de manera notable las propiedades moduladoras de la CaM, algunos ejemplos relevantes son las nonenólidas obtenidas de *Phoma herbarum*, el indolmonoterpenoide malbranqueamida de *Malbranchea aurantiaca* y recientemente el hidrato de tajixantona (**23**) y compuestos relacionados obtenidos a partir del hongo marino *Emericella* 25379. Este compuesto y sus análogos poseen actividad citotóxica contra distintas líneas celulares (Pornpakakul, 2006). Estos hallazgos, en conjunto con la gran biodiversidad de hongos en México, prácticamente inexplorada como una fuente de agentes biodinámicos, constituyen un punto de partida valioso para el descubrimiento de nuevos inhibidores de la proteína calmodulina (CaM). En consecuencia, el objetivo primordial del presente trabajo es continuar con el análisis del complejo metabolismo de rejilla de la especie fúngica *Emericella* 25379, con la finalidad de obtener compuestos análogos del hidrato de

tajixantona (**23**) con mejores propiedades inhibitoras de la CaM y que sirvan como prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos potenciales.

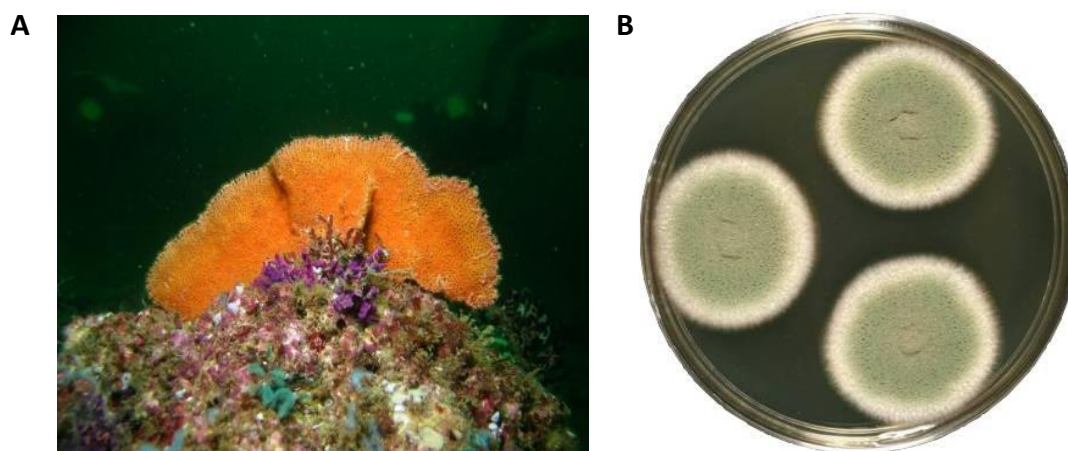
Para el cumplimiento del objetivo principal propuesto, se formularon los siguientes objetivos específicos:

- a. Obtener y caracterizar químicamente los metabolitos minoritarios presentes en el extracto orgánico obtenido a partir del micelio y medio de cultivo de *Emericella* 25379, utilizando diferentes procedimientos de separación y purificación, así como las técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales. El cumplimiento de este objetivo permitirá conocer con mayor detalle el complejo perfil metabólico del anamorfo objeto de estudio.
- b. Determinar la interacción potencial de los metabolitos aislados con la proteína calmodulina utilizando un método espectrofluorimétrico. El cumplimiento de este objetivo permitirá establecer si los metabolitos interaccionan de manera directa con la proteína y establecer los parámetros de unión.
- c. Realizar estudios de acoplamiento molecular de los metabolitos aislados y una serie de análogos para predecir su probable sitio de unión y generar información de utilidad para el diseño futuro de compuestos más potentes.

## 4. Parte experimental

### 4.1 Material fúngico

*Emericella* 25379 (Trichocomaceae) se aisló a partir de la superficie de un coral blando (*Pacifigorgia rutilia*) recolectado en los arrecifes de las Islas Marietas, ubicadas en el estado de Nayarit, México en el año 2006 (**Figura 7**). La Dra. María del Carmen González, investigadora del Instituto de Biología, UNAM, identificó el aislamiento fúngico a nivel de género. Una muestra de referencia (N° 25379) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología UNAM.



**Figura 7.** A) Coral blando (*Pacifigorgia rutilia*), B) *Emericella* 25379.

### 4.2 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron en placas de vidrio (modalidad preparativa) o aluminio (modalidad analítica), recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck® [tamaño de partícula 3.5-7.0 ASTM y de 0.25 mm de espesor]. Se emplearon 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) y un agente revelador consistente



de una solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico. 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] o Sephadex® LH-20 de acuerdo a las técnicas convencionales.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Waters® (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2996). Para el control del equipo, así como para la adquisición, manejo y manipulación de datos se utilizó el programa Empower® Versión 2.0 (Waters®). Los análisis cromatográficos se realizaron en columnas empacadas con dimetiloctadecilsilil (HCR-C<sub>18</sub>) SymmetryPrep™ 7µm (Waters®) [7.8 × 300 mm, 2.0 mL/min] y Symmetry® 5 µm (Waters®) [4.6 × 250 mm, 0.6 mL/min]. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. Las longitudes de onda ( $\lambda$ ) utilizadas para la detección de los compuestos de interés fueron 254 y 273 nm.

#### **4.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas**

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. 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-<sup>1</sup>H, 300 o 500 MHz) y de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C, 125 MHz) se registraron en un aparato Varian Unity-Plus, o en un Bruker HDX500, utilizando CDCl<sub>3</sub> 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 e Instituto de Química de la UNAM y en la UAM Iztapalapa.

#### **4.4 Fermentación de la especie fúngica *Emericella* 25379**

El cultivo en mediana escala (20 L) de *Emericella* 25379 se realizó en medio líquido Czapek utilizando las mismas condiciones experimentales previamente descritas por Figueroa y colaboradores (2009), es decir 30 días de fermentación a temperatura ambiente, sin agitación y con periodos de luz oscuridad normales. El inóculo consistió en dos cuadros de agar de un cm<sup>2</sup> de un cultivo de microorganismos en medio sólido agar papa dextrosa comercial (PDA).

#### **4.5 Estudio químico del hongo *Emericella* 25379**

##### **4.5.1 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 durante tres días, utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como disolvente de extracción; el proceso se realizó por triplicado. Por otra parte, el extracto orgánico obtenido a partir del medio de cultivo se obtuvo mediante particiones sucesivas utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 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 5.0 g de un residuo de color café.

##### **4.5.2 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de *Emericella* 25379**

El extracto orgánico seco (5.0 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento preliminar mediante una CCA, empleando una columna de vidrio empacada con gel de sílice (290 g) y como fase móvil mezclas binarias de polaridad creciente iniciando con

hexano, pasando por CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y finalizando con MeOH [Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100:0→0:100); CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (100:0→0:100); CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (100:0→50:50)]. Este procedimiento generó 11 fracciones primarias (F<sub>1</sub>-F<sub>11</sub>).

#### 4.5.3 Aislamiento, purificación e identificación de la emericelina (142) a partir de la fracción primaria F<sub>4</sub>

La resolución de la fracción primaria F<sub>4</sub> (50 mg) mediante CCFP (Hex-AcOEt 7:3) permitió el aislamiento y purificación de 20 mg de un sólido amarillo identificado como emericelina (142).

**Emericelina (142):** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 1.71 (3H, s, CH<sub>3</sub>-23), 1.74 (6H, s, CH<sub>3</sub>-17, CH<sub>3</sub>-18), 1.81 (1H, s, CH<sub>3</sub>-22), 2.41 (3H, s, CH<sub>3</sub>-24), 3.39 (2H, d, J = 7.2 Hz, H-14), 4.45 (2H, dd, J = 7.5 Hz, H-19), 4.50 (1H, d, J = 8.1 Hz, 25-OH), 5.09 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-25), 5.34 (1H, dd, J = 7.5, 1.5 Hz, H-15), 5.61 (1H, dd, J = 7.2, 1.5 Hz, H-20), 6.85 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2), 7.28 (1H, d, J = 0.6 Hz, H-5), 7.48 (1H, dd, J = 8.4, 0.45 Hz, H-3), 12.92 (1H, d, J = 0.3 Hz, 1-OH); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 184.5 (C-13), 159.7 (C-1), 152.8 (C-10), 152.3 (C-11), 149.4 (C-7), 142.6 (C-21), 138.4 (C-6), 136.6 (C-3), 133.3 (C-16), 123.9 (C-8), 122.1 (C-15), 119.5 (C-20), 119.4 (C-5), 118.8 (C-9), 118.7 (C-12), 109.8 (C-4), 106.2 (C-2), 71.6 (C-19), 56.2 (C-25), 27.1 (C-14), 25.8 (C-22), 25.3 (C-17), 18.4 (C-18), 18.2 (C-23), 17.9 (C-24). Los datos espectroscópicos son idénticos a los reportados en la literatura (Ishida *et al.*, 1975; Kawahara *et al.*, 1988).

#### 4.5.4 Aislamiento, purificación y elucidación estructural del acetato de variecoxantona A (148) a partir de la fracción F<sub>5</sub>

El fraccionamiento secundario de la fracción primaria F<sub>5</sub> (212 mg), mediante una CCA de Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (500 mL: MeOH) condujo a la obtención de cinco fracciones secundarias F<sub>5-I</sub>-F<sub>5-V</sub>. Posteriormente, el análisis cromatográfico por CLAE de la fracción F<sub>5-V</sub> (30 mg) bajo las condiciones que se indican en la **Tabla 2** permitió el aislamiento y

purificación del acetato de variecoxantona A (**148**) bajo la forma de un sólido cristalino amarillo (6 mg; p. f. 89-90 °C,  $t_R$  6.40 min).

**Tabla 2.** Condiciones utilizadas para la separación y purificación del acetato de variecoxantona A (**148**).

Columna	SymmetryPrep™ 7 μm (Waters®) 7.8 × 300 mm
Flujo	2.4 mL/min
Fase móvil	ACN 100%

**Acetato de variecoxantona A (148):** IR por reflectancia  $\nu_{\max}$  3482, 2926, 2855, 1736, 1644, 1601, 1467 y 1232  $\text{cm}^{-1}$ ; EM-FAB<sup>+</sup> [M+1]  $m/z$  383.4139 (calc.  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_6$ ); UV  $\lambda_{\max}$   $\text{CHCl}_3$  234.5, 258.1, 287.7 y 370.8 nm.

#### 4.5.5 Aislamiento, purificación e identificación de la tajixanona (**147**) y la 14-metoxitajixantona (**143**) a partir de la fracción primaria F<sub>7</sub>

El análisis cromatográfico por CLAE de la fracción F<sub>7</sub> (54 mg) bajo las condiciones citadas en la **Tabla 2** permitió el aislamiento y purificación de dos sólidos cristalinos amarillos identificados como 14-metoxitajixantona (**143**; 12 mg; p. f. 201-202 °C;  $t_R$  6.17 min) y la tajixanona (**147**; 15 mg; p. f. 153-155 °C;  $t_R$  7.02 min).

**14-Metoxitajixantona (143):** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_H$  (ppm): 1.25 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -17), 1.32 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 1.85 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -23), 2.36 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -24), 2.74 (1H, ddd,  $J = 2.1, 3.0, 3.6$  Hz, H-20), 3.18 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-14), 3.40 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4.35 (1H, dd,  $J = 3.0, 10.8$ , H-19b), 4.43 (1H, dd,  $J = 3.6, 10.8$  Hz, H-19a), 4.60 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz, H-22b), 4.67 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-15), 4.81 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-22a), 4.94 (1H, sa, OH-25), 5.43 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, OH-25), 6.88 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3), 7.23 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz, H-5), 7.72 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2), 12.86 (1H, 1-OH); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_C$  (ppm): 184.4 (C-13), 162.2 (C-1), 152.7 (C-10), 151.9 (C-11), 149.8 (C-7), 142.5 (C-21), 138.9 (C-6), 135.6 (C-2), 119.1 (C-8), 119.0

(C-3), 116.8 (C-9), 115.9 (C-12), 112.3 (C-22), 110.9 (C-5), 109.0 (C-4), 76.1 (C-15), 66.7 (C-14), 64.7 (C-19), 63.3 (C-25), 57.8, (CH<sub>3</sub>O-14), 56.9 (C-16), 45.0 (C-20), 24.7 (C-17), 22.7 (C-23), 19.8 (C-18), 17.5 (C-24). Estos datos son idénticos a los reportados por Figueroa y colaboradores (2009).

**Tajixantona (147):** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 1.30 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-17), 1.44 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-18), 1.84 (3H, *sa*, CH<sub>3</sub>-23), 1.87 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-27), 2.35 (3H, *d*, J = 0.9 Hz, CH<sub>3</sub>-24), 2.72 (1H, *d*, J = 3.0 Hz, H-20), 3.00 (1H, *dd*, J = 4.8, 12.0 Hz, H-15), 4.33 (1H, *dd*, J = 3.0, 10.8 Hz, H-19b), 4.43 (1H, *ddd*, J = 1.2, 3.75, 10.95 Hz, H-19a), 4.57 (1H, *d*, J = 0.9 Hz, H-22b), 4.79 (1H, *d*, J = 0.9 Hz, H-22a), 4.80 (1H, *s*), 5.41 (1H, *d*, J = 1.8 Hz, H-25), 6.76 (1H, *d*, J = 8.4 Hz, H-2), 7.35 (1H, *d*, J = 0.9 Hz, H-5), 7.54 (1H, *d*, J = 8.4 Hz, H-3), 12.61 (1H, *s*, OH-1); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 184.9 (C-13), 160.8 (C-1), 152.5 (C-10), 151.3 (C-11), 143.4 (C-7), 142.0 (C-21), 139.0 (C-6), 137.5 (C-2), 121.7 (C-8), 119.5 (C-3), 116.1 (C-9), 115.9 (C-12), 112.2 (C-22), 110.2 (C-5), 110.0 (C-4), 63.6 (C-15), 65.0 (C-19), 63.6 (C-25), 58.9 (C-16), 45.4 (C-20), 29.0 (C-14), 24.9 (C-17), 22.6 (C-23), 19.2 (C-18), 17.5 (C-24). Estos datos son congruentes con los reportados por Chexal y colaboradores (1974).

#### 4.5.6 Separación, purificación e identificación del 15-acetil hidrato de tajixantona (145) y 16-clorotajixantona (146) a partir de la fracción primaria F<sub>9</sub>

El fraccionamiento secundario de la fracción F<sub>9</sub> (150 mg) mediante una CCA sobre Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (400 mL; MeOH) condujo a la obtención de seis fracciones secundarias F<sub>10-I</sub>-F<sub>10-VI</sub>; el fraccionamiento posterior de la fracción F<sub>9-III</sub> (35 mg) mediante una CCA sobre Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (20 mL; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) llevó al aislamiento y purificación de 3 mg de 15-acetilhidrato de tajixantona (145) como un sólido cristalino amarillo (p. f. 206-208 °C). Por otra parte, la resolución de la fracción secundaria F<sub>9-II</sub> (40 mg) mediante cromatografía en capa fina en su modalidad preparativa (CCFP; 99:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH) permitió el aislamiento y purificación de 4 mg de un polvo amarillo identificado como 16-clorotajixantona (146), p. f. 179-180 °C.

**15-Acetilhidrato de tajixantona (145):**  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 1.34 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -17), 1.38 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 1.85 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -23), 1.87 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.36 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -24), 2.37 (1H, s, OH-16), 2.73 (1H, *sa*, H-20), 2.90 (1H, *dd*,  $J = 14.25, 10.0$  Hz, H-14b), 3.35 (1H, *dd*,  $J = 14.0, 3.0$ , H-14a), 4.35 (1H, *dd*,  $J = 11.0, 3.0$  Hz, H-19b), 4.43 (1H, *dd*,  $J = 10.5, 3.25$  Hz, H-19a), 4.57 (1H, s, H-22b), 4.80 (1H, s, H-22a), 4.96 (1H, *d*,  $J = 4.0$  Hz, OH-25), 5.16 (1H, *dd*,  $J = 10.5, 3.0$  Hz, H-15), 5.41 (1H, s, H-25), 6.72 (1H, *d*,  $J = 8.0$  Hz, H-2), 7.27 (1H, s, H-5), 7.42 (1H, *d*,  $J = 8.0$  Hz, H-3), 12.56 (1H, s, OH-1);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 184.1 (C-13), 170.2 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ), 160.6 (C-1), 153.2 (C-10), 152.0 (C-11), 149.5 (C-7), 142.6 (C21), 138.5 (C-6), 137.8 (C-3), 121.1 (C-8), 119.1 (C-5), 116.9 (C-12), 115.1 (C-9), 112.2 (C-22), 109.6 (C-2), 109.1 (C-4), 78.6 (C-15), 72.4 (C-16), 64.5 (C-19), 63.1 (C-25), 44.9 (C-20), 29.6 (C-14), 26.9 (C-17), 25.2 (C-18), 22.5 (C-23), 20.7 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ), 17.4 (C-24); Datos espectroscópicos idénticos a los descritos por Rivera Chávez (2009).

**16-Clorotajixantona (146):** IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3486, 3073, 2925, 2849, 1736, 1644, 1567, 1240, 1022 y 920  $\text{cm}^{-1}$ ; EMIE  $[\text{M}]^+ m/z$  458.9392 (calc.  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{Cl}$  458.1496); UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\log \epsilon$  (nm) 3.60 (388), 3.25 (339), 3.76 (301), 3.72 (292), 4.07 (277), 3.96 (258), 3.92 (249), 3.94 (244).

#### 4.5.7 Separación, purificación e identificación del hidrato de tajixantona (23) a partir de la fracción primaria F<sub>11</sub>

El análisis cromatográfico por CLAE de la fracción F<sub>11</sub> bajo las condiciones citadas en la **Tabla 2** permitió el aislamiento y purificación de un sólido cristalino amarillo identificado como hidrato de tajixantona (**23**; 15 mg; p. f. 182-184 °C;  $t_{\text{R}}$  5.50 min).

**Hidrato de tajixantona (23):**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 1.34 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -17), 1.38 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 1.82 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -23), 2.28 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -24), 2.37 (1H, s, OH-16), 2.44 (1H, s, OH-15), 2.63 (1H, *dd*,  $J = 10.8, 14.0$  Hz, H-14b), 2.69 (1H, s, H-20), 3.16 (1H, *dd*,  $J = 1.2, 14.0$  Hz, H-14a), 3.70 (1H, *d*,  $J = 10.8$  Hz, H-15), 4.31 (1H, *dd*,  $J = 2.8, 10.8$  Hz, H-19b), 4.41 (1H, *dd*,  $J = 2.0, 10.8$  Hz, H-19a), 4.53 (1H, s, H-22b), 4.77 (1H, s, H-22a), 4.98 (1H, *d*,  $J$

= 4.0 Hz, OH-25), 5.34 (1H, s, H-25), 6.72 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2), 7.19 (1H, s, H-5), 7.49 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3), 12.54 (1H, s, OH-1);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 184.3 (C-13), 160.3 (C-1), 153.1 (C-10), 151.9 (C-11), 149.5 (C-7), 142.5 (C-21), 138.5 (C-6), 138.3 (C-3), 120.8 (C-8), 119.1 (C-5), 116.8 (C-12), 116.4 (C-9), 112.3 (C-22), 109.9 (C-2), 109.2 (C-4), 77.7 (C-15), 72.9 (C-16), 64.5 (C-19), 63.2 (C-25), 44.8 (C-20), 32.0 (C-14), 26.5 (C-17), 23.6 (C-18), 22.6 (C-23), 17.4 (C-24). Datos espectroscópicos idénticos a los reportados en la literatura (Pornpakankul, *et al.*, 2006).

#### 4.6 Ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor *hCaM L39C-mBBr/V91C-mBBr*

Los espectros de fluorescencia de cada uno de los compuestos analizados se registraron en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, USA) a 25 °C. La adquisición de los datos se realizó por medio del software VINCI 1.6.SP4 (Experiment & Instrumeny Control). La  $\lambda_{\text{ex}}$  para el biosensor fue de 381 nm y la  $\lambda_{\text{em}}$  se registro en el intervalo de 410-550 nm. Una vez adquiridos los datos, se ajustaron para obtener la  $K_d$  del complejo proteína-ligando utilizando la siguiente expresión matemática:

$$v_0 = \frac{(1 + k_d/P_0 + L_0/P_0) - \sqrt{(1 + k_d/P_0 + L_0/P_0)^2 - 4L_0/P_0}}{2}$$

En donde  $P_0$  y  $L_0$  son la concentración de proteína y ligando respectivamente y  $K_d$  es la constante de disociación (Miller *et al.*, 1983). El análisis de los datos se realizó con el programa Origin 8.0.

Los ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM en presencia de los ligantes se realizaron utilizando el biosensor fluorescente *hCaM L39C-mBBr/V91C-mBBr* a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  en solución amortiguadora de NaOAc 5 mM y 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  a pH 5.1 siguiendo la metodología descrita por González-Andrade y colaboradores 2009.

## **4.7 Cálculos de acoplamiento molecular**

### **4.7.1 Preparación de las estructuras para los cálculos**

Las moléculas se construyeron con el programa Hyperchem 8.0 (HyperCube Inc., FL). Para su diseño se tomo en cuenta la ausencia o presencia de la cadena isoprenílica en la posición C-4 así como de un anillo tipo pirano fusionado al núcleo xantona, otra característica importante tomada en cuenta fue la naturaleza de los sustituyentes ubicados en la cadena isoprenílica. La visualización de las estructuras se realizó con uno o varios de los siguientes programas: Hyperchem 8.0, Pymol (DeLano Scientific LLC, CA), y AutoDock Tools (ADT; [www.autodock.scripps.edu](http://www.autodock.scripps.edu)).

### **4.7.2 Optimización geométrica**

La optimización geométrica (minimización de la energía) de todas las moléculas se llevó a cabo con el programa Gaussian 09 utilizando un campo de fuerza de teoría de funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés), a un nivel de teoría híbrido B3LYP 321-G.

### **4.7.3 Acoplamiento molecular (AM)**

Los cálculos de acoplamiento molecular (AM) se realizaron utilizando el programa AutoDock 4.0 ([www.autodock.scripps.edu](http://www.autodock.scripps.edu); Morris *et al.*, 1998). La estructura cristalográfica de la proteína se obtuvo del Protein Data Bank (RCSB; código pdb: 1a29). La adición de los átomos de hidrógenos polares, cargas de Kollman, parámetros de solvatación y volúmenes fraccionarios a la proteína, se realizó utilizando el programa ADT (AutoDock Tools). A cada ligando se le asignaron las cargas parciales de Gasteiger-Marsili, y removieron los átomos de hidrógeno no polares. En todos los casos se permitió la libre rotación en torno a los ejes de los ángulos de torsión para generar todos los confórmeros permisible (Morris *et al.*, 1998).



El acoplamiento molecular (AM), consistió en la generación de mapas electrostáticos para cada tipo de átomo que participa en el “docking”, en una caja de 60×60×60 Å, con un espacio de enrejamiento de 0.375 Å, localizada en el centro de la macromolécula, la cual fue generada con el programa AutoGrid 4, programa que evalúa la energía de unión ligando-proteína. Para determinar las posiciones de menor energía de la interacción se utilizó el algoritmo genético Lamarkiano (LGA, Morris *et al.*, 1998) utilizando los siguientes parámetros: una población de 150 individuos, 2,500,000 evaluaciones energéticas y un máximo de 100 evaluaciones independientes. Posterior a la etapa de búsqueda y evaluación de la energía de las diferentes posiciones y conformaciones de los ligantes, se eligió la posición de menor energía y se realizó nuevamente el análisis, pero en esta ocasión, los mapas electrostáticos generados fueron para aquellos átomos presentes en una caja de 30×30×30 Å centrada en el ligando.

Los resultados obtenidos de los cálculos de acoplamiento molecular fueron analizados utilizando los siguientes programas: AutoDock 4.00, AutoDockTools versión 1.5.0 (1997-2007 Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) y PyMOL (DeLano 2004), sobre los sistemas operativos UNIX y Windows. Cabe mencionar que los cálculos de AM se realizaron con apoyo de la supercomputadora KANBALAM HP C 4000 de la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación, UNAM ([www.super.unam.mx/](http://www.super.unam.mx/)).

## 5. Resultados y discusión

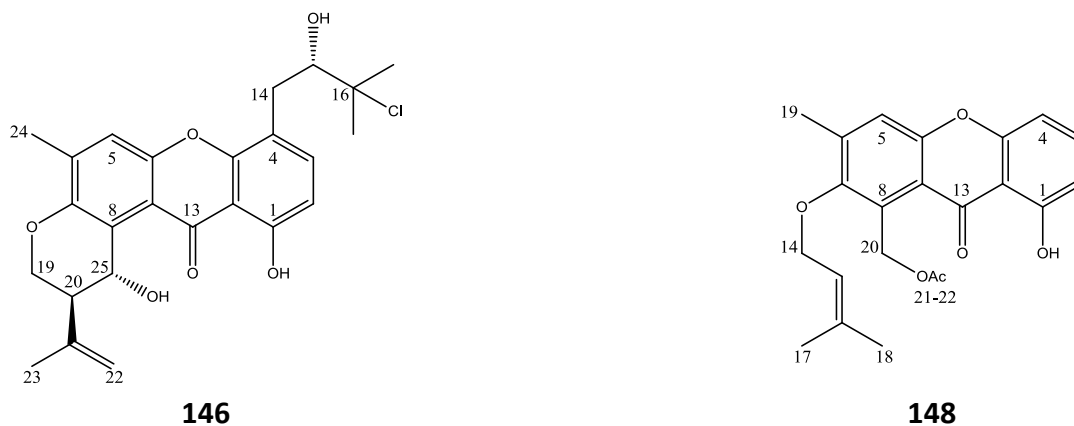
La presentación de los resultados, así como el análisis de los mismos se realizará en tres partes. En la primera se abordará lo concerniente al estudio químico de la especie fúngica *Emericella* 25379; en la segunda parte se discutirán los resultados del efecto de los metabolitos aislados sobre la proteína CaM utilizando el ensayo de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor *hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR*; finalmente, en la tercera sección, se analizarán los resultados de los estudios de acoplamiento molecular realizados con el fin de determinar el probable sitio de unión a la CaM de los ligantes analizados.

### 5.1 Obtención de metabolitos tipo xantona a partir de *Emericella* 25379

La reinvestigación de la especie fúngica *Emericella* 25379 se realizó considerando que los compuestos minoritarios que se detectaron en el estudio realizado por Figueroa y colaboradores en 2009 bien podrían ser análogos del hidrato de tajixantona (**23**) y por lo tanto presentar propiedades anti-CaM (Figueroa *et al.*, 2009).

La estrategia metodológica general seguida para la realización de este estudio fue similar a la descrita por Figueroa (2009) y Rivera Chávez (2009). En primer lugar se realizó la fermentación en mediana escala (20 L) del microorganismo bajo las condiciones descritas en la sección experimental. Al término de la fermentación, se separó el micelio del medio de cultivo y se prepararon los extractos correspondientes. Los extractos orgánicos obtenidos (micelio y medio de crecimiento) se reunieron con base en su similitud cromatográfica. Por último, el extracto orgánico obtenido se sometió a sucesivos procedimientos cromatográficos, lo cual permitió el aislamiento de dos metabolitos secundarios novedosos caracterizados como acetato de variecoxantona A (**148**) y 16-clorotajixantona (**146**); sus estructuras se indican en la **Figura 8**. De manera adicional se obtuvo la tajixantona (**147**), un compuesto conocido, pero aislado por primera vez de esta

especie, el 15-acetil hidrato de tajixantona (**145**), la 14-metoxitajixantona (**143**), la emerigelina (**142**), y el hidrato de tajixantona (**23**). La caracterización de los compuestos obtenidos en este estudio se realizó mediante diversas técnicas espectroscópicas (IR, UV, RMN, uni y bidimensional) y espectrométricas (espectrometría de masas; EMIE, FAB<sup>+</sup>).



**Figura 8.** Metabolitos novedosos de *Emericella 25379*.

## 5.2 Elucidación estructural de los productos obtenidos

### 5.2.1 Elucidación estructural del acetato de variecoxantona A (**148**)

La fórmula molecular del producto **148** se estableció como C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> (12 insaturaciones) mediante EM modalidad FAB<sup>+</sup>. El análisis detallado de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) uni y bidimensional permitió establecer que este producto natural pertenece al grupo de las xantonas preniladas, y es similar a las aisladas por Chexal y colaboradores (1975) a partir de la especie *E. varicolor*. Las características más relevantes de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN (**Espectro 1**) se resumen a continuación:

- a) En δ<sub>H</sub> 12.90 se observa un singulete atribuido a un protón de un grupo hidroxilo ya que al equilibrar la solución bajo análisis con agua deuterada la señal

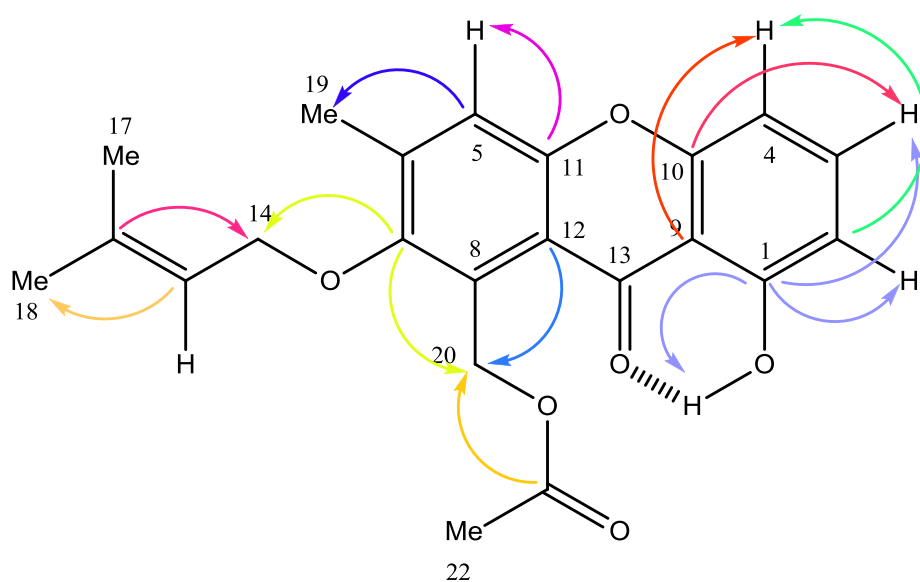
desaparece; el desplazamiento químico de la señal sugirió que el hidroxilo se encuentra quelatado con el grupo carbonilo de la xantona. La presencia del grupo carbonilo se confirmó mediante la presencia de una señal en  $\delta_C$  183.0 en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

- b) En  $\delta_H$  7.88 aparece el cuarteto (*c*,  $J = 1.0$  Hz) típico del protón H-5 del núcleo xantona, el cual muestra un acoplamiento bencílico con la señal en  $\delta_H$  2.50 correspondiente a un metilo sobre anillo aromático.
- c) En  $\delta_H$  7.57 se aprecia un triplete (*t*;  $J = 8.0$ , Hz) asignable al protón H-3.
- d) En  $\delta_H$  6.88 y 6.78 se aprecian las señales doble de dobles (*dd*;  $J = 8.0, 1.0$  Hz) para los hidrógenos aromáticos correspondientes a H-4 y H-2, respectivamente.
- e) En  $\delta_H$  5.79 se observa un singulete que integra para dos protones, y es asignable a los hidrógenos bencílicos (H-20) ubicados en C-20.
- f) En  $\delta_H$  5.60 se aprecia una señal múltiple que corresponde al hidrógeno vinílico H-15.
- g) En  $\delta_H$  4.39 se aprecia una señal doble (*d*;  $J = 7.5$  Hz) que integra para dos protones y es asignable a los hidrógenos H-14 (protones alílicos).
- h) Finalmente, el espectro de  $^1\text{H}$ -NMR muestra señales para cuatro grupos metilos en  $\delta_H$  2,50, 2.10, 1.83 y 1.71, asignables a los metilos  $\text{CH}_3$ -19,  $\text{CH}_3$ -22,  $\text{CH}_3$ -18 y  $\text{CH}_3$ -17.

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (**Espectro 2**) permitió determinar la presencia de 22 átomos de carbono, los cuales pertenecen a once carbonos cuaternarios, cinco metinos, dos metilenos y cuatro metilos. Cabe señalar que los desplazamientos químicos tanto de hidrógeno como de carbono del compuesto **148** son muy similares a los del compuesto **39**, difiriendo únicamente en la señales correspondientes a los hidrógenos y carbono del hidroximetileno en C-20; en **148** la señal para H-20 se encuentra desplazada paramagnéticamente ( $\Delta\delta_H = -0.74$  ppm) debido a que el hidroxilo en esa posición se encuentra esterificado con un residuo de ácido acético. En el caso del carbono la señal se

observó en  $\delta_c$  58 ppm. Además, el espectro de masas del compuesto **148** presentó 42 unidades de masa atómica (*uma*) más que la variecoxantona A (**39**) aislada de *E. varicolor* por Chexal y colaboradores en 1975. Todas estas evidencias indican que **148** es el éster acético de la variecoxantona A (**39**).

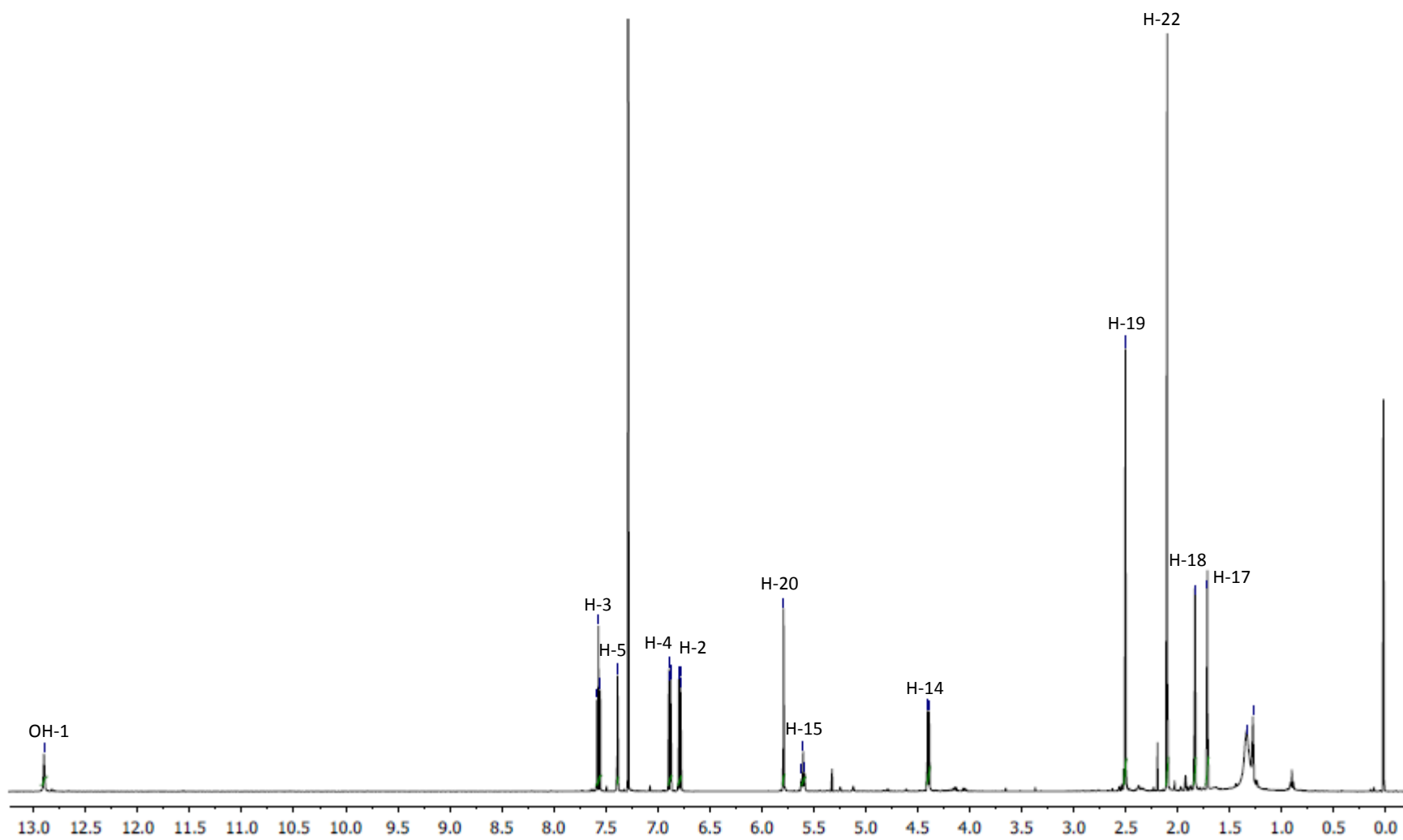
Es importante destacar que el ensamble inequívoco de la molécula se corroboró con el análisis detallado del espectro bidimensional HMBC, el cual permitió determinar las correlaciones mostradas en la **Figura 9**. En la **Tabla 3** se resumen de los datos de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y HMBC del nuevo análogo de la variecoxantona A (**39**).



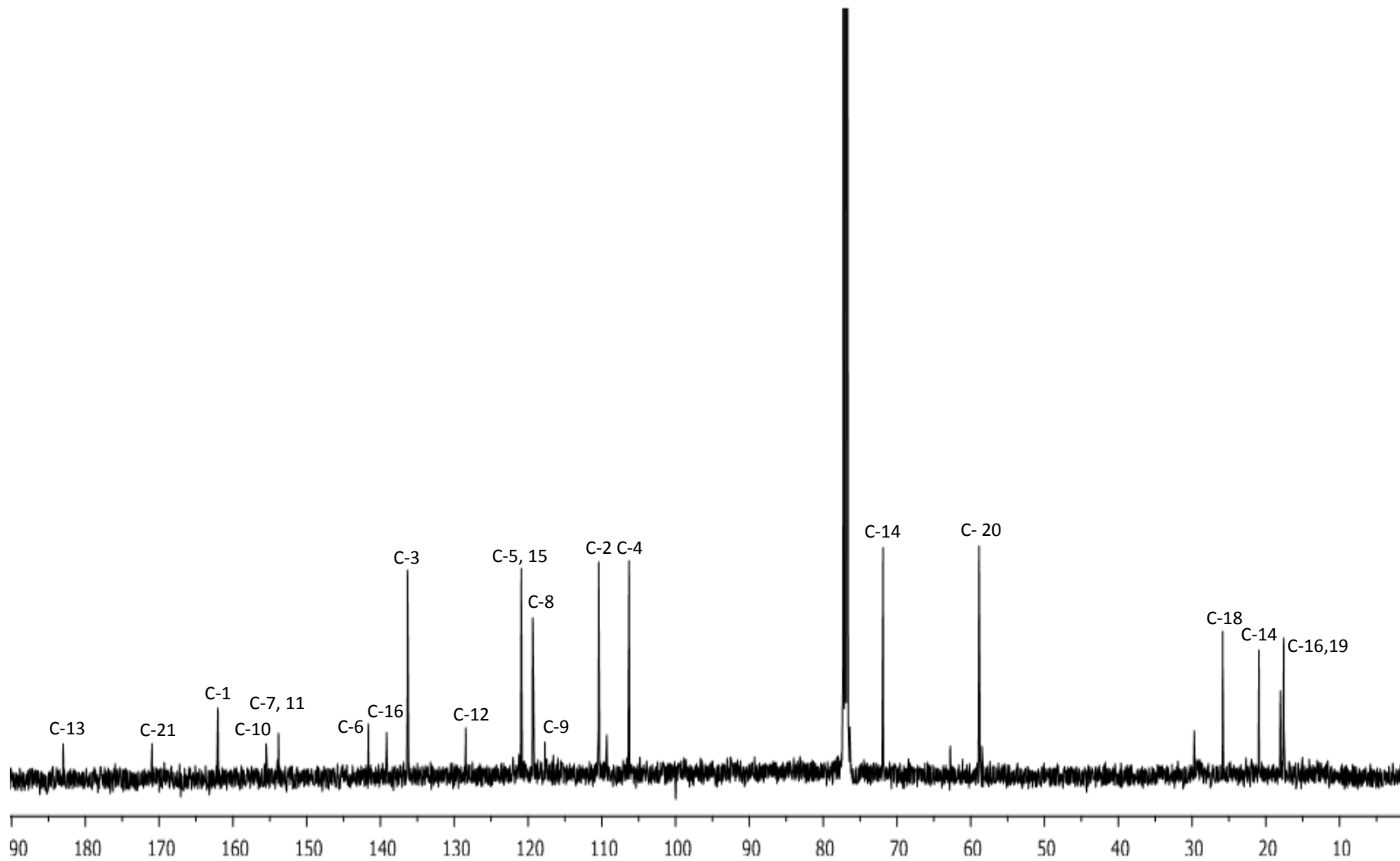
**Figura 9.** Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el acetato de variecoxantona A (**148**).

**Tabla 3.** Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para el acetato de variecoxantona A (**148**).

Posición	Compuesto <b>148</b>		
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), mult ( <i>J</i> en Hz)	HMBC
1	162.0		OH-1, H-2, H-3
2	110.5	6.78 <i>dd</i> (8.0, 1.0)	OH-1, H-4
3	136.3	7.57 <i>dd</i> (8.0, 8.0)	OH-1
4	106.3	6.88 <i>dd</i> (8.0, 1.0)	H-2
5	120.9	7.88 <i>c</i> (1.0)	H-19
6	141.6		H-19
7	153.8		H-5, H-14, H-19, H-20
8	117.7		H-5, H-19, H-20
9	109.3		H-2, H-4
10	155.5		H-3, H-4
11	153.9		H-5, H-19
12	128.4		H-5, H-20
13	183.0		OH-1, H-4, H-5
14	71.8	4.39 <i>d</i> (7.5)	
15	119.3	5.60 <i>m</i>	H-14, H-17, H-18
16	139.1		H-14, H-17, H-18
17	18.0	1.71 <i>s</i>	H-18
18	25.8	1.83 <i>s</i>	H-17
19	17.5	2.50 <i>d</i> (1.0)	H-5
20	58.0	5.79 <i>s</i>	
21	170.9		H-20, H-22
22	20.9	2.10 <i>s</i>	
OH-1		12.90 <i>s</i>	

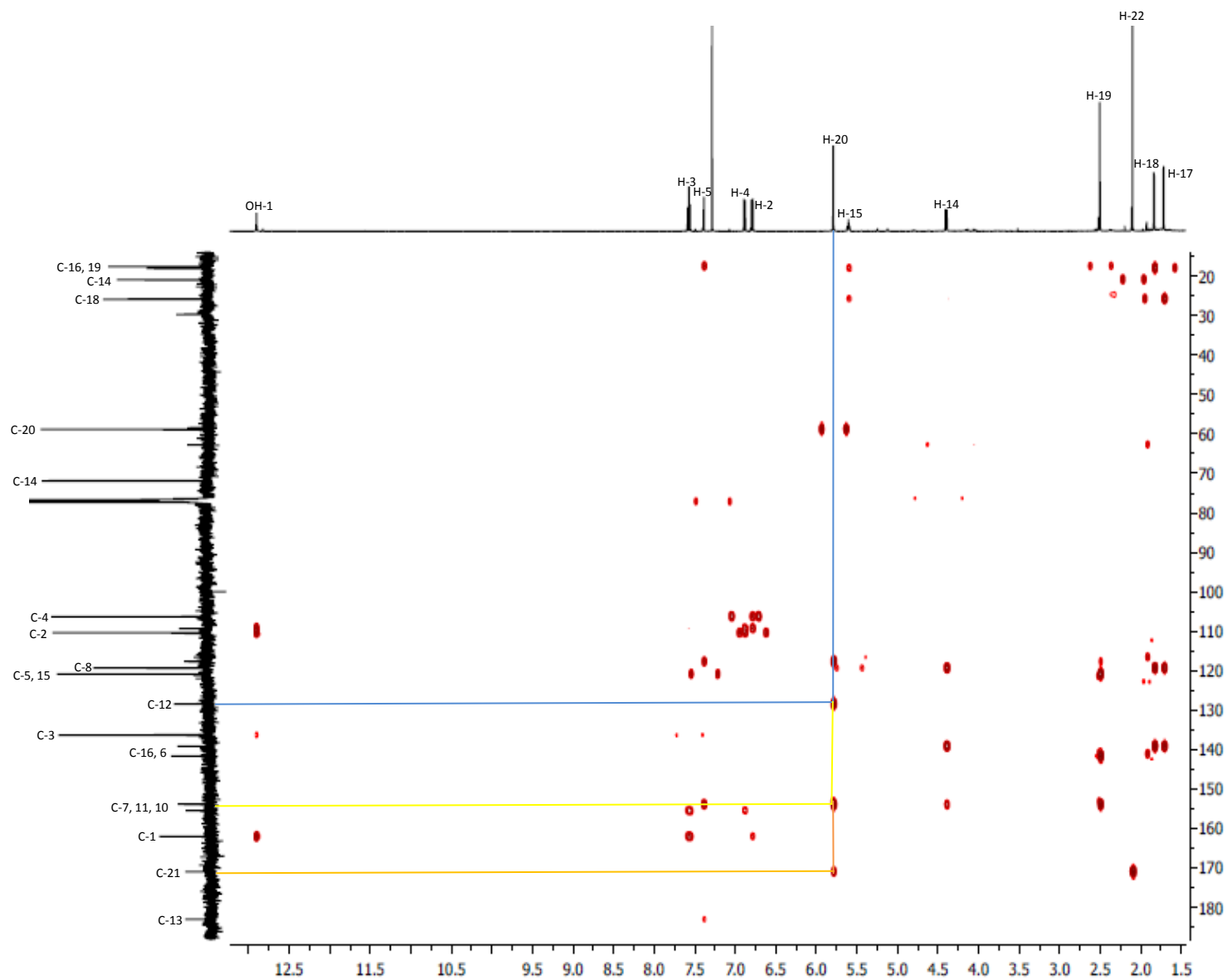


**Espectro 1.** Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del acetato de variecoxantona A (**148**).



**Espectro 2.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del acetato de variecoxantona A (**148**).



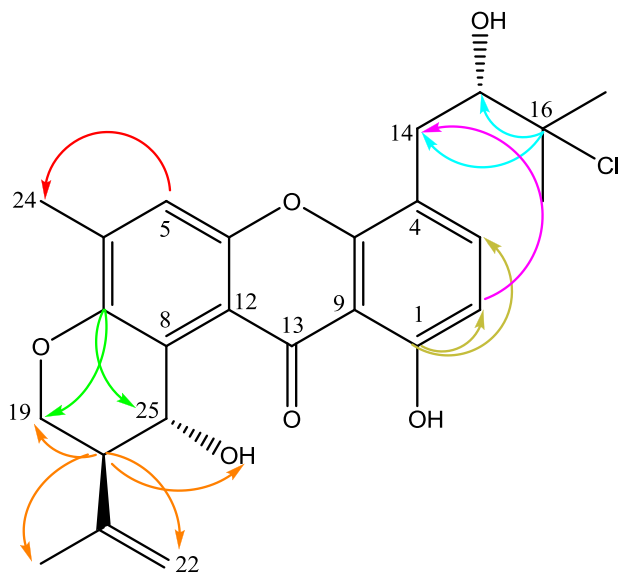


**Espectro 3.** Espectro bidimensional HMBC del acetato de variecoxantona A (**148**).

### 5.2.2 Elucidación estructural de la 16-clorotajixantona (146)

El compuesto **146** se obtuvo como un sólido amarillo (4 mg, p. f. 179-180 °C). El espectro de masas obtenido por impacto electrónico permitió establecer su fórmula molecular como  $C_{25}H_{27}O_6Cl$  y un índice de insaturación de doce.

Por otra parte, el análisis detallado de los espectros de RMN unidimensionales (**Tabla 4**) permitió establecer que este compuesto presentaba el mismo núcleo que el hidrato de tajixantona (**23**), las principales diferencias observadas entre ambos compuestos (**23** y **146**) radican en los desplazamientos químicos de los protones H-14 y H-15 y los carbonos C-14, C-15 y C-16, observadas en  $\delta_H/\delta_C$  3.05, 3.13/28.6, 3.03/63 y  $\delta_C$  58.9 para **146** y en  $\delta_H/\delta_C$  2.63, 3.16/32.0, 5.31/77.7 y  $\delta_C$  72.9 para **23**. De manera adicional, el análisis del espectro HMBC, permitió el ensamblaje de la molécula de manera inequívoca. La **Figura 10** muestra la estructura propuesta para el metabolito **146** y las correlaciones más importantes observadas en el espectro bidimensional HMBC.



**Figura 10.** Correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC para la 16-clorotajixantona (**146**).

Evidentemente, el producto **146** es un derivado de la tajixantona (**147**), que se podría formar vía la apertura del epóxido en condiciones ácidas, y una posterior sustitución nucleofílica ( $S_N1$ ). Sin embargo, ante la duda de que el producto **146** fuese un artefacto generado de la apertura del epóxido del producto **147** durante el proceso de obtención, 2 mg de éste se disolvieron en 2 mL de  $CH_2Cl_2/AcOH$  (10 %) en presencia y ausencia de gel de sílice, y se dejaron en reposo por siete días. El análisis cromatográfico del crudo de esta reacción indicó la ausencia del producto clorado **146**. Así mismo, el análisis por cromatografía en CCF del extracto fúngico preparado con acetato de etilo, en lugar de diclorometano, permitió detectar la presencia del producto **146** en el extracto. Por lo tanto se concluyó que **146** es un metabolito biosintetizado por el hongo y no un artefacto generado durante el proceso de extracción.

### 5.2.3 Elucidación estructural de la tajixantona (**147**)

El compuesto **147** se aisló de la fracción primaria **F<sub>7</sub>** por CLAE y se obtuvo como un sólido cristalino amarillo (15 mg; p. f. 153-155 °C). El espectro de masas en su modalidad impacto electrónico mostró el ión molecular  $[M^+]$  en una relación  $m/z$  de 422, congruente con una fórmula molecular de  $C_{25}H_{26}O_6$  que permite trece insaturaciones. El espectro de masas, además, muestra un pico en  $m/z$  404, que corresponde a la pérdida de una molécula de agua, y otros picos en una  $m/z$  379, 354, 333 (pico base) y 255. En la **Figura 11** se muestran los principales fragmentos estructurales de los picos más importantes observados en el espectro de masas de la tajixantona (**147**).

El análisis detallado de los espectros de  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN del compuesto **147** (**Tabla 5**), permitió establecer que este compuesto presentaba un núcleo similar al de la 14-metoxitajixantona (**143**) aislada por Figueroa y colaboradores (2009) a partir de *Emericella* 25379. Las diferencias principales observadas en los espectros del compuesto **147** y **143** radican en las absorciones de los protones H-14 y H-15 presentes en la cadena isoprenílica que se observan en  $\delta_H/\delta_C$  3.18/66.7 y 4.67/76.1 ppm respectivamente para **143** y 3.05,

3.04/29.0 y 3.00/63.6 ppm, respectivamente para **147**. Las señales para tres hidrógenos en el intervalo entre  $\delta_H$  3.00 y 3.05 atribuidas a H-14 y H-15, así como la ausencia de una señal para un grupo metoxilo en el espectro de RMN de **147** permitieron determinar que este producto es el derivado desmetoxilado de **143**, es decir su estructura corresponde al compuesto conocido como tajixantona (**147**), y sus propiedades concordaron con las descritas previamente en otros trabajos de investigación.

Con fines comparativos, en la **Tabla 6** se incluyen los datos espectroscópicos del resto de las xantonas (**22**, **142** y **145**) aisladas de *Emericella* 25379.

**Tabla 4.** Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para la 16-clorotajixantona (**146**).

Posición	Compuesto <b>146</b>		
	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), mult ( <i>J</i> en Hz)	HMBC
1	160.5		H-2, H-3
2	137.1	7.52 <i>d</i> (8.0)	H-14a, H-14b
3	119.3	6.80 <i>d</i> (8.0)	H-2
4	109.3		H-3, H-14a, H-14b, H-15
5	110.3	7.33 <i>c</i> (1.0)	H-24
6	138.6		
7	149.6		H-5, H-19a, H-19b, H-24, H-25
8	119.3		H-24
9	115.2		H-2
10	152.1		H-14a, H-14b, H-15
11	152.0		H-5
12	121.1		H-20, H-25
13	184.4		
14	28.6	a 3.05 <i>d</i> (8.0) b 3.13 <i>dd</i> (8.0, 16.3)	H-2
15	63.4	3.03 <i>dd</i> (2.0, 10.5)	H-14a, H-14b, H-17, H-18
16	58.9		H-14a, H-14b, H-15
17	24.8	1.34 <i>s</i>	H-18
18	19.0	1.46 <i>s</i>	H-17
19	64.6	a 4.44 <i>ddd</i> (1.0, 3.6, 10.8) b 4.35 <i>dd</i> (3.0, 11.0)	H-25
20	44.9	2.74 <i>ddd</i> (3.0, 3.0, 3.5)	H-19a, H-19b, H-22a, H-22b, H-23, H-25, OH-25
21	142.6		H-19a, H-19b, H-25
22	112.3	a 4.82 <i>ddd</i> (0.5, 1.5, 2.5) b 4.60 <i>dd</i> (1.5, 2.5)	H-23
23	22.5	1.87 <i>s</i>	H-22a, H-22b
24	17.4	2.37 <i>s</i>	H-5
25	63.2	5.43 <i>ddd</i> (1.0, 3.0, 3.5)	H-19a, H-19b, OH-25
OH-1		12.66 <i>s</i>	
OH-15		2.47 <i>s</i>	
OH-25		4.94 <i>a</i>	

**Tabla 5.** Datos espectroscópicos de RMN de la 14-metoxitajixantona (**143**) y la tajixantona (**147**).

Posición	Compuesto <b>143</b>		Compuesto <b>147</b>	
	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), mult ( <i>J</i> en Hz)	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), mult ( <i>J</i> en Hz)
1	162.2		160.8	
2	135.6	7.72 <i>d</i> (8.5)	137.5	6.76 <i>d</i> (8.4)
3	119.0	6.88 <i>d</i> (8.5)	119.5	7.54 <i>d</i> (8.4)
4	109.0		110.0	
5	110.9	7.23 <i>d</i> (1.0)	110.5	7.35 <i>d</i> (0.9)
6	138.9		139.0	
7	149.8		143.4	
8	119.1		121.7	
9	116.8		116.1	
10	152.7		152.5	
11	151.9		151.3	
12	115.9		115.9	
13	184.4		184.9	
14	66.7	3.18 <i>d</i> (8.0)	29.0	a 3.05 <i>dd</i> (7.2, 15.0) b 3.04 <i>d</i> (4.8, 13.2)
15	76.1	4.67 <i>d</i> (8.0)	63.6	3.00 <i>dd</i> (4.8, 7.2)
16	56.9		58.9	
17	24.7	1.25 <i>s</i>	24.9	1.30 <i>s</i>
18	19.8	1.32 <i>s</i>	19.2	1.44 <i>s</i>
19	64.7	a 4.43 <i>dd</i> (3.6, 10.8) b 4.35 <i>dd</i> (3.0, 10.8)	65.0	a 4.43 <i>ddd</i> (1.2, 3.7, 10.9) b 4.33 <i>dd</i> (3.0, 10.8)
20	45.0	2.74 <i>ddd</i> (2.1, 3.0, 3.6)	45.4	2.72 <i>d</i> (3.0)
21	142.5		142.0	
22	112.3	a 4.81 <i>d</i> (2.5) b 4.60 <i>d</i> (1.0)	112.2	a 4.79 <i>d</i> (0.9) b 4.57 <i>d</i> (0.9)
23	22.7	1.85 <i>s</i>	22.6	1.84 <i>sa</i>
24	17.5	2.36 <i>s</i>	17.5	2.35 <i>d</i> (0.9)
25	63.3	5.43 <i>d</i> (2.1)	63.3	5.41 <i>d</i> (1.8)
OH-1		12.86 <i>s</i>		12.61 <i>s</i>
CH <sub>3</sub> O-14	57.8	3.40 <i>s</i>		
OH-25		4.94 <i>sa</i>		4.80 <i>sa</i>

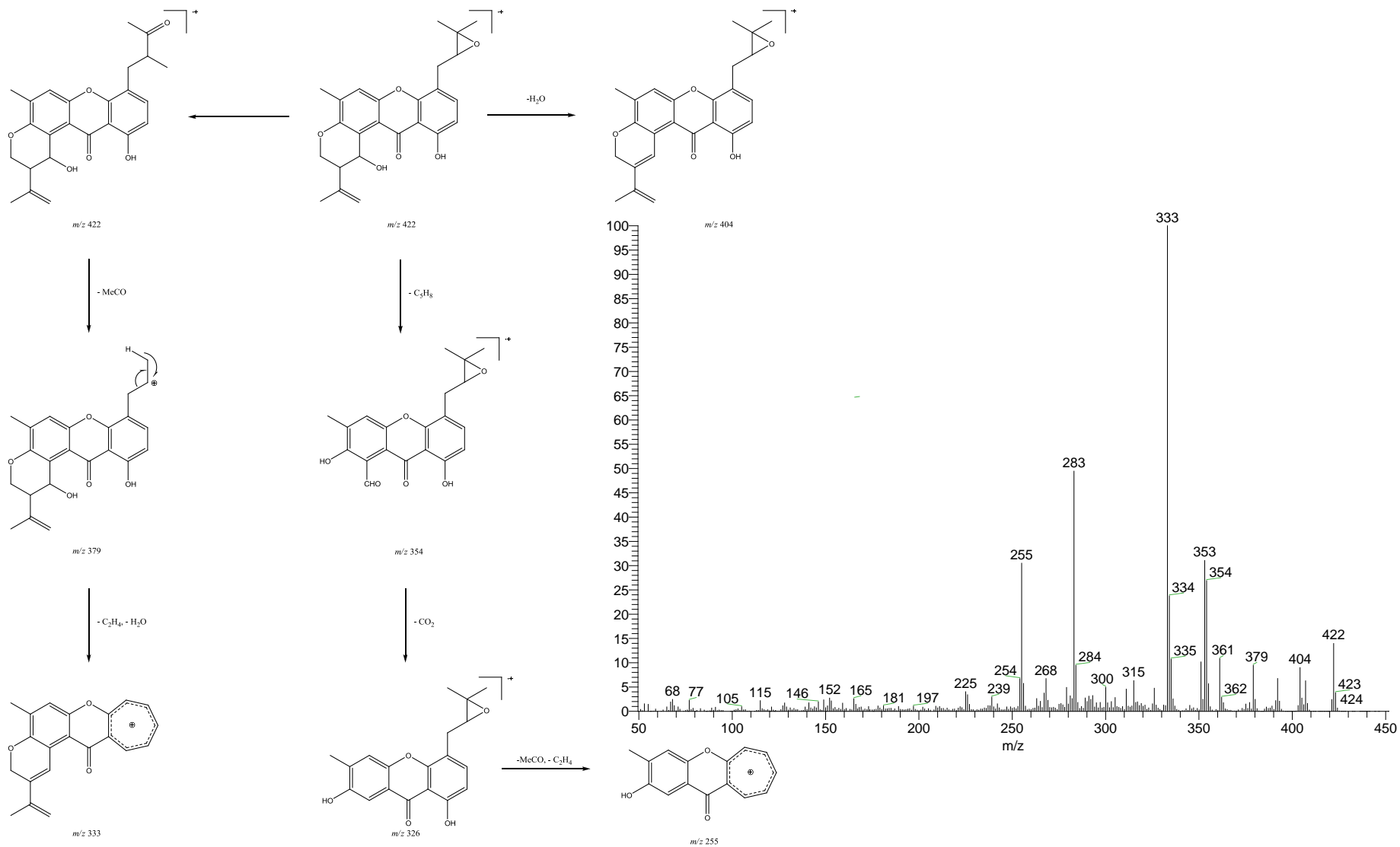


Figura 11. Principales fragmentaciones de la tajixantona (147).

**Tabla 6.** Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para el hidrato de tajixantona (**23**), la emerigelina (**142**) y el 15-acetil hidrato de tajixantona (**145**), compuestos aislados de *Emericella* 25379.

Posición	<b>23</b>	<b>142</b>	<b>145</b>
	$\delta_C/\delta_H$ , mult ( <i>J</i> en Hz)	$\delta_C/\delta_H$ , mult ( <i>J</i> en Hz)	$\delta_C/\delta_H$ , mult ( <i>J</i> en Hz)
1	160.3	159.7	160.6
2	109.9/6.72 <i>d</i> (8.4)	106.2/6.85 <i>d</i> (8.4)	109.6/6.72 <i>d</i> (8.0)
3	138.3/7.49 <i>d</i> (8.4)	136.6/7.48 <i>d</i> (0.45, 8.4)	137.8/7.42 <i>d</i> (8.0)
4	109.2	109.8	109.1
5	119.1/7.19 <i>s</i>	119.4/7.28 <i>d</i> (0.6)	119.1/7.27 <i>s</i>
6	138.5	138.4	138.5
7	149.5	149.4	149.5
8	120.8	123.9	121.1
9	116.3	118.8	115.1
10	153.1	152.8	153.2
11	151.9	152.3	152.0
12	116.8	118.7	116.9
13	184.3	184.5	184.1
14	32.0/a 3.16 <i>dd</i> (1.2, 14.0) b 2.63 <i>dd</i> (10.8, 14.0)	27.1/a 3.39 <i>d</i> (7.2)	29.6/a 3.35 <i>dd</i> (3.0, 14.0) b 2.90 <i>dd</i> (10.0, 14.2)
15	77.7/5.31 <i>dd</i> (7.2, 7.6)	122.1/5.34 <i>dd</i> (1.5, 7.5)	78.6/5.16 <i>dd</i> (3.0, 10.5)
16	72.9	133.3	72.4
17	26.5/1.34 <i>s</i>	25.3/1.74 <i>s</i>	26.9/1.34 <i>s</i>
18	23.6/1.39 <i>s</i>	18.4/1.74 <i>s</i>	25.2/1.38 <i>s</i>
19	64.5/a 4.41 <i>dd</i> (2.0, 10.8) b 4.31 <i>dd</i> (2.8, 10.8)	71.6/4.45 <i>d</i> (7.5)	64.5/a 4.43 <i>dd</i> (3.2, 10.5) b 4.35 <i>dd</i> (3.0, 11.0)
20	44.8/2.69 <i>s</i>	119.5/5.61 <i>dd</i> (1.5, 7.2)	44.9/2.73 <i>sa</i>
21	142.5	142.6	142.6
22	112.3/a 4.77 <i>s</i> ; b 4.53	25.8/1.81 <i>s</i>	112.2/a 4.80 <i>s</i> , b 4.57 <i>s</i>
23	22.6/1.82 <i>s</i>	18.2/1.71 <i>s</i>	18.2/1.85 <i>s</i>
24	17.4/2.28 <i>s</i>	17.9/ 2.41 <i>s</i>	17.4/2.36 <i>s</i>
25	63.2/5.34 <i>s</i>	56.2/5.41 <i>s</i>	63.1/5.41 <i>s</i>
CH <sub>3</sub> COO			170.2
CH <sub>3</sub> COO			20.7/1.87 <i>s</i>
OH-1	12.54 <i>s</i>	12.92 <i>d</i> (0.3)	12.56
OH-15	2.44 <i>s</i>		
OH-16	2.37 <i>s</i>		2.37 <i>s</i>
OH-25	4.98 <i>d</i> (4.0)	4.50 <i>d</i> (8.1)	4.96 <i>d</i> (4.0)



### 5.3 Determinación de la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona (23) con la CaM

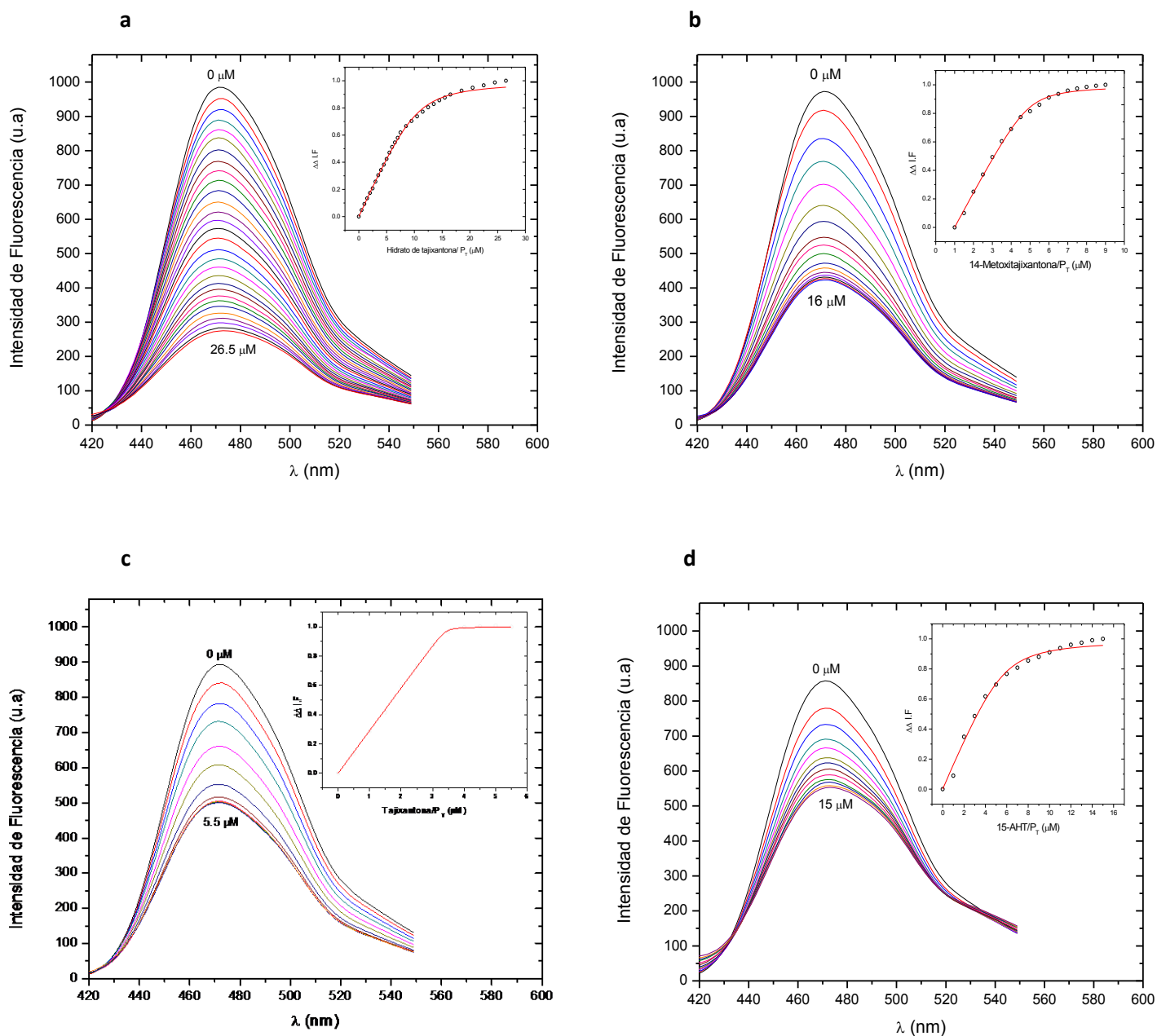
Como se mencionó en el apartado de antecedentes, el hidrato de tajixantona (**23**) y su análogo la 14-metoxitajixantona (**143**) inhiben de manera significativa la activación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-PDE-1 (Figuroa, 2009), con concentraciones inhibitorias cincuenta ( $\text{CI}_{50}$ ) de  $5.54 \pm 1.28$  y  $5.62 \pm 1.25$   $\mu\text{M}$  respectivamente; sus actividades son comparables con las del inhibidor clásico **CPZ** ( $\text{CI}_{50} = 7.26 \pm 1.60$ ). Sin embargo, hasta ahora no se ha determinado si estos compuestos se unen directamente a la proteína CaM, la enzima PDE-1 o al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-PDE-1. Por lo tanto, en el presente estudio se realizaron ensayos de apagamiento de la fluorescencia utilizando el biosensor **hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR**. La utilización de este desarrollo presenta ciertas ventajas tales como: mediciones directas en solución, utilización de una mínima cantidad de muestra, una alta sensibilidad y especificidad de unión, así mismo, este biosensor permite realizar determinaciones cuantitativas de los parámetros de unión. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de estos ensayos.

#### 5.3.1 Ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor **hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR**

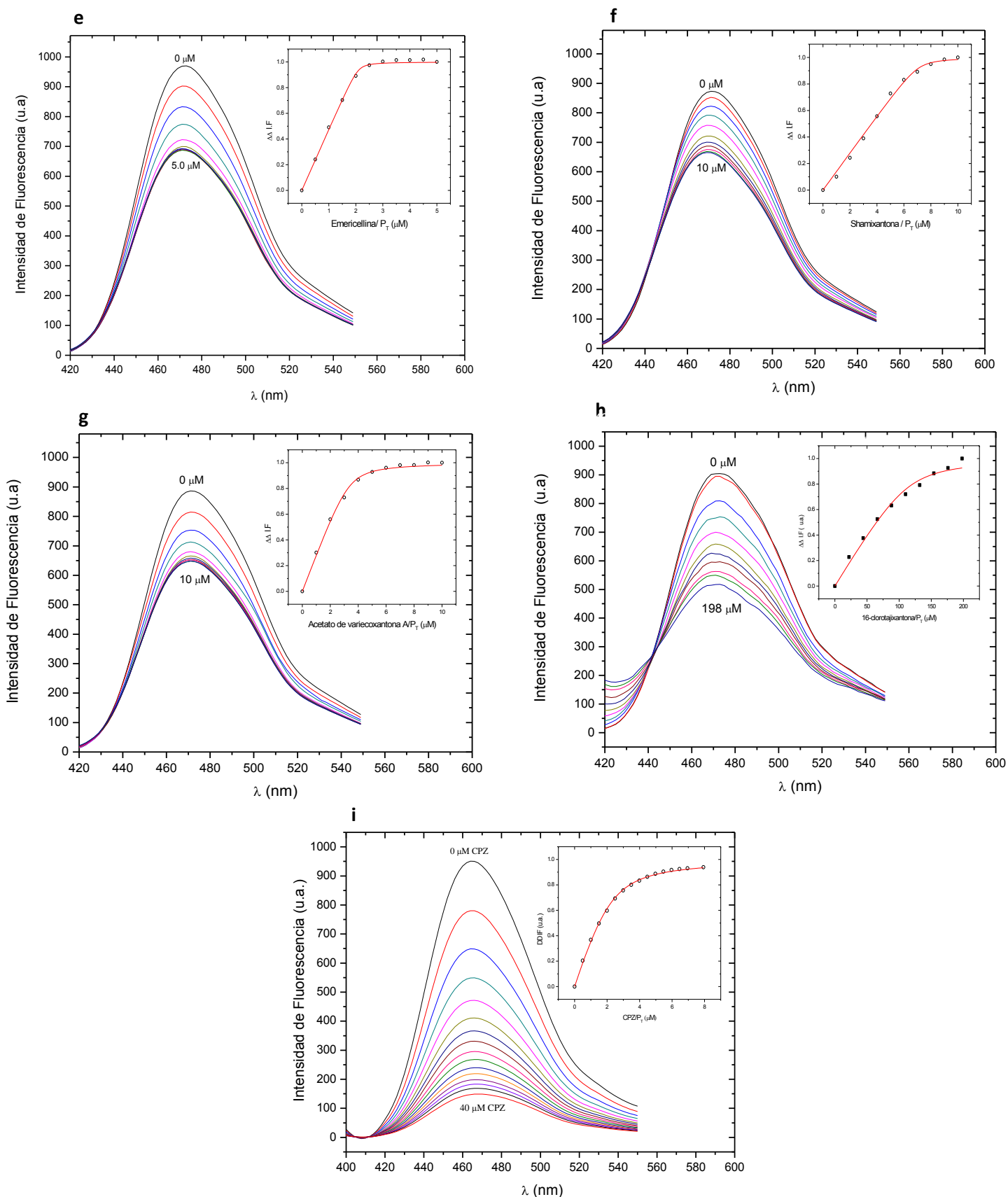
La interacción de un ligante con el biosensor **hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR** provoca un cambio conformacional en la proteína que modifica el microambiente de los fluoróforos en las posiciones 39 y 91 y con ello, la intensidad de fluorescencia del biosensor. Esta respuesta permite determinar si los compuestos a ensayar interaccionan directamente con la proteína CaM.

En el presente trabajo los cambios de las curvas de la fluorescencia del biosensor en presencia de varios ligantes se registraron luego de titular la proteína con cantidades conocidas de cada uno de los compuestos. El análisis de los resultados obtenidos mediante la expresión matemática mostrada en la sección de antecedentes permitió

determinar la constante de disociación ( $K_d$ ), un parámetro de afinidad de cada compuesto con la CaM. En la **Figura 12** y **Tabla 7** se muestran los resultados de las titulaciones del biosensor con los metabolitos (**23**), 14-metoxitajixantona (**143**), tajixantona (**147**), 15-acetil hidrato de tajixantona (**145**), emerlicina (**142**), shamixantona (**141**), acetato de variecoxantona A (**148**), la 16-clorotajixantona y, el control positivo clorpromazina (**CPZ**).



**Figura 12.** Espectros de fluorescencia y curvas de titulación del biosensor *hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR* con los ligantes a) hidrato de tajixantona (**23**), b) 14-metoxitajixantona (**143**), c) tajixantona (**147**), d) 15-acetil hidrato de tajixantona (15-AHT, **145**), e) emerlicina (**142**), f) shamixantona (**141**), g) acetato de variecoxantona A (**148**), h) 16-clorotajixantona e i) clorpromazina (**CPZ**).



**Figura 12.** Espectros de fluorescencia y curvas de titulación del biosensor fluorescente *hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR* con los ligandos a) hidrato de tajixantona (**23**), b) 14-metoxitajixantona (**143**), c) tajixantona (**147**), d) 15-acetil hidrato de tajixantona (15-AHT, **145**), e) emericelina (**142**), f) shamixantona (**141**), g) acetato de variecoxantona A (**148**), h) 16-clorotajixantona e i) clorpromazina (**CPZ**) (continuación).

**Tabla 7.** Resultados del ensayo de fluorescencia; cálculo de la constante de disociación ( $K_d$ ) y coeficiente de correlación cuadrático ( $R^2$ ) del ajuste para los compuestos **23**, **143**, **147**, **145**, **142**, **141**, **148**, **146** y **CPZ**.

Ligante	$K_d$ (nM)	$R^2$
<b>23</b>	828 ± 73	0.996
<b>143</b>	250 ± 41	0.996
<b>147</b>	4 ± 1	0.999
<b>145</b>	308 ± 63	0.990
<b>142</b>	10 ± 4	0.998
<b>141</b>	49 ± 23	0.995
<b>148</b>	138 ± 28	0.997
<b>146</b>	7.35 ± 2.6*	0.985
<b>CPZ</b>	410 ± 20	0.998

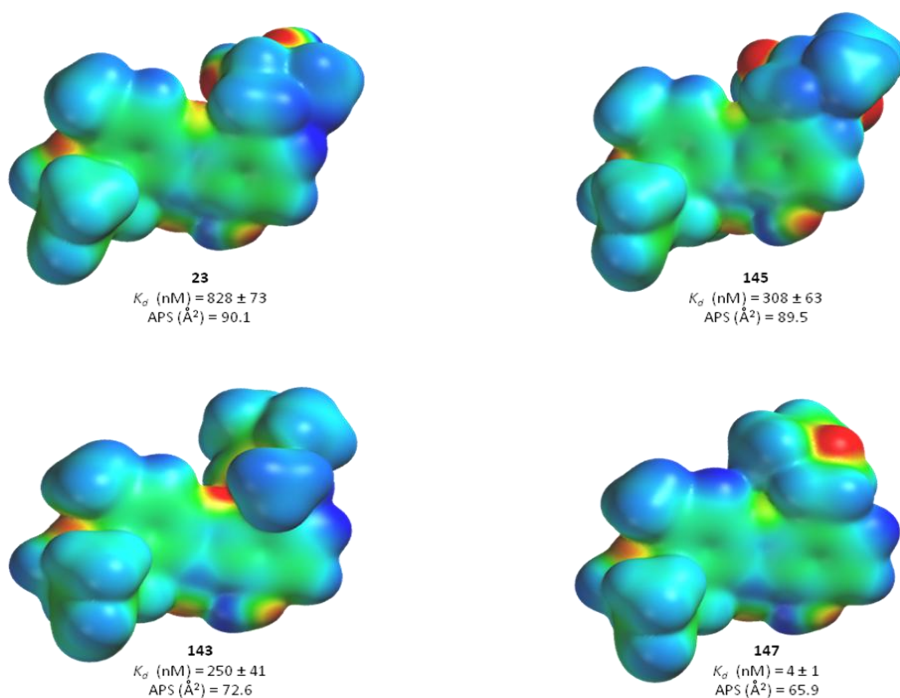
\* Valor dado en concentración  $\mu\text{M}$

Como se ilustra en la **Figura 12**, en todos los casos se observó un cambio de la fluorescencia del biosensor que se atribuye a la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -hCaM L39C-mBBr/V91C-mBBr-ligante. Los compuestos **23**, **143**, **145**, **147**, **146** y **CPZ** provocan un claro apagamiento de la fluorescencia del biosensor de una magnitud del 72, 52, 57, 44, 42 y 85 %, respectivamente. En el caso de los ligantes **141**, **142** y **148** el apagamiento es menor (24, 28 y 23 %, respectivamente), estas diferencias pueden ser atribuidas al diferente arreglo estructural que adoptan los ligando al unirse a la CaM. Sin embargo, cabe destacar que los valores de  $K_d$  en todos los casos analizados son del orden nanomolar (nM), excepto para **146**. Estos resultados indican que los metabolitos de tipo xantona aislados del extracto orgánico de la especie fúngica *Emericella* 25379 interaccionan directamente con la CaM y su elevada afinidad con la proteína permite proponerlos como moléculas prototipo para el desarrollo de fármacos antipsicóticos o anticancerígenos. Asimismo, es importante destacar que todos los ligantes evaluados excepto **23** y **146** muestran una mejor afinidad hacia la CaM que el control positivo clorpromazina (**CPZ**).

Por otra parte, el análisis global de los resultados obtenidos permitió establecer algunas relaciones estructura-afinidad importantes para lograr una interacción más estable entre el ligante y la proteína; las cuales se resumen a continuación:

- a. La presencia de la cadena isoprenílica en la posición C-4 aumenta considerablemente la capacidad antagonista sobre la CaM, así la  $K_d$  calculada para el compuesto **148** que carece de esta cadena fue de  $138 \pm 28$  nM; en contraste, la constante para el ligante **142** que sí posee una cadena isoprenílica en C-4 fue de  $10 \pm 4$  nM.
- b. La ausencia de sustituyentes en la posición C-14 incrementa la actividad anti-CaM de los compuestos, esto se observa claramente en los compuestos **143** y **147** cuyas  $K_d$ 's calculadas fueron de  $250 \pm 41$  nM y  $4 \pm 1$  nM, respectivamente. Entonces, la presencia de un sustituyente en C-14 disminuye la afinidad alrededor de 60 veces.
- c. A medida que disminuye el área polar superficial, es decir la densidad electrónica, en la cadena isoprenílica de la posición C-4 (**Figura 13**), la afinidad de los ligantes con la CaM aumenta. Así en la serie de productos **23**, **145**, **147** y **143**, el compuesto **147** presenta la interacción más estable con la proteína, en tanto que la de menor estabilidad es la de **23**.
- d. La apertura del anillo piráno genera un ligante de mayor afinidad. Esta afirmación se basa en el hecho de que el compuesto **142** presenta una afinidad con la CaM cinco veces mayor que la del compuesto **141**; las  $K_d$ 's calculadas son  $10 \pm 4$  nM y  $49 \pm 23$ , respectivamente.
- e. Finalmente, el apagamiento de la fluorescencia del biosensor puede estar relacionado con el tipo de sustituyentes en la cadena isoprenoide, por ejemplo, el compuesto **23** con dos grupos hidroxilos en la cadena presenta una elevada densidad electrónica e induce un apagamiento de la fluorescencia del 72 %; en el caso del compuesto **147**, con un grupo epóxido, la densidad electrónica es menor y el apagamiento es del 44 %;

por último, el ligante **141** con una cadena netamente hidrofóbica muestra un apagamiento de la fluorescencia del 24 % y el compuesto **148** que carece de cadena apaga la fluorescencia en un 23 %. Entonces, los compuestos que contienen sustituyentes polares en la cadena isoprenílica de la posición C-4 provocan un mayor apagamiento de la fluorescencia, debido a dos factores, el tipo de sustituyente y el arreglo estructural en el complejo CaM-ligante.



**Figura 13.** Densidad electrónica de los compuestos **23**, **145**, **143** y **147**, calculada y visualizada con Spartan '08.

#### 5.4 Estudios de acoplamiento molecular (AM)

Las técnicas de acoplamiento molecular constituyen una herramienta adicional que permite estimar, de manera teórica, la interacción ligante-receptor y son las más ampliamente usadas para predecir el sitio probable de unión de un ligante con su receptor, así como la afinidad de unión de fármacos de interés terapéutico con sus

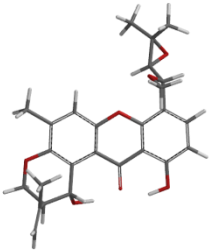
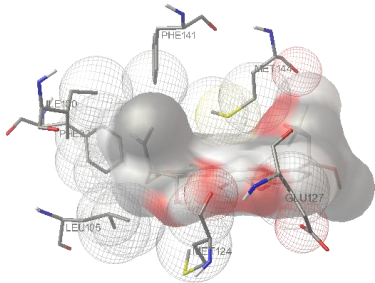
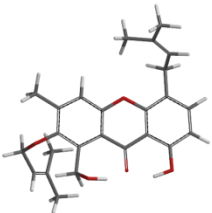
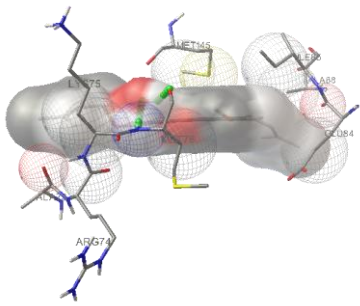
blancos moleculares. Complementario a lo anterior, el conocimiento del sitio de interacción entre un ligante y la macromolécula receptora constituye una herramienta poderosa para el diseño racional de fármacos ya que nos permiten entender los factores estructurales que son importantes en la interacción de un fármaco con un blanco terapéutico. Además son de gran utilidad para la elucidación de la función de algunas proteínas involucradas en procesos metabólicos.

La técnica de AM utiliza una parametrización energética con la cual se obtienen constantes de unión o afinidad ( $K_i$ ) y permite encontrar el sitio de unión más probable entre el ligante y el receptor, es decir, la que menos energía requiera.

Con base en estas consideraciones, en el presente trabajo se realizaron estudios de acoplamiento molecular (AM) de diversos análogos del hidrato de tajixantona (**23**) previamente ensayados experimentalmente con el biosensor fluorescente **hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR** y de algunos compuestos aislados a partir de diferentes especies del género *Emericella*. En total se analizaron 14 compuestos, 8 de ellos evaluados experimentalmente y, los otros seis estructuralmente relacionados. Todo ello con la finalidad de comparar y complementar los resultados experimentales obtenidos de los ensayos de apagamiento de la fluorescencia reportados en este trabajo y los ensayos enzimáticos funcionales reportados por Figueroa y colaboradores (2009).

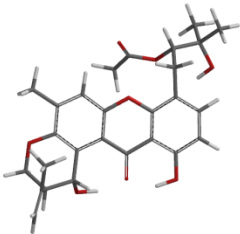
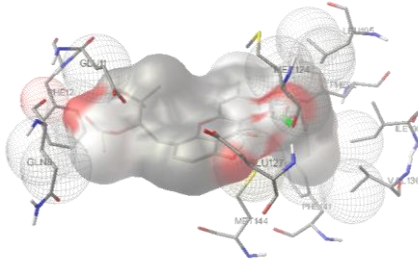
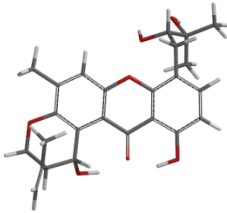
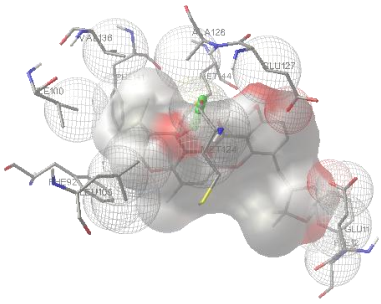
Los estudios de AM se realizaron empleando la estructura cristalizada de la CaM, obtenida del Protein Data Bank (PDB; código 1a29). Para ello, se optimizaron las geometrías de los compuestos a evaluar utilizando el programa Gaussian 09 (**Tabla 8**), posteriormente, se encontraron los sitios de unión más probables de cada uno de los ligantes tomando en cuenta diferentes factores energéticos y empleando el programa AutoDock. Para cada ligante se obtuvo la energía libre de unión estimada (kcal/mol), la constante de inhibición, así como los residuos con los que estos interactúan.

**Tabla 8.** Parámetros e información sobre la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona (**23**) y la CaM generados por acoplamiento molecular. Estructura optimizada del ligante y energía calculada en unidades arbitrarias (u.a), energía libre de unión (ELU), constante de inhibición estimada ( $K_i$ ) y residuos involucrados en la interacción.

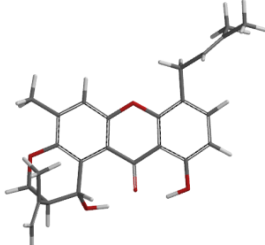
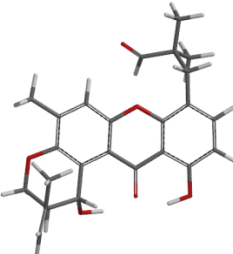
Ligante	Estructura optimizada y energía (u.a)	Energía libre de unión (ELU, kcal/mol)/ $K_i$ (nM)/ residuos involucrados en la interacción (EH)
143	 <p>-1525.74</p>	<p>- 10.3/ 26.9</p> <p>Phe 141, Met 124, Glu 127, Met 144, Leu 105, Phe 92, Ile 100</p> 
142	 <p>-1386.56</p>	<p>-9.36/ 137.3</p> <p>Lys 75, Met 145, Ile 85, Ala 88, Glu 84, Met 76, Ala 73, Arg 74</p> 

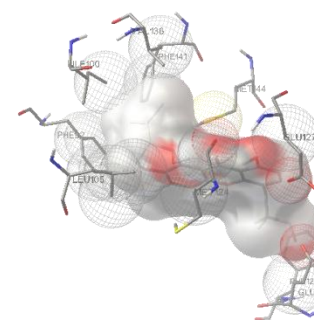
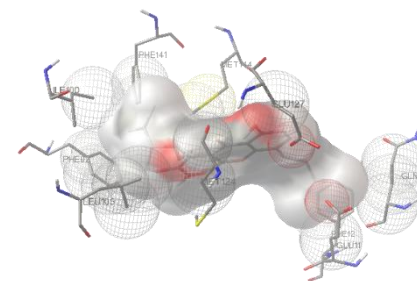


**Tabla 8.** Parámetros e información sobre la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona (**23**) y la CaM generados por acoplamiento molecular. Estructura optimizada del ligante y energía calculada en unidades arbitrarias (u.a), energía libre de unión (ELU), constante de inhibición estimada ( $K_i$ ) y residuos involucrados en la interacción (**continuación**).

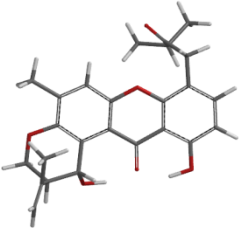
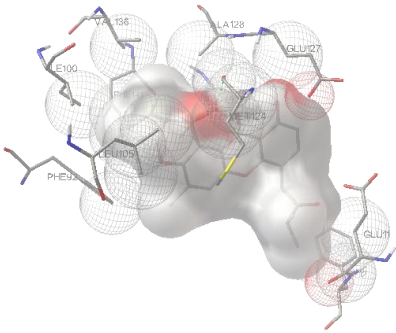
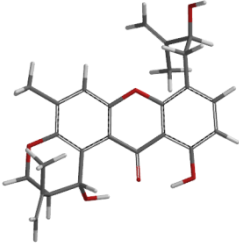
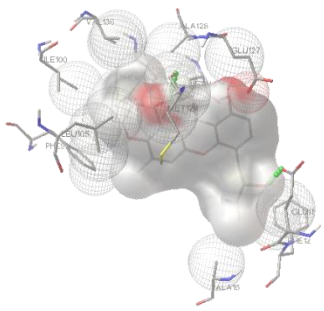
Ligante	Estructura optimizada y energía (u.a)	Energía libre de unión (ELU, kcal/mol)/ $K_i$ (nM)/ residuos involucrados en la interacción (EH)
145	 <p>-1639.73</p>	<p>-11.6/ 3.1</p> <p>Phe 92, Leu 105, Ile 100, <i>Met 124</i>, Val 136, Phe 141, Met 144, Glu 127, Glu 11, Phe 12</p> 
23	 <p>-1487.89</p>	<p>-11.0/ 8.6</p> <p>Val 136, Phe 141, Ile 100, Phe 92, Leu 105, Ala 128, Met 144, <i>Met 124</i>, Glu 127, Glu 11, Phe 12</p> 

**Tabla 8.** Parámetros e información sobre la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona (**23**) y la CaM generados por acoplamiento molecular. Estructura optimizada del ligante y energía calculada en unidades arbitrarias (u.a), energía libre de unión (ELU), constante de inhibición estimada ( $K_i$ ) y residuos involucrados en la interacción (**continuación**).

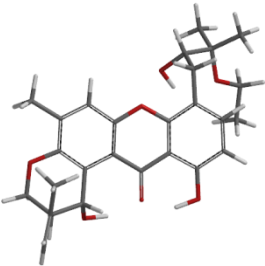
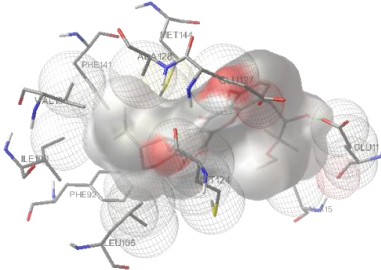
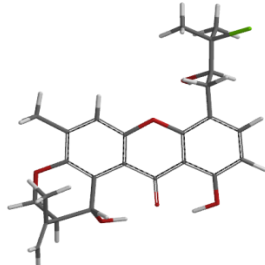
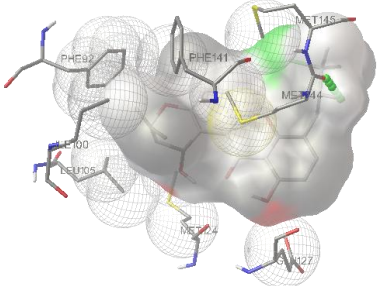
Ligante	Estructura optimizada y energía (u.a)	Energía libre de unión (ELU, kcal/mol)/ $K_i$ (nM)/ residuos involucrados en la interacción (EH)
141	 -1337.08	- 9.65/ 83.0  Phe 141, Met 144, Glu 127, Met 124, Leu 105, Phe 92, Ile 100, Phe 12, Glu 11, Gln 8
131	 -1411.90	- 9.56/ 98.2  Phe 141, Met 144, Val 136, Ile 100, Phe 92, Leu 105, Met 124, Glu 127, Glu 11, Phe 12



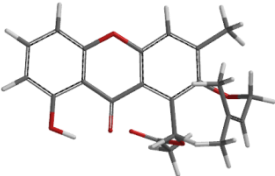
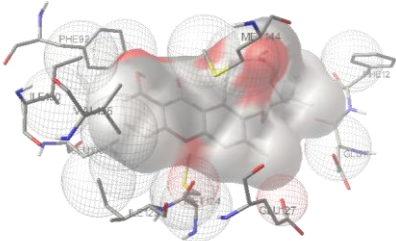
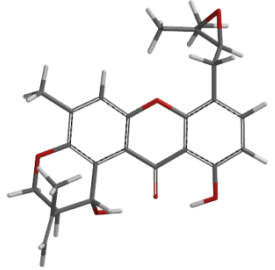
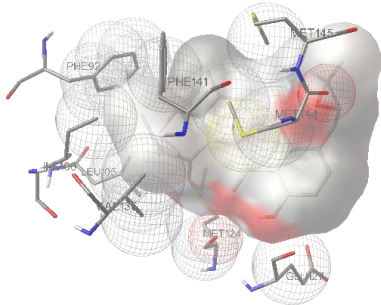
**Tabla 8.** Parámetros e información sobre la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona (**23**) y la CaM generados por acoplamiento molecular. Estructura optimizada del ligante y energía calculada en unidades arbitrarias (u.a), energía libre de unión (ELU), constante de inhibición estimada ( $K_i$ ) y residuos involucrados en la interacción (**continuación**).

Ligante	Estructura optimizada y energía (u.a)	Energía libre de unión (ELU, kcal/mol)/ $K_i$ (nM)/ residuos involucrados en la interacción (EH)
132	 <p>-1411.90</p>	<p>- 9.79/ 66.1</p> <p>Phe 141, Val 136, Ile 100, Phe 92, Leu 105, <i>Met</i> 124, Ala 128, Met 144, Glu 127, Glu 11, Phe 12</p> 
133	 <p>-1411.86</p>	<p>-9.86/ 58.7</p> <p>Val 136, Ile 100, Leu 105, Phe 92, Ala 128, Phe 141, Glu 127, <i>Met</i> 124, Met 144, Glu 11, Phe 12, Ala 15</p> 

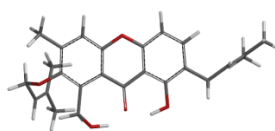
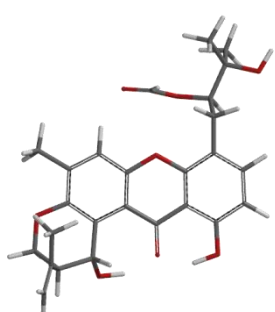
**Tabla 8.** Parámetros e información sobre la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona (**23**) y la CaM generados por acoplamiento molecular. Estructura optimizada del ligante y energía calculada en unidades arbitrarias (u.a), energía libre de unión (ELU), constante de inhibición estimada ( $K_i$ ) y residuos involucrados en la interacción (**continuación**).

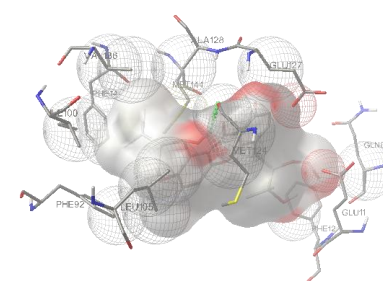
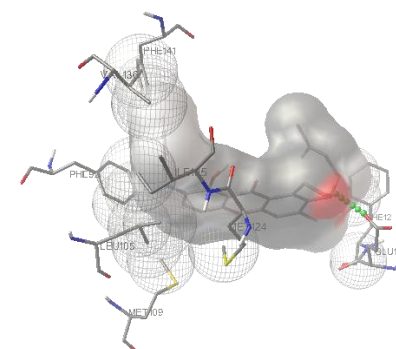
Ligante	Estructura optimizada y energía (u.a)	Energía libre de unión (ELU, kcal/mol)/ $K_i$ (nM)/ residuos involucrados en la interacción (EH)
134	 <p>-1566.10</p>	<p>- 10.81/ 11.8</p> <p>Phe 141, Met 144, Val 136, Ile 100, Phe 92, Ala 128, Leu 105, Met 124, Glu 127, Glu 11, Ala 15</p> 
146	 <p>-1870.50</p>	<p>- 9.70/ 76.9</p> <p>Phe 92, Ile 100, Leu 105, Met 124, Phe 141, Glu 127, Met 144, Met 145</p> 

**Tabla 8.** Parámetros e información sobre la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona (**23**) y la CaM generados por acoplamiento molecular. Estructura optimizada del ligante y energía calculada en unidades arbitrarias (u.a), energía libre de unión (ELU), constante de inhibición estimada ( $K_i$ ) y residuos involucrados en la interacción (**continuación**).

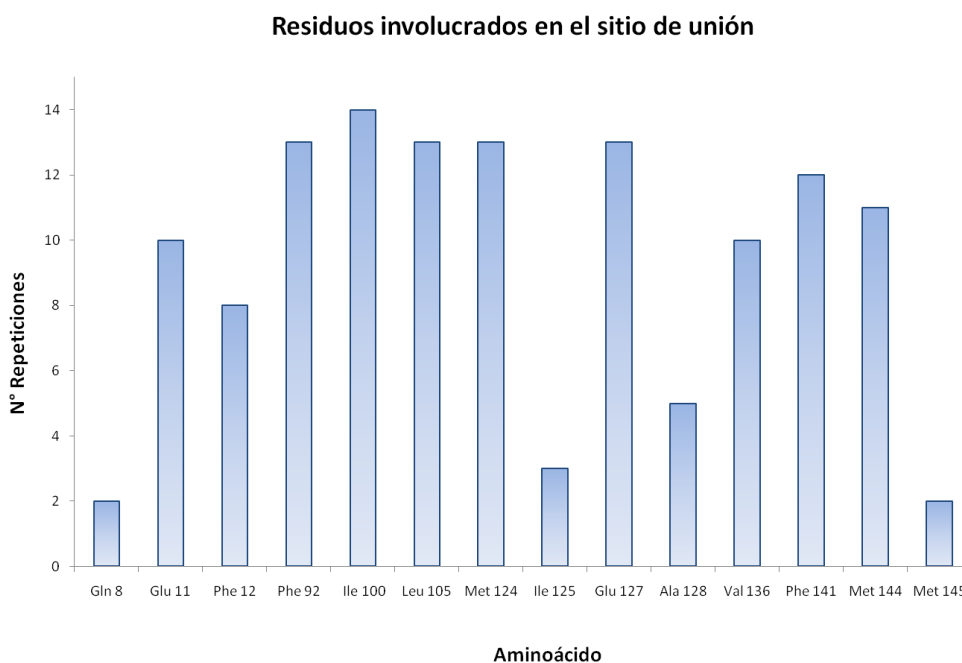
Ligante	Estructura optimizada y energía (u.a)	Energía libre de unión (ELU, kcal/mol)/ $K_i$ (nM)/ residuos involucrados en la interacción (EH)
148	 <p>-1295.80</p>	<p>- 8.94/ 282.1</p> <p>Phe 92, Ile 100, Val 136, Leu 105, Met 144, Phe 12, Glu 11, Glu 127, Met 124, Ile 125</p> 
147	 <p>-1411.86</p>	<p>- 9.92/ 53.4</p> <p>Phe 92, Ile 100, Leu 105, Met 124, Phe 141, Met 144, Met 145, Glu 127</p> 

**Tabla 8.** Parámetros e información sobre la interacción de los análogos del hidrato de tajixantona (**23**) y la CaM generados por acoplamiento molecular. Estructura optimizada del ligante y energía calculada en unidades arbitrarias (u.a), energía libre de unión (ELU), constante de inhibición estimada ( $K_i$ ) y residuos involucrados en la interacción (**continuación**).

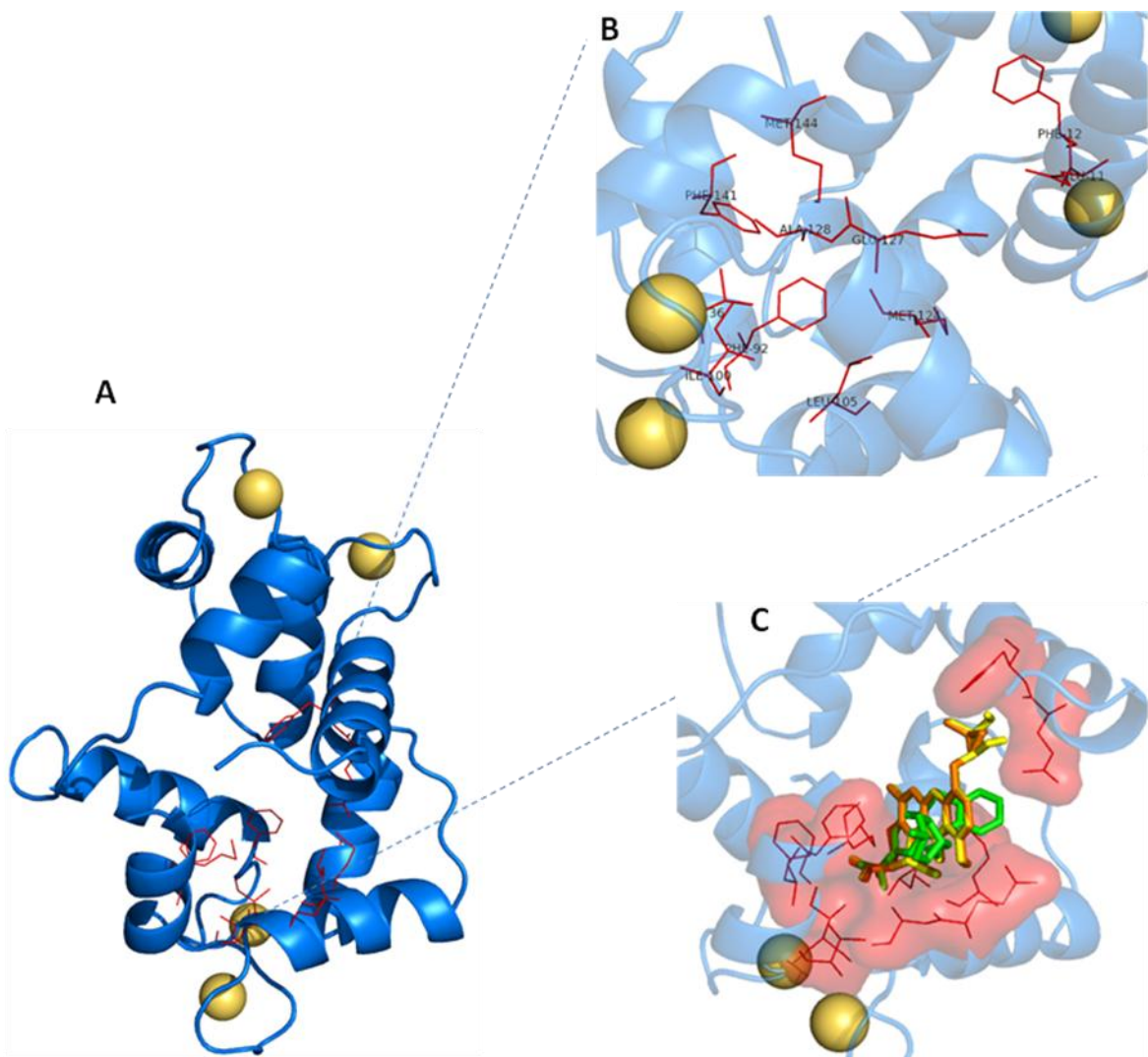
Ligante	Estructura optimizada y energía (u.a)	Energía libre de unión (ELU, kcal/mol)/ $K_i$ (nM)/ residuos involucrados en la interacción (EH)
49	 -1338.26	- 8.37/ 735.7  Phe 92, Phe 141, Val 136, Leu 105, Met 109, Ile 125, Met 124, <i>Glu 11</i>
27	 -1600.60	- 11.10/ 6.9  Val 136, Phe 141, Met 144, Ala128, Ile 100, Glu 127, Leu 105, <i>Met 124</i> , Glu 11, Phe 12, Gln 8, Phe 92



El análisis de los resultados presentados en la **Tabla 8 (Figura 14)** permitió establecer el sitio de unión para la mayoría de los ligantes analizados. Para construir el sitio probable de unión se seleccionaron los diez residuos con los que interaccionaron al menos ocho de los análogos ensayados. De manera adicional se incluyó el residuo Ala 128, que forma parte del sitio 1 de unión del inhibidor clásico **TFP** (Vandonselaar, *et al.*, 1994). En conjunto, nueve de los once residuos incluidos para modelar el sitio de unión (Phe 92, Ile 100, Leu 105, Met 124, Glu 127, Ala 128, Val 136, Phe 141 y Met 144) coinciden con el 90 % de los residuos encontrados en el sitio 1 de unión del inhibidor clásico **TFP**; este sitio es el de mayor afinidad de la **TFP** con la CaM y está asociado con ambos dominios de la proteína (N-terminal y C-terminal). La **Figura 15** muestra el modelo estructural construido.



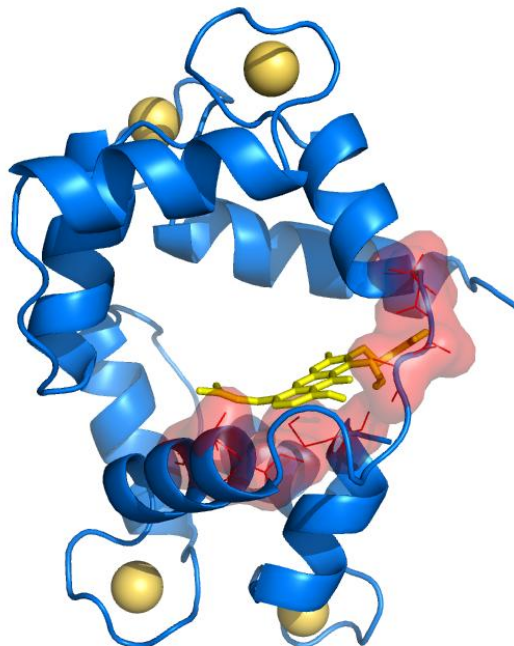
**Figura 14.** Análisis de los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción con los ligantes ensayados. En el eje de las abscisas se representan los aminoácidos involucrados en las interacciones y, en el eje de las ordenadas el número de ligantes que interaccionan con éstos.



**Figura 15.** A) Sitio de unión a la CaM de los ligantes analizados. B) residuos de aminoácidos involucrados en la interacción. C) líneas rojas residuos de aminoácidos, bastones amarillos **23**, bastones naranjas **147**, bastones verdes inhibidor clásico **TFP**.

Como se puede observar en la **Figura 15-B** el lugar donde interactúan la mayoría de los ligantes analizados coincide con el sitio de unión 1 del inhibidor clásico **TFP** (Vandonseelar, *et al.*, 1994), sin embargo, la emericelina (**142**) se une en una región que involucra aminoácidos diferentes. Esta diferencia se puede atribuir al mayor carácter hidrofóbico de **142** que contiene una cadena isoprenílica sin sustituyentes y carece de anillo piránico fusionado al núcleo xantona. A continuación, se presenta el sitio de interacción del ligante **142** con la CaM (**Figura 16**).

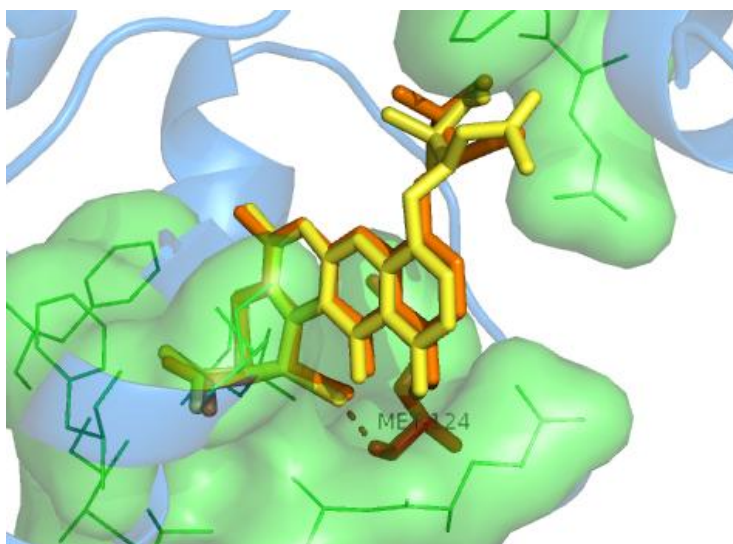




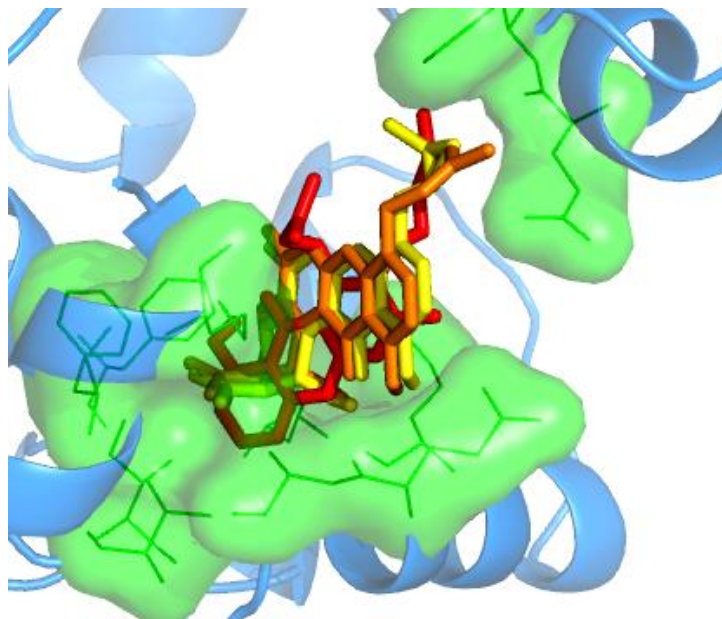
**Figura 16.** Modelo molecular construido para el sitio de unión del ligante **142** con la CaM. En líneas rojas se muestran los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción y en bastones amarillos **142**.

Por otra parte, los resultados presentados en la **Tabla 8**, en particular el parámetro de energía libre de unión, permitieron establecer que la afinidad de los análogos por el sitio de unión se ve influenciada por la formación de enlaces de hidrógeno entre la Met 124 y el hidroxilo de la posición 25 de los distintos análogos analizados (**Figura 17**). Así, los metabolitos **145**, **27**, **23**, y **132** presentaron energías de unión de -11.6, -11.1, -11.0, y 9.79 kcal/mol respectivamente. En el caso de los productos **23** y **145**, los resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo enzimático funcional y en el experimento de apagamiento de la fluorescencia (**145**, Figueroa, 2009, Rivera Chávez, 2009). Además, los datos indican que la presencia de la cadena en la posición C-4 y la oxidación de la misma influyen considerablemente en la estabilidad del complejo formado y corroboran los resultados obtenidos a través del ensayo de apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM reportados en este trabajo (**Figura 18**). Así en el producto **148** en el cual el residuo isoprenílico está ausente, la energía libre de unión es de -8.94 kcal/mol, mientras que para los compuestos **141** y **147**, con una doble ligadura y un epóxido, en la cadena lateral respectivamente, las energías calculadas son de -9.61 y -9.92 kcal/mol.

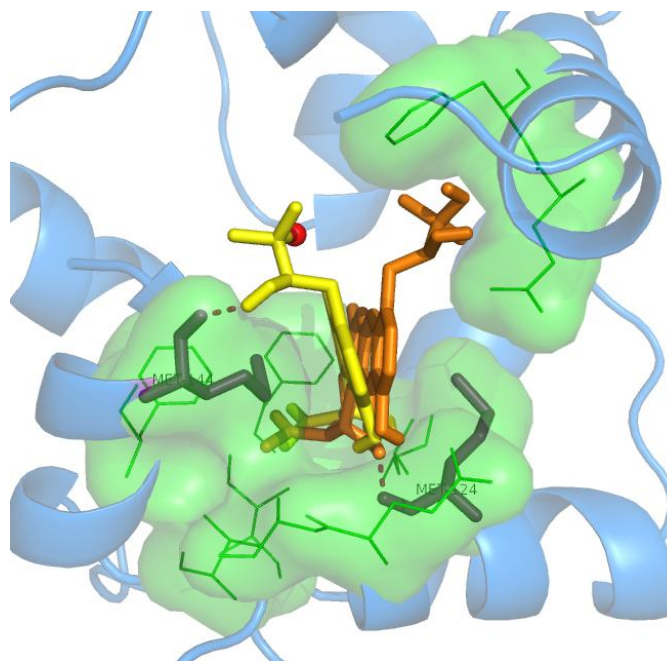
Finalmente, para determinar si los factores estéricos influyen en la estabilidad del complejo CaM-Ca<sup>2+</sup>-xantona, se analizó el análogo **146** (16-clorotajixantona) y los resultados generados se compararon con aquellos obtenidos para **23**. El modelo teórico propuesto para la interacción de estos análogos con la CaM se ilustra en la **Figura 19**. De acuerdo con el modelo estructural, la orientación de la cadena isoprenílica de ambos compuestos es diferente en el sitio de unión, a pesar de que ambos productos forman un enlace de hidrógeno con los residuos de metionina 144 y 124. Estos resultados indican que la presencia de sustituyentes con radios atómicos grandes en C-16 afectan considerablemente la afinidad por la proteína calmodulina (energía de unión -9,70 kcal/mol para **146** compuesto clorado y -11.0 kcal/mol para **23** compuesto hidroxilado) y están en armonía con los resultados experimentales obtenidos de los ensayos de apagamiento de la fluorescencia, en los que se pudo detectar que la presencia de un átomo de cloro en esta posición disminuye la afinidad del ligante hacia la proteína ( $K_d = 7.35 \mu\text{M}$  para **146** y  $K_d = 828 \text{ nM}$  para **23**).



**Figura 17.** Superposición de los compuestos **23** (bastones amarillos) y **145** (bastones naranjas) en el sitio de unión a la CaM (superficie verde; la línea punteada muestra el enlace de hidrógeno que se establece entre el OH-25 de los compuestos y la metionina 124 (Met 124)).



**Figura 18.** Superposición de los compuestos **147** (bastones amarillos), **141** (bastones naranjas) y **148** (bastones rojos) en el sitio de unión a la CaM (superficie verde).



**Figura 19.** Superposición de los compuestos **146** (bastones amarillos) y **23** (bastones naranjas) en el sitio de unión a la CaM (superficie verde). Los bastones morados indican los residuos de Met-124 y Met-144 involucrados en la interacción de estos compuestos; las líneas punteadas indican la formación de enlaces de hidrógeno.

Evidentemente, los resultados antes presentados permiten concluir de manera general que los ligantes evaluados interaccionan con la CaM uniéndose a ésta con una elevada afinidad (orden nanomolar). Por otro lado, los ensayos de acoplamiento molecular indican que la mayoría de los ligantes evaluados interaccionan en la misma región que los inhibidores clásicos fenotiazínicos, lo que permite proponer a los compuestos de tipo xantona como candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos anti-CaM.

## 6. Conclusiones

- a) La reinvestigación de la especie fúngica *Emericella* 25379 condujo al aislamiento y caracterización de dos análogos novedosos del hidrato de tajixantona (**23**), la 16-clorotajixantona (**146**) y el acetato de variecoxantona A (**148**), así como cinco metabolitos conocidos, el mismo hidrato de tajixantona (**23**), la emericeína (**142**), la 14-metoxitajixantona (**143**), el 15-acetil hidrato de tajixantona (**145**) y la tajixantona (**147**). De acuerdo a los ensayos de apagamiento de fluorescencia, todos los metabolitos interactúan directamente con la proteína CaM, presentando parámetros de afinidad en el orden nanomolar de concentraciones, excepto **146** ( $K_d = 7.35 \mu\text{M}$ ). Estos resultados, además de satisfacer el objetivo primordial planteado al inicio del estudio, indicaron los elementos estructurales más relevantes para la interacción de **23** y sus análogos con la proteína CaM. De tal forma que la presencia de una cadena isoprenílica en la posición C-4 del núcleo xantona aumenta considerablemente la afinidad sobre la CaM (**142 vs 148**) y a medida que disminuye el potencial electrostático y el radio atómico de los sustituyentes (O vs Cl) en la cadena isoprenílica (**23 vs 147**), la afinidad de los ligantes hacia la proteína aumenta. Por otro lado, la ausencia de sustituyentes en la posición C-14 y la apertura del anillo pirano fusionado al núcleo xantona genera un farmacóforo con mayor afinidad (**142 vs 141**).
- b) Los estudios de acoplamiento molecular permitieron proponer que el sitio de unión "pocket" de los metabolitos analizados se encuentra conformado por los siguientes residuos de aminoácidos: Glu 11, Phe 12, Phe 92, Ile 100, Leu 105, Met 124, Glu 127, Ala 128, Val 136, Phe 141 y Met 144, este sitio de unión coincide en un 90 % con el sitio 1 reportado para el inhibidor clásico **TFP**.
- c) El biosensor *hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR* mostró ser una herramienta eficiente para determinar la afinidad a la CaM de los productos naturales obtenidos en el presente estudio.

- d) Los resultados experimentales obtenidos de los ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor en conjunto con los generados a través de los ensayos de acoplamiento molecular, permiten proponer al hidrato de tajixantona (**23**) y sus análogos como candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos.

## 7. Perspectivas

1. Determinar la estequiometría del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-hidrato de tajixantona por medio de ensayos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC), así como resolver la estructura cristalográfica del mismo, con la finalidad de corroborar su sitio de unión experimentalmente.
2. Determinar la actividad citotóxica contra diversas líneas celulares de los compuestos aislados a partir de la especie fúngica objeto de estudio, esto con el propósito de complementar los resultados obtenidos de ésta investigación y así, comprobar sí la interacción ligante-CaM tiene implicaciones en procesos de proliferación celular.

## 8. Bibliografía

- ✓ Abdel-Lateff, A., G. M. König, *et al.* (2002). "New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp." J Nat Prod **65**(11): 1605-1611.
- ✓ Allen, M. W., R. J. Urbauer, *et al.* (2004). "Single-molecule assays of calmodulin target binding detected with a calmodulin energy-transfer construct." Anal Chem **76**(13): 3630-3637.
- ✓ Allen, M. W., R. J. Urbauer, *et al.* (2004). "Fluorescence labeling, purification, and immobilization of a double cysteine mutant calmodulin fusion protein for single-molecule experiments." Anal Biochem **325**(2): 273-284.
- ✓ Amagata, T., A. Amagata, *et al.* (2003). "Unusual C25 steroids produced by a sponge-derived *Penicillium citrinum*." Org Lett **5**(23): 4393-4396.
- ✓ Amagata, T., K. Minoura, *et al.* (1998). "Cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a *Sargassum* alga." J Antibiot **51**(4): 432-434.
- ✓ Amagata, T., K. Minoura, *et al.* (2006). "Gymnastatins F-H, cytostatic metabolites from the sponge-derived fungus *Gymnascella dankaliensis*." J Nat Prod **69**(10): 1384-1388.
- ✓ Amagata, T., C. Rath, *et al.* (2003). "Structures and cytotoxic properties of trichoverroids and their macrolide analogues produced by saltwater culture of *Myrothecium verrucaria*." J Med Chem **46**(20): 4342-4350.
- ✓ Amagata, T., M. Tanaka, *et al.* (2008). "Gymnastatins and dankastatins, growth inhibitory metabolites of a gymnascella species from a *Halichondria* sponge." J Nat Prod **71**(3): 340-345.
- ✓ Amagata, T., Y. Usami, *et al.* (1998). "Cytotoxic substances produced by a fungal strain from a sponge: physico-chemical properties and structures." J Antibiot **51**(1): 33-40.
- ✓ Amagata, T., S. Whitman, *et al.* (2003). "Exploring sponge-derived terpenoids for their potency and selectivity against 12-human, 15-human, and 15-soybean lipoxygenases." J Nat Prod **66**(2): 230-235.
- ✓ Au, W. Y., A. C. Chan, *et al.* (1998). "Multiple osseous metastases from occult paraganglioma: a diagnostic pitfall." Histopathology **33**(3): 287-288.
- ✓ Babu, Y. S., J. S. Sack, *et al.* (1985). "Three-dimensional structure of calmodulin." Nature **315**(6014): 37-40.
- ✓ Bhadury, P., B. T. Mohammad, *et al.* (2006). "The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents." J Ind Microbiol Biotechnol **33**(5): 325-337.
- ✓ Bardsley-Elliott, A. y S. Noble (1999). "Oseltamivir." Drugs **58**(5): 851-860; discussion 861-852.
- ✓ Bardsley-Elliott, A., S. Noble, *et al.* (1999). "Mycophenolate mofetil: a review of its use in the management of solid organ transplantation." BioDrugs **12**(5): 363-410.
- ✓ Berdy, J. (2005). "Bioactive microbial metabolites." J Antibiot **58**(1): 1-26.



- ✓ Bergqvist, S., M. A. Williams, *et al.* (2004). "Heat capacity effects of water molecules and ions at a protein-DNA interface." J Molecular Biology **336**(4): 829-842.
- ✓ Berridge, M. J., M. D. Bootman, *et al.* (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.
- ✓ Biabani, M. A., M. Baake, *et al.* (1998). "Anthranilamides: new antimicrobial active substances from a marine *Streptomyces* sp." J Antibiot **51**(3): 333-340.
- ✓ Blunt, J. W., B. R. Copp, *et al.* (2009). "Marine natural products." Nat Prod Rep **26**(2): 170-244.
- ✓ Boot, C. M., T. Amagata, *et al.* (2007). "Four classes of structurally unusual peptides from two marine-derived fungi: structures and bioactivities." Tetrahedron **63**(39): 9903-9914.
- ✓ Boot, C. M., N. C. Gassner, *et al.* (2007). "Pinpointing pseudotins from a marine-derived *Aspergillus* as tools for chemical genetics using a synthetic lethality yeast screen." J Nat Prod **70**(10): 1672-1675.
- ✓ Boot, C. M., K. Tenney, *et al.* (2006). "Highly N-methylated linear peptides produced by an atypical sponge-derived *Acremonium* sp." J Nat Prod **69**(1): 83-92.
- ✓ Brakhage, A. A. (1997). "Molecular regulation of penicillin biosynthesis in *Aspergillus (Emericella) nidulans*." Fems Microbiology Letters **148**(1): 1-10.
- ✓ Brauers, G., R. A. Edrada, *et al.* (2000). "Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: novel inhibitors of protein kinases." J Nat Prod **63**(6): 739-745.
- ✓ Bringmann, G., T. A. Gulder, *et al.* (2007). "Large-scale biotechnological production of the antileukemic marine natural product sorbicillactone A." Mar Drugs **5**(2): 23-30.
- ✓ Bringmann, G., G. Lang, *et al.* (2003). "Novel marine natural products. Part 5 - Evariquinone, isoemicellin, and stromemycin from a sponge derived strain of the fungus *Emericella varicolor*." Phytochemistry **63**(4): 437-443.
- ✓ Brini, M. y E. Carafoli (2000). "Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives." Cell Mol Life Sci **57**(3): 354-370.
- ✓ Bugni, T. S. y C. M. Ireland (2004). "Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms." Nat Prod Rep **21**(1): 143-163.
- ✓ Bugni, T. S., J. E. Janso, *et al.* (2004). "Dictyosphaeric acids A and B: new decalactones from an undescribed *Penicillium* sp. obtained from the alga *Dictyosphaeria versluyii*." J Nat Prod **67**(8): 1396-1399.
- ✓ Burger, D., J. A. Cox, *et al.* (1984). "Sequential conformational-changes in calmodulin upon binding of calcium." Biochemistry **23**(9): 1966-1971.
- ✓ Butler, M. S. (2005). "Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials." Nat Prod Rep **22**(2): 162-195.
- ✓ Butler, M. S. y A. D. Buss (2006). "Natural products-the future scaffolds for novel antibiotics?" Biochem Pharmacol **71**(7): 919-929.
- ✓ Carafoli, E. (1987). "Intracellular calcium homeostasis." Annu Rev Biochem **56**: 395-433.

- ✓ Carafoli, E. (2002). "Calcium signaling: a tale for all seasons." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1115-1122.
- ✓ Carafoli, E., A. Genazzani, *et al.* (1999). "Calcium controls the transcription of its own transporters and channels in developing neurons." Biochem Biophys Res Commun **266**(3): 624-632.
- ✓ Carafoli, E. y S. Longoni (1987). "The plasma membrane in the control of the signaling function of calcium." Soc Gen Physiol Ser **42**: 21-29.
- ✓ Carswell, C. I., G. L. Plosker, *et al.* (2002). "Rosuvastatin." Drugs **62**(14): 2075-2085; discussion 2086-2077.
- ✓ Cohen, N. M. y W. J. Lederer (1988). "Changes in the calcium current of rat heart ventricular myocytes during development." J Physiol **406**: 115-146.
- ✓ Crouch, T. H. y C. B. Klee (1980). "Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin." Biochemistry **19**(16): 3692-3698.
- ✓ Curran, M. P. y G. M. Keating (2005). "Mycophenolate sodium delayed release: prevention of renal transplant rejection." Drugs **65**(6): 799-805; discussion 806-797.
- ✓ Chapman, T. M. y C. M. Perry (2004). "Everolimus." Drugs **64**(8): 861-872; discussion 873-864.
- ✓ Charpentreau, M., K. Jaworski, *et al.* (2004). "A receptor-like kinase from *Arabidopsis thaliana* is a calmodulin-binding protein." Biochem J **379**(Pt 3): 841-848.
- ✓ Chatterjee, S. y A. Kolmakova (2004). Lactosylceramide synthase: From molecular biochemistry to biological function. In *Lipids (sphingolipid metabolizing enzymes 2004)*, Research Signpost: Trivandrum, India, pp. 33–41.
- ✓ Cheng, X., M. Varoglu, *et al.* (1994). "Chloriolins A-C, chlorinated sesquiterpenes produced by fungal cultures separated from a *Jaspis* marine sponge." J Org Chem **59**, 6344–6348.
- ✓ Cheung, W. Y. (1980). "Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation." Science **207**(4426): 19-27.
- ✓ Chexal, K. K., C. Fouweath, *et al.* (1974). "Biosynthesis of fungal metabolites .3. Structure of shamixanthone and tajixanthone, metabolites of *Aspergillus-variicolor*." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions **1**(13): 1584-1593.
- ✓ Chin, B. y G. Y. Lip (2000). "Cariporide Aventis." Curr Opin Investig Drugs **1**(3): 340-346.
- ✓ Chin, D. y A. R. Means (2000). "Calmodulin: a prototypical calcium sensor." Trends Cell Biol **10**(8): 322-328.
- ✓ Chinworrungsee, M., P. Kittakoop, *et al.* (2002). "Halorosellins A and B, unique isocoumarin glucosides from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions **1**(22): 2473-2476.
- ✓ Chinworrungsee, M., P. Kittakoop, *et al.* (2001). "Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*." Bioorg Med Chem Lett **11**(15): 1965-1969.
- ✓ Chock, S. P. y C. Y. Huang (1984). "An optimized continuous assay for cAMP phosphodiesterase and calmodulin." Anal Biochem **138**(1): 34-43.

- ✓ Chou, J. J., F. Delaglio, *et al.* (2000). "Measurement of one-bond  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  dipolar couplings in medium sized proteins." J Biomol NMR **18**(2): 101-105.
- ✓ Chou, J. J., S. Li, *et al.* (2000). "Study of conformational rearrangement and refinement of structural homology models by the use of heteronuclear dipolar couplings." J Biomol NMR **18**(3): 217-227.
- ✓ Daferner, M., T. Anke, *et al.* (2002). Zopfiellamides A and B, antimicrobial pyrrolidinone derivatives from the marine fungus *Zopfiella latipes*. Tetrahedron **58**: 7781-7784.
- ✓ Darkes, M. J. y G. L. Plosker (2002). "Cefditoren pivoxil." Drugs **62**(2): 319-336; discussion 337-318.
- ✓ Davidson, B. S. (1995). "New Dimensions in Natural-Products Research - Cultured Marine Microorganisms." Current Opinion in Biotechnology **6**(3): 284-291.
- ✓ Demain, A. L. (2009). "Antibiotics: natural products essential to human health." Med Res Rev **29**(6): 821-842.
- ✓ Demain, A. L. y S. Sanchez (2009). "Microbial drug discovery: 80 years of progress." J Antibiot **62**(1): 5-16.
- ✓ Doshida, J., H. Hasegawa, *et al.* (1996). "Exophilin A, a new antibiotic from a marine microorganism *Exophiala pisciphila*." J Antibiot **49**(11): 1105-1109.
- ✓ Ebel, R. (2006). "Secondary metabolites from marine-derived fungi. In *Frontiers in Marine Biotechnology*; Proksch, P., Müller, W.E.G., Eds.; Horizon Scientific Press: Norwich, UK, 2006; pp. 73-143.
- ✓ Edrada, R. A., R. Ebel, *et al.* (2002). "Swinhoeiamide A, a new highly active calyculin derivative from the marine sponge *Theonella swinhoei*." J Nat Prod **65**(8): 1168-1172.
- ✓ Edrada, R. A., M. Heubes, *et al.* (2002). "Online analysis of xestodecalactones A-C, novel bioactive metabolites from the fungus *Penicillium cf. montanense* and their subsequent isolation from the sponge *Xestospongia exigua*." J Nat Prod **65**(11): 1598-1604.
- ✓ Evenas, J., A. Malmendal, *et al.* (1998). "Calcium." Curr Opin Chem Biol **2**(2): 293-302.
- ✓ Evenas, J., A. Malmendal, *et al.* (1998). "Ca<sup>2+</sup> binding and conformational changes in a calmodulin domain." Biochemistry **37**(39): 13744-13754.
- ✓ Figueroa M. (2009). Elucidación estructural y estudios de interacción ligando-proteína de inhibidores selectos de la calmodulina obtenidos de las especies fúngicas *Malbranchea aurantiaca* y *Emericella* 25379. MExico, D. F., Universidad Nacional Autónoma de México. **Tesis de doctorado**.
- ✓ Figueroa, M., C. Gonzalez Mdel, *et al.* (2009). "Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp." Bioorg Med Chem **17**(6): 2167-2174.
- ✓ Frattarelli, D. A., M. D. Reed, *et al.* (2004). "Antifungals in systemic neonatal candidiasis." Drugs **64**(9): 949-968.
- ✓ Frisvad, J. C. y R. A. Samson (2004). "*Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B1." Syst Appl Microbiol **27**(6): 672-680.

- ✓ Frisvad, J. C. y R. A. Samson (2004). "*Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B-1." Systematic and Applied Microbiology **27**(6): 672-680.
- ✓ Frisvad, J. C., R. A. Samson, *et al.* (2004). "*Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B-1, B-2 and sterigmatocystin." Letters in Applied Microbiology **38**(5): 440-445.
- ✓ Fujimoto, H., E. Nakamura, *et al.* (2000). "Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Emericella aurantio-brunnea*." Chem Pharm Bull **48**(10): 1436-1441.
- ✓ Fukuyama, K., Y. Katsube, *et al.* (1980). "The Absolute-Configuration of Desacetylaustin Isolated from *Emericella-nidulans* Var *dentata*." Chem Pharm Bull **28**(7): 2270-2271.
- ✓ Gangopadhyay, J. P., Z. Grabarek, *et al.* (2004). "Fluorescence probe study of Ca<sup>2+</sup>-dependent interactions of calmodulin with calmodulin-binding peptides of the ryanodine receptor." Biochem Biophys Res Commun **323**(3): 760-768.
- ✓ Garo, E., C. M. Starks, *et al.* (2003). "Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens*." J Nat Prod **66**(3): 423-426.
- ✓ Gonzalez-Andrade, M., M. Figueroa, *et al.* (2009). "An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein." Anal Biochem **387**(1): 64-70.
- ✓ Govek, S.P. y L.E. Overman (2001). Total synthesis of asperazine. J. Am. Chem. Soc. **123**: 9468–9469.
- ✓ Haefner, B. (2003). "Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates." Drug Discov Today **8**(12): 536-544.
- ✓ Harmon, A. C., H. W. Jarrett, *et al.* (1984). "An enzymatic assay for calmodulins based on plant NAD kinase activity." Anal Biochem **141**(1): 168-178.
- ✓ Hiort, J., K. Maksimenka, K. *et al.* (2004). "New natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*". J Nat Prod **67**: 1532–1543.
- ✓ Holler, U., G. M. Konig, *et al.* (1999). "Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera coniothyrium and microsphaeropsis." J Nat Prod **62**(1): 114-118.
- ✓ Horne, J. H. y T. Meyer (1997). "Elementary calcium-release units induced by inositol trisphosphate." Science **276**(5319): 1690-1693.
- ✓ Horne, M. C., K. L. Donaldson, *et al.* (1997). "Cyclin G2 is up-regulated during growth inhibition and B cell antigen receptor-mediated cell cycle arrest." J Biol Chem **272**(19): 12650-12661.
- ✓ Horvath, C. R., P. A. Martos, *et al.* (2005). "Identification and quantification of eight flavones in root and shoot tissues of the medicinal plant huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) using high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection." J Chromatogr A **1062**(2): 199-207.
- ✓ Hosoe, T., T. Itabashi, *et al.* (2006). "Three new types of indoloditerpenes, emindole PA-PC, from *Emericella purpurea*. Revision of the structure of emindole PA." Chem Pharm Bull **54**(2): 185-187.

- ✓ Hosoe, T., T. Itabashi, *et al.* (2006). "Three new types of indoloditerpenes, emindole PA-PC, from *Emericella purpurea*. Revision of the structure of emindole PA." Chem Pharm Bull **54**(2): 185-187.
- ✓ Itabashi, T., K. Nozawa, *et al.* (1992). "Falconensin-a, Falconensin-B, Falconensin-C, and Falconensin-D, New Compounds Related to Azaphilone, from *Emericella falconensis*." Chem Pharm Bull **40**(12): 3142-3144.
- ✓ Itabashi, T., K. Nozawa, *et al.* (1993). "A New Azaphilone, Falconensin-H, from *Emericella falconensis*." Chem Pharm Bull **41**(11): 2040-2041.
- ✓ Itabashi, T., N. Ogasawara, *et al.* (1996). "Isolation and structures of new azaphilone derivatives, falconensins E-G, from *Emericella falconensis* and absolute configurations of falconensins A-G." Chem Pharm Bull **44**(12): 2213-2217.
- ✓ Jadulco, R., G. Brauers, *et al.* (2002). "New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*." J Nat Prod **65**(5): 730-733.
- ✓ Jadulco, R., R. A. Edrada, *et al.* (2004). "New communesin derivatives from the fungus *Penicillium* sp. derived from the Mediterranean sponge *Axinella verrucosa*." J Nat Prod **67**(1): 78-81.
- ✓ Jadulco, R., P. Proksch, *et al.* (2001). "New macrolides and furan carboxylic acid derivative from the sponge-derived fungus *Cladosporium herbarum*." J Nat Prod **64**(4): 527-530.
- ✓ Jaren, O. R., S. Harmon, *et al.* (2000). "Paramecium calmodulin mutants defective in ion channel regulation can bind calcium and undergo calcium-induced conformational switching." Biochemistry **39**(23): 6881-6890.
- ✓ Jarvis, B., D. P. Figgitt, *et al.* (2004). "Micafungin." Drugs **64**(9): 969-982; discussion 983-964.
- ✓ Jiang, T., T. Li, *et al.* (2004). "Cerebroside analogues from marine-derived fungus *Aspergillus flavipes*." J Asian Nat Prod Res **6**(4): 249-257.
- ✓ Jiang, Y., K. W. Fan, *et al.* (2004). "Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*." J Agric Food Chem **52**(5): 1196-1200.
- ✓ Junker, J. P. y M. Rief (2009). "Single-molecule force spectroscopy distinguishes target binding modes of calmodulin." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14361-14366.
- ✓ Junker, J. P., F. Ziegler, *et al.* (2009). "Ligand-dependent equilibrium fluctuations of single calmodulin molecules." Science **323**(5914): 633-637.
- ✓ Kawahara, N., S. Nakajima, *et al.* (1989). "Structure of a novel epidithiodioxopiperazine, emethallicin A, a potent inhibitor of histamine release from *Emericella heterothallica*." Chem Pharm Bull **37**(10): 2592-2595.
- ✓ Kawahara, N., K. Nozawa, *et al.* (1990). "Structures of novel epipolythiodioxopiperazines, emethallicins B, C, and D, potent inhibitors of histamine release, from *Emericella heterothallica*." Chem Pharm Bull **38**(1): 73-78.
- ✓ Kawahara, N., S. Sekita, *et al.* (1994). "Structures of a new dihydroxanthone derivative, nidulalin-a, and a new benzophenone derivative, nidulalin-B, from *Emericella nidulans*." Chem Pharm Bull **42**(9): 1720-1723.

- ✓ Kawai, K., K. Nozawa, *et al.* (1987). "Studies on fungal products .12. Structure of aurantioemestrin from *Emericella striata*." Heterocycles **26**(2): 475-479.
- ✓ Keating, G. y D. Figgitt (2003). "Caspofungin: a review of its use in oesophageal candidiasis, invasive candidiasis and invasive aspergillosis." Drugs **63**(20): 2235-2263.
- ✓ Kim, G. B., H. Nakata, *et al.* (1998). "In vitro inhibition of hepatic cytochrome P450 and enzyme activity by butyltin compounds in marine mammals." Environ Pollut **99**(2): 255-261.
- ✓ Kinghorn, A. D., Y. W. Chin, *et al.* (2009). "Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms." Curr Opin Drug Discov Devel **12**(2): 189-196.
- ✓ Kito, K., R. Ookura, *et al.* (2008). "New cytotoxic 14-membered macrolides from marine-derived fungus *Aspergillus ostianus*." Org Lett **10**(2): 225-228.
- ✓ Klee, C. B., T. H. Crouch, *et al.* (1980). "Calmodulin." Annu Rev Biochem **49**: 489-515.
- ✓ Kobayashi, T., J. Yamada, *et al.* (1986). "Effects of chlorpromazine and other calmodulin antagonists on phosphatidylcholine-induced vesiculation of platelet plasma membranes." Biochim Biophys Acta **855**(1): 58-62.
- ✓ Kobayashi, Y., J. J. Oppenheim, *et al.* (1990). "Calcium-dependent binding of phosphorylated human pre interleukin 1 alpha to phospholipids." J Biochem **107**(5): 666-670.
- ✓ Kobayashi, Y., K. Yamamoto, *et al.* (1990). "Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5548-5552.
- ✓ Koehn, F. E. y G. T. Carter (2005). "The evolving role of natural products in drug discovery." Nat Rev Drug Discov **4**(3): 206-220.
- ✓ Koehn, F. E. y G. T. Carter (2005). "Rediscovering natural products as a source of new drugs." Discov Med **5**(26): 159-164.
- ✓ König, G.M., S. Kehraus, *et al.* (2005). "Natural products from marine organisms and their associated microbes." ChemBioChem **7**: 229-238.
- ✓ Koizumi, Y., M. Arai, *et al.* (2004). "Oxaline, a fungal alkaloid, arrests the cell cycle in M phase by inhibition of tubulin polymerization." Biochim Biophys Acta **1693**(1): 47-55.
- ✓ Kolachana, P. y M. T. Smith (1994). "Induction of kinetochore-positive micronuclei in human lymphocytes by the anti-fungal drug griseofulvin." Mutat Res **322**(3): 151-159.
- ✓ Konig, G. M. y A. D. Wright (1996). "Marine natural products research: current directions and future potential." Planta Med **62**(3): 193-211.
- ✓ Konig, G. M., A. D. Wright, *et al.* (1999). "Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. 1." J Nat Prod **62**(1): 155-157.
- ✓ Kralj, A., S. Kehraus, *et al.* (2006). "Arugosins G and H: Prenylated polyketides from the marine-derived fungus *Emericella nidulans* var. *acristata*." Journal of Natural Products **69**(7): 995-1000.

- ✓ Kralj, A., S. Kehraus, *et al.* (2007). "Two new depsipeptides from the marine fungus *Spicellum roseum*." Planta Med **73**(4): 366-371.
- ✓ Kuznetsova, T. A., O. F. Smetanina, *et al.* (2001). "The identification of fusidic acid, a steroidal antibiotic from marine isolate of the fungus *Stilbella aciculosa*." Biochem Syst Ecol **29**(8): 873-874.
- ✓ Ladbury, J. E. y M. A. Williams (2004). "The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions." Current Opinion in Structural Biology **14**(5): 562-569.
- ✓ Laird, D. W., R. Poole, *et al.* (2007). "Pycnanthuquinone C, an unusual 6,6,5-tricyclic Geranyltoquinone from the Western Australian brown alga *Cystophora harveyi*." J Nat Prod **70**(4): 671-674.
- ✓ Lalor, D. J., T. Schnyder, *et al.* (2003). "Structural and functional analysis of a truncated form of *Saccharomyces cerevisiae* ATP sulfurylase: C-terminal domain essential for oligomer formation but not for activity." Protein Eng **16**(12): 1071-1079.
- ✓ Lang, C., D. Schuler, *et al.* (2007). "Synthesis of magnetite nanoparticles for bio- and nanotechnology: genetic engineering and biomimetics of bacterial magnetosomes." Macromol Biosci **7**(2): 144-151.
- ✓ Leclerc, C., M. Lee, *et al.* (2003). "Calcium transients triggered by planar signals induce the expression of ZIC3 gene during neural induction in *Xenopus*." Dev Biol **261**(2): 381-390.
- ✓ Lee, Y. M., H. Li, *et al.* (2010). "Bioactive metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus versicolor*." Arch Pharm Res **33**(2): 231-235.
- ✓ Leis, S., S. Schneider, *et al.* (2010). "In silico prediction of binding sites on proteins." Curr Med Chem **17**(15): 1550-1562.
- ✓ Leung, P. C., W. A. Taylor, *et al.* (1984). "Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin." J Biol Chem **259**(5): 2742-2747.
- ✓ Li, X., H. D. Choi, *et al.* (2003a). "New polyoxygenated farnesylcyclohexenones, deacetoxyanuthone A and its hydro derivative from the marine derived fungus *Penicillium* sp." J Nat Prod **66**: 1499–1500.
- ✓ Li, X., M. K. Kim, *et al.* (2005). Myrothenones A and B, cyclopentenone derivatives with tyrosinase inhibitory activity from the marine-derived fungus *Myrothecium* sp. Chem Pharm Bull **53**: 453–455.
- ✓ Li, Y., X. Li, *et al.* (2004). "Golmaenone, a new diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp." Chem Pharm Bull **52**(3): 375-376.
- ✓ Liberra, K. y U. Lindequist (1995). "Marine fungi a prolific resource of biologically active natural products?" Pharmazie **50**(9): 583-588.
- ✓ Lin, S. M., C. A. Chen, *et al.* (2002). "Molecular phylogeny and biogeography of the grass lizards genus *Takydromus* (Reptilia: Lacertidae) of East Asia." Mol Phylogenet Evol **22**(2): 276-288.
- ✓ Liu, C. H., J. C. Meng, *et al.* (2002). "Antifungal metabolite with a new carbon skeleton from *Keissleriella* sp. YS4108, a marine filamentous fungus." Planta Med **68**(4): 363-365.

- ✓ Lopez-Gresa, M. P., N. Cabedo, *et al.* (2009). "Terretonins E and F, inhibitors of the mitochondrial respiratory chain from the marine-derived fungus *Aspergillus insuetus*." J Nat Prod **72**(7): 1348-1351.
- ✓ Ma, M., J. Zhao, *et al.* (2007). "Bromophenols coupled with nucleoside bases and brominated tetrahydroisoquinolines from the red alga *Rhodomela confervoides*." J Nat Prod **70**(3): 337-341.
- ✓ Macias, M., A. Gamboa, *et al.* (2001). "Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*." Phytochemistry **58**(5): 751-758.
- ✓ Macias, M., M. Ulloa, *et al.* (2000). "Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *guanomyces polythrix*." J Nat Prod **63**(6): 757-761.
- ✓ MAdariaga Mazón A. (2008). Malbrancheamida C, un nuevo alcaloide de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca* Sieglér & Carmichel. Facultad de Química.
- ✓ Malmstrom, J. (1999). "Unguisins A and B: new cyclic peptides from the marine-derived fungus *emericella unguis*." J Nat Prod **62**(5): 787-789.
- ✓ Malmstrom, J., C. Christophersen, *et al.* (2002). "Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Emericella variecolor*." J Nat Prod **65**(3): 364-367.
- ✓ Malmstrom, J., A. Ryager, *et al.* (2002). "Unguisin C, a GABA-containing cyclic peptide from the fungus *Emericella unguis*." Phytochemistry **60**(8): 869-872.
- ✓ Martinez-Luis, S., M. C. Gonzalez, *et al.* (2005). "Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*." Phytochemistry **66**(9): 1012-1016.
- ✓ Martinez-Luis, S., A. Perez-Vasquez, *et al.* (2007). "Natural products with calmodulin inhibitor properties." Phytochemistry **68**(14): 1882-190.
- ✓ Masino, L., S. R. Martin, *et al.* (2000). "Ligand binding and thermodynamic stability of a multidomain protein, calmodulin." Protein Sci **9**(8): 1519-1529.
- ✓ Mata, R., A. Gamboa, *et al.* (2003). "Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulin-dependent activity of the enzymes cAMP phosphodiesterase and NAD-kinase." J Agric Food Chem **51**(16): 4559-4562.
- ✓ Mayer, A.M.S. (1994). "Marine Pharmacology in 1998: Antitumor and Cytotoxic Compounds." Pharmacologist **41**: 159-164.
- ✓ Mayer, A. M. y K. R. Gustafson (2004). "Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds." Eur J Cancer **40**(18): 2676-2704.
- ✓ Mayer, A. M. y M. T. Hamann (2004). "Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action." Mar Biotechnol (NY) **6**(1): 37-52.
- ✓ McCormack, P. L. y C. M. Perry (2005). "Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections." Drugs **65**(14): 2049-2068.
- ✓ McDonald, L. A., L. R. Barbieri, *et al.* (2004). "07H239-A, a new cytotoxic eremophilane sesquiterpene from the marine-derived *Xylariaceae* fungus LL-07H239." J Nat Prod **67**(9): 1565-1567.



- ✓ Moosophon, P., S. Kanokmedhakul, *et al.* (2009). "Prenylxanthenes and a bicyclo[3.3.1]nona-2,6-diene derivative from the fungus *Emericella rugulosa*." J Nat Prod **72**(8): 1442-1446.
- ✓ Needham, J., M. T. Kelly, *et al.* (1994). "Andrimid and moiramides A-C, metabolites produced in culture by a marine isolate of the bacterium *Pseudomonas fluorescens*: Structure elucidation and biosynthesis." J Org Chem **1994**, *59*, 2058–2063.
- ✓ Nagai, K., K. Kamigiri, *et al.* (2002). "YM-202204, a new antifungal antibiotic produced by marine fungus *Phoma* sp." J Antibiot **55**(12): 1036-1041.
- ✓ Newman, D. J. y G. M. Cragg (2004). "Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources." Curr Med Chem **11**(13): 1693-1713.
- ✓ Namikoshi, M., R. Negishi, *et al.* (2003). "Three new chlorine containing antibiotics from a marine-derived fungus *Aspergillus ostianus* collected in Pohnpei." J Antibiot **56**: 755–761.
- ✓ Newman, D. J. y G. M. Cragg (2004). "Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials." J Nat Prod **67**(8): 1216-1238.
- ✓ Newman, D. J., G. M. Cragg, *et al.* (2003). "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002." J Nat Prod **66**(7): 1022-1037.
- ✓ Nielsen, J., P. H. Nielsen, *et al.* (1999). "Fungal depside, guisinol, from a marine derived strain of *Emericella unguis*." Phytochemistry **50**(2): 263-265.
- ✓ Nozawa, K., Y. Horie, *et al.* (1989). "Isolation of a new tremorgenic indoloditerpene, 1'-O-acetylpaxilline, from *Emericella striata* and distribution of paxilline in *Emericella* spp." Chem Pharm Bull **37**(5): 1387-1389.
- ✓ Nozawa, K., H. Seye, *et al.* (1987). "Studies on fungal products .10. Isolation and structures of novel bicoumarins, Desertorin-A, Desertorin-B, and Desertorin-C, from *Emericella desertorum*." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions **1**(8): 1735-1738.
- ✓ Nozawa, K., S. Udagawa, *et al.* (1987). "Structures of 2 Stereoisomers of a New Type of Indoloditerpene Related to the Tremorgenic Mycotoxin Paxilline, from *Emericella desertorum* and *Emericella striata*." Journal of the Chemical Society-Chemical Communications(15): 1157-1159.
- ✓ Nozawa, K., S. I. Udagawa, *et al.* (1987). "Studies on Fungal Products .14. Emestrin-B, a new Epitrithiodioxopiperazine, from *Emericella striata*." Chem Pharm Bull **35**(8): 3460-3463.
- ✓ Numata, A., T. Amagata, *et al.* "Gymnastatins, novel cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a sponge." Tetrahedron Lett **38**: 5675–5678.
- ✓ O'Day, D. H. (2003). "CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins." Cell Signal **15**(4): 347-354.
- ✓ Odom, A., S. Muir, *et al.* (1997). "Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*." EMBO J **16**(10): 2576-2589.
- ✓ Ogasawara, N. y K. I. Kawai (1998). "Hydrogenated azaphilones from *Emericella falconensis* and *E. fruticulosa*." Phytochemistry **47**(6): 1131-1135.

- ✓ Ogasawara, N., R. Mizuno, *et al.* (1997). "Structures of a new type of yellow pigments, falconensones A and B, from *Emericella falconensis*." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions **1**(17): 2527-2530.
- ✓ Okubo, T. y S. Okada (1998). "Kinetic analyses of colloidal crystallization in alcoholic organic solvents and their aqueous mixtures as studied by reflection spectroscopy." J Colloid Interface Sci **204**(1): 198-204.
- ✓ Osterhage, C., R. Kaminsky, *et al.* (2000). "Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*." J Org Chem **65**(20): 6412-6417.
- ✓ Perez-Vasquez, A., E. Linares, *et al.* (2008). "Phytotoxic activity and conformational analysis of thymol analogs from *Hofmeisteria schaffneri*." Phytochemistry **69**(6): 1339-1347.
- ✓ Perez-Vasquez, A., A. Reyes, *et al.* (2005). "Phytotoxins from *Hofmeisteria schaffneri*: isolation and synthesis of 2'-(2' '-hydroxy-4' '-methylphenyl)-2'-oxoethyl acetate1." J Nat Prod **68**(6): 959-962.
- ✓ Pinto, M. M., M. E. Sousa, *et al.* (2005). "Xanthone derivatives: new insights in biological activities." Curr Med Chem **12**(21): 2517-2538.
- ✓ Pornpakakul, S., J. Liangsakul, *et al.* (2006). "Cytotoxic activity of four xanthenes from *Emericella varicolor*, an endophytic fungus isolated from *Croton oblongifolius*." Archives of Pharmacal Research **29**(2): 140-144.
- ✓ Pozzan, T., M. Mongillo, *et al.* (2003). "The Theodore Bucher lecture. Investigating signal transduction with genetically encoded fluorescent probes." Eur J Biochem **270**(11): 2343-2352.
- ✓ Raistrick, H. (1949). "Aureomycin, a new antibiotic." Nature **163**(4135): 159.
- ✓ Raistrick, H. (1949). "Chloromycetin; its structure and synthesis." Nature **163**(4145): 553.
- ✓ Ranty, B., D. Aldon, *et al.* (2006). "Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals." Plant Signal Behav **1**(3): 96-104.
- ✓ Rivera Chávez, J. A. (2009). 15-Acetil-hidrato de tajixantona, un nuevo metabolito secundario de *Emericella* 25379. Facultad de química.
- ✓ Rivero-Cruz, B., I. Rivero-Cruz, *et al.* (2007). "Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin." Phytochemistry **68**(8): 1147-1155.
- ✓ Rivero-Cruz, I., J. L. Trejo, *et al.* (2000). "Phytotoxic compounds from *Xanthocephalum gymnospermoides* var. *eradiatum*." Planta Med **66**(8): 734-739.
- ✓ Rivero-Cruz, J. F., M. Macias, *et al.* (2003). "A new phytotoxic nonenolide from *Phoma herbarum*." J Nat Prod **66**(4): 511-514.
- ✓ Saleem, M., M. S. Ali, *et al.* (2007). "Marine natural products of fungal origin." Nat Prod Rep **24**(5): 1142-1152.
- ✓ Scott, L. J., M. P. Curran, *et al.* (2004). "Rosuvastatin: a review of its use in the management of dyslipidemia." Am J Cardiovasc Drugs **4**(2): 117-138.
- ✓ Seya, H., K. Nozawa, *et al.* (1986). "Studies on fungal products .8. isolation and structure of Emestrin, a novel antifungal macrocyclic Epidithiodioxopiperazine

- from *Emericella striata* - X-Ray molecular-structure of Emestrin." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions **1**(1): 109-116.
- ✓ Seya, H., K. Nozawa, *et al.* (1986). "Studies on fungal products .9. Dethiosecoemestrin, a new metabolite related to Emestrin, from *Emericella striata*." Chem Pharm Bull **34**(6): 2411-2416.
  - ✓ Sharma, R. K. y J. H. Wang (1979). "Preparation and assay of the Ca<sup>2+</sup>-dependent modulator protein." Adv Cyclic Nucleotide Res **10**: 187-198.
  - ✓ Sharma, R. K. y E. Wirch (1979). "Ca<sup>2+</sup>-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from rabbit lung." Biochem Biophys Res Commun **91**(1): 338-344.
  - ✓ Sharma, R. (2003). "Diversity of calcium action regulation of mammalian calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase." J Indian of Biochemistry & Biophysics **40**: 77-91.
  - ✓ Simmons, T. L., E. Andrianasolo, *et al.* (2005). "Marine natural products as anticancer drugs." Mol Cancer Ther **4**(2): 333-342.
  - ✓ Soderling, T. R. (1999). "The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade." Trends Biochem Sci **24**(6): 232-236.
  - ✓ Sorensen, B. R., W. VanScyoc, *et al.* (2001). "Calcium-dependent melittin binding to Paramecium calmodulin is domain-specific and altered by mutations." Biophysical Journal **80**(1): 312a-313a.
  - ✓ Speitling, M., O. F. Smetanina, *et al.* (2007). Bromoalterochromides A and A', unprecedented chromopeptides from a marine *Pseudoalteromonas maricaloris* strain KMM 636T. J Antibiot **60**: 36-42.
  - ✓ Sufrin, J. R., S. Finckbeiner, *et al.* (2009). "Marine-derived metabolites of S-adenosylmethionine as templates for new anti-infectives." Mar Drugs **7**(3): 401-434.
  - ✓ Sugie, Y., H. Hirai, *et al.* (2001). "A new antibiotic CJ-17,665 from *Aspergillus ochraceus*." J Antibiot **54**(11): 911-916.
  - ✓ Takahashi, H., T. Hosoe, *et al.* (1999). "Two new sesterterpenes from the ascomycetous fungus *Emericella purpurea*." Journal of Natural Products **62**(12): 1712-1713.
  - ✓ Takahashi, H., K. Nozawa, *et al.* (1996). "Isolation and structures of dicyanide derivatives, epurpurins A to C, from *Emericella purpurea*." Chem Pharm Bull **44**(12): 2227-2230.
  - ✓ Thakur, N.L., U. Hentschel, *et al.* (2003). "Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for epibacterial chemical defense." Aquat Microb Ecol **31**: 77-83.
  - ✓ Thomas, T. R., D. P. Kavlekar, *et al.* (2010). "Marine drugs from sponge-microbe association a review." Mar Drugs **8**(4): 1417-1468.
  - ✓ Tsuda, M., Y. Kasai, *et al.* (2004). "Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*." Org Lett **6**(18): 3087-3089.
  - ✓ Tsuda, M., T. Mugishima, *et al.* (2003). "Modiolides A and B, two new 10-membered macrolides from a marine-derived fungus." J Nat Prod **66**(3): 412-415.

- ✓ Tsukamoto, S., S. Miura, *et al.* (2004). "Aspermytin A: a new neurotrophic polyketide isolated from a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*." Bioorg Med Chem Lett **14**(2): 417-420.
- ✓ Vandonselaar, M., R. A. Hickie, *et al.* (1994). "Trifluoperazine-induced conformational change in Ca(2+)-calmodulin." Nat Struct Biol **1**(11): 795-801.
- ✓ VanScyoc, W. S., L. Coffeen, *et al.* (2001). "Structure, stability, and calcium binding properties of defective ion channel regulation mutants of *Paramecium calmodulin*." Biophysical Journal **80**(1): 317a-317a.
- ✓ VanScyoc, W. S. y M. A. Shea (2001). "Phenylalanine fluorescence studies of calcium binding to N-domain fragments of *Paramecium calmodulin* mutants show increased calcium affinity correlates with increased disorder." Protein Science **10**(9): 1758-1768.
- ✓ Varoglu, M., T. H. Corbett, *et al.* (1997). "Asperazine, a selective cytotoxic alkaloid from a sponge-derived culture of *Aspergillus niger*". J. Org. Chem. **62**, 7078–7079.
- ✓ Vertessy, B. G., V. Harmat, *et al.* (1998). "Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca<sup>2+</sup>-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies." Biochemistry **37**(44): 15300-15310.
- ✓ Vetter, S. W. y E. Leclerc (2003). "Novel aspects of calmodulin target recognition and activation." J Bioche **270**: 404-414.
- ✓ Wade, R. C., T. Wang, *et al.* (2002). "Electrostatic models for protein-protein binding." Abstracts of Papers of the American Chemical Society **223**: C93-C93.
- ✓ Walsh, M. P. (1983). "Calmodulin and its roles in skeletal muscle function." Can Anaesth Soc J **30**(4): 390-398.
- ✓ Wei, H., T. Itoh, *et al.* (2005). "Shimalactone A, a novel polyketide, from marine-derived fungus *Emericella varicolor* GF10." Tetrahedron **61**(33): 8054-8058.
- ✓ Wei, H., T. Itoh, *et al.* (2004). "Cytotoxic sesterterpenes, 6-epi-ophiobolin G and 6-epi-ophiobolin N, from marine derived fungus *Emericella varicolor* GF10." Tetrahedron **60**(28): 6015-6019.
- ✓ Williams, P. G., R. N. Asolkar, *et al.* (2007). "Saliniketals A and B, bicyclic polyketides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*." J Nat Prod **70**(1): 83-88.
- ✓ Xie, L.W., S. M. Jiang., *et al.* (2008). Potential inhibitors against *Sclerotinia sclerotiorum*, produced by the fungus *Myrothecium* sp. Associated with the marine sponge *Axinella* sp. Eur J Plant Pathol **122**: 571–578.
- ✓ Xin, Z. H., Y. Fang, *et al.* (2007). "Aurantiomides A-C, quinazoline alkaloids from the sponge-derived fungus *Penicillium aurantiogriseum* SP0-19." J Nat Prod **70**(5): 853-855.
- ✓ Xin, Z.H., W. M. Zhu, *et al.* (2005). "A new cytotoxic compound from *Penicillium auratiogriseum*, symbiotic or epiphytic fungus of sponge *Mycale plumose*." Chin Chem Lett **16**: 1227–1229.
- ✓ Yamazaki, M., Y. Satoh, *et al.* (1988). "Monoamine oxidase inhibitors from a fungus, *Emericella navahoensis*." Chem Pharm Bull **36**(2): 670-675.
- ✓ Yoganathan, K., C. Rossant, *et al.* (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**(10): 1681-1684.
- ✓ Yoshida, S., K. Kito, *et al.* (2007). "Four Pimarane diterpenes from marine fungus: chloroform incorporated in crystal lattice for absolute configuration analysis by X-ray." Chem Lett **36**: 1386.
  - ✓ Yu, C. M., J. M. Curtis, *et al.* (1996). "Potent inhibitors of cysteine proteases from the marine fungus *Microascus longirostris*." J Antibiot **49**(4): 395-397.
  - ✓ Yurimoto, S., N. Hatano, *et al.* (2009). "Identification and characterization of wolframmin, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein." Biochemistry **48**(18): 3946-3955.
  - ✓ Zalar, P., J. C. Frisvad, *et al.* (2008). "Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe." Mycologia **100**(5): 779-795.
  - ✓ Zhanel, G. G., K. Ennis, *et al.* (2002). "A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections." Drugs **62**(1): 13-59.
  - ✓ Zhanel, G. G. y D. J. Hoban (2002). "Ketolides in the treatment of respiratory infections." Expert Opin Pharmacother **3**(3): 277-297.
  - ✓ Zhanel, G. G., D. J. Hoban, *et al.* (2002). "Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia." N Engl J Med **347**(1): 65-67; author reply 65-67.
  - ✓ Zhanel, G. G., K. Homenuik, *et al.* (2004). "The glycylcyclines: a comparative review with the tetracyclines." Drugs **64**(1): 63-88.
  - ✓ Zhanel, G. G., D. Roberts, *et al.* (2002). "Pharmacodynamic activity of fluoroquinolones against ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*." J Antimicrob Chemother **49**(5): 807-812.
  - ✓ Zhanel, G. G., M. Walters, *et al.* (2002). "The ketolides: a critical review." Drugs **62**(12): 1771-1804.
  - ✓ Zhang, Y., X. M. Li, *et al.* (2007). "Nigerasperones A approximately C, new monomeric and dimeric naphtho-gamma-pyrones from a marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13." J Antibiot **60**(3): 204-210.