



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

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

TEMA DE TESIS

**“ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPECIE FÚNGICA *Aspergillus stromatoides* COMO
UNA FUENTE POTENCIAL DE AGENTES INHIBIDORES DE LA CALMODULINA
Y DE LAS ENZIMAS α -GLUCOSIDASAS”**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. PAULINA DEL VALLE PÉREZ



TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

AÑO: 2011



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. Alfredo Ortega Hernández
Vocal: Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez
Vocal: Dra. Adela Rodríguez Romero
Vocal: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Secretario: Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

Lugar donde se realizó la tesis:

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

Parte de los resultados obtenidos a partir de este proyecto se presentaron en la 7ª Reunión Nacional de Investigación en Productos Naturales (Morelia, Michoacán 2011) y en el QuimiUNAM 2011 (Ciudad Universitaria 2011)

Q.F.B. Paulina Del Valle Pérez
Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag
Tutora

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM, 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 la beca otorgada durante mis estudios de maestría (Numero de becario: 234569).

Al Dr. Martín González Andrade (Instituto Nacional de Medicina Genómica) a quien agradezco infinitamente su apoyo en todo momento para la realización de este proyecto.

A la Dra. Martha Macías Rubalcava (Instituto de Química) por el apoyo para la obtención de los espectros de RMN y de EM-IE así como para la realización de los análisis por difracción de rayos X.

A la Dra. María del Carmen González Villaseñor (Instituto de Biología) por proporcionar el material fúngico para la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado por las revisiones y las valiosas observaciones realizadas para enriquecer el presente trabajo.

Especialmente quiero agradecer a la Dra. Rachel Maya Essayag por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo, por ser una guía muy importante a lo largo de mi formación académica, por sus valiosas observaciones y recomendaciones que fueron esenciales para la realización de este proyecto.

ÍNDICE

	Página
Lista de Figuras	I
Lista de Cuadros y Tablas	II
Lista de Espectros	III
Lista de Abreviaturas	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Antecedentes sobre la proteína reguladora calmodulina	7
2.1.1 Generalidades	7
2.1.2 Agentes inhibidores de la CaM	8
2.1.3 Importancia de la calmodulina como blanco terapéutico en los procesos de proliferación celular	12
2.1.4 Métodos para la detección de inhibidores de la CaM	14
2.2 Antecedentes sobre las enzimas α -glucosidasas	16
2.2.1 Generalidades	16
2.2.2 Importancia de las α -glucosidasas en la terapéutica de la diabetes	17
2.2.3 Agentes inhibidores de las α -glucosidasas	18
2.3 Antecedentes sobre el género <i>Aspergillus</i>	28
2.3.1 Generalidades	28

2.3.2 Metabolitos secundarios biodinámicos producidos por especies del género <i>Aspergillus</i>	29
2.3.3 Antecedentes sobre especie fúngica <i>Aspergillus stromatoides</i>	48
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	50
4. PARTE EXPERIMENTAL	54
4.1 Material fúngico	54
4.1.1 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento	54
4.2 Análisis cromatográficos	55
4.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	56
4.4 Estudio químico de la especie fúngica <i>Aspergillus stromatoides</i>	56
4.4.1 Fermentación de la especie fúngica	56
4.4.2 Obtención del extracto orgánico del micelio y medio de cultivo de <i>A. stromatoides</i>	56
4.4.3 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>A. stromatoides</i>	57
4.4.4 Aislamiento, purificación y elucidación estructural de la emodina (107) y de la ω -hidroxiemodina (108)	57
4.4.5 Obtención del perfil cromatográfico del extracto orgánico de <i>A. stromatoides</i>	58
4.5 Estudio de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor <i>hCaM M124C-mBBr</i>	58
4.6 Estudio de inhibición enzimática de la α -glucosidasa	59
4.6.1 Cinética de inhibición enzimática	60
4.7 Cálculos de acoplamiento molecular	61

4.7.1 Preparación de las estructuras y optimización geométrica	61
4.7.2 Acoplamiento molecular	61
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
5.1 Condiciones óptimas de crecimiento	63
5.2 Obtención de los metabolitos secundarios a partir del extracto orgánico de <i>A. stromatoides</i>	64
5.3 Elucidación estructural de las antraquinonas emodina (107) y ω -hidroxiemodina (108)	65
5.4 Elucidación estructural de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (109)	74
5.5 Elucidación estructural de la 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[<i>b</i>]cromen-1,9-diona (110)	75
5.6 Elucidación estructural de la citrinina (67)	81
5.7 Perfil cromatográfico del extracto orgánico de <i>Aspergillus stromatoides</i>	84
5.8 Estudios de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor <i>hCaM M124C-mBBr</i>	84
5.9 Estudio de inhibición enzimática de la α -glucosidasa	90
5.10 Estudios de acoplamiento molecular	92
5.10.1 Acoplamiento molecular con CaM	92
5.10.2 Acoplamiento molecular con α -glucosidasa	96
6. CONCLUSIONES	99
7. PERSPECTIVAS	101
8. BIBLIOGRAFÍA	102

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Cambio conformacional de la apo-CaM (a) a la holo-CaM (b) al unir los cuatro iones Ca^{2+}	8
2	Regulación del ciclo celular por las cinasas dependientes de CaM y la calcineurina.	13
3	a) Biosensor fluorescente <i>hCaM M124C-mBBr</i> con el fluoróforo monobromobimano (en verde) unido en la posición 124; b) Cambio conformacional del biosensor al unirse al inhibidor clásico trifluoperazina (en rojo).	15
4	Patogénesis de la diabetes mellitus tipo II.	17
5	<i>Aspergillus stromatoides</i> : a) Colonia en medio agar papa-dextrosa (PDA); b) Micrografía electrónica de barrido de una cabeza aspergilar.	48
6	Filograma de la sección <i>Cremeri</i> y <i>Chaetosartoya</i> .	49
7	Principales causas de muerte en países de ingresos medios-altos en el año 2008.	50
8	Prevalencia mundial de niveles elevados de glucosa en sangre (en ayunas) en personas mayores de 25 años.	51
9	<i>Aspergillus stromatoides</i> : colonia en medio agar papa-dextrosa (PDA).	54
10	Estudio de la cinética de inhibición de α -glucosidasa a diferentes concentraciones de <i>p</i> -NPG y de ω -hidroxiemodina (108).	60
11	Correlaciones observadas en los espectros HMBC para la emodina (107) y ω -hidroxiemodina (108).	66
12	Estructura tridimensional resuelta por difracción de rayos X de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (109).	74
13	Correlaciones observadas en HMBC para el compuesto 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[<i>b</i>]cromen-1,9-diona (110).	76
14	Estructuras tridimensionales resueltas por difracción de rayos X de la 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[<i>b</i>]cromen-1,9-diona (110).	80
15	Estructura tridimensional resuelta por difracción de rayos X de la citrinina (67).	81
16	Perfil cromatográfico del extracto orgánico de <i>A. stromatoides</i> .	84
17	Espectros de fluorescencia y curvas de titulación del biosensor <i>hCaM M124C-mBBr</i> con los ligandos a) emodina (107); b) ω -hidroxiemodina (108); c) CPZ y d) control negativo + emodina (107).	85-86
18	Complejo CaM-iNOS (en azul se representa el dominio de CaM, en rosa el dominio de iNOS).	89
19	Curvas de inhibición enzimática y gráficos de Dixon para el cálculo de los parámetros cinéticos de inhibición de la α -glucosidasa para a) acarbosa y b) ω -hidroxiemodina (107).	91

Lista de Cuadros y Tablas

		Página
Cuadro		
1	Metabolitos selectos con actividad inhibidora sobre las α -glucosidasas.	25
2	Micotoxinas selectas producidas por especies del género <i>Aspergillus</i> .	30
3	Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género <i>Aspergillus</i> .	35
4	Parámetros e información sobre la interacción de los productos fúngicos 107 , 108 y CPZ con la CaM generados del estudio de acoplamiento molecular.	93
5	Parámetros e información sobre la interacción del producto fúngico 108 y acarbosa con la α -glucosidasa generados del estudio de acoplamiento molecular.	97
Tabla		
1	Clasificación de α -glucosidasas y enzimas relacionadas.	17
2	Condiciones evaluadas para el desarrollo de <i>A. stromatoides</i> .	55
3	Condiciones utilizadas para la obtención del perfil cromatográfico por CLAE.	58
4	Resultados de la determinación de las mejores condiciones de crecimiento	63
5	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C de la emodina (107) y de la ω -hidroxiemodina (108).	67
6	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (109).	75
7	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C de la 8-hidoxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[<i>b</i>]cromen-1,9-diona (110).	77
8	Resultados del ensayo de fluorescencia: cálculo de la constante de disociación.	87

Lista de Espectros

Espectro		Página
1	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, (CD ₃) ₂ CO) de la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (107).	68
2	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, (CD ₃) ₂ CO) de la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (107).	69
3	Espectro HMBC de la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (107).	70
4	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de la 1,3,8-trihidroxi-6-(hidroximetil)-antraquinona (108).	71
5	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de la 1,3,8-trihidroxi-6-(hidroximetil)-antraquinona (108).	72
6	Espectro HMBC de la 1,3,8-trihidroxi-6-(hidroximetil)-antraquinona (108).	73
7	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de la 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[<i>b</i>]cromen-1,9-diona (110).	78
8	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[<i>b</i>]cromen-1,9-diona (110).	79
9	Espectro de RMN- ¹ H (500MHz, CDCl ₃) de la citrinina (67).	82
10	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la citrinina (67).	83

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
Å	Amstrong
ADT	AutoDock Tools
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
<i>c</i>	Cuadruplete
°C	Grados Celsius
Ca ²⁺	Ion calcio
CaM	Calmodulina
CaMK	Cinasa dependiente de calmodulina
CaM-PDE	Fosfodiesterasa dependiente de calmodulina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CDCl ₃	Cloroforno deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterada
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
Cl ₅₀	Concentración inhibidora media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CPZ	Clorpromazina
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de dobles
DE ₅₀	Dosis efectiva media
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELU	Energía libre de unión
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
eV	Electrón-volt
FDA	Food and Drug Administration
<i>g</i>	Gramos
GH	Glicosil-hidrolasa
HMG-CoA reductasa	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
kcal	Kilocalorías

K_d	Constante de disociación
kDa	Kilodaltones
K_i	Constante de inhibición
K_{ic}	Constante de inhibición competitiva
L	Litros
m/z	Relación masa/carga
M^+	Ión molecular
<i>mBBr</i>	Monobromobimano
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
min	Minutos
mm	Milímetros
MLCK	Cinasa de cadena ligera de miosina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Agar papa-dextrosa
PDB	Protein Data Bank
P.f.	Punto de fusión
<i>p</i> -NPG	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosido
ppm	Partes por millón
R^2	Coefficiente de correlación cuadrático
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- 1H	Resonancia magnética nuclear protónica
<i>s</i>	Singulete
T	Temperatura
TFA	Ácido trifluoroacético
TFP	Trifluoperazina
TMS	Tetrametilsilano
U	Unidades
U. A.	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico

λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar

RESUMEN

En los últimos años se ha demostrado que los hongos de ambientes marinos son una importante fuente de metabolitos biodinámicos de interés para el desarrollo de fármacos y/o herramientas de investigación. Estos productos fúngicos presentan estructuras novedosas y blancos de acción muy diversos que pueden ser de relevancia en la terapéutica de patologías de alta prevalencia mundial como el cáncer y la diabetes mellitus tipo II. Uno de los blancos moleculares de interés para la búsqueda de nuevos fármacos anticancerígenos es la proteína calmodulina (CaM), la cual está implicada en la regulación de diversos procesos celulares como la proliferación de células normales y tumorales. Asimismo, las enzimas α -glucosidasas, involucradas en el metabolismo de oligosacáridos y polisacáridos, constituyen otro blanco molecular de importancia en la búsqueda de nuevos agentes antidiabéticos.

En este contexto, el presente trabajo de investigación se planteó con la finalidad de descubrir nuevos inhibidores de la CaM y de las α -glucosidasas a partir del hongo marino *Aspergillus stromatoides*, aislado de la zona intermareal en las costas del estado de Tabasco, México. El extracto orgánico del medio de cultivo se obtuvo a través de procesos sucesivos de reparto con CH_2Cl_2 seguidos de concentración *in vacuo*. A partir de este extracto cristalizó de forma espontánea la micotoxina citrinina (**67**). Por otro lado, el fraccionamiento del extracto orgánico empleando técnicas cromatográficas convencionales, condujo al aislamiento de la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (**107**) y la 1,3,8-trihidroxi-6-(hidroximetil)-antraquinona (**108**), así como al compuesto de tipo xantona, la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (**109**) y de la cromona 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona (**110**). Las estructuras de los cinco compuestos aislados se determinaron por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales y en algunos casos fueron determinadas de manera inequívoca mediante un análisis por difracción de rayos X.

Los ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca empleando el biosensor *hCaM* M124C-*mBBR* permitieron determinar la afinidad de los compuestos fúngicos aislados por la CaM, demostrando que la antraquinona **107**, mejor conocida como emodina, se une de manera directa a la proteína con una K_d de 46 nM, una excelente afinidad en comparación con el inhibidor clásico clorpromazina (CPZ) el cual tuvo una K_d de 1.2 μ M. Asimismo, los estudios de acoplamiento molecular indicaron que la emodina (**107**) interacciona de igual forma que los inhibidores clásicos de la CaM (CPZ).

Por otra parte, los estudios de cinética de inhibición enzimática de la α -glucosidasa de levadura empleando un método espectrofotométrico demostraron que la ω -hidroxiemodina (**108**) es un inhibidor de tipo competitivo con una K_{ic} de 0.057 mM, casi seis veces más efectivo que la acarbosa (K_{ic} de 0.32 mM), fármaco prototipo inhibidor de las α -glucosidasas. Por último, los estudios de acoplamiento molecular indicaron que ambos inhibidores se unen en el sitio catalítico de la enzima.

El presente trabajo muestra una clara estrategia para la búsqueda de moléculas inhibitoras de la CaM y/o de las α -glucosidasas a partir de microorganismos marinos, los cuales han sido poco explorados en nuestro país.

ABSTRACT

Marine derived fungi have been shown in recent years to produce new bioactive secondary metabolites. These compounds are of interest as new lead structures for developing new drugs for treating high prevalence diseases such as cancer and type II diabetes mellitus. In this regard, one important molecular target for anticancer drug is the protein calmodulin (CaM), which is implicated in a variety of cellular functions including cell growth and proliferation in both malign and normal cells. On the other hand, the enzymes α -glucosidases, which catalyze the cleavage of glycosidic bonds in oligosaccharides and polysaccharides, are valuable targets for new antidiabetic drugs.

Thus, the main goals proposed for this work were to carry out the isolation and chemical characterization of novel CaM and α -glucosidase inhibitors from the broth culture of the marine derived fungi *Aspergillus stromatoides*. The fungal organic extract was prepared by extensive partition of the growth media with CH_2Cl_2 . From this extract spontaneously crystallized citrinin (**67**). On the other hand, the fractionation of the remaining extract using various chromatographic techniques led to the isolation of the two anthraquinones, emodin (**107**) and ω -hydroxyemodin (**108**) as well as 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylic acid methyl ester (**109**) and 8-hydroxy-6-methyl-2,3-dihydrocyclopenta[*b*]chromene-1,9-dione (**110**). The structure of these five compounds was determined with spectral and spectrometric methods and in some cases by X-ray analysis.

Fluorescence quenching experiments, using the novel biosensor *hCaM M124C-mBBR*, revealed that emodin (**107**) interacted with the protein with a very high affinity binding compared with the well-known CaM inhibitor chlorpromazine (CPZ); the K_d values were of 146 nM and 1.2 μM , respectively. Docking studies were also performed in order to define the probable binding site of emodin (**107**) and revealed that this anthraquinone interacts with the same site as CPZ.

On the other side, the results of the kinetic α -glucosidase inhibition study, using a spectrophotometric assay, indicate that ω -hydroxyemodin (**108**) is a competitive inhibitor of yeast α -glucosidase with a K_{ic} of 0.057 mM, a very high inhibitory activity compared with the antidiabetic drug acarbose with a K_{ic} of 0.32 mM. Docking studies of α -glucosidase showed that compound **108** and acarbose interact in the catalytic domain.

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales los productos naturales han jugado un papel muy importante en el tratamiento y prevención de padecimientos que afectan al ser humano, y gracias a los avances tecnológicos que se emplean en la actualidad para el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios bioactivos, éstos constituyen a la fecha una de las principales fuentes en el descubrimiento de nuevos fármacos *per se* o de prototipos estructurales para el desarrollo de los mismos. Así, en una revisión reciente, se demostró que en el periodo comprendido de 1940 hasta mediados de 2006, cerca del 30% de todas las nuevas entidades químicas descubiertas correspondían a productos naturales o bien derivados semisintéticos de éstos. De igual forma, en el transcurso de 1994 hasta el año 2007, cerca de la mitad de los fármacos que fueron aprobados por la FDA, se basan en productos naturales o sus derivados. Estos productos se han considerado especialmente importantes para la terapia del cáncer, enfermedades infecciosas y la diabetes. De este modo, alrededor del 45% de los fármacos disponibles para el tratamiento del cáncer son de origen natural o sus derivados (Newman y Cragg, 2007; Harvey 2008).

Es importante mencionar que estos productos pueden ser obtenidos a partir de plantas, animales o microorganismos, siendo estos últimos una fuente invaluable para el desarrollo de moléculas líder con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antihelmínticas, inmunosupresoras, hipocolesterolemiantes, antidiabéticas y anticancerígenas, entre otras (Newman 2003). Desde el descubrimiento de la penicilina y la estreptomycinina, los hongos y actinomicetos han cobrado especial atención por su potencial para producir metabolitos secundarios biodinámicos estructuralmente diversos (Kjer *et al.*, 2010). De manera particular, se ha demostrado que los hongos de origen marino son una importante fuente de moléculas bioactivas novedosas con blancos de acción muy diversos que son de relevancia en la patogénesis de diversas enfermedades de alta prevalencia mundial como el cáncer y la diabetes tipo II. En este sentido, uno de los blancos moleculares de interés en el tratamiento del cáncer y otros padecimientos es la

proteína reguladora calmodulina, ya que desempeña un papel muy importante en la transducción de señales dependientes de Ca^{2+} a través de las cuales regula numerosos procesos celulares, incluyendo la proliferación celular (Jagadeesh *et al.*, 2006). En la actualidad existen diversos fármacos para el tratamiento del cáncer, como la vincristina y sus análogos, que actúan modificando las propiedades reguladoras de esta proteína. Por otro lado, un blanco molecular de importancia en la terapia de la diabetes mellitus tipo II es la familia de las α -glucosidasas, enzimas que están implicadas en el metabolismo de carbohidratos y que son inhibidas por un extenso grupo de productos naturales incluyendo a la acarbosa, fármaco prototipo que inhibe de forma competitiva a estas enzimas.

Bajo este marco de referencia se planteó el presente trabajo de investigación que tiene como objetivo realizar el estudio químico de la especie fúngica *Aspergillus stromatoides* para aislar y caracterizar metabolitos que interactúen con la calmodulina y/o con la α -glucosidasa. Cabe destacar que en la actualidad no existen reportes sobre el metabolismo secundario de esta especie de origen marino por lo que este trabajo representa una contribución original al estudio del género *Aspergillus* y al estudio de los organismos de origen marino en México que a la fecha han sido poco explorados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes sobre la proteína reguladora calmodulina

2.1.1 Generalidades

El ion calcio (Ca^{2+}) es uno de los segundos mensajeros más importantes en la transducción de señales a través de las cuales la célula puede regular numerosos procesos indispensables para su desarrollo y homeostasis. Este ion puede actuar de forma directa uniéndose a sus proteínas blanco o bien puede mediar sus efectos por medio de proteínas de unión a calcio (Berridge 2004). El principal receptor intracelular y extracelular de unión a calcio presente en la mayoría de las células eucariontes es la calmodulina (CaM), una proteína pequeña de 148 aminoácidos (16.7 kDa) de carácter ácido, que regula procesos de señalización celular calcio-dependientes. Esta proteína no posee una actividad enzimática inherente, sin embargo, regula la actividad de numerosas enzimas (*v.g.* fosfodiesterasas, proteínas cinasas, adenilciclasas, calcineurina, Ca^{2+} -ATPasa, óxido nítrico sintetasa, entre otras) así como de canales iónicos. Actualmente se conocen más de 300 enzimas blanco de la CaM para la regulación de diversos procesos celulares, incluyendo proliferación y crecimiento celular, transcripción y expresión de genes, ensamblaje del citoesqueleto, contracción muscular, metabolismo de calcio y nucleótidos cíclicos, fosforilación y desfosforilación de proteínas y proteólisis, entre otros (Sharma 2003; Jagadeesh *et al.*, 2006; Junker y Rief, 2009).

Los datos cristalográficos muestran que la estructura terciaria de la calmodulina en forma libre (apo-CaM) se compone por dos dominios globulares constituidos por cuatro α -hélices cada uno (lóbulo N-terminal y lóbulo C-terminal) conectados por una región poco flexible. Al unir los cuatro iones Ca^{2+} , la CaM cambia a una conformación extendida denominada holo-CaM en la que se forma una α -hélice central de ocho giros que conecta a los dos dominios globulares (Figura 1), los cuales a su vez exponen sus superficies cóncavas de carácter hidrofóbico ricas en residuos de metionina. La flexibilidad de la hélice central así como la exposición de los residuos hidrofóbicos, contribuyen a que la

CaM pueda adoptar diversas conformaciones que son indispensables para la unión a sus muy diversos blancos con una gran afinidad ($K_d \sim \text{nM}$) (Kovesi *et al.*, 2008).

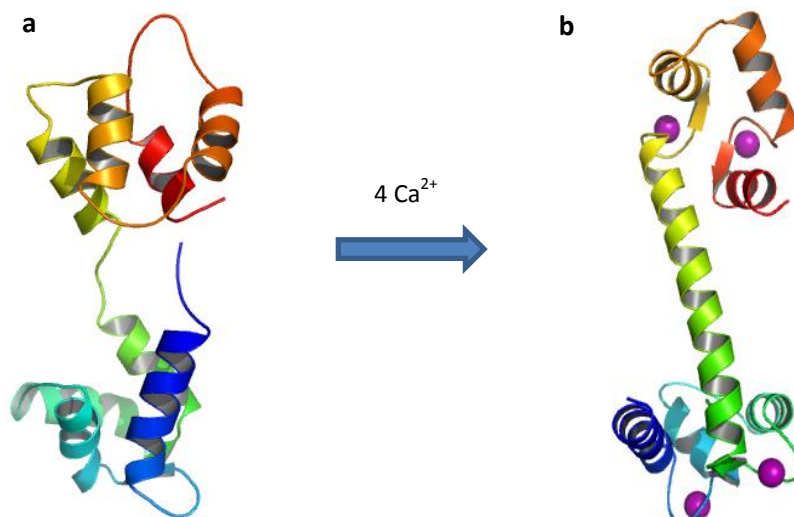
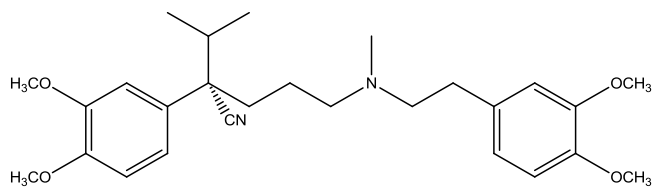


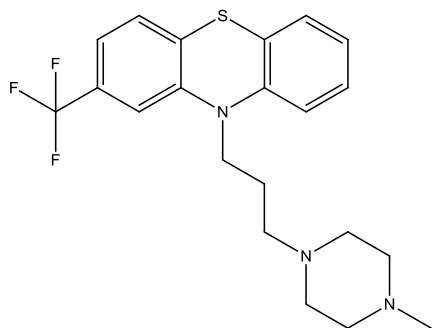
Figura 1. Cambio conformacional de la apo-CaM (a) a la holo-CaM (b) al unir los cuatro iones Ca^{2+} .

2.1.2. Agentes inhibidores de la CaM

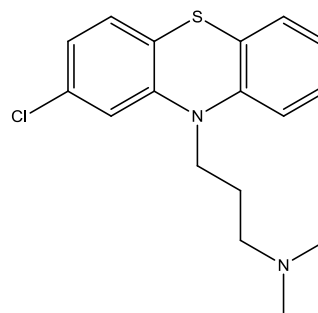
La función de la CaM como proteína reguladora puede ser modificada efectivamente por una gran variedad de compuestos con estructuras químicas muy diversas incluyendo algunos fármacos, herramientas de investigación y un grupo importante de productos biodinámicos, tanto naturales como sintéticos. Entre los fármacos más relevantes se encuentran algunos bloqueadores de canales de calcio como el verapamilo (1), indicado para el tratamiento de la hipertensión y la angina de pecho (Jagadeesh *et al.*, 2006) y agentes antipsicóticos como las fenotiazinas trifluoperazina (2) y clorpromazina (3) (Vertessy *et al.*, 1998). El compuesto W-7 (4) y el calmidazolio (5) son ejemplos de herramientas de investigación con propiedades inhibitoras de la CaM (Osawa *et al.*, 1998; Dhillon *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004).



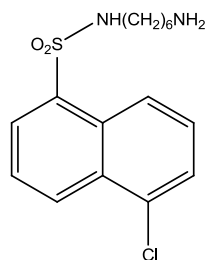
verapamilo (1)



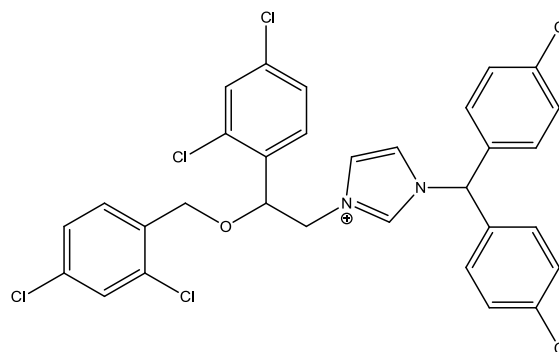
trifluoperazina (2)



clorpromazina (3)



calmidazolío (4)

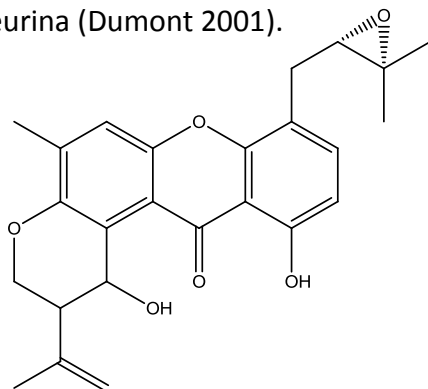
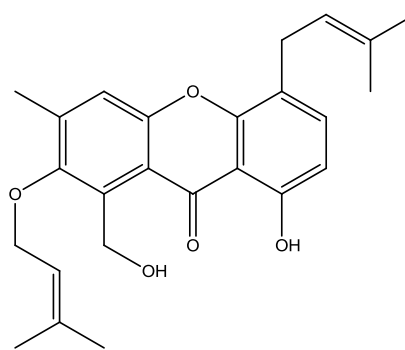


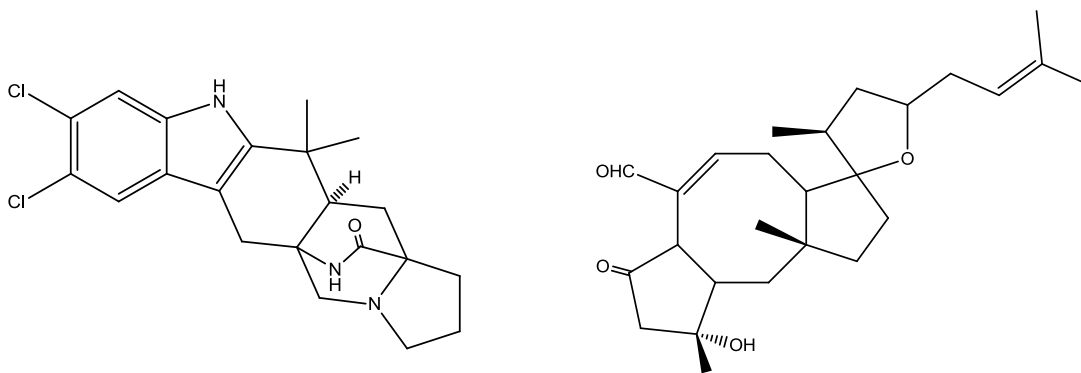
W-7 (5)

Del mismo modo, una amplia variedad de productos naturales tienen propiedades anti-CaM. En una revisión reciente publicada en 2007 por Martínez-Luis y colaboradores, se discuten los principales compuestos de origen natural que inhiben las propiedades moduladoras de la CaM, mismos que pertenecen a las principales categorías de metabolitos secundarios incluyendo alcaloides, péptidos, poliaminas, terpenoides, cumarinas, xantonas, antraquinonas, antraciclinas, lignanos y flavonoides (Martínez-Luis *et al.*, 2007).

Cabe enfatizar que algunos de estos productos son de origen fúngico, entre los que destacan la malbrancheamida (**6**), un indolmonoterpenoide aislado del hongo coprófilo *Malbranchea aurantiaca* (Mata *et al.*, 2006), así como las xantonas preniladas emericelina (**7**) y tajixantona (**8**), obtenidas a partir de la especie marina *Emericella* sp. (Mata *et al.*, 2009). Mediante experimentos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la proteína se demostró que todos estos compuestos interaccionan de forma directa con la CaM y presentan constantes de disociación (K_d) del orden nanomolar (Figuroa *et al.*, 2011; Mata *et al.*, 2011).

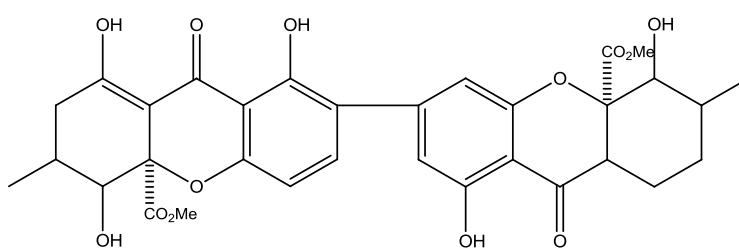
Otros ejemplos relevantes de metabolitos fúngicos son el sesterterpenoide ofiobolina A (**9**), aislado del hongo *Helminthosporium maydis*, que tiene la propiedad de inhibir a la fosfodiesterasa dependiente de CaM (CaM-PDE) (Leung *et al.*, 1984); el verruculógeno (**76**), una micotoxina aislada de especies de *Penicillium* y *Aspergillus*, presenta actividad inhibitoria sobre la PDE-1, así como el ácido secalónico (**10**), obtenido de la especie *Penicillium oxalicum* (Pala *et al.*, 1999); el esteroide ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**11**) aislado del hongo *Guanomyces polytrix*, inhibe a la PDE-1 y a la NAD-cinasa dependiente de CaM (CaM-NADK) (Mata *et al.*, 2003); una serie de metabolitos policlorados denominados KS-504's (**12**) de *Mollisia ventosa* son capaces de inhibir a la cinasa de cadena ligera de la miosina dependiente de CaM (CaM-MLCK) (Nakanishi *et al.*, 1990); por último la ciclosporina A (**13**), un agente inmunosupresor empleado en el trasplante de órganos, que se aisló del hongo *Tolypocladium inflatum* y actúa como inhibidor de la calcineurina (Dumont 2001).

malbrancheamida (**6**)emicelina (**7**)

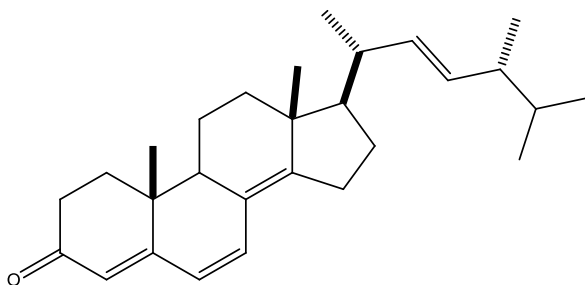


tajixantona (8)

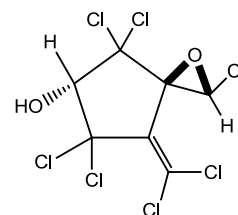
ofiobolina A (9)



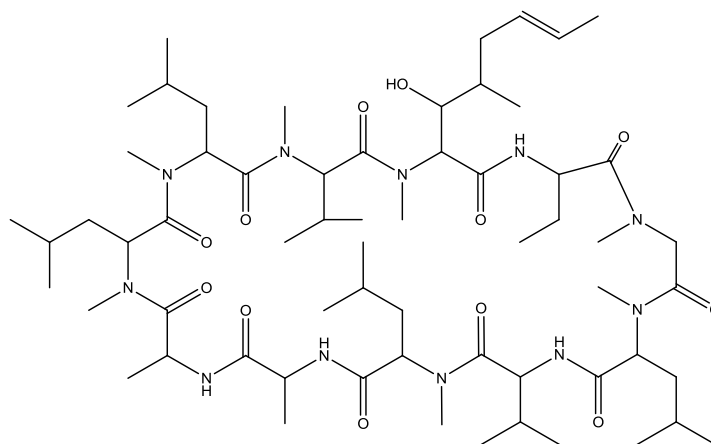
ácido secalónico (10)



ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (11)



KS-504a (12)



ciclosporina A (13)

2.1.3 Importancia de la calmodulina como blanco terapéutico en los procesos de proliferación celular

La división celular es un proceso complejo mediante el cual la célula replica su ADN y se divide para formar dos células hijas idénticas. De manera general, este proceso se lleva a cabo en diferentes fases consecutivas denominadas G_1 , S, G_2 y M. En la primera fase, la célula se prepara bioquímicamente para llevar a cabo la replicación del ADN, la cual se lleva a cabo en la siguiente fase denominada S, en la que se realiza la síntesis de ADN y la duplicación del material genético. Posteriormente, durante la fase G_2 , la célula se prepara para la mitosis (M). En esta última fase, el núcleo celular se divide con igual reparto del material genético y finalmente, se divide el citoplasma para generar dos células hijas haploides (Vermeulen *et al.*, 2003).

En relación a la participación de la CaM en los procesos de proliferación celular, diversos estudios demuestran que la cantidad intracelular de esta proteína se ve modificada en el transcurso del ciclo celular, encontrándose los mayores niveles en la transición de la fase G_1 a S y de G_2 a M. Asimismo, se ha encontrado que células modificadas para sobreexpresar CaM, presentan un aumento en su tasa de proliferación y por el contrario, aquellas que tienen una disminución en la expresión de la proteína, presentan una disminución en su proliferación. También se ha demostrado que las células cancerígenas muestran mayores niveles de CaM en comparación con las células normales lo cual evidencia su importante participación en la regulación de los procesos de proliferación celular en células malignas.

Si bien el ciclo celular es un proceso muy complejo con estrictos puntos de regulación, se sabe que la CaM modula a diversas cinasas dependientes (CaMK's) y a la calcineurina, enzimas que juegan un papel muy importante en este proceso. Así por ejemplo, la CaMKII regula el ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos durante la mitosis; y la calcineurina regula la transcripción de la ciclina D y de la cinasa dependiente de ciclina 4 (cdk4) las cuales participan en la progresión de la fase G_1 (Molnar *et al.*, 1995; Kahl y

Means, 2003; Jagadeesh *et al.*, 2006; Mayur *et al.*, 2006; Dotto 2011;). En la Figura 2 se representa el ciclo celular y las fases en las que participan las CaMKs y la calcineurina.

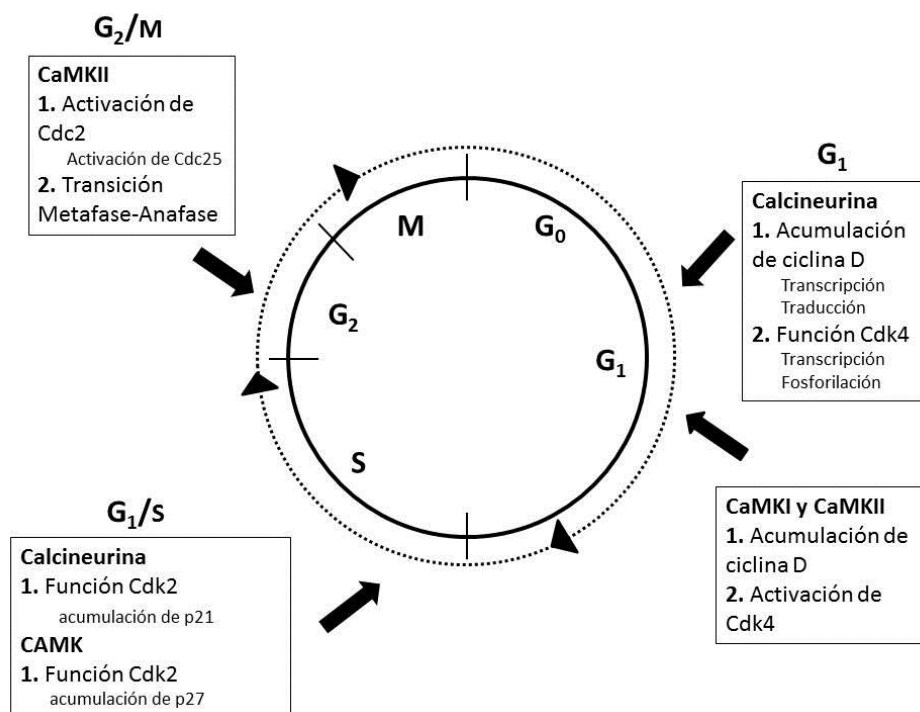
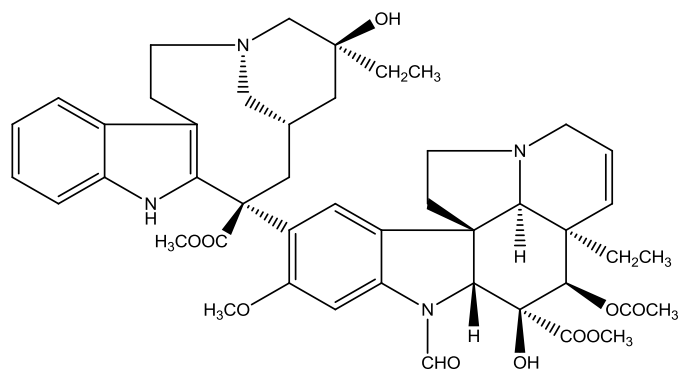


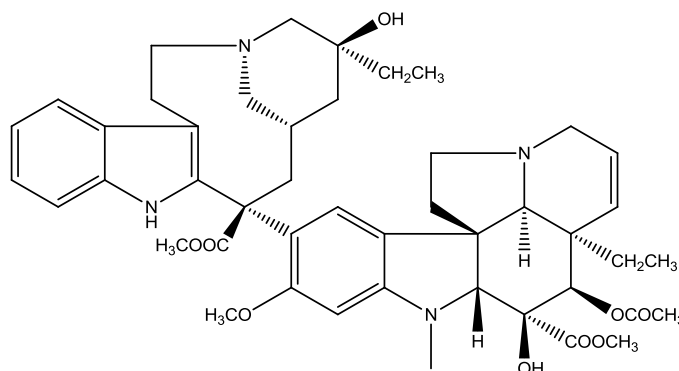
Figura 2. Regulación del ciclo celular por las cinasas dependientes de CaM y la calcineurina (modificado de Kahl y Means, 2003).

La participación de la CaM en la regulación de procesos de proliferación celular en células cancerosas demuestra su potencial como un blanco terapéutico de agentes antineoplásicos novedosos, tan necesarios para combatir esta enfermedad causante de altas tasas de morbilidad y mortalidad a nivel global (Shim *et al.*, 2007). En este sentido, cabe mencionar que algunos agentes antineoplásicos de uso actual en la terapia de diversos tipos de cáncer, tales como los alcaloides de la vinca (*Catharanthus roseus*) vincristina (**14**) y vinblastina (**15**), y su derivado semisintético KAR-2 (**16**), así como el tamoxifeno (**17**), presentan una actividad inhibitoria sobre los distintos complejos CaM-enzima que participan en el proceso de división celular, y en consecuencia sobre las

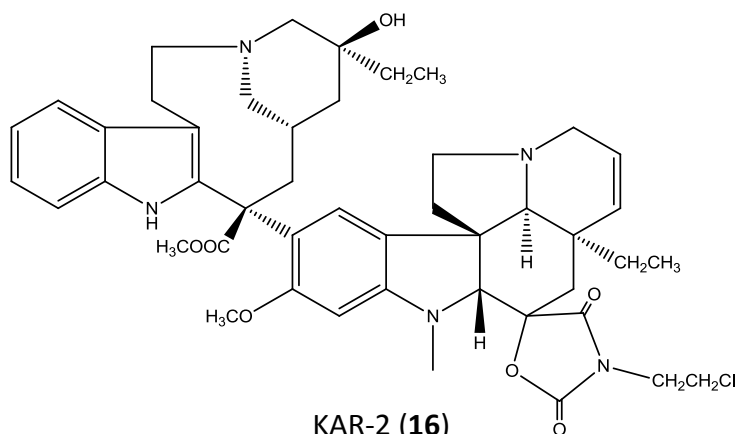
propiedades reguladoras de la CaM (Frankfurt *et al.*, 1995; Ovadi *et al.*, 2006; Bermejo *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010;).



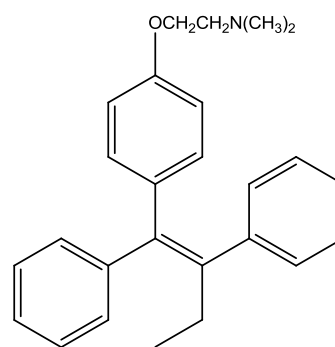
vincristina (14)



vinblastina (15)



KAR-2 (16)



tamoxifeno (17)

2.1.4 Métodos para la detección de inhibidores de la CaM

Los inhibidores de la calmodulina pueden actuar de forma directa uniéndose con gran afinidad a la proteína, o bien uniéndose al complejo CaM-enzima. Estos últimos se denominan inhibidores funcionales. Existen diversos métodos para la detección de inhibidores clásicos y/o funcionales de la CaM entre los que destacan la cromatografía de afinidad, la electroforesis nativa en gel, métodos espectroscópicos, cristalografía de rayos X, métodos enzimáticos funcionales, métodos computacionales y métodos basados en fluorescencia, por mencionar algunos (Charpentreau *et al.*, 2004; Yurimoto *et al.*, 2009;

Figueroa *et al.*, 2011). Dentro de los métodos que determinan la fluorescencia extrínseca de la CaM, han surgido los que se apoyan en el uso de los biosensores, que son dispositivos diseñados a partir de biomoléculas que transducen señales fluorescentes detectables cuando un ligando se une directamente a éste. El empleo de biosensores en el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas representa algunas ventajas tales como alta especificidad y selectividad, tiempos de análisis cortos y un costo relativamente bajo (Douglass *et al.*, 2002; Keusgen 2002).

En el año 2009, González-Andrade diseñó un biosensor fluorescente de la calmodulina humana (*hCaM*) por medio de mutagénesis dirigida, reemplazando el aminoácido metionina en la posición 124 por cisteína para posteriormente unir de forma covalente el fluoróforo monobromobimano (*mBBR*). Este biosensor denominado *hCaM M124C-mBBR* permite detectar inhibidores clásicos de la CaM ya que correlaciona los cambios conformacionales provocados por la unión CaM-ligando con el cambio en la fluorescencia proporcionada por el fluoróforo estratégicamente unido (Figura 3) (Gonzalez-Andrade *et al.*, 2009).

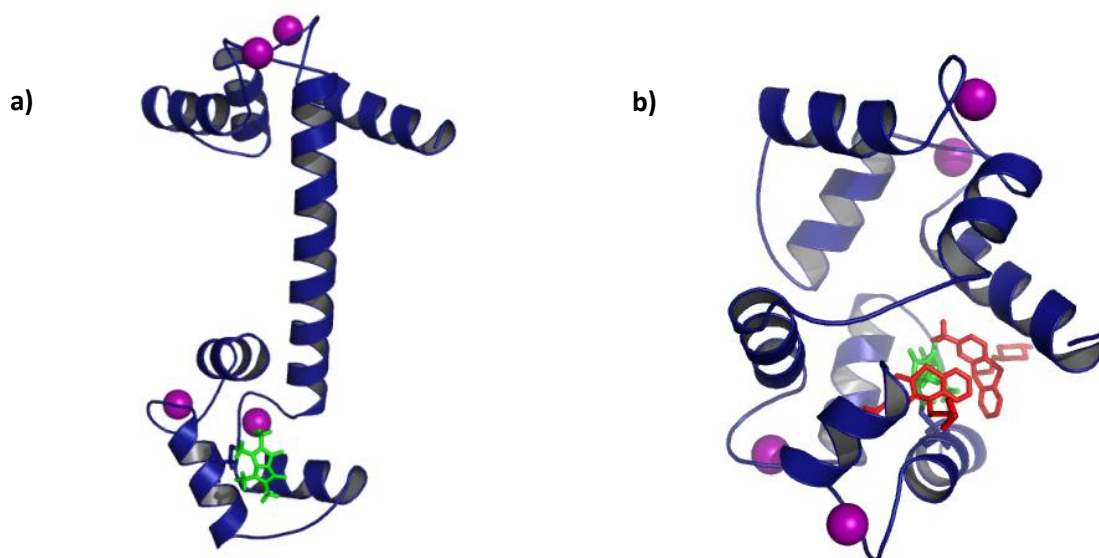


Figura 3. a) Biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBR* con el fluoróforo monobromobimano (en verde) unido en la posición 124; b) Cambio conformacional del biosensor al unirse al inhibidor clásico trifluoperazina (en rojo).

2.2 Antecedentes sobre las enzimas α -glucosidasas

2.2.1 Generalidades

Las glucosidasas son enzimas que catalizan el último paso del proceso digestivo de los carbohidratos, realizando la hidrólisis del enlace glicosídico de los polisacáridos, oligosacáridos y glicoconjugados. Estas enzimas pertenecen a las familias de las glicosilhidrolasas (GH) y son fundamentales para la degradación de diversos tipos de carbohidratos a monosacáridos para su absorción y utilización por el organismo, en el catabolismo lisosomal de glicoconjugados, y finalmente en la biotransformación de oligosacáridos en glicoproteínas o glicolípidos.

Algunas glucosidasas presentan especificidad sobre ciertos enlaces dependiendo del número, posición o configuración de los grupos hidroxilos presentes en el sacárido. Las más estudiadas han sido las α - y β -glucosidasas, que catalizan la ruptura del enlace glicosídico cuando está presente un residuo de glucosa terminal en el azúcar. En particular, las α -glucosidasas, que pertenecen a las familias GH13 y GH31, catalizan la hidrólisis de los enlaces α -D-glicosídico de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Estas enzimas poseen dos ácidos carboxílicos en su sitio catalítico, uno actúa como nucleófilo atacando el centro anomérico, y el otro funciona como donador de protones al enlace C-O para favorecer la hidrólisis. Al cabo de la hidrólisis, el centro anomérico puede retener su configuración o puede cambiar dependiendo del tipo de glucosidasa involucrada en la escisión. En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de α -glucosidasas y enzimas relacionadas así como las familias de GH a las que pertenecen (Park *et al.*, 2008).

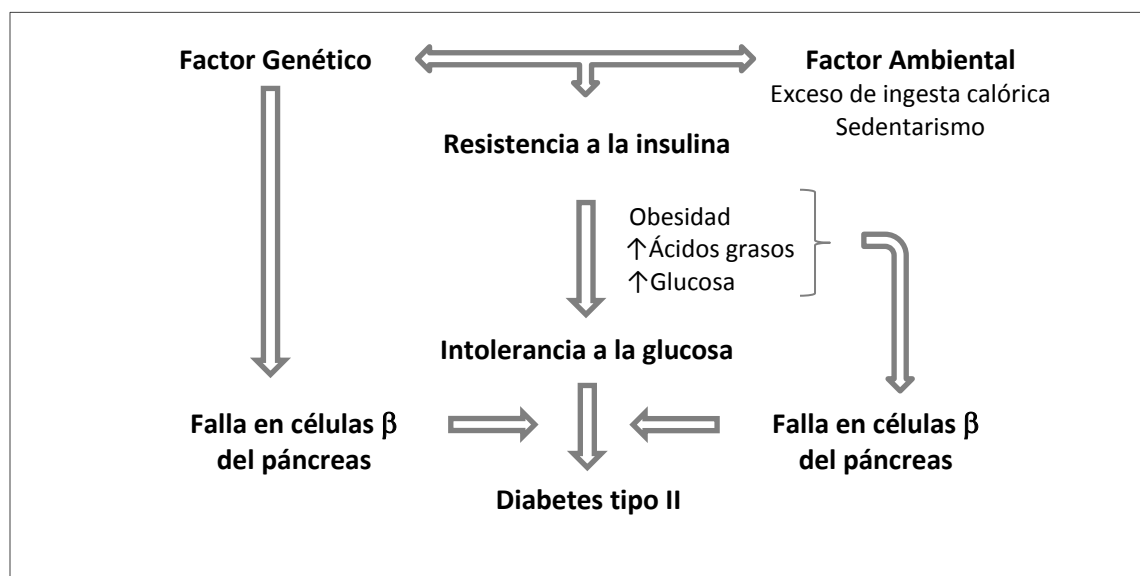
Las α -glucosidasas han cobrado especial interés en la investigación farmacéutica ya que la inhibición de sus funciones catalíticas ha demostrado ser de utilidad para retardar la absorción de glucosa y disminuir los niveles postprandiales de glucosa en sangre, y por ende son de importancia en la terapéutica de la diabetes (Carvalho *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2008; Hakamata *et al.*, 2009).

Tabla 1. Clasificación de α -glucosidasas y enzimas relacionadas.

Nombre	Familia GH	Producto de hidrólisis	Configuración del carbono anomérico tras la hidrólisis
α -glucosidasa	4, 13, 31, 97	α -glucosa	Retenida
Manosil-oligosacarido glucosidasa	63	β -glucosa	Inversión
Glucan 1,3- α -glucosidasa	31	Desconocido	Desconocida
Oligo-1,6-glucosidasa	4, 13, 31	α -glucosa	Retenida
Sucrosa α -glucosidasa	31	α -glucosa	Retenida
β -fructofuranosidasa	32, 68, 100	α -glucosa	Retenida
Glucan 1,4- α -glucosidasa	15	β -glucosa	Inversión

2.2.2 Importancia de las α -glucosidasas en la terapéutica de la diabetes

La diabetes mellitus tipo II es un desorden metabólico resultante de la compleja interacción de múltiples factores y se caracteriza por dos defectos endócrinos principales: la disminución en la secreción de insulina por las células pancreáticas, así como la resistencia a la acción de la insulina por diversos tejidos como el músculo, el hígado y el tejido adiposo (Figura 4).

**Figura 4.** Patogénesis de la diabetes mellitus tipo II (modificado de Fantus y Cheng, 2005).

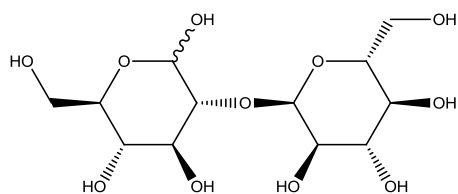
Actualmente existe una diversidad de fármacos antidiabéticos para el tratamiento de este padecimiento, mismos que ejercen su efecto mediante diferentes mecanismos de acción. Entre estos fármacos se encuentran los inhibidores de las α -glucosidasas los cuales actúan a nivel intestinal inhibiendo de forma competitiva a estas enzimas; de esta manera disminuyen la absorción de glucosa con la consecuente desaparición de la hiperglicemia postprandial característica de esta enfermedad. La acarbosa (**28**), el miglitol (**44**) y la voglibosa (**27**) son ejemplos de fármacos prototipo inhibidores de las α -glucosidasas. Estos fármacos se pueden emplear solos o en combinación con otros agentes antidiabéticos como la glibenclamida y la metformina (Fantus y Cheng, 2005; Coleman *et al.*, 2011).

2.2.3 Agentes inhibidores de las α -glucosidasas

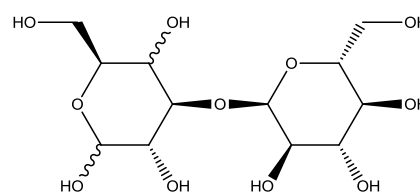
Debido al aumento en la prevalencia de la diabetes mellitus tipo II a nivel mundial, la búsqueda de nuevas entidades químicas con propiedades inhibitoras de las α -glucosidasas ha cobrado vital relevancia. Generalmente, los inhibidores de las α -glucosidasas poseen estructuras que mimetizan a los azúcares que son sustrato de éstas, además, presentan la capacidad de formar interacciones iónicas o puentes de hidrógeno con el sitio catalítico e interacciones hidrofóbicas en otros sitios (Hakamata *et al.*, 2009).

De acuerdo a una revisión reciente de Carvalho y colaboradores, se han reportado diversos inhibidores de glucosidasas, tanto naturales como sintéticos, que incluyen derivados de carbohidratos, como disacáridos, polialcoholes, pseudoaminoazúcares y tiosacáridos, así como alcaloides polihidroxilados piperidínicos, pirrolidínicos indolizidínicos y pirrolizidínicos y otros.

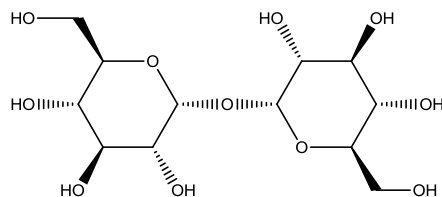
Dentro del grupo de los disacáridos se encuentran la kojibiosa (**18**), aislado de la especie *Aspergillus oryzae*, y la nigerosa (**19**), obtenida mediante la hidrólisis parcial de la amilopectina, que muestran inhibición sobre la α -D-glucosidasa I y la α -D-glucosidasa II respectivamente. De igual forma, la D-(+)-trehalosa (**20**), aislada de la planta *Momordica charantia*, muestra actividad inhibitora (Matsuura *et al.*, 2002).



kojibiosa (18)

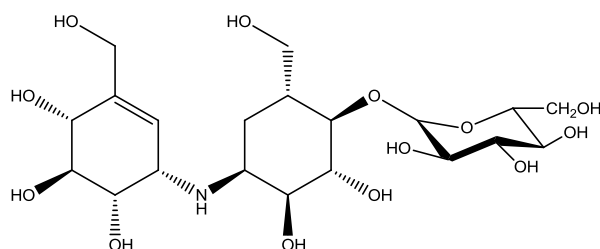


nigerosa (19)

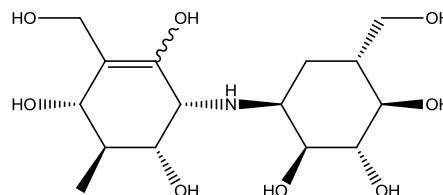


D-(+)-trehalosa (20)

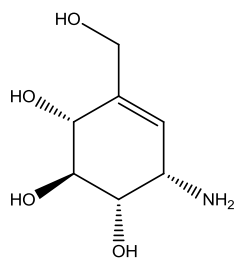
Dentro de los pseudoaminoazúcares los más importantes son del tipo C₇N aminociclitol de los que destacan la validamicina A (21) y la validoxilamina (22), biosintetizadas por *Streptomyces hygroscopicus*; y la valienamina (23) y la validamida (24) que derivan de la degradación microbiana de la validoxilamina (22) por *Pseudomonas denitrificans*. Estos compuestos sirvieron de prototipo para el diseño de valiolamina (25), la hidroxivalidamina (26) y la voglibosa (27) que son potentes inhibidores de las α -glucosidasas. Dentro de esta clase de compuestos también se encuentra la acarbosa (28), el primer fármaco inhibidor de las α -glucosidasas aprobado en 1995 por la FDA para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II. Este fármaco, también conocido como Precose[®], es un pseudotetrasacárido complejo producido por la bacteria *Actinoplanes utahensis* y muestra actividad inhibidora en el orden micromolar sobre la sucrasa, maltasa, dextrinasa y glucoamilasa (Mahmud 2003).



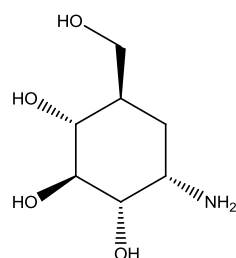
validamicina A (21)



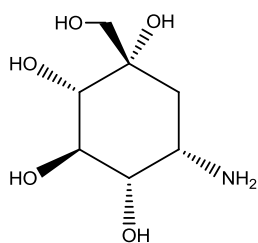
validoxilamina (22)



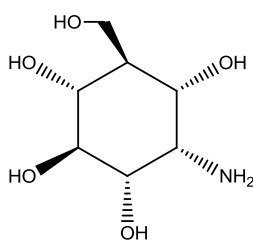
valienamina (23)



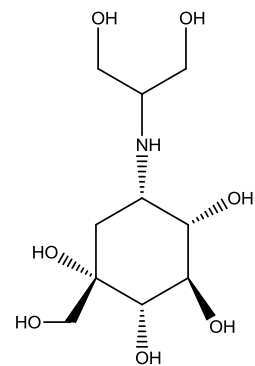
validamina (24)



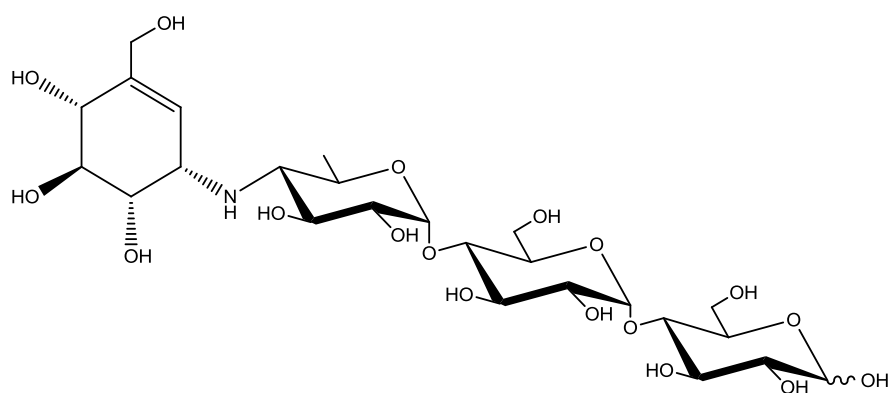
valiolumina (25)



hidroxivalidamina (26)



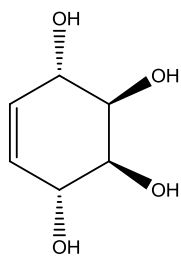
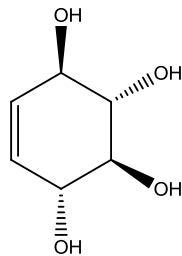
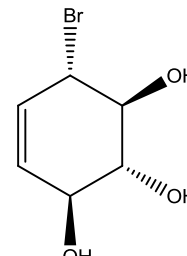
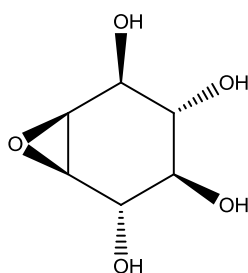
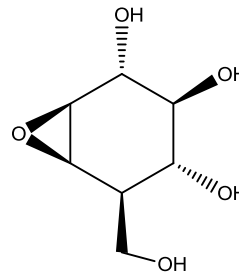
voglibosa (27)



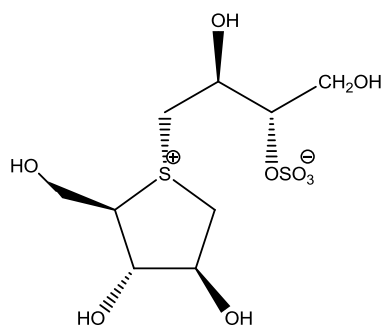
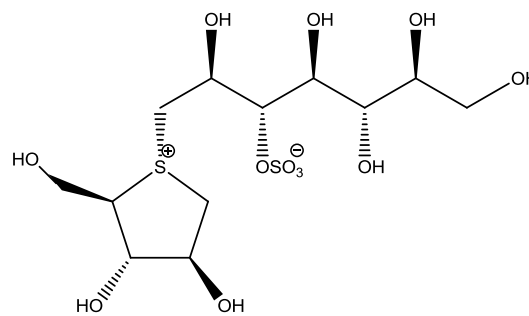
acarbosa (28)

Otro tipo de inhibidores de α -glucosidasas son los ciclitos insaturados llamados conduritoles (isómeros A-F), de los cuales destaca el conduritol A (29), aislado de *Gymnena sylvestre*, planta utilizada en la medicina tradicional de la India para el tratamiento de la diabetes. Estos compuestos y sus derivados son ejemplos relevantes de inhibidores de la absorción intestinal de glucosa, ya que inhiben de forma selectiva a las α -glucosidasas (Mehta y Ramesh, 2005). Cabe mencionar que el epóxido del conduritol B

(**30**) y el bromoconduritol B (**31**) son inhibidores irreversibles de las glucosidasas ya que se unen de manera covalente a la enzima. El ciclofelitol (**33**), un análogo del epóxido del conduritol B (**32**), se aisló del hongo *Phellinus* sp. (Withers y Rempel, 2008).

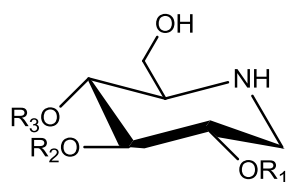
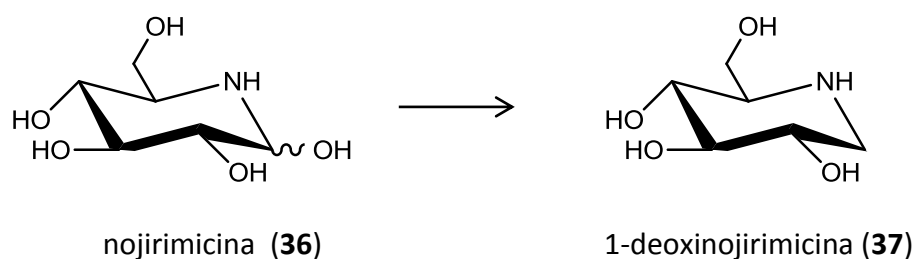
conduritol A (**29**)conduritol B (**30**)bromoconduritol B (**31**)epóxido de conduritol B (**32**)ciclofelitol (**33**)

Dentro de los inhibidores de tipo tiosacárido destacan el salacínol (**34**) y el kotalanol (**35**), aislados de la planta *Salacia reticulata* que se emplea en la medicina tradicional de la India para el tratamiento de la diabetes. Estos compuestos producen una fuerte inhibición *in vivo* de la elevación de glucosa en sangre (Yoshikawa *et al.*, 1997, 1998).

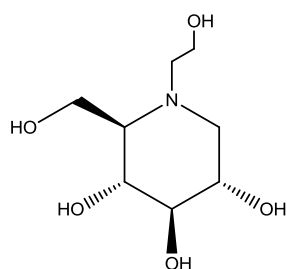
salacínol (**34**)kotalanol (**35**)

En el grupo de los alcaloides polihidroxiados de tipo piperidínicos se encuentra la nojirimicina (**36**), considerada el primer análogo de la glucosa, que se aisló de diversas especies de *Bacillus* y *Streptomyces* y mostró tener una potente actividad inhibitora sobre las α -glucosidasas, sin embargo presenta poca estabilidad debido al hidroxilo en C-1. La reducción de este compuesto condujo a la obtención de la 1-deoxinojirimicina (**37**), un análogo más estable y con gran actividad *in vitro* sobre las glucosidasas (Carvalho *et al.*, 2006).

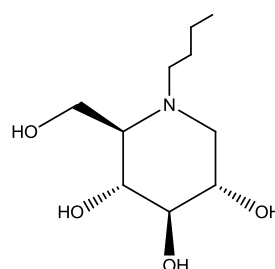
A partir del descubrimiento de estas piperidinas polihidroxiadas, se han reportado más derivados de origen fúngico, bacteriano y vegetal así como sintéticos (Kato *et al.*, 2011). Así por ejemplo, los análogos *N*-alquilados de la 1-deoxinojirimicina como el miglitol (**44**) y la *N*-butil-1-deoxinojirimicina (**45**) se emplean como fármacos para el tratamiento de la diabetes y la enfermedad de Gaucher respectivamente (Nash *et al.*, 2011). Por otra parte, los derivados glicosilados (**38-43**) de la 1-deoxinojirimicina (**37**), sintéticos o aislados de diversas especies vegetales como *Morus alba* y *Scilla siberica*, son potentes inhibidores de las α -glucosidasas (Asano *et al.*, 1994; 2002). Los derivados hidroximetilados de la nojirimicina (**36**), la α -homonojirimicina (**46**) y β -homonojirimicina (**47**), aislados de *Omphalea diandra* y *Aglaonema treubii*, también presentan inhibición sobre las α -glucosidasas intestinales (Asano *et al.*, 1998).



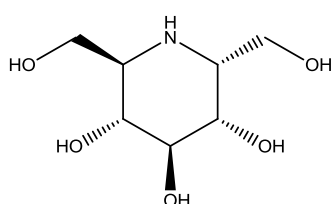
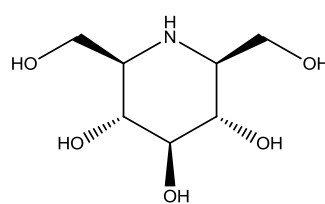
- (**38**) $R_1 = \alpha$ -D-glucopiranososa; $R_2; R_3 = H$
 (**39**) $R_2 = \alpha$ -D-glucopiranososa; $R_1; R_3 = H$
 (**40**) $R_3 = \alpha$ -D-glucopiranososa; $R_1; R_2 = H$
 (**41**) $R_1 = \beta$ -D-glucopiranososa; $R_2; R_3 = H$
 (**42**) $R_3 = \beta$ -D-glucopiranososa; $R_1; R_2 = H$
 (**43**) $R_2 = \beta$ -D-glucopiranososa; $R_1; R_3 = H$



miglitol (44)

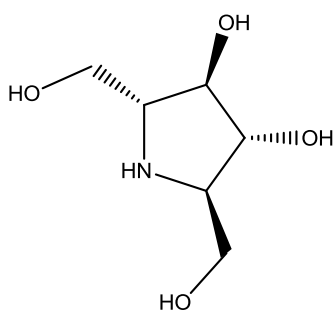
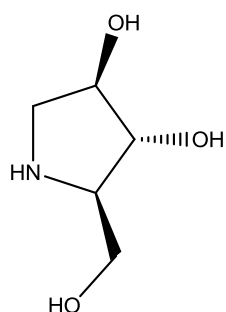
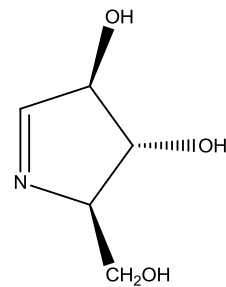
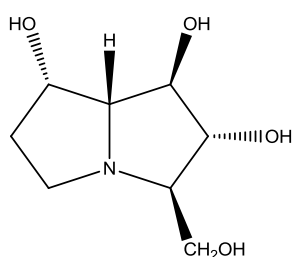
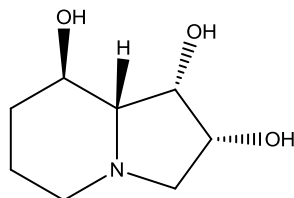
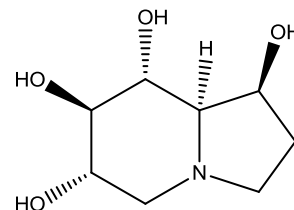


N-butil-1-deoxinojirimicina (45)

 α -homonojirimicina (46) β -homonojirimicina (47)

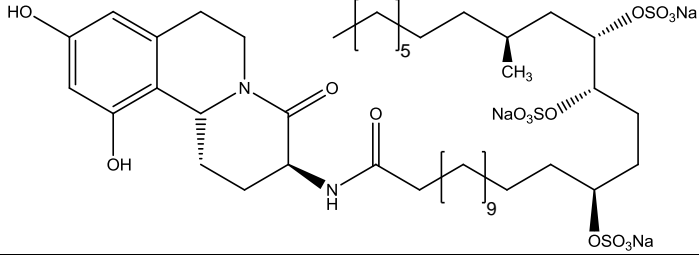
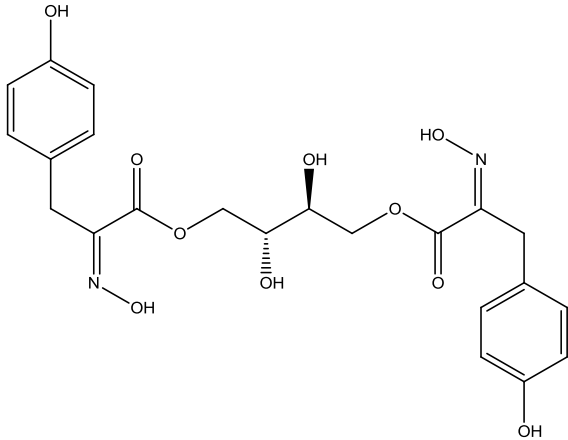
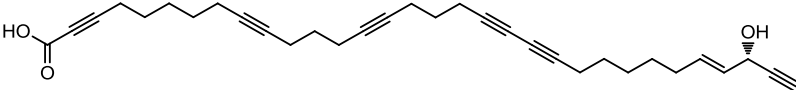
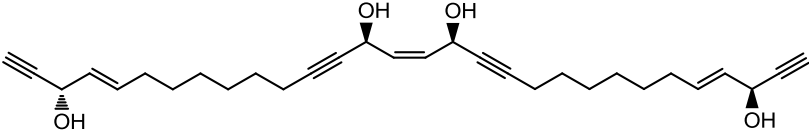
Dentro de los alcaloides pirrolidínicos que inhiben a las α -glucosidasas de tipo I y II se encuentran el 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-manitol (DMDP **48**), aislado de diversas plantas y microorganismos y el 1,4-didesoxi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB-1 **49**), de *Angylocalyx boutiquenus*, que inhibe a la α -glucosidasa II, la isomaltasa y la trehalasa; por último, cabe mencionar a la nectrisina (**50**), aislada del hongo *Nectria lucida*, la cual muestra una potente inhibición sobre las α -glucosidasas, tanto *in vitro* como en cultivos de células (Nash *et al.*, 2001).

En el grupo de alcaloides pirrolizidínicos polihidroxiados destaca la australina (**51**), aislada de *Castanospermum australe*, que inhibe de forma competitiva a la α -glucosidasa y a la amiloglucosidasa. Por último, entre los alcaloides indolizidínicos son relevantes la swainsonina (**52**) aislada de *Swainsona canescens* y del hongo *Metarhizium anisopliae* y la castanospermina (**53**); estos compuestos tiene actividad inhibidora sobre las α -manosidasas y las α -glucosidasas (Asano *et al.*, 2000; 2003).

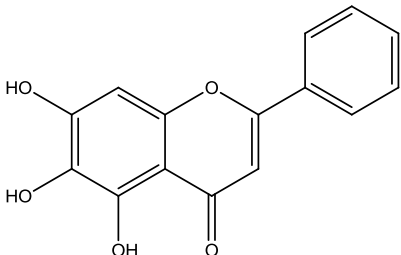
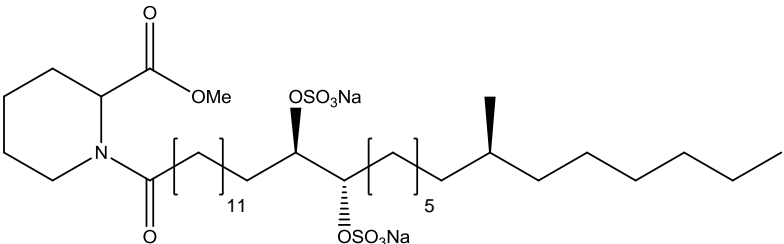
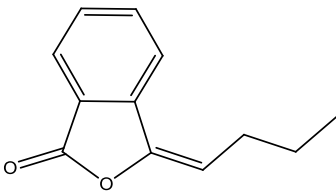
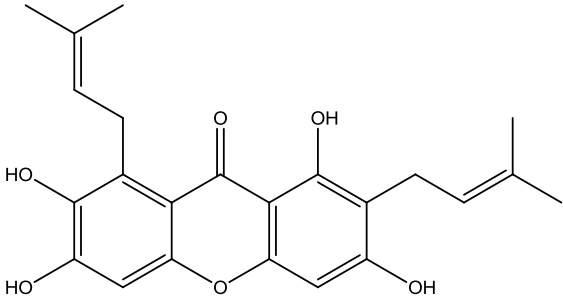
DMDP (**48**)DAB-1 (**49**)nectrisina (**50**)australina (**51**)swainsonina (**52**)castanospermina (**53**)

Otros metabolitos selectos derivados de plantas, microorganismos y animales y que tienen potente actividad inhibidora sobre las α -glucosidasas (del orden micro a nanomolar) se ilustran en el Cuadro 1. Estos metabolitos presentan una gran diversidad estructural e incluyen flavonoides, esteroides, acetilenos, derivados del ácido cinámico y alcaloides como el aspergilusol (**55**), obtenido a partir de la especie *Aspergillus aculeatus* que se aisló de la esponja marina *Xestospongia testudinaria*; este compuesto presenta inhibición selectiva sobre la α -glucosidasa de levadura.

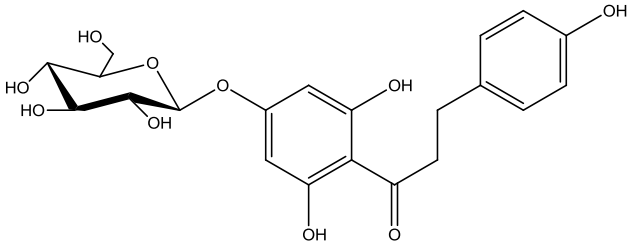
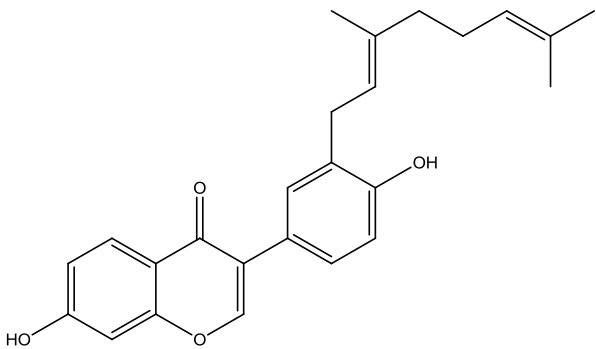
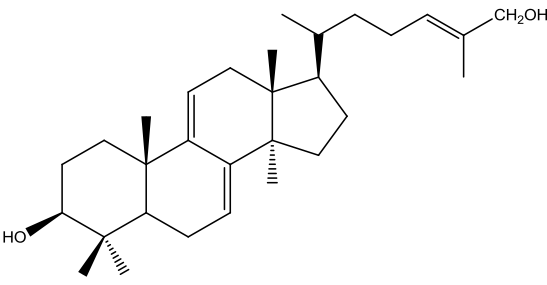
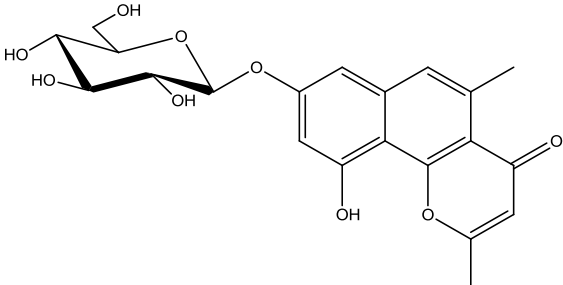
Cuadro 1. Metabolitos selectos con actividad inhibidora sobre las α -glucosidasas.

Metabolito	Fuente natural	Referencia
<p data-bbox="224 394 448 426">Schulzeina A (54)</p> 	<p data-bbox="1084 485 1192 632">Esponja marina <i>Penares schulzei</i></p>	<p data-bbox="1263 520 1390 590">Takada <i>et al.</i>, 2004</p>
<p data-bbox="224 732 444 764">Aspergilusol (55)</p> 	<p data-bbox="1065 926 1208 1031"><i>Aspergillus aculeatus</i> marino</p>	<p data-bbox="1263 947 1390 1016">Ingavat <i>et al.</i>, 2009</p>
<p data-bbox="224 1247 545 1278">Ácido calispongínico (56)</p> 	<p data-bbox="1084 1272 1224 1419">Esponja marina <i>Callyspongia truncata</i></p>	<p data-bbox="1263 1293 1390 1398">Fusetani <i>et al.</i>, 2002</p>
<p data-bbox="224 1461 415 1493">Petrosinol (57)</p> 	<p data-bbox="1084 1528 1208 1633">Esponja marina <i>Petrosia sp.</i></p>	<p data-bbox="1263 1528 1390 1633">Carvalho <i>et al.</i>, 2006</p>

Cuadro 1. Metabolitos selectos con actividad inhibidora sobre las α -glucosidasas (continuación).

Metabolito	Fuente natural	Referencia
<p>Baicaleina (58)</p> 	<i>Origanum majorana</i>	Kawabata <i>et al.</i> , 2003
<p>Penasulfato A (59)</p> 	Esponja marina <i>Penaria</i> sp.	Fusetani <i>et al.</i> , 2000
<p>Z-3-Butilideneftálida (60)</p> 	<i>Ligusticum porteri</i>	Brindis <i>et al.</i> , 2011
<p>γ-mangostina (61)</p> 	<i>Garcinia mangostana</i>	Ryu <i>et al.</i> , 2011

Cuadro 1. Metabolitos selectos con actividad inhibitoria sobre las α -glucosidasas (continuación).

Metabolito	Fuente natural	Referencia
<p>Trilobatina (62)</p> 	<p><i>Lithocarpus polystachyus</i></p>	<p>Dong 2012</p>
<p>Corilifol A (63)</p> 	<p><i>Psoralea corylifolia</i></p>	<p>Oh <i>et al.</i>, 2010</p>
<p>Ganoderol B (64)</p> 	<p><i>Ganoderma lucidum</i></p>	<p>Fatmawati <i>et al.</i>, 2010</p>
<p>Eleuterinósido A (65)</p> 	<p><i>Eleutherine americana</i></p>	<p>Ieyama <i>et al.</i>, 2010</p>

2.3 Antecedentes sobre el género *Aspergillus*

2.3.1 Generalidades

Clasificación taxonómica:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Aspergillus*

El género *Aspergillus* posee quizá una de las taxonomías mejor descritas dentro de todos los géneros de hongos filamentosos que existen y gracias al surgimiento de las técnicas de biología molecular, las especies que pertenecen a este género han sido clasificadas dentro de ocho subgéneros: *Aspergillus*, *Fumigati*, *Circumdati*, *Candidi*, *Terrei*, *Nidulantes*, *Warcupi* y *Ornati*. Asimismo, los análisis filogenéticos empleando diferentes loci de ADN han permitido dividir a estos subgéneros en diferentes secciones así como identificar sus fases de reproducción sexual.

Las especies del género *Aspergillus* son anamórficas y se caracterizan por presentar cabezas aspergilaras en donde se ubican las conidias, estructuras a través de las cuales se reproducen de forma asexual. Algunas especies presentan fases sexuales (teleomorfos) y éstas han sido clasificadas dentro de los géneros *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Eurotium*, *Neosartorya* y *Petromyces*, principalmente (Machida y Gomi, 2010).

Los *Aspergillus* son especies ubicuas y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en diversos sustratos incluyendo suelos, productos alimenticios, polvo, desechos orgánicos y materia en descomposición (Guagni 2003). En general, se consideran especies terrestres, sin embargo, son tolerantes a altas concentraciones de sales y pueden habitar en el mar o asociadas a especies marinas (Ireland y Bugni, 2004).

Actualmente, se reconocen cerca de 180 especies pertenecientes a este género, siendo muchas de ellas de gran importancia para el ser humano ya sea por su patogenicidad, en particular *Aspergillus fumigatus*, que es capaz de causar graves infecciones oportunistas en seres humanos y animales conocidas como aspergilosis; por su importancia industrial, como por ejemplo *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, que son empleadas para la producción industrial de enzimas incluyendo celulasas, amilasas, proteasas, lipasas y pectinasas, así como de ácidos orgánicos como el ácido cítrico, el ácido glucónico, el ácido itacónico y el ácido kójico (81); y por último, por su potencial como fuente de metabolitos secundarios biodinámicos (Gugnani 2003).

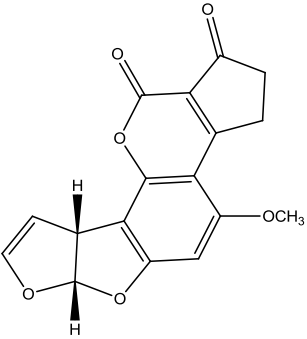
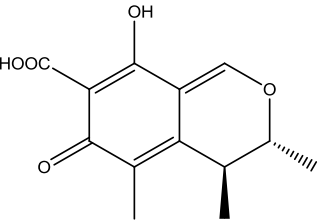
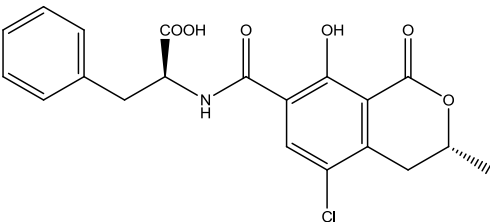
2.3.2 Metabolitos secundarios biodinámicos producidos por especies del género *Aspergillus*

Las especies del género *Aspergillus* biosintetizan un extenso número de metabolitos secundarios con una gran variedad de estructuras y actividades biológicas. Estos metabolitos pueden ser benéficos para el ser humano por su uso como fármacos o prototipos estructurales para el desarrollo de éstos. Sin embargo, algunos compuestos producidos por estos microorganismos pueden ser potencialmente tóxicos (Bohnert *et al.*, 2010). Tal es el caso de sus micotoxinas, que han constituido una amenaza a la salud del ser humano y animales desde tiempos inmemoriales (Bennett y Klich, 2003).

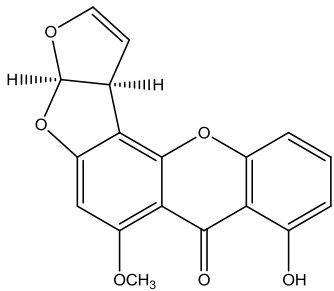
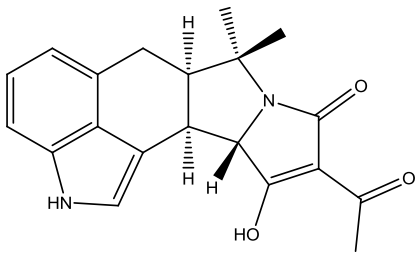
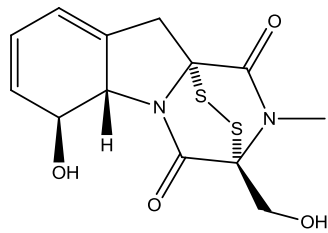
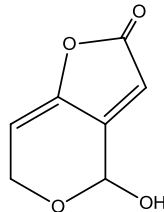
Las micotoxinas son compuestos de bajo peso molecular (PM<300) de estructuras químicas muy diversas producidos por hongos filamentosos principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*; generalmente se encuentran en alimentos contaminados y en dosis pequeñas son capaces de causar enfermedad y hasta la muerte (Kamei y Watanabe, 2005). Actualmente se conocen cerca de 400 micotoxinas, de las cuales un gran número se han encontrado en especies de *Aspergillus* (Bennett y Klich, 2003). En el Cuadro 2 se ilustran algunos ejemplos selectos de estas micotoxinas, señalándose además su fuente natural así como los problemas de salud que ocasionan.

Merecen especial atención las aflatoxinas, producidas principalmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, ya que desde 1994 se consideran carcinógenos humanos potenciales, capaces de ocasionar cáncer de hígado, cirrosis y hepatitis (Kensler *et al.*, 2011). Las aflatoxinas más comunes son las B1 (66), B2, G1 y G2 que generalmente se encuentran en granos contaminados de maíz, arroz, frijol, trigo, cacahuate y pistache, entre otros (Sharifnabi *et al.*, 2008).

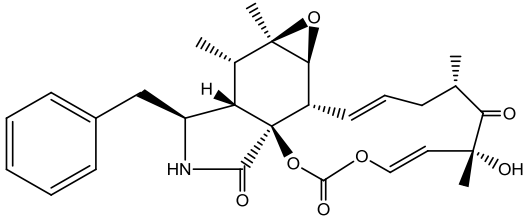
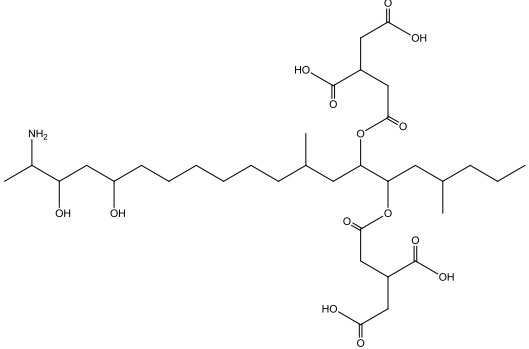
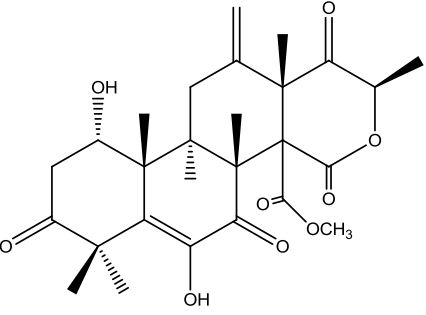
Cuadro 2. Micotoxinas selectas producidas por especies del género *Aspergillus*.

Micotoxina	Especies productoras	Problemas a la salud	Referencias
<p>Aflatoxina B1 (66)</p> 	<p><i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nominus</i> <i>A. pseudotamarii</i> <i>A. bombycis</i></p>	<p>Carcinogénico Hepatotóxico Teratogénico</p>	<p>Kensler <i>et al.</i>, 2010; Feizy <i>et al.</i>, 2011</p>
<p>Citrinina (67)</p> 	<p><i>A. terreus</i> <i>A. niveus</i> <i>A. oryzae</i></p>	<p>Nefrotóxico Genotóxico</p>	<p>Bennett y Klich, 2003; Chang <i>et al.</i>, 2011</p>
<p>Ocratoxina A (68)</p> 	<p><i>A. ochraceus</i> <i>A. alliaceus</i> <i>A. carbonarius</i> <i>A. glaucus</i> <i>A. niger</i> <i>A. wentii</i></p>	<p>Nefrotóxico Immunosupresor Carcinogénico Genotóxico Mutagénico Teratogénico</p>	<p>Varga <i>et al.</i>, 1996; Klaric <i>et al.</i>, 2011</p>

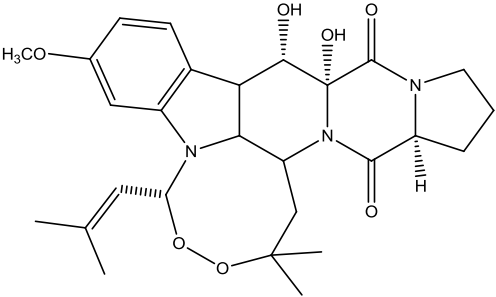
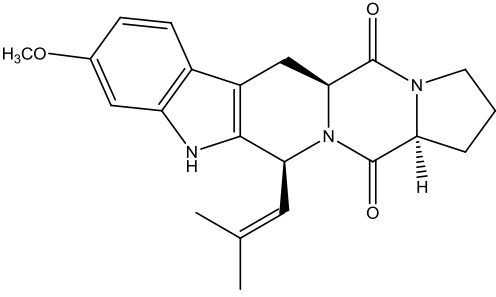
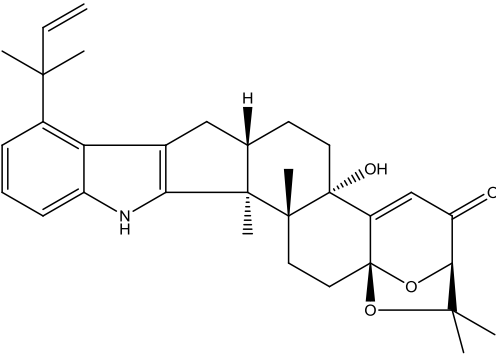
Cuadro 2. Micotoxinas selectas producidas por especies del género *Aspergillus* (continuación).

Micotoxina	Especies productoras	Problemas a la salud	Referencias
<p>Esterigmatocistina (69)</p> 	<p><i>A. versicolor</i> <i>A. nidulans</i></p>	Carcinogénico	Kamei y Watanabe, 2005
<p>Ácido ciclopiazónico (70)</p> 	<p><i>A. flavus</i> <i>A. versicolor</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. tamarii</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. candidus</i> <i>A. niger</i> <i>A. terreus</i> <i>A. wentii</i></p>	Hepatotóxico Nefrotóxico Carcinogénico	Antony <i>et al.</i> , 2003; Heperkan <i>et al.</i> , 2011
<p>Gliotoxina (71)</p> 	<p><i>A. fumigatus</i> <i>A. terreus</i> <i>A. niger</i> <i>A. flavus</i></p>	Inmunosupresor	Kupfahl <i>et al.</i> , 2008
<p>Patulina (72)</p> 	<p><i>A. clavatus</i></p>	Inmunosupresor	Lopez-Diaz y Flannigan, 1997; Maresca y Fantini, 2010

Cuadro 2. Micotoxinas selectas producidas por especies del género *Aspergillus* (continuación).

Micotoxina	Especies productoras	Problemas a la salud	Referencias
<p data-bbox="224 457 462 489">Citocalasina E (73)</p> 	<p data-bbox="781 625 927 657"><i>A. clavatus</i></p>	<p data-bbox="1024 625 1154 657">Citotóxico</p>	<p data-bbox="1252 625 1398 657">Wang 2002</p>
<p data-bbox="224 835 462 867">Fumonisina B₂ (74)</p> 	<p data-bbox="797 1066 911 1098"><i>A. niger</i></p>	<p data-bbox="992 1066 1187 1098">Carcinogénico</p>	<p data-bbox="1235 1052 1409 1119">Frisvad <i>et al.</i>, 2007</p>
<p data-bbox="224 1341 462 1373">Terretonina E (75)</p> 	<p data-bbox="781 1535 927 1566"><i>A. insectus</i></p>	<p data-bbox="976 1493 1203 1602">Inhibe la cadena respiratoria mitocondrial</p>	<p data-bbox="1235 1514 1409 1581">Lopez-Gresa <i>et al.</i>, 2009</p>

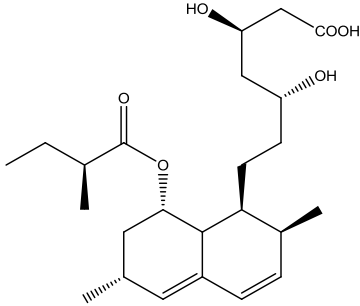
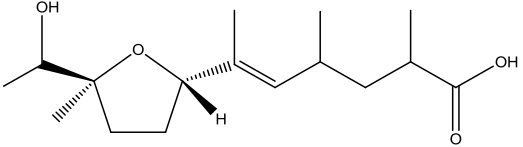
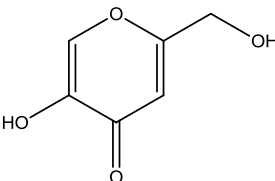
Cuadro 2. Micotoxinas selectas producidas por especies del género *Aspergillus* (continuación).

Micotoxina	Especies productoras	Problemas a la salud	Referencias
<p>Verruculógeno (76)</p> 	<i>A. fumigatus</i>	Neurotóxico	Tepsic <i>et al.</i> , 1997
<p>Fumitremorgina B (77)</p> 	<i>A. fumigatus</i>	Neurotóxico Citotóxico	Merino <i>et al.</i> , 2010
<p>Aflatrem (78)</p> 	<i>A. fumigatus</i>	Neurotóxico	Duran <i>et al.</i> , 2007

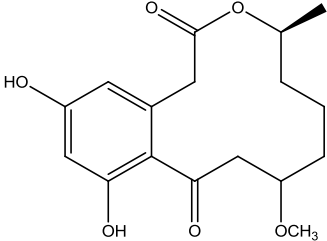
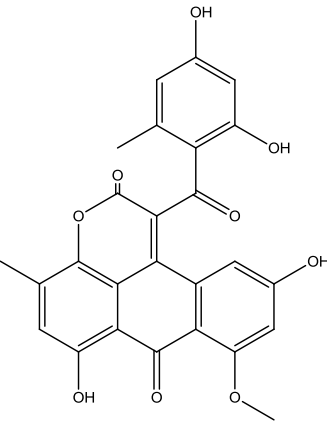
Otros metabolitos producidos por especies del género *Aspergillus* son menos dañinos y presentan actividades biológicas de importancia potencial para el desarrollo de fármacos, así como servir de prototipos estructurales para el diseño de nuevas moléculas biodinámicas. En el Cuadro 3 se ilustran algunos ejemplos selectos de estos metabolitos que incluyen policétidos, alcaloides, terpenoides, péptidos, neolignanos y flavonoides, por mencionar los más importantes. Estos compuestos presentan diversas actividades biológicas dentro de las que destacan la citotoxicidad contra líneas celulares de distintos tipos de cáncer, así como actividad antibacteriana, fungistática, antioxidante e inhibidora sobre de ciertas enzimas. Cabe destacar que la mayoría de estos productos fúngicos han sido aislados de especies de origen marino o de especies asociadas a organismos marinos como esponjas, algas, corales y moluscos, ya que se ha demostrado que éstas son una fuente potencial de metabolitos biodinámicos novedosos (Antia *et al.*, 2011).

Dentro de los metabolitos más relevantes producidos por *Aspergillus*, especial atención merece la lovastatina (**79**) (Mevacor®), producida por la especie *A. terreus*, ya que es un fármaco empleado en la terapéutica de la dislipidemia y la hipercolesterolemia por ser un potente agente hipocolesterolemiante. Este actúa inhibiendo a la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA-reductasa), enzima reguladora en la biosíntesis de colesterol.

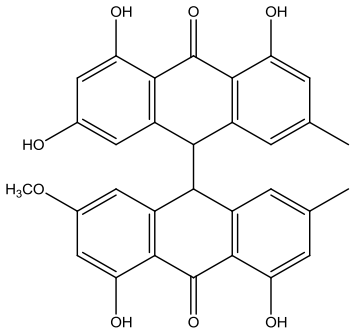
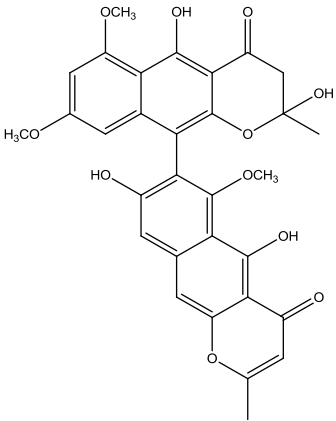
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus*.

a) POLICÉTIDOS			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
Lovastatina (79) 	<i>A. terreus</i> (origen no especificado)	Inhibe la HMG-CoA reductasa	Alberts 1988
Ácido aspérico (80) 	<i>A. phoenicis</i> (origen no especificado)	Inhibe el crecimiento de células de leucemia murina (DE ₅₀ = 0.18 μM)	Pettit <i>et al.</i> , 2009
Ácido kójico (81) 	<i>Aspergillus sp.</i> (origen no especificado)	Induce la activación de macrófagos y la fagocitosis	Rodriguez <i>et al.</i> , 2011

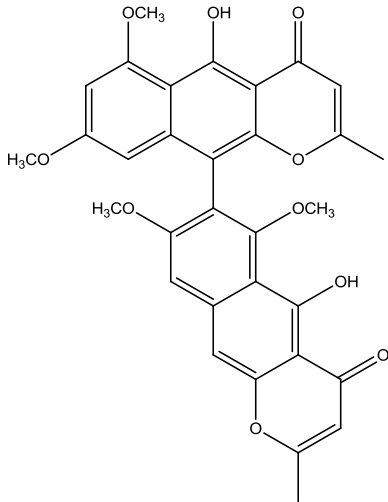
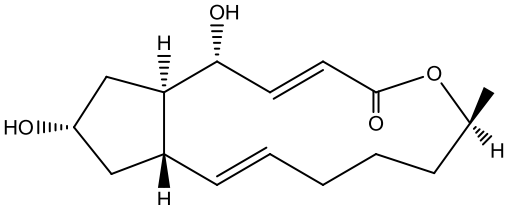
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

a) POLICÉTIDOS			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
11-metoxicurvularina (82) 	<i>A. terreus</i> (aislado de la rizósfera de <i>Brickellia</i> sp.)	Citotóxico sobre células de cáncer de mama $CI_{50} = 0.6 \mu M$	He <i>et al.</i> , 2004
Aspergiólida B (83) 	<i>A. glaucus</i> (marino)	Citotóxico contra células de leucemia humana $CI_{50} = 0.51 \mu M$	Du <i>et al.</i> , 2008

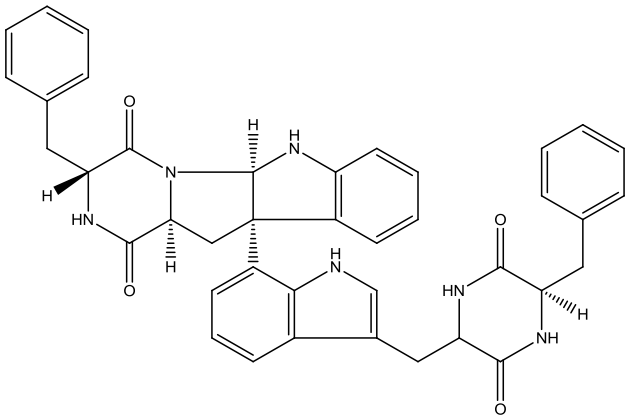
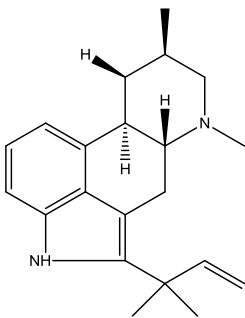
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

a) POLICÉTIDOS			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p><i>(trans)</i>-emodin-fiscion-diantrona (84)</p> 	<p><i>A. glaucus</i> (marino)</p>	<p>Citotóxico contra células de leucemia humana Cl₅₀= 7.8 μM</p>	<p>Du <i>et al.</i>, 2008</p>
<p>Nigerasperona C (85)</p> 	<p><i>A. niger</i> (aislado del alga marina <i>Colpomenia sinuosa</i>)</p>	<p>Antioxidante y antibacteriana</p>	<p>Zhang <i>et al.</i>, 2007</p>

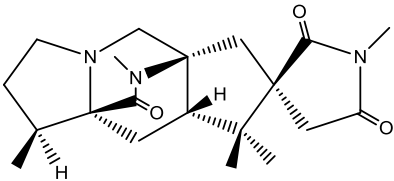
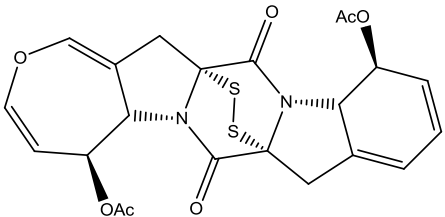
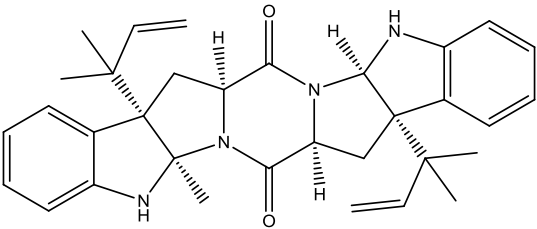
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

a) POLICÉTIDOS			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Aurasperona A (86)</p> 	<p><i>A. niger</i> (aislado de suelo)</p>	<p>Inhibe a la <i>Taq</i> ADN polimerasa (49% de inhibición a 100 $\mu\text{g/mL}$)</p>	<p>Akiyama <i>et al.</i>, 2003</p>
<p>Brefeldina A (87)</p> 	<p><i>A. clavatus</i> (aislado de <i>Taxus mairei</i>)</p>	<p>Citotóxico sobre células de cáncer cervicouterino (HeLa) $\text{CI}_{50} = 1.8 \mu\text{M}$</p>	<p>Wang <i>et al.</i>, 2002</p>

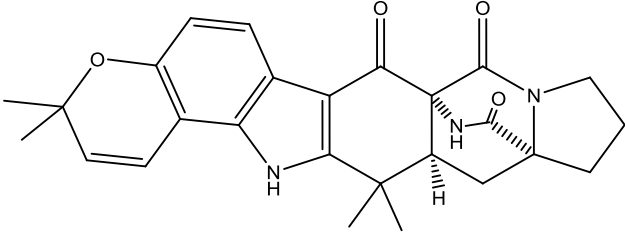
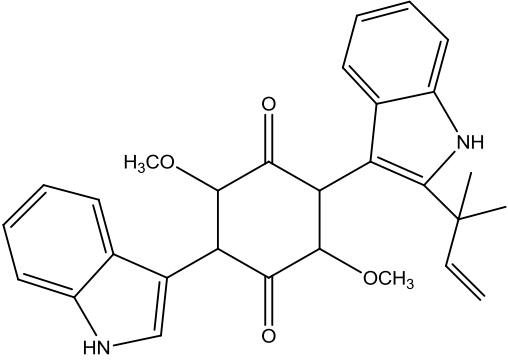
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación)

b) ALCALOIDES			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Asperazina (88)</p> 	<p><i>A. niger</i> (aislado de la esponja marina <i>Hyrtios proteus</i>)</p>	<p>Induce citotoxicidad selectiva contra células de leucemia</p>	<p>Varoglu y Crews, 2000</p>
<p>9-deacetoxifumigaclavina C (89)</p> 	<p><i>A. fumigatus</i> (endófito de <i>Cynodon dactylon</i>)</p>	<p>Citotóxico selectivo sobre células de leucemia humana Cl₅₀= 3.1 μM</p>	<p>Ge <i>et al.</i>, 2009</p>

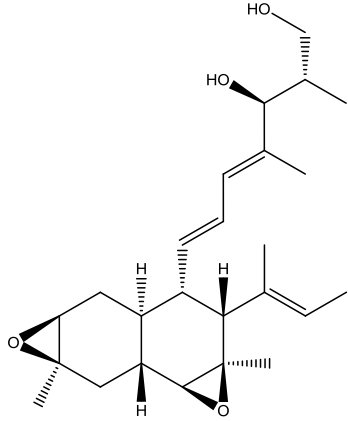
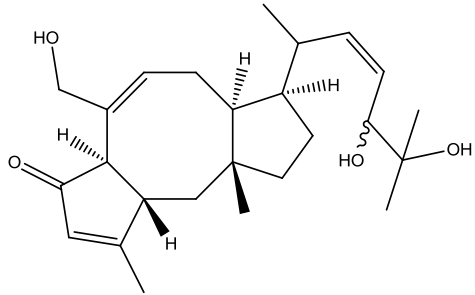
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

b) ALCALOIDES			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Asperparalina A (90)</p> 	<i>A. japonicus</i> (origen no especificado)	Bloqueador del receptor nicotínico del gusano de seda $CI_{50} = 20.2 \text{ nM}$	Hirata <i>et al.</i> , 2011
<p>Acetilapoarantina (91)</p> 	<i>A. versicolor</i> (marino)	Citotóxico sobre células cancerosas de pulmón $CI_{50} = 2 \text{ } \mu\text{M}$	Choi <i>et al.</i> , 2011
<p>Novoamauromina (92)</p> 	<i>A. novofumigatus</i> (aislado del suelo)	Citotóxico sobre células de cáncer cervicouterino (HeLa) $CI_{50} = 70 \text{ } \mu\text{M}$	Ishikawa <i>et al.</i> , 2010

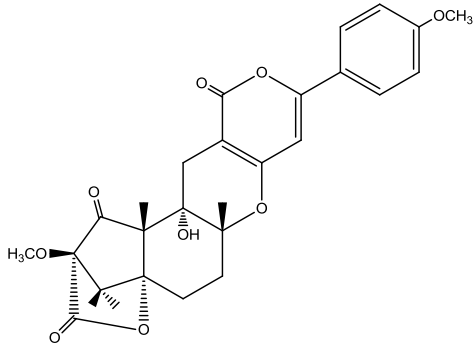
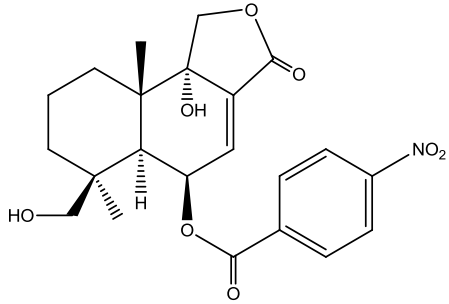
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

2) ALCALOIDES			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Notoamida I (93)</p> 	<i>Aspergillus</i> sp. (marino)	Citotóxico sobre células de cáncer cervicouterino (HeLa) $CI_{50} = 21 \mu M$	Tsakamoto <i>et al.</i> , 2008
<p>Asterriquinona C (94)</p> 	<i>A. terreus</i> (aislado de la rizósfera de <i>Opuntia</i> <i>Versicolor</i>)	Provoca efectos tóxicos sobre células de cáncer de mama $CI_{50} = 4.1 \mu M$	Wijeratne <i>et al.</i> , 2003

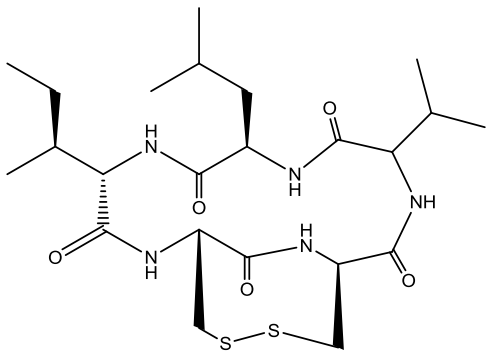
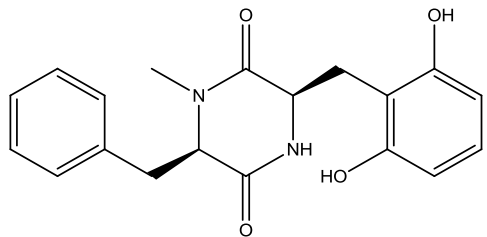
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

c) TERPENOIDES			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
Fusarielina A (95) 	<i>Aspergillus</i> sp. (marino)	Antibacteriana sobre <i>S. aureus</i> (MRSA) CMI= 32.5 µg/mL	Nguyen <i>et al.</i> , 2007
(6a)-18,19,21,21- <i>O</i> -tetrahidro-18,19- dihidroxiobiobolina G (96) 	<i>A. ustus</i> (origen no especificado)	Citotoxicidad moderada sobre células de linfoma murino	Lin <i>et al.</i> , 2011

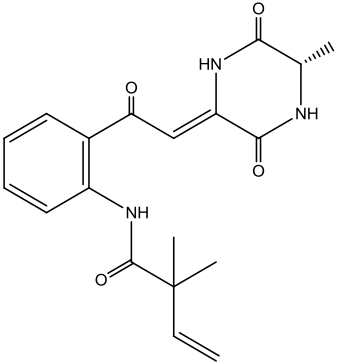
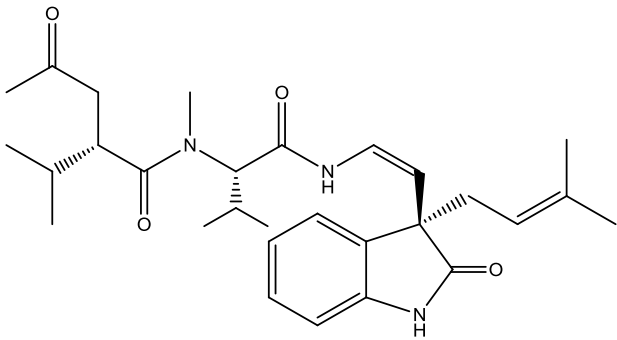
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

c) TERPENOIDES			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Terreulactona A (97)</p> 	<p><i>A. terreus</i> (origen no especificado)</p>	<p>Inhibe a la acetilcolinesterasa $CI_{50} = 0.2 \mu M$</p>	<p>Yoo <i>et al.</i>, 2002</p>
<p>Insulicólida A (98)</p> 	<p><i>A. insulicola</i> (aislado del alga marina <i>Penicillus</i> sp.)</p>	<p>Citotóxico sobre diversas líneas celulares de cáncer $CI_{50} = 1.1 \mu g/mL$</p>	<p>Bugni e Ireland, 2004</p>

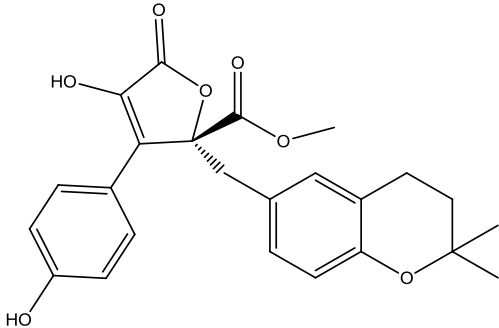
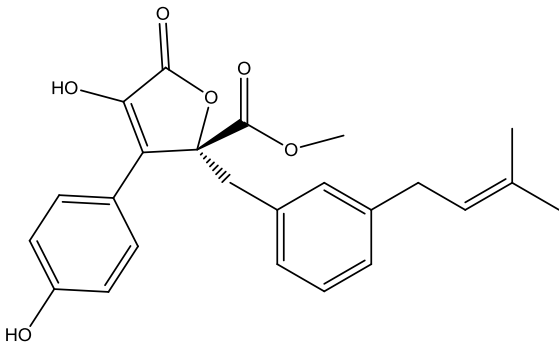
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

d) PÉPTIDOS			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Malformina A (99)</p> 	<p><i>A. tubingensis</i> (aislado de la rizósfera de <i>Fallugia paradoxa</i>)</p>	<p>Citotóxico contra células de cáncer de pulmón, páncreas, mama y glioma $Cl_{50} = 0.07, 0.05, 0.1$ y $0.07 \mu M$ respectivamente</p>	<p>Gunatilaka <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>Mactanamida (100)</p> 	<p><i>Aspergillus</i> sp. (aislado del alga marina <i>Sargassum</i> sp.)</p>	<p>Fungistático</p>	<p>Huang <i>et al.</i>, 2010</p>

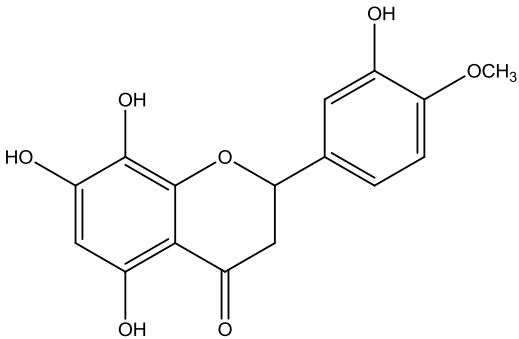
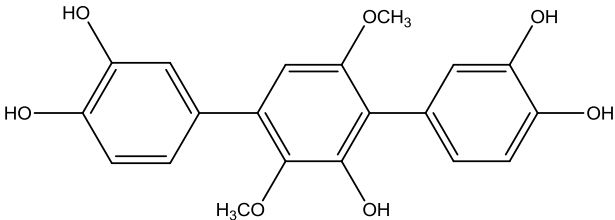
Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

d) PÉPTIDOS			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Golmaenona (101)</p> 	<p><i>Aspergillus</i> sp. (aislado del alga marina <i>Lomentaria catenata</i>)</p>	<p>Fotoprotector DE₅₀= 90 μM</p>	<p>Son <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>Terpeptina A (102)</p> 	<p><i>Aspergillus</i> sp. (Endófito de <i>Acanthus ilicifolius</i>)</p>	<p>Citotóxico sobre células A-549 CI₅₀= 0.07</p>	<p>Lin <i>et al.</i>, 2008</p>

Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

e) OTROS (neolignanós, flavonoides y polifenoles)			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>Aspernólida A (103)</p> 	<p><i>A. terreus</i> (aislado del coral <i>Sinularia kavarattiensis</i>)</p>	<p>Citotóxico sobre células de cáncer de pulmón CI₅₀= 88 μM</p>	<p>Parvatkar <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>Butirolactona I (104)</p> 	<p><i>A. terreus</i> var. <i>Africanus</i> (origen no especificado)</p>	<p>Inhibidor selectivo de ciclinas- cinasas (CDK1 y CDK2). Inhibe el crecimiento de células tumorales de páncreas CI₅₀= 94 μM</p>	<p>Fisher y Lane, 2000</p>

Cuadro 3. Metabolitos bioactivos selectos aislados de diversas especies del género *Aspergillus* (continuación).

e) OTROS (neolignan, flavonoides y polifenoles)			
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica	Referencia
<p>8-hidroxihesperetina (105)</p> 	<p><i>A.saitoi</i> (origen no especificado)</p>	<p>Antioxidante (Atrapa el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo en un 63% con respecto al control)</p>	<p>Miyake <i>et al.</i>, 2003</p>
<p>3,3'-dihidroxiterfenilina (106)</p> 	<p><i>A.candidus</i> (origen no especificado)</p>	<p>Antioxidante (Atrapa el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo en un 94% con respecto al control)</p>	<p>Yen <i>et al.</i>, 2002</p>

2.3.3 Antecedentes sobre la especie fúngica *Aspergillus stromatoides*

La especie fúngica estudiada en el presente trabajo de investigación se aisló de la zona intermareal en el estado de Tabasco, México, y por sus características morfológicas se identificó como *Aspergillus stromatoides*.

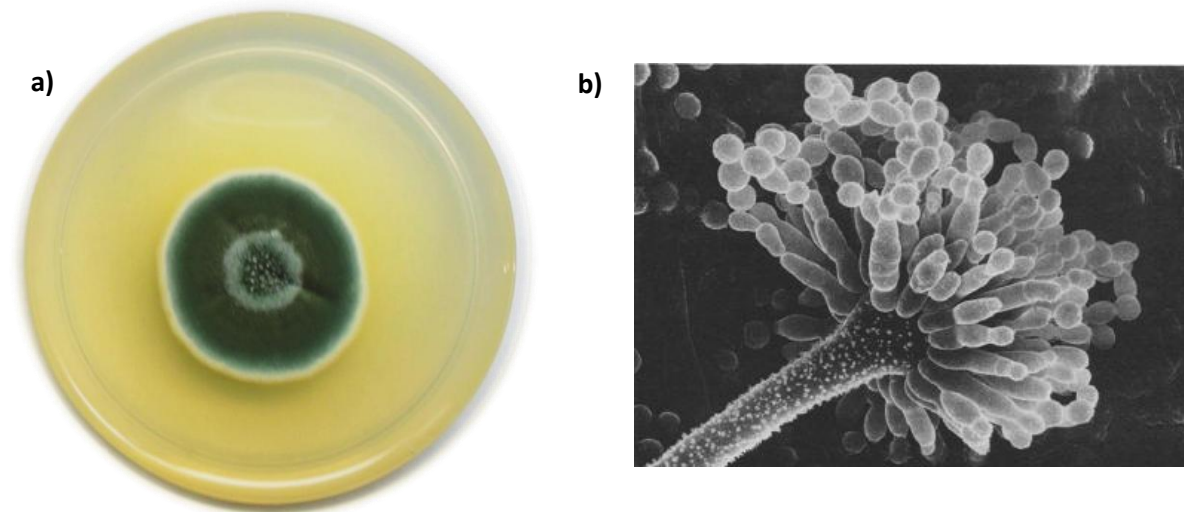


Figura 5. *Aspergillus stromatoides*: **a)** Colonia en medio agar papa-dextrosa (PDA); **b)** Micrografía electrónica de barrido de una cabeza aspergilar (tomada de Sacho *et al.*, 1987).

Esta especie anamórfica se aisló por primera vez de una muestra de suelo en Panamá por Raper y Fennell en 1965 y se identificó como una especie perteneciente a la sección *Cremeri* del subgénero *Circumdati* (Wiley y Fennell, 1973). Las especies clasificadas en esta sección se caracterizan por presentar conidias de color verde-gris, vesículas hemisféricas biseriadas y por ser osmofílicas (Peterson 1995). El análisis filogenético mediante diferentes *loci* de ADN demostró que *Aspergillus stromatoides* y *Chaetosartoya stromatoides* son especies diferentes, y no son la fase anamórfica y teleomórfica, respectivamente (Peterson 2008). En la Figura 6 se muestra el filograma de las especies que pertenecen a la sección *Cremeri* y *Chaetosartoya*. La especie *A. stromatoides* ha sido poco estudiada y sólo existe un reporte de aspergilosis seno-orbital grave, causada por este microorganismo (Sacho *et al.*, 1987). Por otro lado, dentro de la sección *Cremeri* se ha

reportado que las especies *A. wentii* y *A. tamarii* son productoras de micotoxinas en especial de ácido ciclopiazónico (70) y ocratoxina (68).

Hasta la fecha no existen reportes acerca del metabolismo secundario de *Aspergillus stromatoides*, por lo que el presente trabajo de investigación representa una contribución original al conocimiento de esta especie.

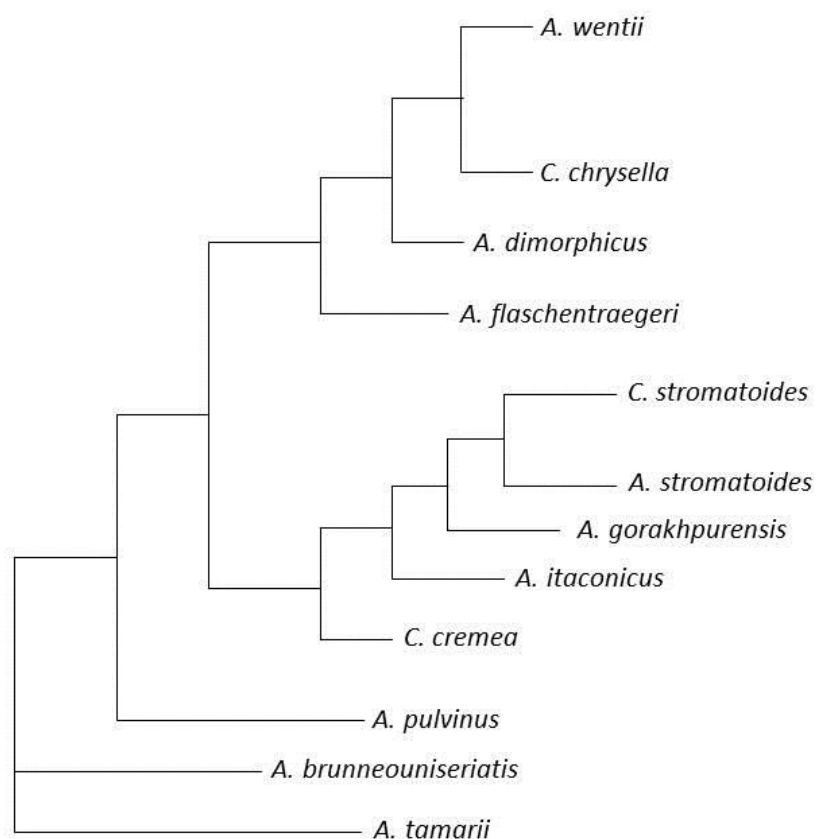


Figura 6. Filograma de la sección *Cremei* y *Chaetosartoya* (modificado de Peterson 2008).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades degenerativas como el cáncer y la diabetes mellitus se encuentran dentro de las diez principales causas de muerte a nivel global, cobrando millones de vidas al año (Figura 7).

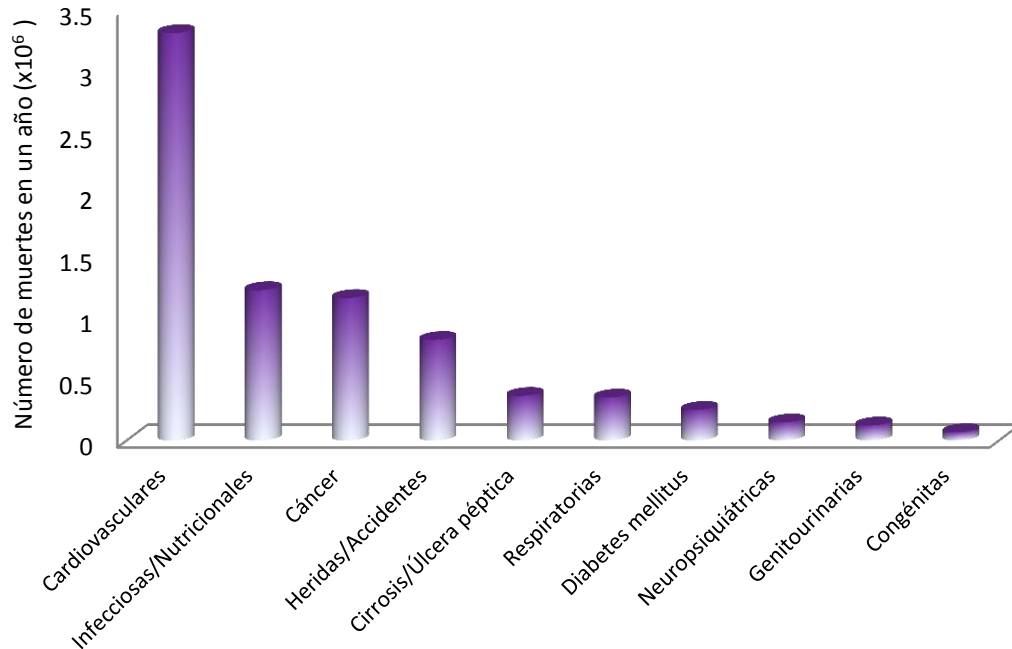


Figura 7. Principales causas de muerte en países de ingresos medios-altos en el año 2008 (datos obtenidos de <http://apps.who.int/ghodata/?vid=10015>).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), los tipos de cáncer más prevalentes en países en vías de desarrollo, incluyendo a México, son de pulmón, tráquea, estómago, colon, recto, mama, próstata y de cuello cervicouterino, siendo los principales factores de riesgo el abuso del tabaco y alcohol, una dieta inadecuada, inactividad física así como agentes infecciosos como el virus del papiloma humano (VPH). Actualmente, existe una diversidad de fármacos de elección para el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer, algunos de ellos de origen natural como la vincristina (14) y la vinblastina (15), el paclitaxel, la doxorubicina, la daunorrubicina, la briostatina, y la dactinomicina, entre

muchos otros. Algunos de estos fármacos ejercen su efecto terapéutico a través de la inhibición de las funciones reguladoras de la calmodulina en las células malignas.

Por otro lado, de acuerdo con la OMS, México es uno de los principales países que presenta una alta incidencia de diabetes mellitus tipo II en personas mayores de 25 años (Figura 8), y de acuerdo con el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), ésta enfermedad es la primera causa de muerte en nuestro país (<http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>). Una de las alternativas para la terapia de la diabetes mellitus tipo II son los inhibidores de las α -glucosidasas, enzimas que participan en el metabolismo de los carbohidratos y que al ser inhibidas pueden disminuir la absorción de glucosa durante el proceso digestivo.

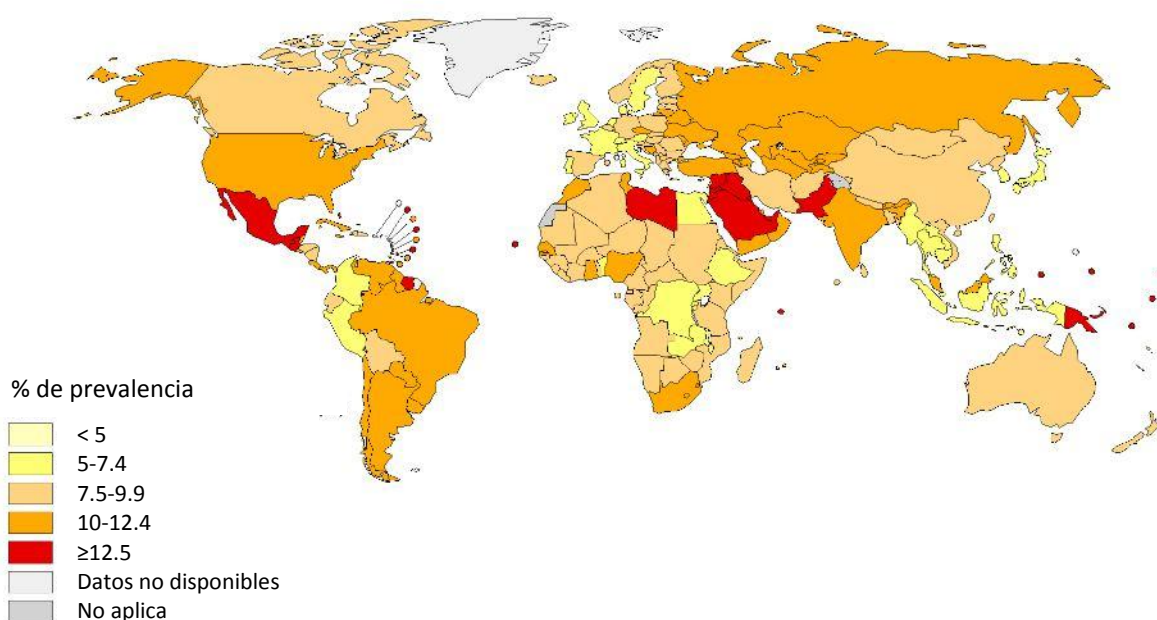


Figura 8. Prevalencia mundial de niveles elevados de glucosa en sangre (en ayunas) en personas mayores de 25 años (tomado de http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_BloodGlucosePrevalence).

Debido a la alta prevalencia de estas dos enfermedades, la búsqueda de agentes que sirvan como prototipos estructurales para el diseño y desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos ha cobrado gran interés. En este sentido, la gran biodiversidad fúngica

de México, permite explorar un sinnúmero de especies de origen marino que han demostrado ser una fuente muy valiosa para el descubrimiento de inhibidores de la CaM y de las enzimas α -glucosidasas.

Con base en las consideraciones anteriores, el principal objetivo de este trabajo consiste en realizar el estudio químico de la especie fúngica *Aspergillus stromatoides*, con la finalidad de descubrir compuestos con propiedades inhibitorias de la CaM y/o de la α -glucosidasa y contribuir así al desarrollo de nuevos fármacos de utilidad para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II y/o del cáncer.

Para lograr este objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Aislar y caracterizar químicamente los metabolitos mayoritarios y minoritarios presentes en el extracto orgánico obtenido a partir del micelio y medio de cultivo de *Aspergillus stromatoides*, empleando diferentes técnicas de separación y purificación, así como técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.
- Determinar la interacción de los metabolitos aislados con la proteína calmodulina utilizando un método espectrofluorimétrico. Este procedimiento permitirá establecer si los productos interaccionan de manera directa con la CaM y obtener los parámetros de unión.
- Determinar si los metabolitos aislados presentan actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa empleando un método espectrofotométrico y establecer los parámetros cinéticos de la inhibición.

- Realizar los estudios de acoplamiento molecular de los metabolitos bioactivos para predecir el probable sitio de unión a la CaM y a la α -glucosidasa y determinar de manera teórica las constantes de unión (K_i) y las energías libres de unión.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material Fúngico

La especie fúngica *Aspergillus stromatoides* se aisló del sustrato arenoso de la zona intermareal (banda costera que pasa del medio acuático al aéreo durante las mareas) en el puerto de Sánchez Magallanes, localizado en el municipio de Cárdenas en el estado de Tabasco, México en el año 2009 (Figura 9). La recolección e identificación del ascomiceto se realizaron por la Dra. María del Carmen González, investigadora del Instituto de Biología, UNAM. Una muestra de referencia con clave MEXU26344 se depositó en el Herbario Nacional del mismo Instituto.

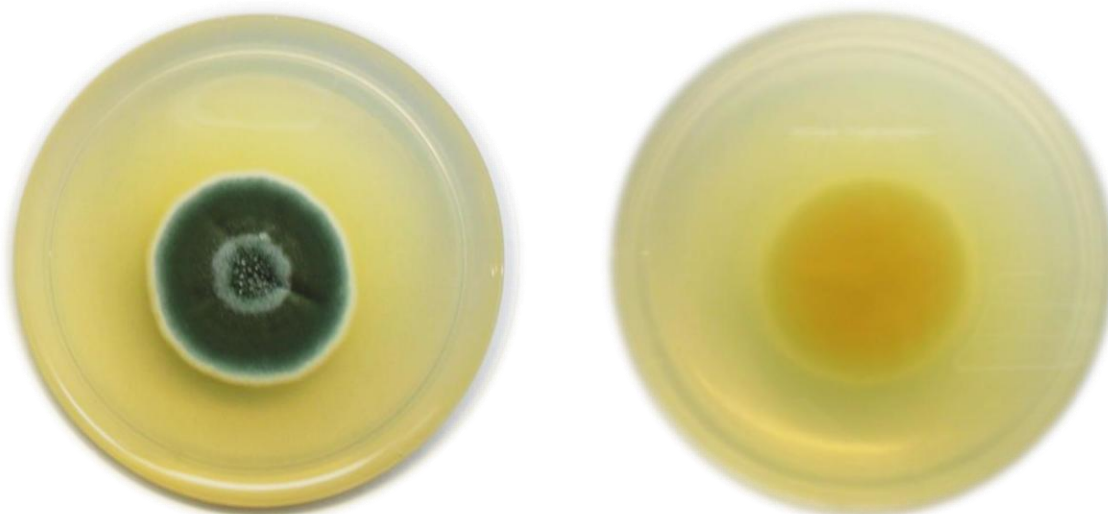


Figura 9. *Aspergillus stromatoides*: colonia en medio agar papa-dextrosa (PDA).

4.1.1 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento

Las condiciones óptimas para el desarrollo de *A. stromatoides* se determinaron a través de ensayos en pequeña escala (250 mL) utilizando el medio de cultivo caldo papa-dextrosa (PDB) comercial (Difco®). Los cultivos se incubaron durante un periodo de 15 días y se variaron condiciones de temperatura, luz y estrés mecánico (Tabla 2). Las condiciones óptimas se establecieron de acuerdo a la cantidad de biomasa seca, así como al

rendimiento de los extractos orgánicos preparados de cada una de las distintas fermentaciones, utilizando CH_2Cl_2 como disolvente de extracción.

Tabla 2. Condiciones evaluadas para el desarrollo de *A. stromatoides*.

Condición	Temperatura	Estrés mecánico	Periodos luz-oscuridad
1	T. ambiente	Agitación	Normal (12/12)
2	T. ambiente	Sin agitación	Oscuridad
3	30 °C	Sin agitación	Oscuridad
4	T. ambiente	Sin agitación	Normal (12/12)

4.2 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa delgada de tipo analítica (CCD) se realizaron en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck®, tamaño de partícula de 3.5-7.0 mm ASTM y de 0.25 mm de espesor) de diferentes dimensiones. Los análisis en capa delgada de tipo preparativa (CCDP) se realizaron en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (espesor de 1 mm) de 20 x 20 cm. Se emplearon diversos sistemas de elución utilizando mezclas de CH_2Cl_2 y MeOH. La visualización de las placas se realizó utilizando una lámpara de luz UV a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm), y se revelaron con una solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico. Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron en gel de sílice (Kieselgel 60 Merck®, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 Mesh ASTM) o en Sephadex® LH-20 de acuerdo a las técnicas convencionales.

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizaron en un cromatógrafo Waters® (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2996). El control del equipo así como la adquisición y manejo de los datos se realizó utilizando el programa

Empower[®] versión 2.0 (Waters[®]). Los análisis cromatográficos se realizaron en una columna analítica empacada con dimetiloctadecilsilil (HCR-C₁₈) Symmetry[®] 5 mm (Waters[®]) de 4.6 x 250 mm, 0.6 mL/min. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente y se emplearon diferentes longitudes de onda para la detección de los compuestos.

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 de 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-¹H, 500 MHz) y de carbono 13 (RMN-¹³C, 125 MHz) se registraron en un equipo Varian Unity Inova, utilizando diversos disolventes deuterados y tetrametilsilano (TMS) como referencia para los desplazamientos químicos (δ) expresados en ppm. Los espectros de masas por impacto electrónico (EM-IE) se obtuvieron mediante un espectrómetro de masas Jeol JMS AX-505 HA por introducción directa a 70 eV y un barrido de 33 a 880 unidades de masa carga (m/z) por segundo. Los espectros se obtuvieron en el Instituto de Química de la UNAM.

4.4 Estudio químico de la especie fúngica *Aspergillus stromatoides*

4.4.1 Fermentación de la especie fúngica

La fermentación en mediana escala se realizó en 20 litros de medio líquido PDB durante un periodo de 30 días en forma estática, a 30 °C y en oscuridad. El inóculo consistió en dos cuadros de agar de aproximadamente 1 cm² de un cultivo del microorganismo desarrollado previamente en medio sólido agar papa-dextrosa (PDA).

4.4.2 Obtención del extracto orgánico del micelio y medio de cultivo de *A. stromatoides*

Una vez transcurrido el periodo de fermentación, el micelio (biomasa) y el medio de cultivo se separaron por medio de filtración simple a través de gasa estéril. El medio de

cultivo se sometió a tres procesos sucesivos de reparto utilizando CH_2Cl_2 como disolvente de extracción, la fase orgánica resultante se filtró sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró *in vacuo*. Por otro lado, el extracto del micelio se obtuvo mediante un proceso de maceración con el mismo disolvente (CH_2Cl_2) por un periodo de ocho días, posteriormente, se filtró a través de gasa, se trató con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente *in vacuo*. Los extractos orgánicos resultantes (micelio y medio de cultivo) se analizaron mediante CCD (fase móvil CH_2Cl_2 -MeOH 95:5) y se reunieron con base en su similitud cromatográfica obteniéndose 10 g de extracto total. A partir de este extracto cristalizaron de manera espontánea 320 mg de citrinina (**67**) bajo la forma de cristales amarillos (P.f.= 177-178 °C) que se separaron por medio de filtración al vacío.

4.4.3 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de *A. stromatoides*

Parte del extracto orgánico (4 g) se sometió a un fraccionamiento primario mediante CCA, empleando una columna de vidrio empacada con gel de sílice (250 g) y como fase móvil mezclas binarias de polaridad creciente de hexano, CH_2Cl_2 y MeOH. Este proceso generó 435 fracciones primarias que se reunieron con base en su similitud cromatográfica en 40 fracciones (F_1 - F_{40}). A partir de la fracción F_6 se aislaron 5 mg de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (**109**) bajo la forma de cristales color amarillo claro (P.f.= 193 °C) que se separaron por filtración al vacío. Por otra parte, a partir de la fracción F_{13} se aislaron 10 mg del 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona (**110**) como un sólido cristalino anaranjado claro (P.f.= 175-177 °C).

4.4.4 Aislamiento, purificación y elucidación estructural de la emodina (**107**) y de la ω -hidroxiemodina (**108**)

El fraccionamiento primario del extracto orgánico (1 g) mediante CCA sobre Sephadex[®] LH-20 empleando MeOH como eluyente, condujo a la obtención de 57 fracciones primarias que se reunieron con base en su similitud cromatográfica en 10 fracciones (F_1 - F_x). La resolución de la fracción F_x mediante CCDP (fase móvil CH_2Cl_2 -MeOH 95:5) permitió el aislamiento y purificación de 14 mg de emodina (**107**) y 12 mg de ω -hidroxiemodina

(108) bajo la forma de sólidos amorfos de color anaranjado a rojizo intenso (P.f.= 253-255 °C y 287-289 °C, respectivamente). La estructura de estas antraquinonas se determinó mediante técnicas espectroscópicas (ultravioleta-visible, infrarrojo, RMN-¹H y RMN-¹³C uni y bidimensional) y espectrométricas (EM-IE).

4.4.5 Obtención del perfil cromatográfico del extracto orgánico de *A. stromatoides*

El extracto orgánico se analizó mediante CLAE con la finalidad de obtener el perfil cromatográfico y los tiempos de retención de los compuestos mayoritarios. Se emplearon las condiciones que se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones utilizadas para la obtención del perfil cromatográfico por CLAE.

Columna	Symmetry C18 5µm (Waters®) 4.6 x 250 mm
Flujo	0.5 mL/min
Fase Móvil	CH ₃ CN-H ₂ O _(0.1% TFA) 1:1

El extracto orgánico y los compuestos puros se analizaron bajo las mismas condiciones disolviéndolos en CH₃CN a una concentración de 0.5 mg/mL.

4.5 Estudio de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor *hCaM M124C-mBBR*

Con el fin de evaluar la afinidad de los compuestos aislados por la proteína calmodulina, se realizó el estudio de apagamiento de la fluorescencia extrínseca empleando el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBR* de acuerdo al procedimiento descrito por González-Andrade y colaboradores (2009). Los espectros de fluorescencia resultantes de la titulación del biosensor con los compuestos de prueba se registraron en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, USA) a 37 °C. Los datos se adquirieron utilizando el software VINCI 1.6SP4.

En cada caso el biosensor fluorescente se utilizó a una concentración de 1 µM en solución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM y CaCl₂ 10 mM (pH 5.1) y se tituló con una

solución 2 mM del compuesto a evaluar. La longitud de onda de excitación (λ_{ex}) fue de 381 nm y la de emisión (λ_{em}) fue adquirida en el rango de 415-550 nm, con diez integraciones de adquisición cada dos nanómetros.

Los datos obtenidos se ajustaron para obtener el valor de la constante de disociación K_d del complejo proteína-ligando mediante la siguiente ecuación:

$$v_o = \frac{1 + K_d/P + x/P - \sqrt{(1 + K_d/P + x/P)^2 - 4(x/P)}}{2}$$

Donde P es la estequiometría de la unión y x es la relación de la concentración de ligando y proteína total (González- Andrade, 2011). Este ajuste se realizó con el programa Origin 8.0. Se utilizó la CPZ y la citrinina (**67**) como control positivo y negativo, respectivamente.

4.6 Estudio de inhibición enzimática de la α -glucosidasa

El estudio de inhibición de la α -glucosidasa *in vitro* se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Brindis y colaboradores (2011). Se utilizó α -glucosidasa tipo I de levadura (Sigma-Aldrich[®], lote 119K7685) a una concentración de 0.75 U/mL y como sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) 5 mM, en solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM a pH 7.0. La inhibición se determinó espectrofotométricamente a 30 °C en placas de 96 pozos, utilizando un lector de placas iMark (BioRad[®]) a una λ de 415 nm. La acarbosa se utilizó como control positivo partiendo de una disolución stock 20 mM en solución amortiguadora. Adicionalmente, se prepararon disoluciones stock 20 mM de cada compuesto a evaluar disuelto en DMSO. Se realizaron una serie de diluciones en un rango de 0.2 a 2 mM de acarbosa así como de los compuestos a evaluar en solución amortiguadora, se colocaron 20 μ L de α -glucosidasa en cada pozo, se incubó durante 5 minutos y se realizó la primera lectura. Posteriormente, se agregaron 10 μ L de *p*-NPG a cada pozo y se incubó durante 35 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la segunda lectura. Los datos de absorbancia se adquirieron a través del programa Microplate Manager 6 y se analizaron con el programa Origin 8.0.

4.6.1 Cinética de inhibición enzimática

Para determinar los parámetros cinéticos de inhibición de la α -glucosidasa se realizó el ensayo en placas de 96 pozos (Figura 10) utilizando concentraciones crecientes de sustrato (p -NPG: 0.37, 0.56, 1.12, 2.24 y 3.32 mM) y de inhibidor (0 a 1 mM para acarbosa y 0 a 0.3 mM para ω -hidroxiemodina **108**). Se empleó el gráfico de Dixon para determinar si la inhibición es de tipo competitiva o no competitiva, graficando la concentración de inhibidor (mM) contra el recíproco de la velocidad de reacción (mM/min). Los parámetros cinéticos V_m , K_m , y K_i se determinaron mediante un ajuste no lineal basado en la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_m S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_{ic}}\right) + S \left(1 + \frac{I}{K_{iu}}\right)}$$

Donde v es la velocidad inicial en ausencia y presencia de inhibidor, S e I son la concentración de sustrato e inhibidor respectivamente, V_m es la velocidad máxima, K_m es la constante de Michaelis-Menten, K_{ic} es la constante de inhibición competitiva y K_{iu} es la constante de inhibición no competitiva.



Figura 10. Estudio de la cinética de inhibición de α -glucosidasa a diferentes concentraciones de p -NPG y de ω -hidroxiemodina (**108**).

4.7 Cálculos de acoplamiento molecular

4.7.1 Preparación de las estructuras y optimización geométrica

Los ligandos de la CaM y de la α -glucosidasa se construyeron y optimizaron con el programa HyperChem 8.0. La optimización geométrica (minimización de la energía) se realizó mediante mecánica molecular empleando el campo de fuerza AMBER, siguiendo el algoritmo de gradiente conjugado (Polak-Ribiere), teniendo como condición de término un gradiente de 0.01 kcal/(Å mol), o un máximo de 450 ciclos. Esta minimización se llevó a cabo al vacío.

4.7.2. Acoplamiento molecular

Como blancos moleculares (macromoléculas) se emplearon las estructuras tridimensionales de la calmodulina y de la α -glucosidasa. En el caso de la CaM, se utilizó la estructura del complejo CaM-TFP (1:2) resuelta por difracción de rayos X obtenida del Protein Data Bank (www.pdb.org; código PDB: 1a29), mientras que la estructura de la α -glucosidasa de levadura se construyó por homología con la estructura de la oligo-1,6-glucosidasa de *Bacillus cereus*, empleando el programa CPH models y de acuerdo a la metodología descrita por Brindis y colaboradores, 2011. La adición de los átomos de hidrógeno polares a la proteína, las cargas de Kollman y los parámetros de solvatación se realizaron utilizando el programa ADT (AutoDockTools). A cada ligando se le asignaron las cargas parciales de Gasteiger-Marsili, se removieron los átomos de hidrógeno no polares y se permitió la libre rotación en torno a los ejes de los ángulos de torsión para generar todos los conformeros permisibles del ligando.

El acoplamiento molecular se realizó utilizando el programa AutoDock 4.0 (<http://autodock.scripps.edu>) y consistió en la generación de mapas electrostáticos para cada tipo de átomo que participa en el acoplamiento, en una caja de 80 x 80 x 80 Å en los ejes X, Y y Z, con un espacio de retícula (grid) de 0.375 Å, localizada en el centro de la macromolécula, la cual fue construida con el programa AutoGrid 4 que evalúa la energía

de unión proteína-ligando. Para determinar las posiciones de menor energía de esta interacción se utilizó el algoritmo genético Lamarkiano (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. Una vez determinada la posición de menor energía, se realizó un refinamiento de los resultados empleando una caja de 30 x 30 x 30 Å centrada en el ligando.

Los resultados obtenidos de los cálculos de acoplamiento molecular fueron analizados utilizando los siguientes programas: AutoDock 4.0, AutoDockTools versión 1.5.0 (1997-2007 Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) y PyMol (DeLano 2004), sobre el sistema operativo LINUX. Cabe mencionar que los cálculos se llevaron a cabo de forma remota con el apoyo de la supercomputadora KANBALAM HP CP 4000, la cual tiene 1368 procesadores AMD Opteron, 3 terabytes de memoria y 160 terabytes de almacenamiento y que se encuentra en la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación, UNAM (www.super.unam.mx).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presentación de los resultados así como el análisis de los mismos se realizará en tres secciones: en la primera se abordará lo correspondiente al estudio químico de la especie fúngica *Aspergillus stromatoides*; en la segunda se discutirán los resultados obtenidos de los estudios de la interacción de los metabolitos con la CaM, así como con la α -glucosidasa de levadura; y para finalizar, se analizarán los resultados de los estudios de acoplamiento molecular realizados con la finalidad de determinar el probable sitio de unión de los ligandos activos a la CaM y/o a la α -glucosidasa.

5.1 Condiciones óptimas de crecimiento

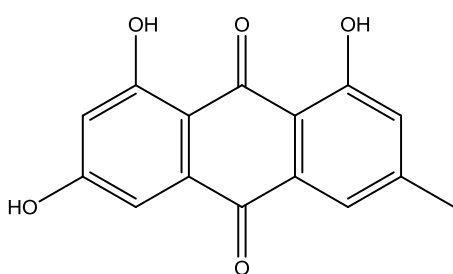
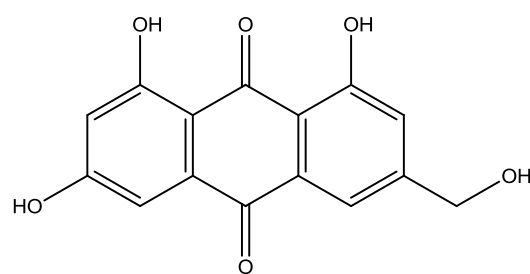
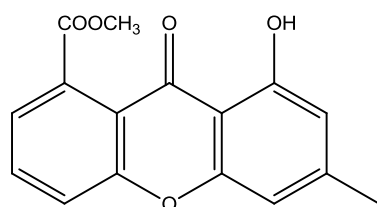
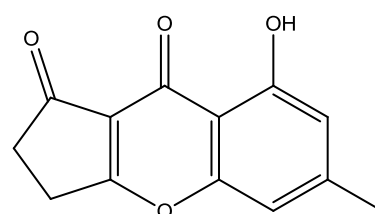
Los ensayos en pequeña escala empleando el medio PDB permitieron establecer las mejores condiciones para el desarrollo de *Aspergillus stromatoides* de acuerdo a la cantidad de biomasa seca y al rendimiento del extracto, obtenidos de las distintas condiciones evaluadas. En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos. De acuerdo con éstos, bajo las condiciones de 30 °C, de forma estática y en oscuridad (condición número 3), se obtiene el mejor rendimiento del extracto por lo que las posteriores fermentaciones en mediana escala se llevaron a cabo de esta forma.

Tabla 4. Resultados de la determinación de las mejores condiciones de crecimiento.

Condición	Temperatura	Estrés mecánico	Periodos luz-oscuridad	Biomasa seca (g)	Rendimiento extracto (g/L)
1	T. ambiente	Agitación	Normal (12/12)	0.498	2.24
2	T. ambiente	Sin agitación	Oscuridad	0.523	2.20
3	30 °C	Sin agitación	Oscuridad	0.559	2.65
4	T. ambiente	Sin agitación	Normal (12/12)	0.466	1.55

5.2 Obtención de los metabolitos secundarios a partir del extracto orgánico de *A. stromatoides*

La fermentación del microorganismo en mediana escala (20 L), bajo las condiciones previamente establecidas, condujo a la obtención de los extractos del micelio y del medio de cultivo que se reunieron con base en su similitud cromatográfica. A partir del extracto orgánico resultante cristalizó de manera espontánea la micotoxina **citrinina (67)**. Por otra parte, el fraccionamiento primario del extracto mediante CCA sobre Sephadex[®] LH-20 permitió el aislamiento de dos compuestos de tipo antraquinona, la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (**emodina 107**) y la 1,3,8-trihidroxi-6-(hidroximetil)-antraquinona (**ω-hidroxiemodina 108**), que fueron purificadas por CCDP. La elucidación estructural de estos dos compuestos se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales. Por último, el fraccionamiento primario del extracto orgánico por medio de CCA sobre gel de sílice condujo al aislamiento del compuesto de tipo xantona **8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109)** y de la cromona **8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[b]cromen-1,9-diona (110)**. En el caso de estos últimos y de la citrinina, las estructuras se determinaron inequívocamente mediante un análisis de difracción de rayos X.

**107****108****109****110**

5.3 Elucidación estructural de las antraquinonas emodina (**107**) y ω -hidroxiemodina (**108**)

La fórmula molecular de la emodina (**107**) y de la ω -hidroxiemodina (**108**) se estableció como $C_{15}H_{10}O_5$ y $C_{15}H_{10}O_6$, respectivamente, por medio de espectrometría de masas modalidad impacto electrónico (EM-IE). El análisis detallado de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) uni y bidimensionales permitió establecer la estructura de estas antraquinonas. Las características más relevantes de los espectros de RMN- 1H (500 MHz) se resumen a continuación:

a) En el espectro del producto **107** se observan dos dobletes en δ_H 12.15 ($d, J= 9$ Hz) y δ_H 12.03 ($d, J= 8.5$ Hz) atribuidos a los hidrógenos de dos grupos hidroxilos que desaparecen al tratar la disolución con agua deuterada (D_2O); el desplazamiento químico de estas señales sugiere que los hidroxilos se encuentran quelatados con un grupo carbonilo. Este sistema no se pudo observar en el espectro de RMN- 1H de la ω -hidroxiemodina (**108**). La presencia del grupo carbonilo se confirmó mediante la señal alrededor de δ_C 191 en los espectros de RMN- ^{13}C .

b) En δ_H 7.21 y δ_H 6.64 ($d, J= 2.5$ Hz) de **107** y en δ_H 7.08 y δ_H 6.42 ($d, J= 2.3$ Hz) de **108**, se observan dos dobletes que corresponden a los hidrógenos aromáticos H-2 y H-4; la constante de acoplamiento indica que estos protones se encuentran en relación meta.

c) En δ_H 7.52 y δ_H 7.09 de **107** y en δ_H 7.64 y δ_H 7.19 de **108**, se aprecian dos singuletes asignados a los hidrógenos aromáticos H-5 y H-7, respectivamente.

d) En el espectro de la emodina (**107**), se observa un singulete en δ_H 2.44 que corresponde a los hidrógenos del metilo en C-6. Esta señal no se aprecia en el espectro de la ω -hidroxiemodina (**108**), en su lugar se encuentra un singulete en δ_H 4.66 correspondiente a los hidrógenos bencílicos de un grupo hidroximetileno.

Los espectros de RMN- ^{13}C de los productos **107** y **108** fueron muy similares y permitieron determinar la presencia de 15 átomos de carbono: dos que pertenecen a grupo carbonilo, ocho carbonos cuaternarios y cuatro metinos. La única diferencia entre los espectros fue la presencia de la señal en δ_c 21.96, que corresponde al metilo sobre anillo aromático en el producto **107**, misma que no aparece en el espectro de la ω -hidroxiemodina (**108**); en su lugar se observa una señal en δ_c 64.14 que confirma la presencia del grupo hidroximetileno en C-6.

Los datos espectroscópicos se resumen en la Tabla 5 y son congruentes con los reportados en la literatura (Fujimoto *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010). La asignación estructural inequívoca de las antraquinonas se corroboró mediante el análisis detallado de los espectros bidimensionales. Los espectros bidimensionales HMBC permitieron determinar las correlaciones mostradas en la Figura 11.

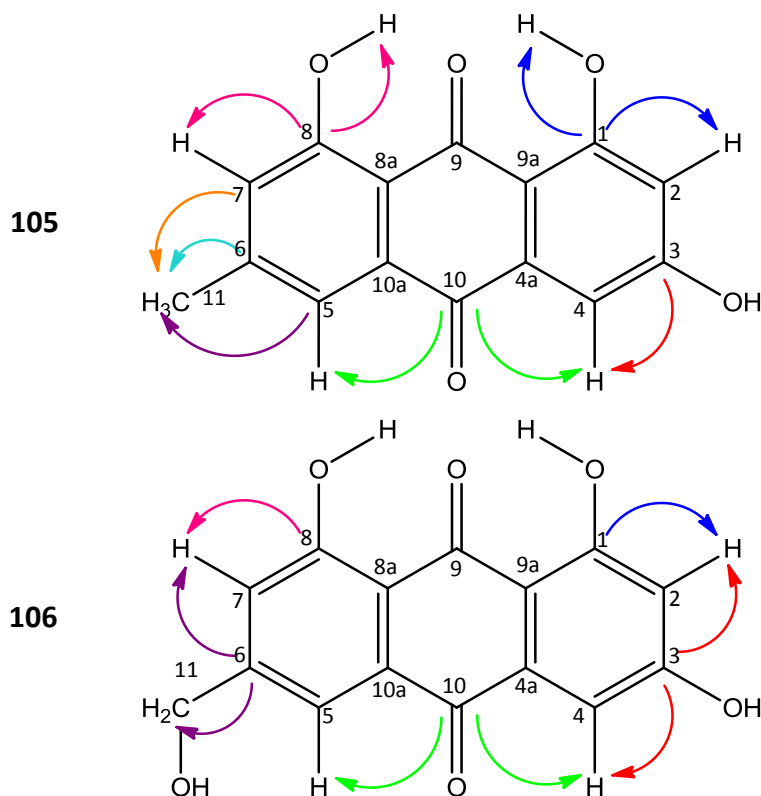
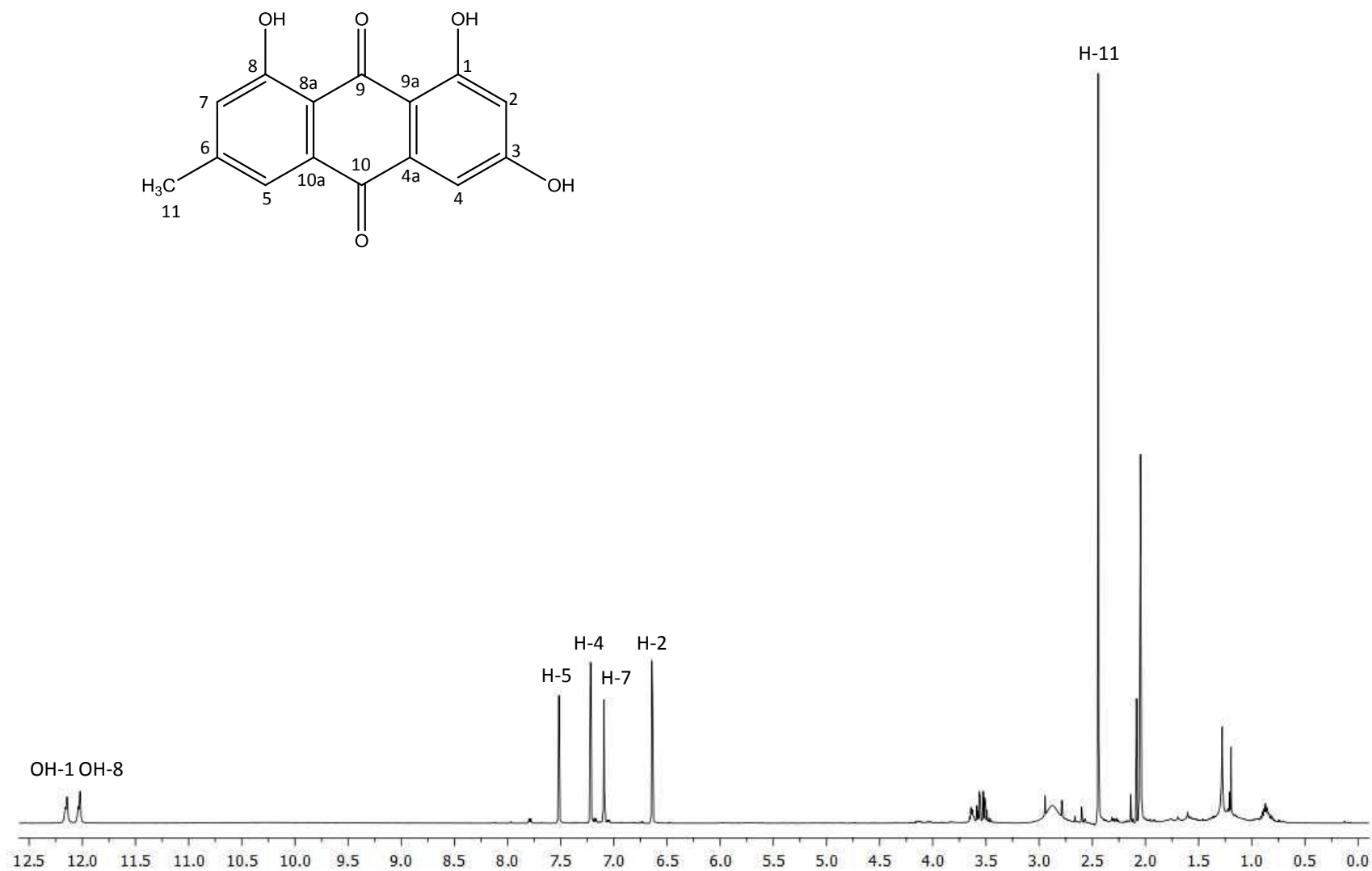


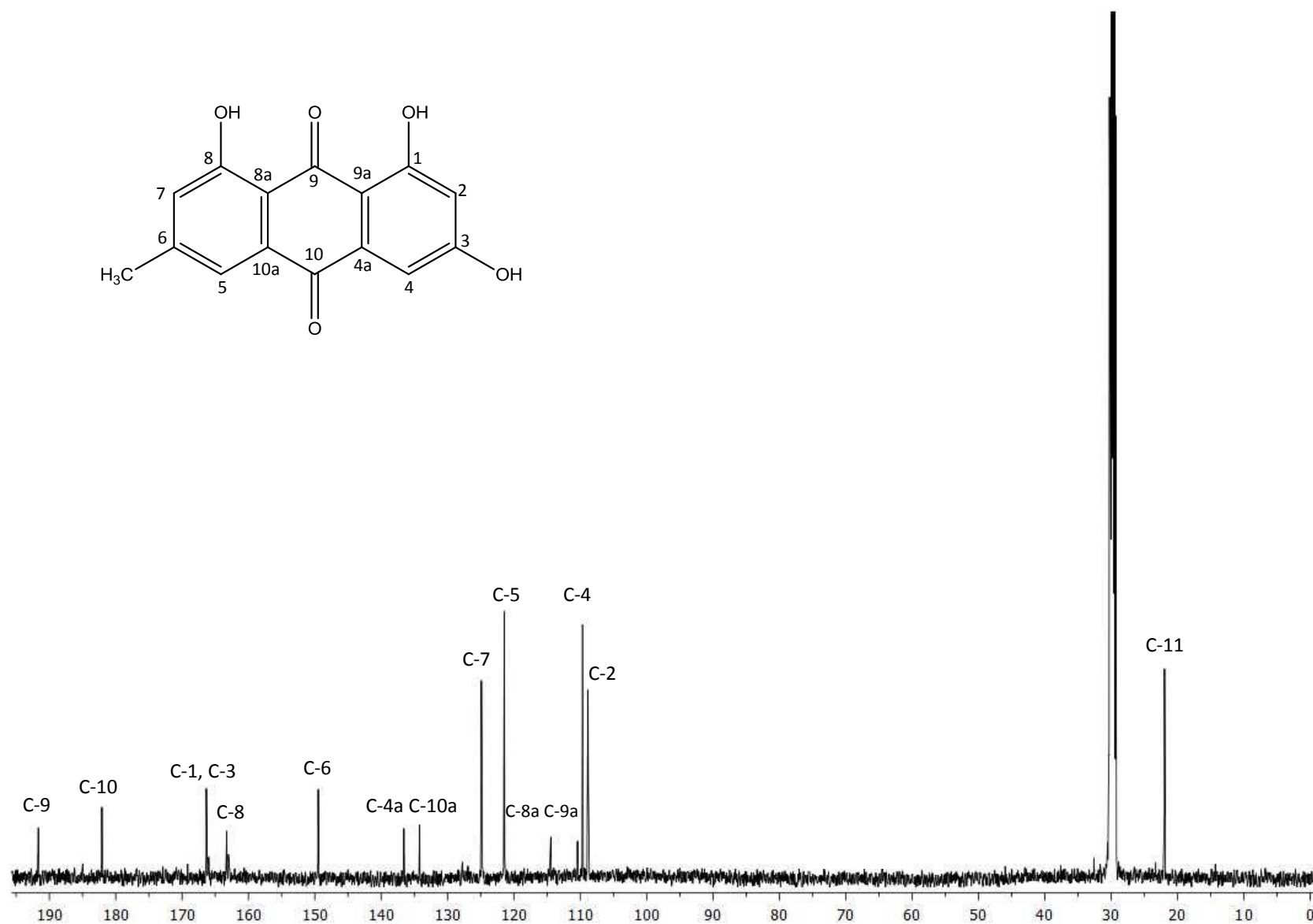
Figura 11. Correlaciones observadas en los espectros HMBC para la emodina (**107**) y la ω -hidroxiemodina (**108**).

Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C de la emodina (**107**) y de la ω-hidroxiemodina (**108**).

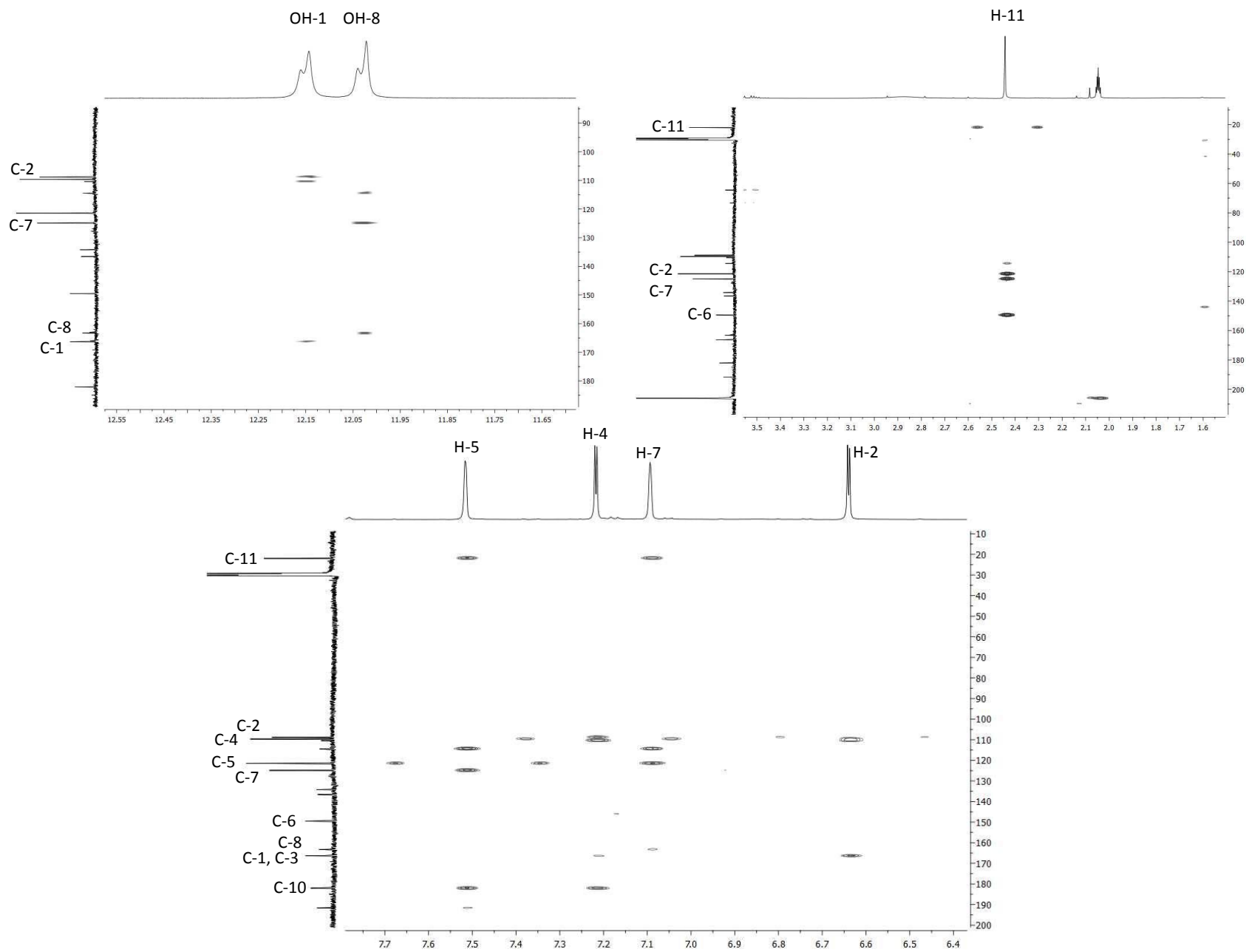
Posición (C)	δ_c (ppm)		δ_H (ppm) mult. (J en Hz)		Correlaciones en HMBC	
	107	108	107	108	107	108
1	166.3	166.9	-	-	OH-1, H-2, H-4	H-2
2	108.8	109.4	6.64 <i>d</i> (2.5)	6.42 <i>d</i> (2.3)	OH-1, H-4	H-4
3	166.3	170.1	-	-	H-2, H-4	H-2, H-4
4	109.7	111.8	7.21 <i>d</i> (2.5)	7.08 <i>d</i> (2.3)	H-2	H-2
4a	136.6	136.6	-	-	OH-1, H-4	H-4
5	121.4	118.3	7.52 <i>s</i>	7.64 <i>s</i>	H-11, H-7	H-11, H-7
6	149.5	152.7	-	-	H-11, H-5	H-11, H-7
7	124.9	122.2	7.09 <i>s</i>	7.19 <i>s</i>	OH-8, H-11, H-5	H-11, H-5
8	163.3	163.5	-	-	OH-8, H-7	H-11, H-5, H-7
8a	114.4	116.0	-	-	OH-8, H-5, H-7	H-11, H-5, H-7
9	191.7	191.0	-	-	H-5	H-5, H-7
9a	110.4	109.4	-	-	OH-1, H-2, H-4	H-2
10	182.1	183.5	-	-	H-4, H-5	H-4, H-5
10a	134.2	134.9	-	-	OH-8	H-11
11	22.0	64.1	2.44 <i>s</i>	4.66 <i>s</i>	H-5, H-7	H-5, H-7
OH-1	-	-	12.15 <i>d</i> (9)	-	-	-
OH-8	-	-	12.03 <i>d</i> (8.5)	-	-	-



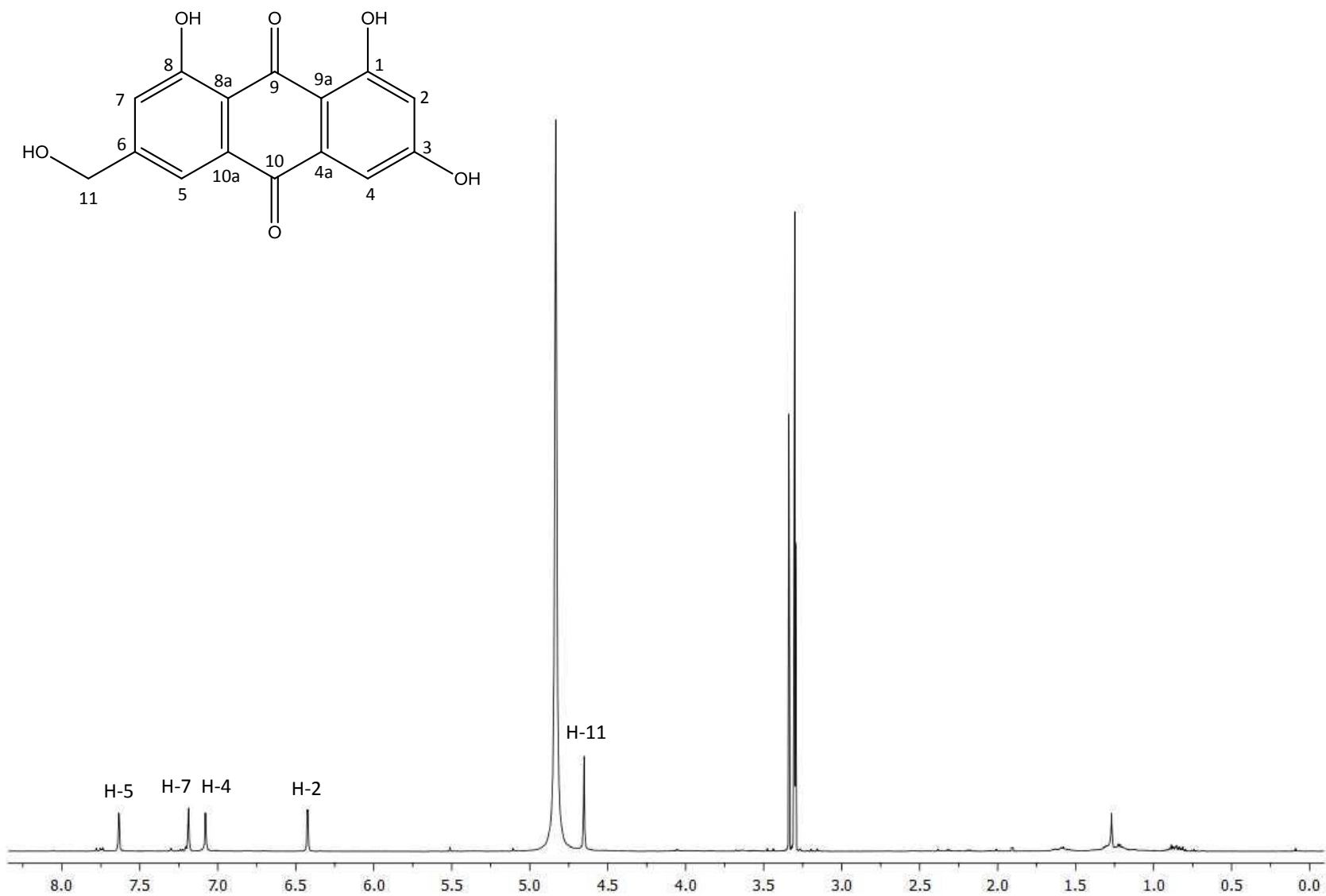
Espectro 1. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (**107**).



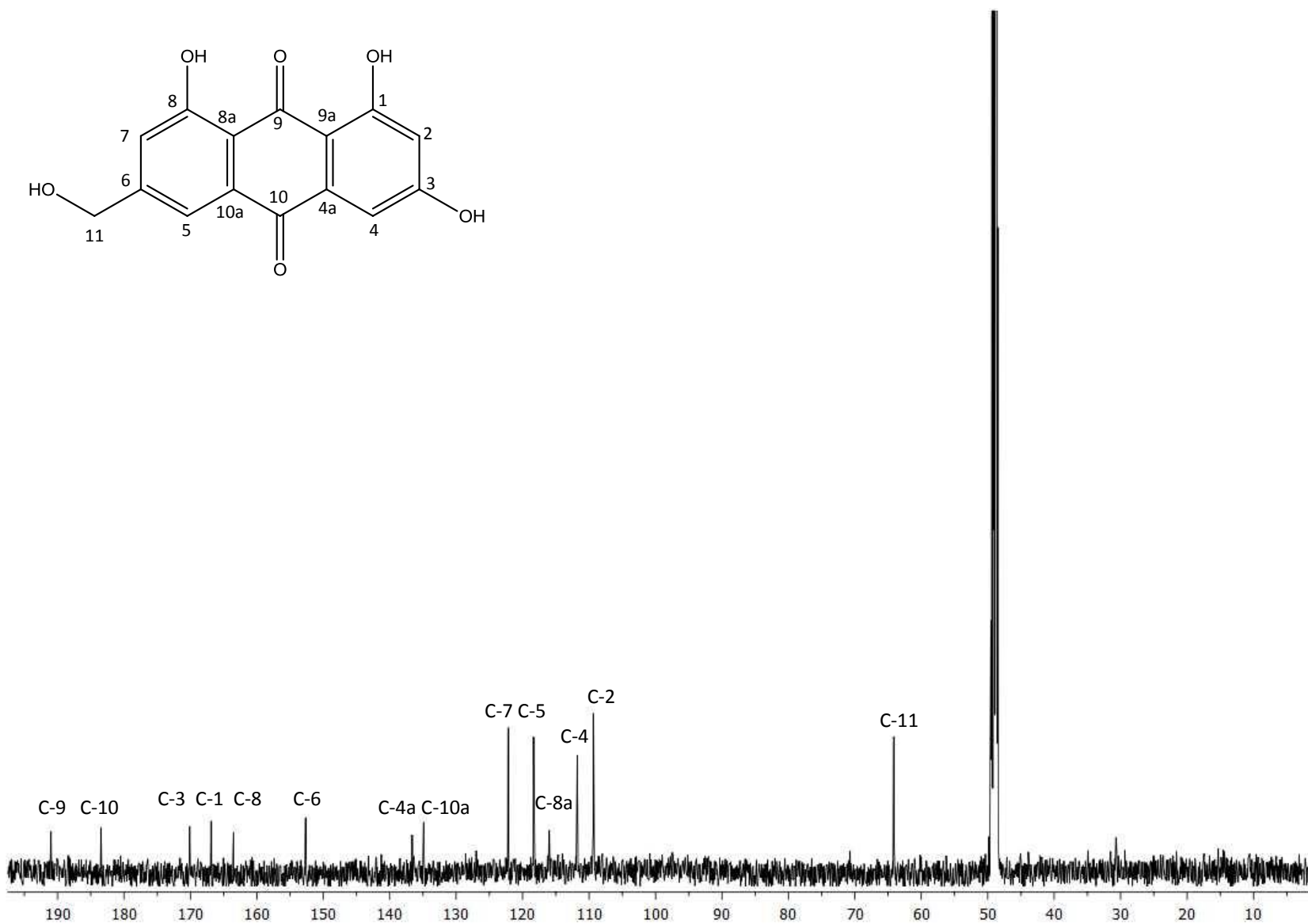
Espectro 2. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (**107**).



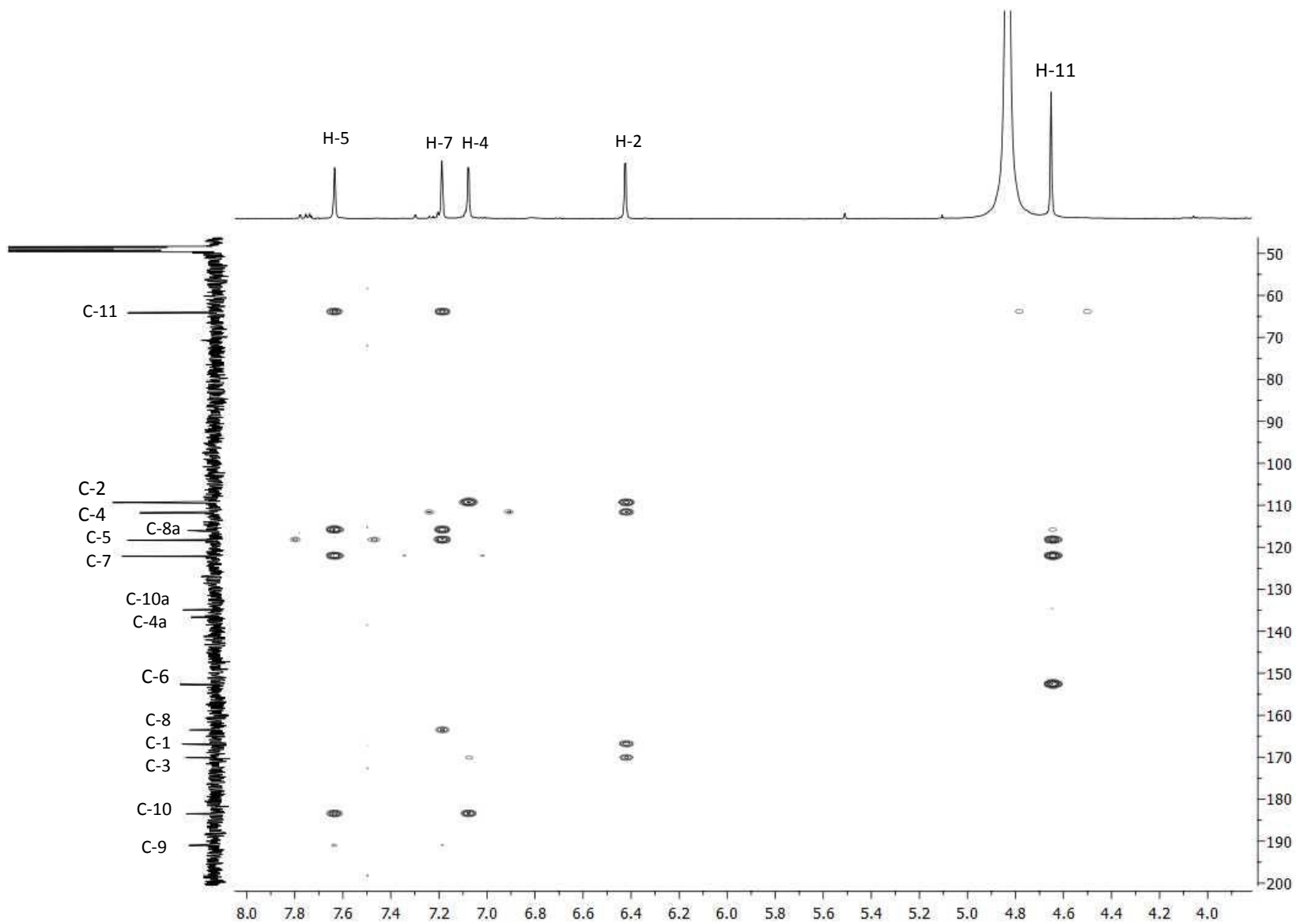
Espectro 3. Espectro HMBC de la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (**107**).



Espectro 4. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CD₃OD) de la 1,3,8-trihidroxi-6-(hidroximetil)-antraquinona (**108**).



Espectro 5. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CD₃OD) de la 1,3,8-trihidroxi-6-(hidroximetil)-antraquinona (**108**).



Espectro 6. Espectro HMBC de la 1,3,8-trihidroxi-6-(hidroximetil)-antraquinona (**108**).

5.4 Elucidación estructural de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (109)

La 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (**109**) se obtuvo como un sólido cristalino de color amarillo claro y su estructura se determinó mediante el análisis por difracción de rayos X de monocristal. En la vista estereoscópica obtenida, se puede observar que la molécula es plana excepto por el grupo éster en C-1 (Figura 12). Este compuesto se aisló por primera vez en el hongo fitopatógeno *Monilinia fructicola* (Kachi y Sassa, 1986). Hasta la fecha sólo se han descrito otros cuatro aislamientos a partir de hongos endófitos como *Microsphaeropsis* sp. y de hongos coprófilos como *Guanomyces polytrix* (Macías *et al.*, 2001; Krohn *et al.*, 2009). Los datos espectroscópicos del compuesto **109** se resumen en la Tabla 6 (Macías 2001). Este compuesto muestra actividad fitotóxica sobre *Amaranthus hypochondriacus* e *Echinochloa crusgalli*.

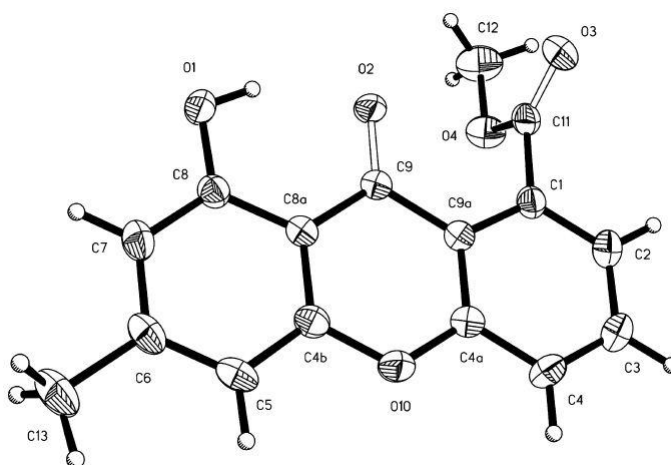


Figura 12. Estructura tridimensional resuelta por difracción de rayos X de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (**109**).

Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (**109**).

Posición (C)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) mult. (J en Hz)	Correlaciones en HMBC
1	156.0	-	H-3
2	122.5	7.30 <i>dd</i> (7.0, 1.0)	-
3	134.8	7.74 <i>dd</i> (8.2, 7.5)	-
4	119.4	7.52 <i>dd</i> (8.7, 1.0)	H-2
4a	133.6	-	H-3
5	107.4	6.64 <i>q</i>	H-7, CH ₃ -6
5a	155.7	-	H-5
6	149.4	-	CH ₃ -6
7	111.7	6.75 <i>q</i>	H-5, CH ₃ -6
8	161.5	-	H-7
8a	107.0	-	H-5
9	180.4	-	H-5
9a	117.6	-	H-2, H-4
CH ₃ -6	22.6	2.43 <i>s</i>	-
OH-8	-	12.15 <i>s</i>	-
<u>CH</u> ₃ OCO-5	53.1	4.03 <i>s</i>	-
CH ₃ OO <u>C</u> -5	169.7	-	H-2

5.5 Elucidación estructural de la 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona (**110**)

La cromona **110** se aisló como un sólido cristalino de color anaranjado claro. El espectro de masas obtenido por impacto electrónico permitió establecer su fórmula molecular como C₁₃H₁₀O₄. En el espectro de RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) se observa un singulete en δ_H 12.23 correspondiente al hidrógeno de un hidroxilo quelatado con un grupo carbonilo; se observan dos singuletes en δ_H 6.79 y δ_H 6.70 correspondientes a dos hidrógenos

aromáticos (H-5 y H-7, respectivamente) en relación meta. Además se observan dos tripletes en δ_H 3.09 y δ_H 2.72 (t , $J=5$ Hz) que se asignaron a los hidrógenos de dos metilenos vecinales (H-2 y H-3). Por último, en δ_H 2.43 se aprecia un singlete atribuido a los hidrógenos de un metilo sobre anillo aromático. El espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) permitió determinar la presencia de 13 carbonos: dos que pertenecen a grupos carbonilos, ocho carbonos de tipo cuaternario, dos metilenos y por último un metilo. Las unidades estructurales determinadas, así como las escasas correlaciones observadas en los espectros de RMN bidimensionales permitieron integrar la estructura del producto natural como la de la coniocaetona A (8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona), un compuesto con propiedades antifúngicas previamente aislado de los hongos coprófilos *Coniochaeta saccardoi* y *Coniochaeta tetraspora* (Wang *et al.*, 1995; Fujimoto *et al.*, 1996). Sus datos espectroscópicos fueron idénticos a los del producto **110**. Es importante destacar que este compuesto es poco común en la naturaleza y que éste representa el tercer reporte de su aislamiento de fuente natural alguna.

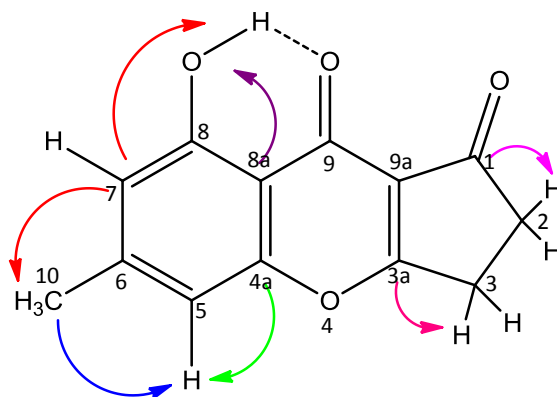
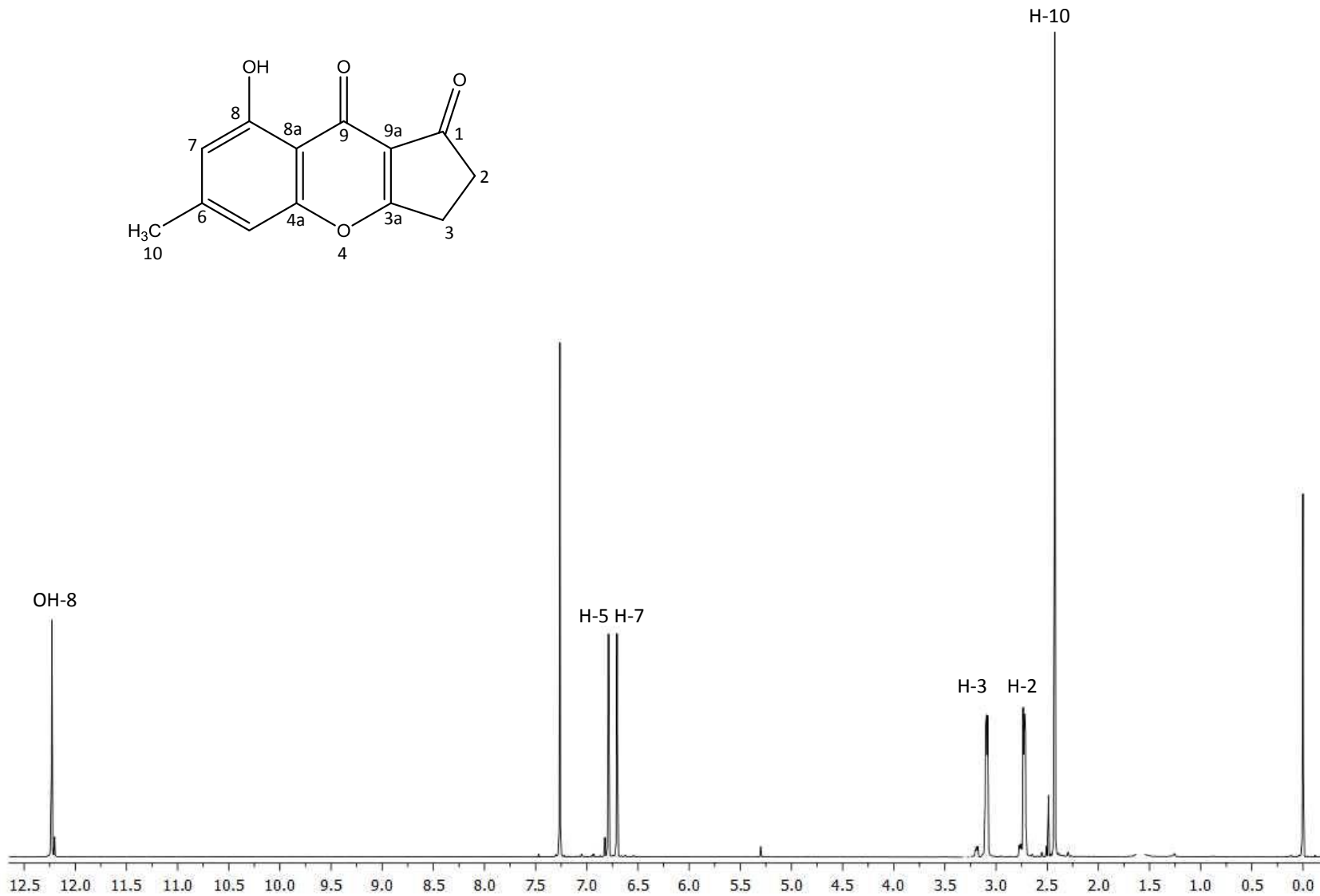


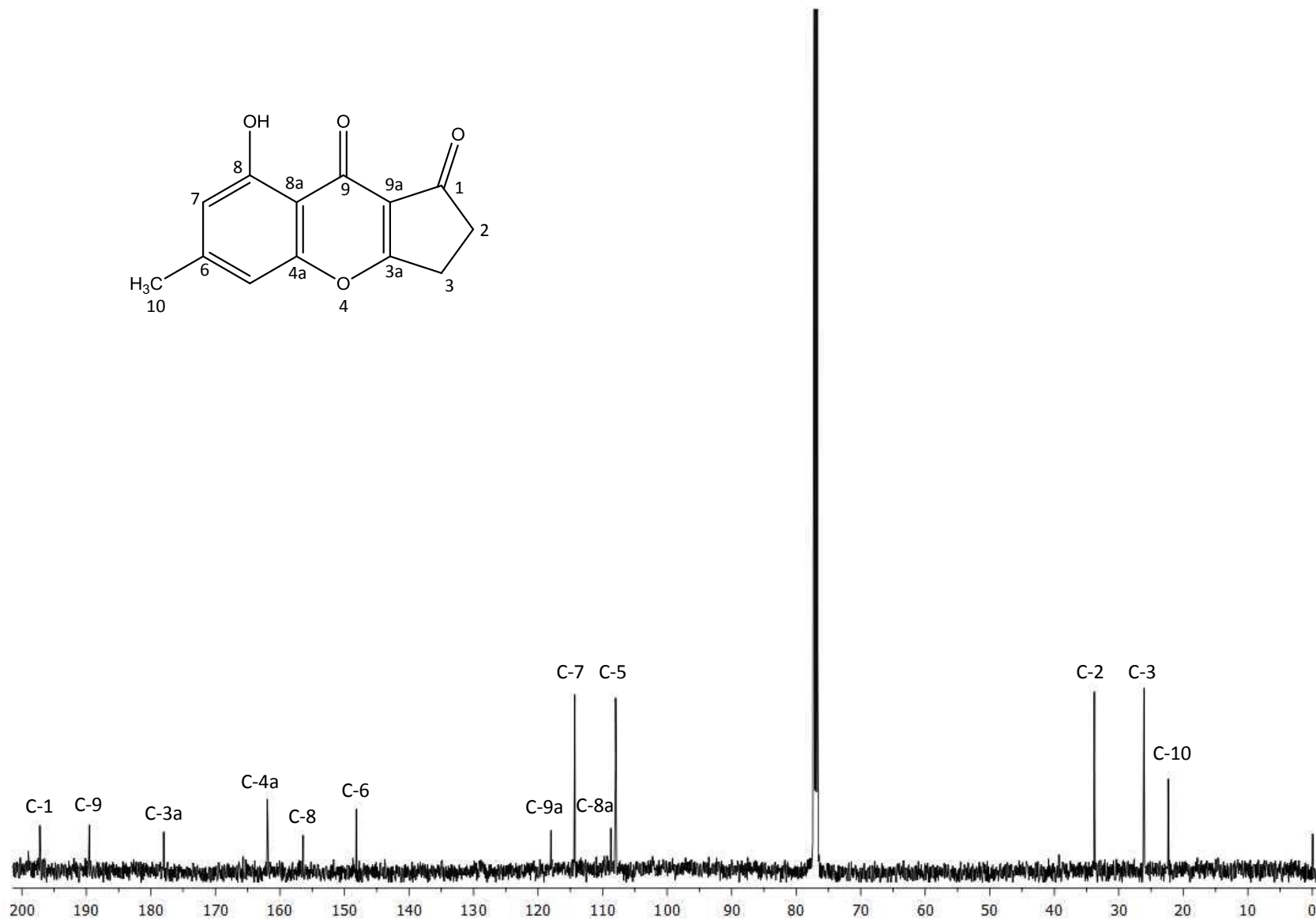
Figura 13. Correlaciones observadas en HMBC para el compuesto 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona (**110**).

Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C de la 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona (**110**).

Posición (C)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) mult. (J en Hz)	Correlaciones en HMBC
1	197.2		H-2, H-3
2	33.8	2.72 <i>t</i> (5)	H-3
3	26.1	3.09 <i>t</i> (5)	H-2
3a	178.0	-	H-2, H-3
4a	162.0	-	H-5
5	108.0	6.79	H-7
6	148.2		H-10
7	114.3	6.70	OH-8, H-5, H-10
8	156.4	-	OH-8, H-7
8a	108.7	-	OH-8, H-5
9	189.6	-	-
9a	118.0	-	H-3
10	22.3	2.43	H-5, H-7
OH-8	-	12.23	-



Espectro 7. Espectro de RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) de la 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona (**110**).



Espectro 8. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl₃) de la 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona (**110**).

La estructura del compuesto **110** se corroboró inequívocamente mediante un análisis por difracción de rayos X siendo el presente trabajo la primera descripción cristalográfica de esta cromona. Los datos cristalográficos se resumen a continuación: el sistema cristalino es de tipo triclinico con grupo espacial P-1. Las dimensiones de la celda unitaria son: $a = 6.2038(17) \text{ \AA}$, $b = 8.108(2) \text{ \AA}$, $c = 20.947(6) \text{ \AA}$ con ángulos $\alpha = 79.357(4)^\circ$, $\beta = 84.180(4)^\circ$ y $\gamma = 86.523(5)^\circ$; $Z = 4$, $V = 1029.2(5) \text{ \AA}^3$, $D_c = 1.486 \text{ g cm}^{-3}$ y $\mu = 0.111 \text{ mm}^{-1}$. En la vista estereoscópica de la molécula se puede observar una estructura plana y la formación de dos enlaces de hidrógeno, uno intermolecular y otro intramolecular entre el hidrógeno del hidroxilo en C-8 y el oxígeno del grupo carbonilo en C-9 (Figura 14).

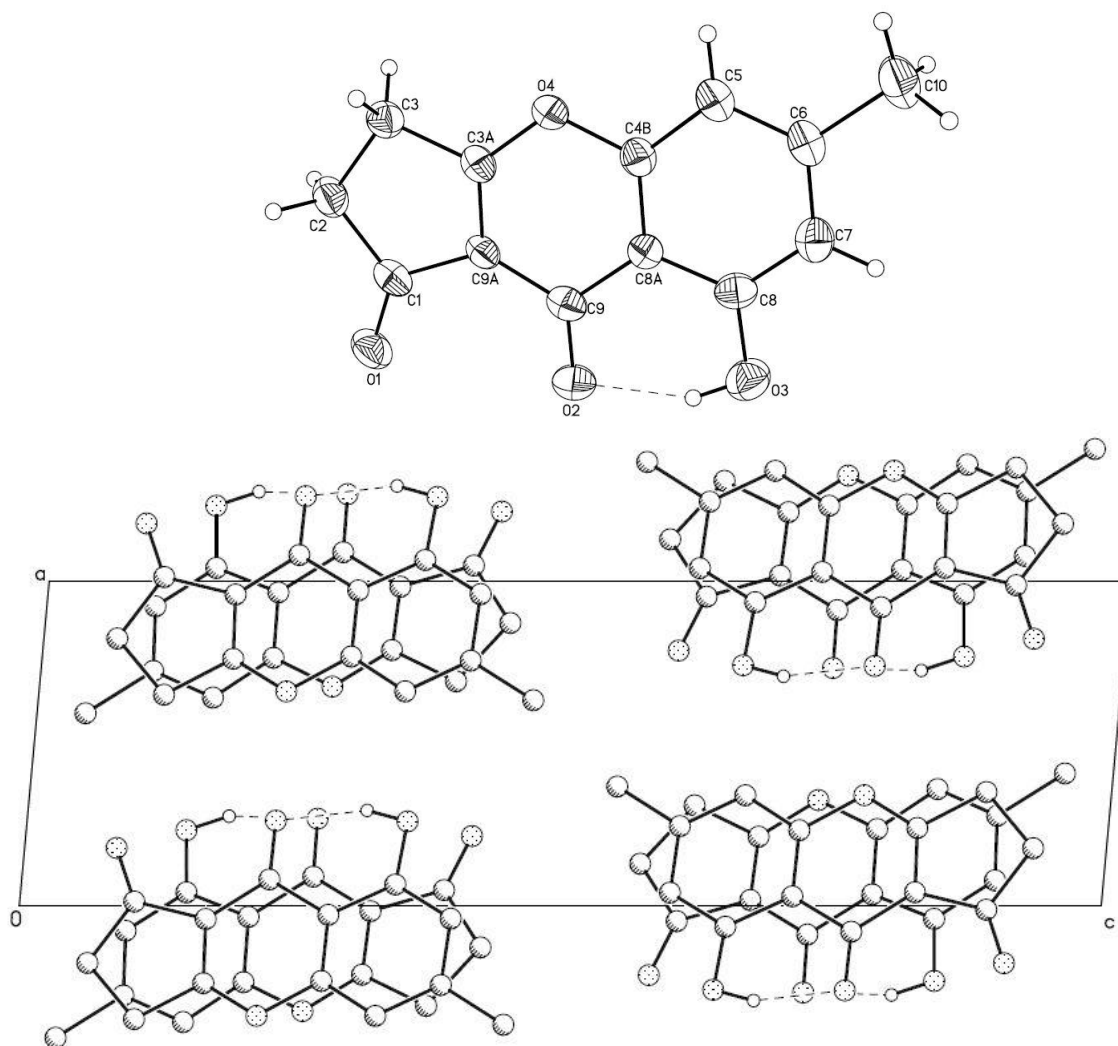


Figura 14. Estructuras tridimensionales resueltas por difracción de rayos X de la 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[b]cromen-1,9-diona (**110**).

5.6 Elucidación estructural de la citrinina (67)

La citrinina (**67**) se aisló en grandes cantidades (3.26% de rendimiento) a partir del extracto orgánico de *A. stromatoides* bajo la forma de cristales amarillos. El espectro de masas obtenido por impacto electrónico mostró el ión molecular $[M^+]$ en una relación m/z de 270, congruente con la fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_5$. En el espectro de RMN- 1H (500 MHz, $CDCl_3$) se observan dos dobletes en δ_H 1.20 (d , $J= 9$ Hz) y δ_H 1.32 (d , $J= 8.5$ Hz) asignables a los hidrógenos de los metilos CH_3 -4 y CH_3 -3 respectivamente; en δ_H 1.99 se aprecia un singulete que corresponde a los hidrógenos del metilo CH_3 -5; se observan dos cuadrupletes en δ_H 2.95 (c , $J= 9$ Hz) y δ_H 4.74 (c , $J= 8.5$ Hz) que corresponden a los hidrógenos H-4 y H-3 respectivamente; por último, se aprecia una señal en δ_H 8.20 que se asigna al hidrógeno H-1. En el espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) se observó la presencia de 13 carbonos: dos de grupo carbonilo, dos carbonos olefínicos unidos a oxígeno, cuatro carbonos cuaternarios, dos metinos y tres metilos. Estos datos espectroscópicos resultaron idénticos a los reportados en la literatura para la micotoxina **67** (Marinho y Rodrigues, 2011). La estructura del producto natural se corroboró de manera inequívoca mediante difracción de rayos X de monocristal (Figura 15).

La citrinina (**67**), ampliamente producida por diversas especies de *Penicillium*, *Monascus* y *Aspergillus*, es causante de diversas nefropatías incluyendo necrosis tubular aguda. En un estudio reciente se demostró el potencial genotóxico de este compuesto ya que desestabiliza a la tubulina y causa el arresto del ciclo celular en la progresión de la fase G_2 a M (Chang *et al.*, 2011).

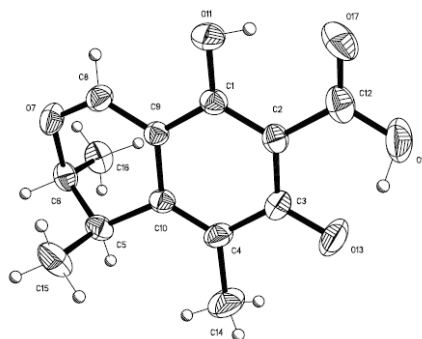
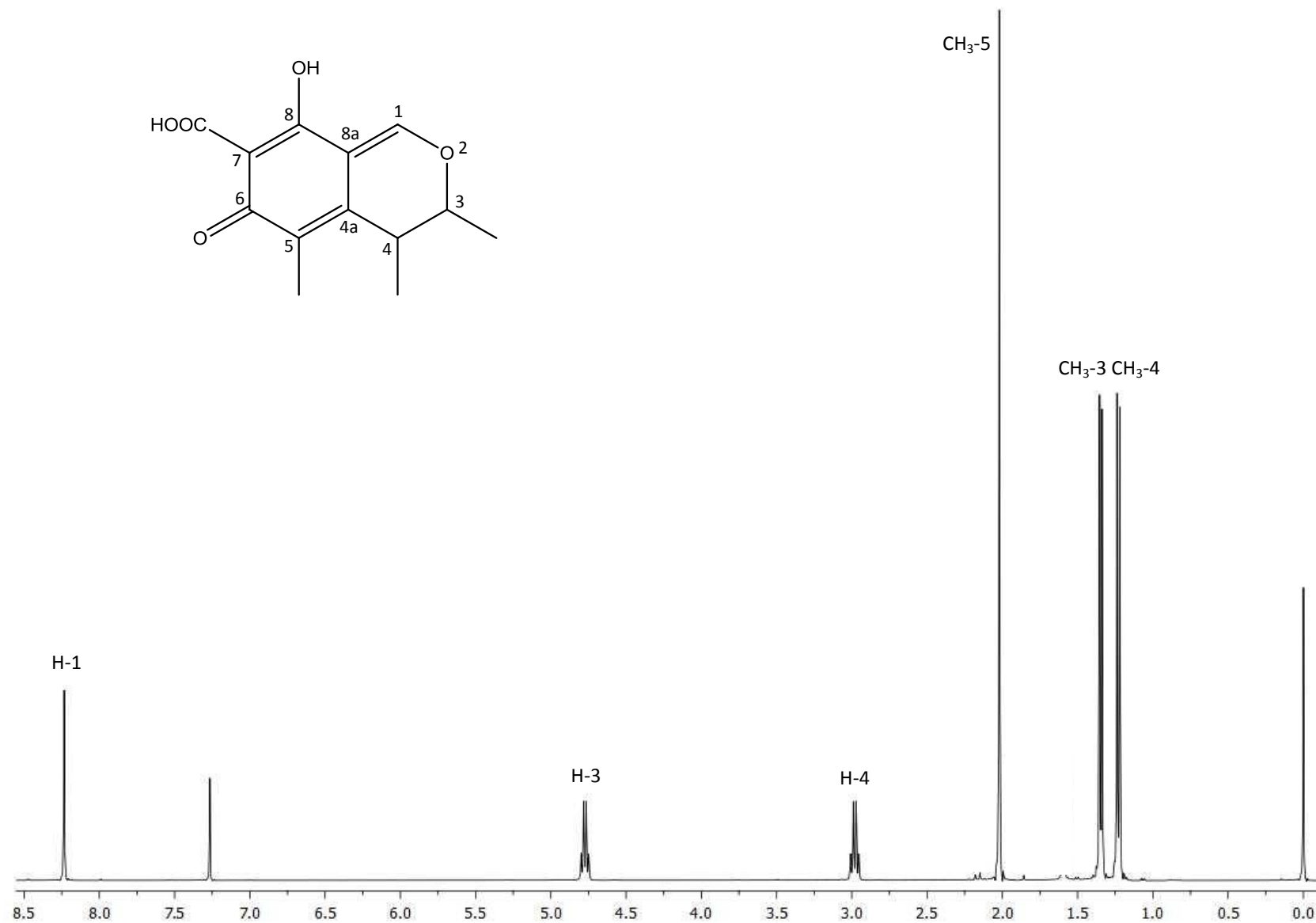
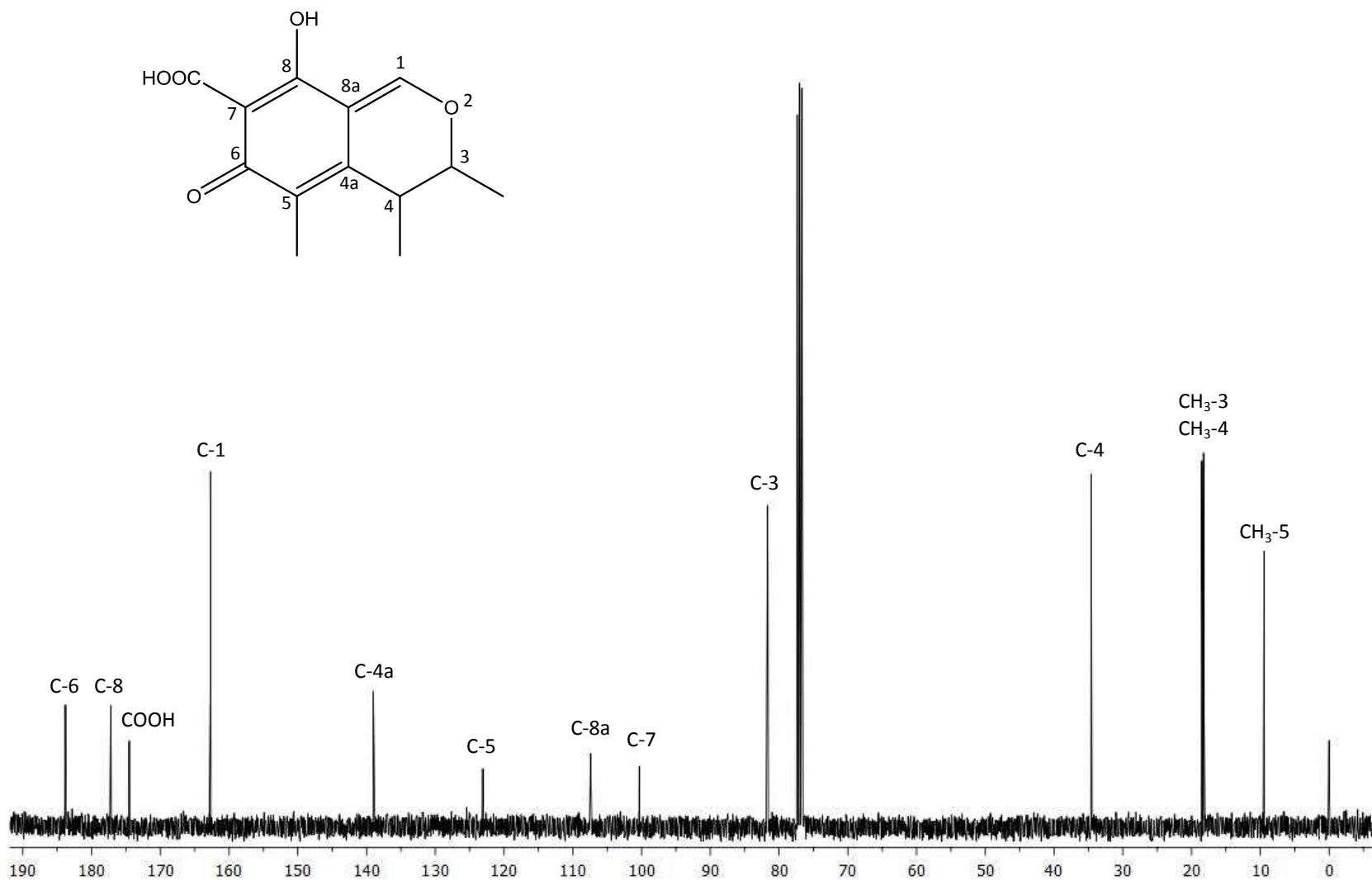


Figura 15. Estructura tridimensional resuelta por difracción de rayos X de la citrinina (**67**).



Espectro 9. Espectro de RMN- ^1H (500MHz, CDCl_3) de la citrinina (**67**).



Espectro 10. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl₃) de la citrinina (67).

5.7 Perfil cromatográfico del extracto orgánico de *Aspergillus stromatoides*

El perfil cromatográfico del extracto orgánico de la especie fúngica se estableció por CLAE empleando una columna analítica de fase reversa Symmetry C18 5 μ m (Waters®) 4.6 x 250 mm; en el cromatograma de la Figura 16 se aprecia un compuesto mayoritario a un tiempo de retención de 16 min, mismo que corresponde a la citrinina (**67**). Los demás compuestos aislados se indican en el cromatograma con el número correspondiente.

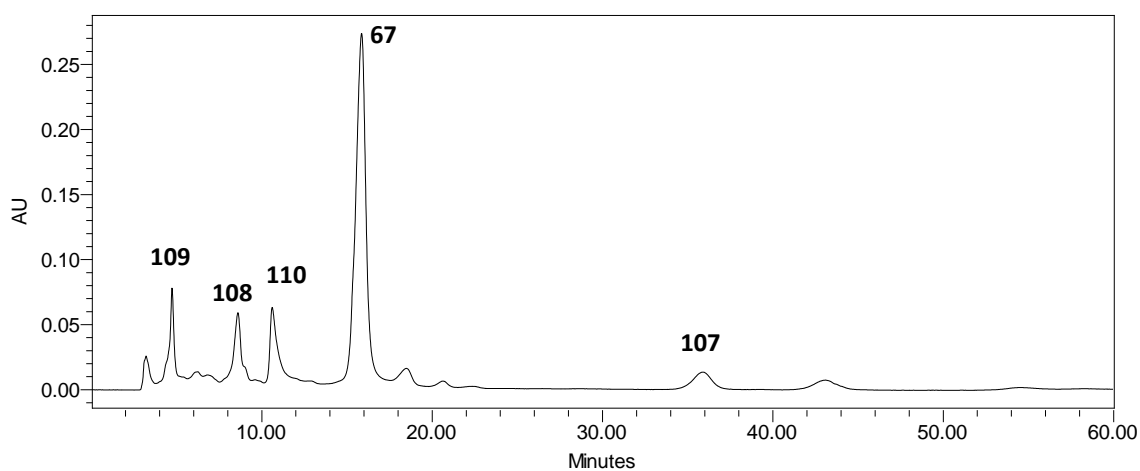


Figura 16. Perfil cromatográfico del extracto orgánico de *A. stromatoides*.

5.8 Estudios de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor *hCaM M124C-mBBr*

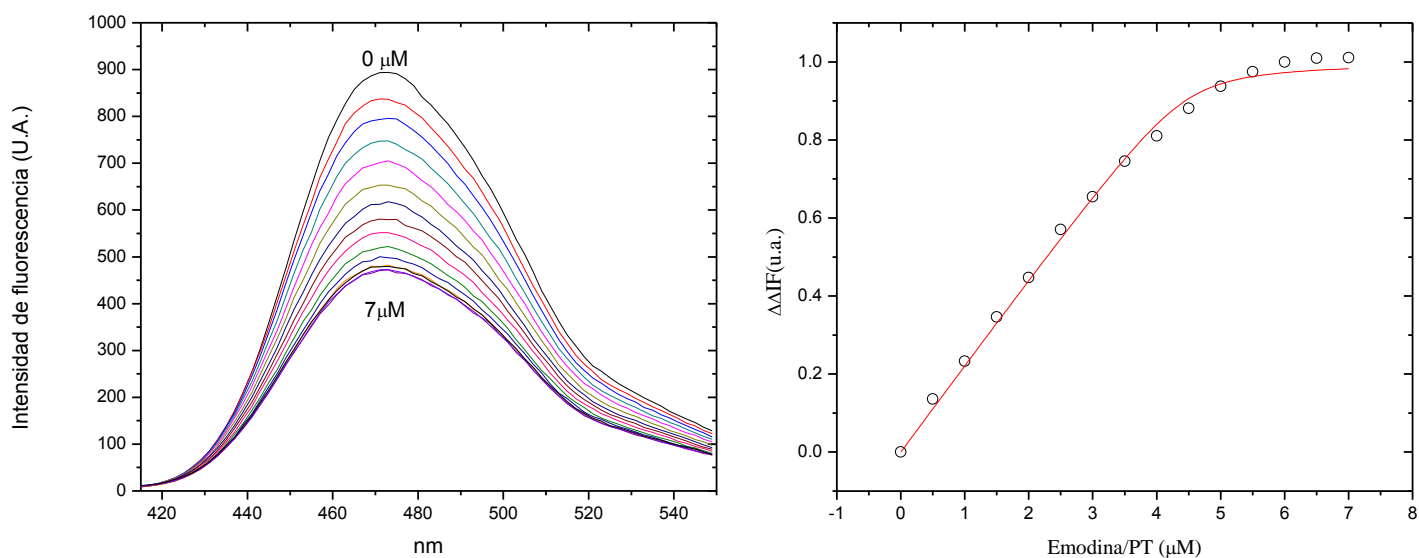
La interacción de un ligando con el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBr* provoca un cambio en la conformación de la proteína que modifica el microambiente que rodea al grupo fluoróforo monobromobimano (*mBBr*) unido en la posición 124. Este cambio conformacional provoca un apagamiento en la fluorescencia del biosensor que se relaciona con la afinidad del ligando y que puede medirse a través de un espectrofluorómetro. Esta respuesta permite determinar si los compuestos evaluados interaccionan de manera directa con la calmodulina.

En el presente trabajo, se evaluaron los compuestos fúngicos **67**, **107**, **108**, **109** y **110** con la finalidad de determinar si se unen de manera directa a la proteína. De este modo, la

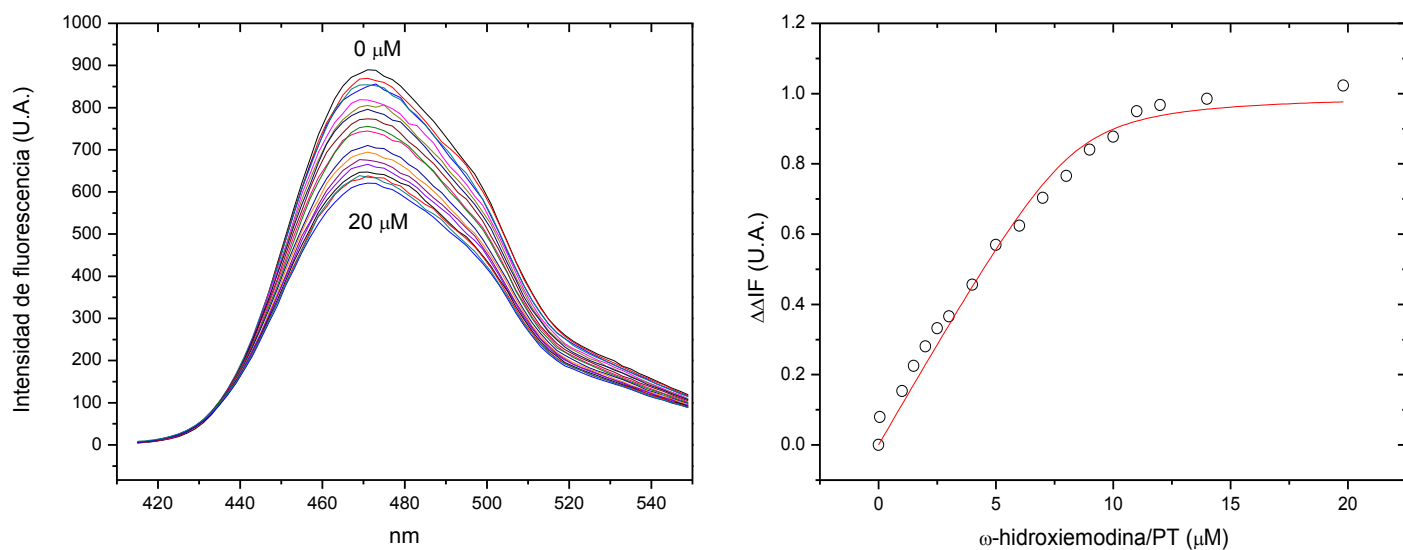
titulación del biosensor con concentraciones conocidas del ligando permitió calcular la constante de disociación (K_d), parámetro que indica la afinidad de los compuestos por la proteína.

En este estudio, las antraquinonas emodina (**107**) y ω -hidroxiemodina (**108**) mostraron una excelente afinidad por la CaM. En la Figura 17 se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos de la titulación del biosensor así como el ajuste de los datos por medio de la ecuación mostrada en la parte experimental para el cálculo de la K_d .

a)



b)



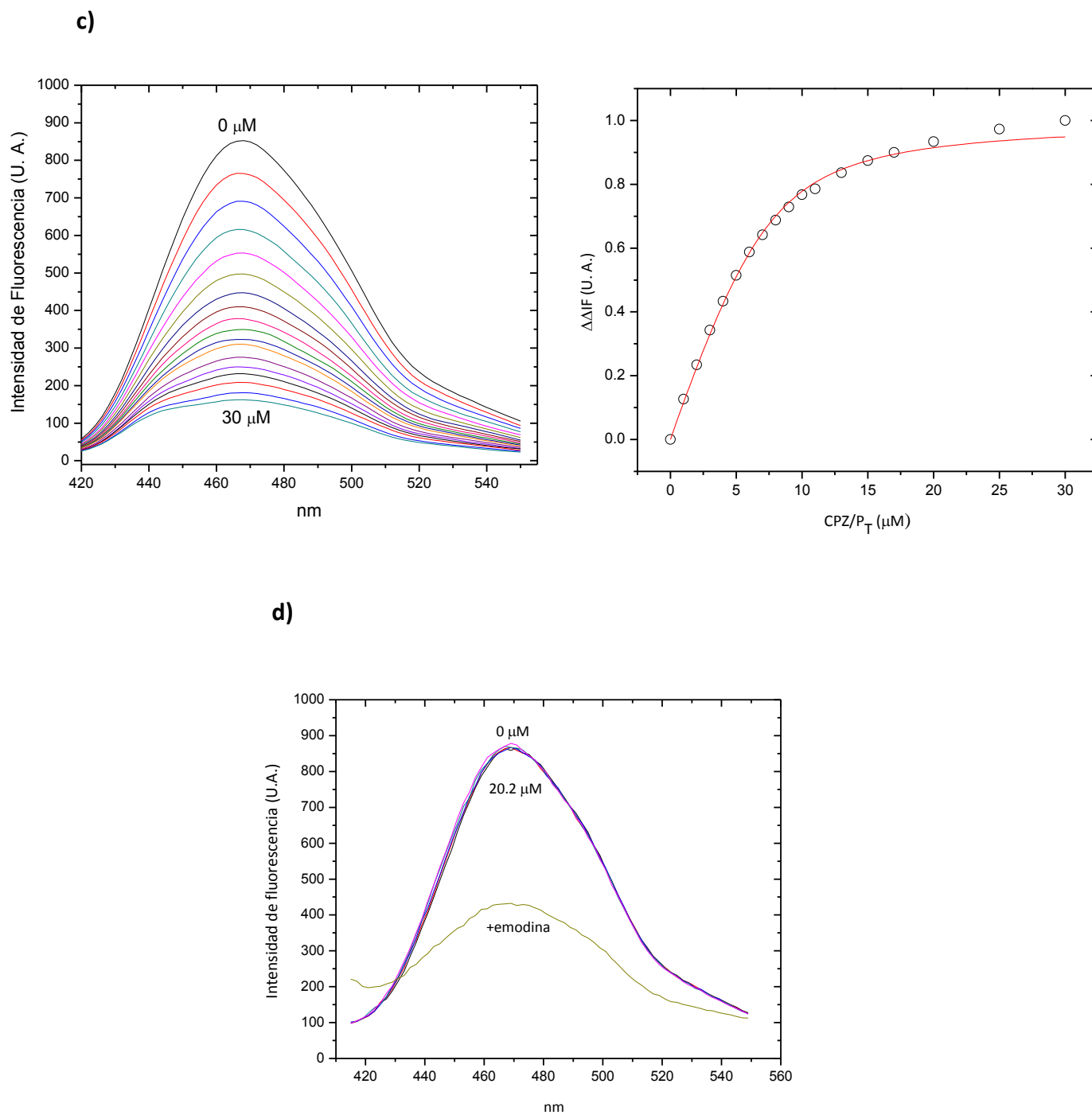


Figura 17. Espectros de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}}=381$ y $\lambda_{\text{em}}=415-550$ nm) y curvas de titulación del biosensor *hCaM M124C-mBBR* con los ligandos **a)** emodina (**107**); **b)** ω -hidroxiemodina (**108**); **c)** control positivo (CPZ) y **d)** control negativo + emodina (**107**).

Como se ilustra en la Figura 17a y 17b, los compuestos **107** y **108** provocan un claro apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor *hCaM M124C-mBBR* indicando que interaccionan de manera directa con la calmodulina. En la Tabla 8 se muestran las constantes de disociación (K_d) de los compuestos evaluados y los coeficientes de correlación cuadrático (R^2) del ajuste.

Tabla 8. Resultados del ensayo de fluorescencia: cálculo de la constante de disociación.

Ligandos	K_d (nM)	R^2
Emodina (107)	46.6 ± 15	0.996
ω -hidroxiemodina (108)	279.3 ± 109	0.988
CPZ*	1245.4 ± 123	0.995

*Control positivo

Las magnitudes de las constantes de disociación (K_d) demuestran que la emodina (**107**) presenta una afinidad por la CaM cerca de treinta veces mayor que el control positivo clorpromazina (CPZ), mientras que la ω -hidroxiemodina (**108**) casi cinco veces mayor. Por otra parte, la afinidad de la emodina (**107**) es seis veces mayor que la de ω -hidroxiemodina (**108**), lo que sugiere que la presencia del grupo hidroximetileno en la posición C-6 disminuye de manera considerable la afinidad de la antraquinona. Los demás compuestos aislados, citrinina (**67**), 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (**109**) y 8-hidroxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona (**110**) no mostraron apagamiento de la fluorescencia del biosensor empleado en este estudio indicando que no interaccionan con la CaM.

En la literatura se han descrito las numerosas actividades biológicas de la emodina (**107**) tales como antiinflamatoria, inmunosupresora, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antidiabética (Lu *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2009), sin embargo, quizá la más estudiada ha sido la actividad anticancerígena ya que es un potente inhibidor de la proliferación de diversos tipos de células cancerosas, además de inducir la apoptosis, potenciar la actividad

de fármacos antineoplásicos como la gemcitabina y el cis-platino e inhibir la metástasis (Liu *et al.*, 2011a; 2011b; Wang *et al.*, 2011). La emodina (**107**) presenta diversos blancos moleculares a través de los que ejerce su actividad antiproliferativa (Srinivas *et al.*, 2007). A continuación se discuten los más importantes:

- Impide la migración de células tumorales a través de la inhibición de las enzimas Cdc42 y Rac1 que regulan rutas de señalización del ciclo celular y de motilidad celular. Actualmente, la emodina (**107**) se encuentra en fase clínica I como un potencial agente para prevención de la metástasis en pacientes con cáncer (Palmer *et al.*, 2011).
- Inhibe la proliferación de tumores y la metástasis mediados por óxido nítrico (NO) (Damodharan *et al.*, 2011).
- Inhibe de forma indirecta a la topoisomerasa II al unirse de manera no covalente al ADN (Srinivas *et al.*, 2007).
- Disminuye los niveles del factor transcripcional NF- κ B (Huang *et al.*, 2009).
- Estimula la expresión de los genes supresores de tumores p53 y p21 lo que resulta en el arresto en la progresión de las fases G₂ a M del ciclo celular (Srinivas *et al.*, 2007).
- Inhibe la cadena de transporte de electrones mitocondrial a nivel de la ubiquinona. (Srinivas *et al.*, 2007).
- Produce especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido y un aumento en los niveles de Ca²⁺ (Srinivas *et al.*, 2007).
- Promueve la apoptosis a través de la activación de las caspasas 3 y 9 (Chang *et al.*, 2011).
- Inhibe la actividad de diversas proteínas del grupo de las cinasas entre las que destacan la CKII α , enzima que fosforila a diversas proteínas asociadas a la progresión del ciclo celular (Zou *et al.*, 2011).
- Activa al citocromo P450A1A (Srinivas *et al.*, 2007).

La alta afinidad de la emodina (**107**) por la CaM, encontrada en el presente estudio, podría estar relacionada con su efecto antitumoral. Existen estudios que demuestran que la emodina (**107**) produce una disminución en la producción de NO, sin embargo se desconoce si este efecto es consecuencia de la inhibición directa de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) o de su expresión genética (Wang *et al.*, 2002). La iNOS es una enzima constituida por un dominio N-terminal con actividad de oxigenasa conectado con un dominio C-terminal con actividad de reductasa. Ambos dominios se conectan mediante un dominio de CaM (Figura 18). La iNOS se puede unir a la forma apo-CaM u holo-CaM y su actividad es independiente de Ca^{2+} (Wu *et al.*, 2011).

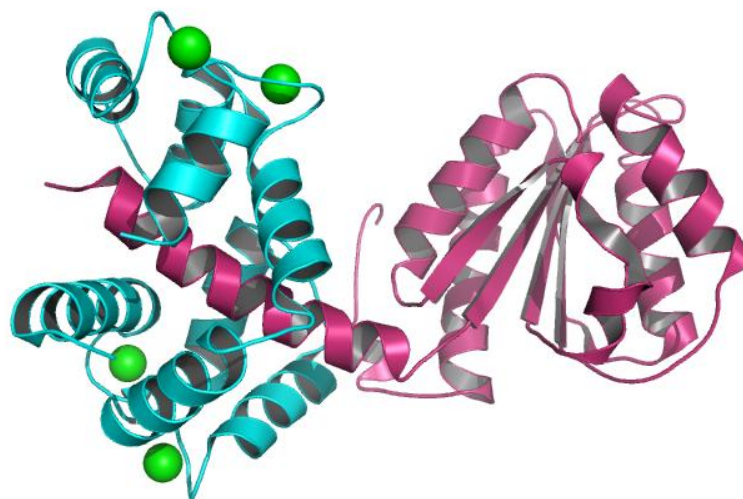


Figura 18. Complejo CaM-iNOS (en azul se representa el dominio de CaM, en rosa el dominio de iNOS) (Código PDB: 3HR4).

Es posible que la emodina (**107**) al interactuar directamente con la CaM modifique las funciones catalíticas de la iNOS y de este modo inhiba la formación de NO, radical que estimula la proliferación celular en células normales y cancerígenas (Villalobo, 2007). Sin embargo, es necesario comprobar si las dos acciones se encuentran relacionadas. Los resultados antes descritos y la información encontrada en la literatura demuestran que la emodina (**107**) es una molécula líder para la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

La emodina (**107**) es ampliamente producida por especies vegetales tales como *Rheum* sp., *Polygonum* sp., *Cassia* sp., *Aloe* sp., *Ventilago* sp. y *Rhamnus* sp., algunas de las cuales se han empleado por más de 2000 años en la medicina tradicional china para el tratamiento de numerosos padecimientos incluyendo el cáncer (Tan *et al.*, 2011). Este compuesto también es producido por una amplia variedad de hongos y líquenes (Koyama *et al.*, 2009).

5.9 Estudio de inhibición enzimática de la α -glucosidasa

Los estudios de inhibición enzimática de la α -glucosidasa de levadura por medio de un ensayo espectrofotométrico, permitieron determinar la actividad inhibidora de los compuestos aislados del extracto orgánico de *A. stromatoides*, de los cuales el único que mostró una actividad inhibidora considerable fue la ω -hidroxiemodina (**108**) por lo que se determinaron los parámetros cinéticos de la inhibición a través de un ensayo en el que se utilizaron diferentes concentraciones del sustrato (*p*-NPG) y de inhibidor (acarbosa y **108**).

En la Figura 19 se muestran las curvas de inhibición enzimática del control positivo (acarbosa) y del compuesto **108** así como los gráficos de Dixon para determinar si los compuestos evaluados son inhibidores competitivos o no competitivos. Se puede apreciar que ambos compuestos son inhibidores competitivos de la α -glucosidasa. Los ajustes permitieron determinar las constantes de inhibición competitivas (K_{ic}) de la acarbosa y de la ω -hidroxiemodina (**108**), resultando de 0.326 ± 0.037 mM ($R^2 = 0.99$) y 0.057 ± 0.004 mM ($R^2 = 0.98$), respectivamente. Estos resultados demuestran que el producto **108**, un derivado de la emodina, produce una inhibición de la α -glucosidasa de levadura casi seis veces mayor que el fármaco prototipo empleado en el tratamiento de la diabetes mellitus.

En la literatura existen algunos reportes acerca de las propiedades antidiabéticas de la emodina (**107**) y sus derivados e indican que estas antraquinonas disminuyen de manera significativa los niveles de glucosa en sangre en ratones y mejoran la tolerancia a la glucosa (Xie y Du, 2011).

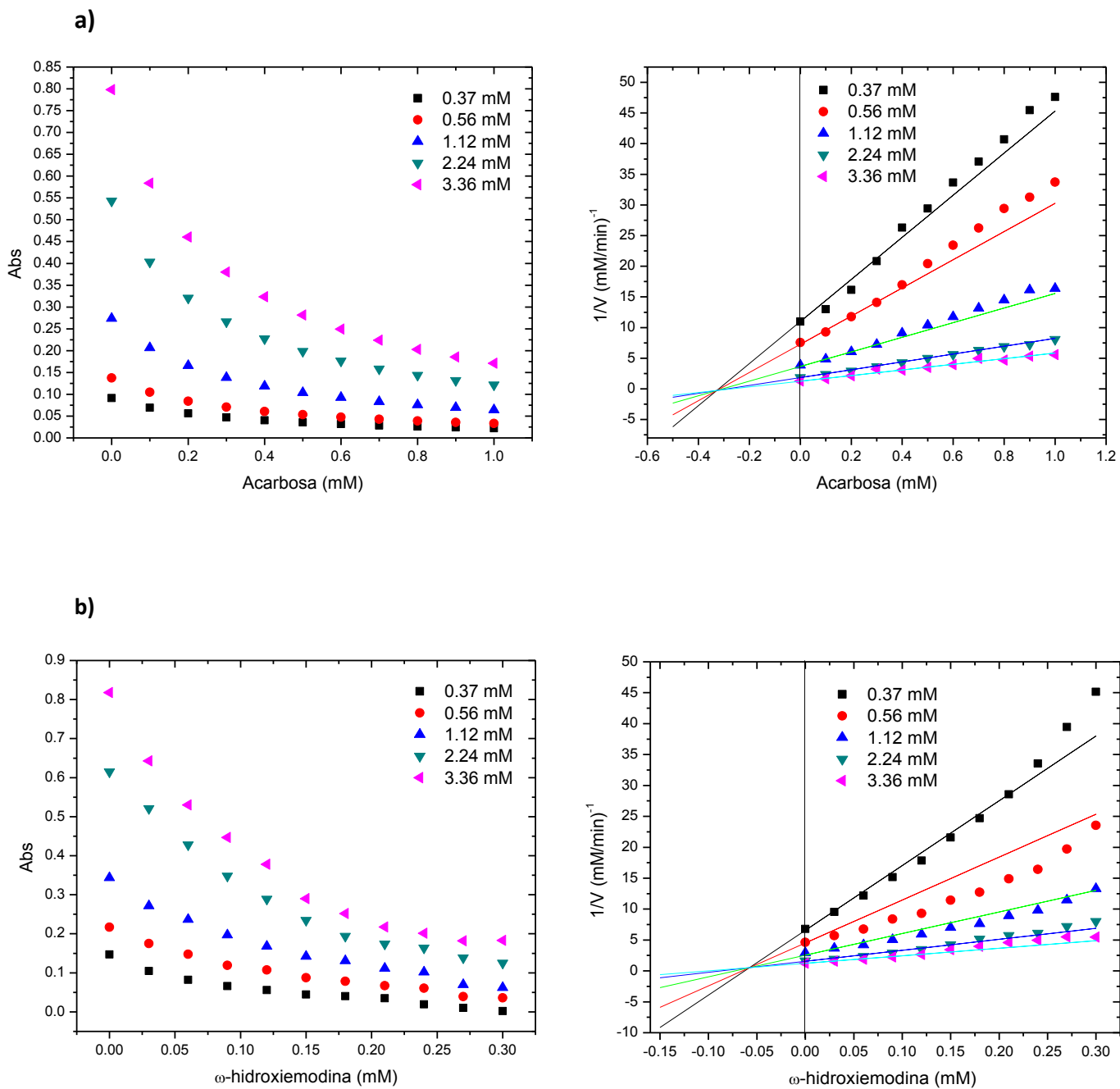


Figura 19. Curvas de inhibición enzimática y gráficos de Dixon para el cálculo de los parámetros cinéticos de inhibición de la α -glucosidasa para **a)** acarbose y **b)** ω -hidroxiemodina (108).

5.10 Estudios de acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una herramienta computacional que permite estimar de manera teórica la asociación de un receptor con un ligando así como predecir el sitio ideal de la unión. Por medio de una parametrización energética, esta técnica permite obtener las constantes teóricas de unión o afinidad (K_i) entre el ligando y la macromolécula y es ampliamente utilizada para predecir las interacciones de fármacos potenciales con sus blancos moleculares y de esta manera complementar el estudio de sus mecanismos de acción. Asimismo, constituyen una herramienta muy útil para el diseño racional de fármacos ya que nos permite entender los factores estructurales que modifican los parámetros de unión (Cavasotto y Orry, 2007)

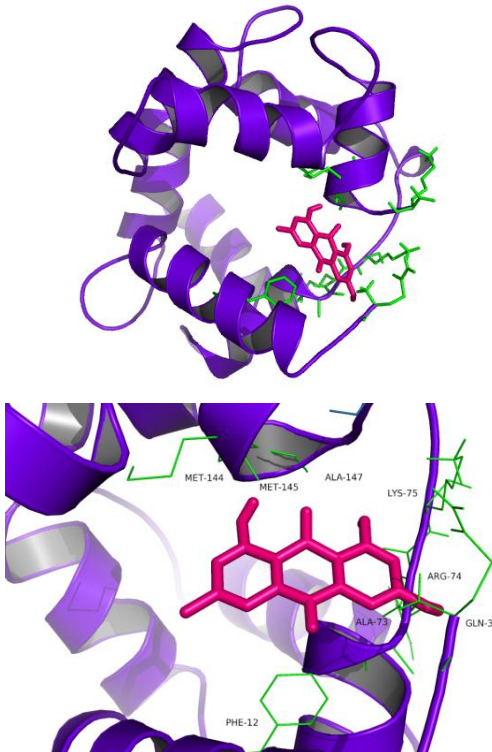
En el presente trabajo, se realizaron los estudios de acoplamiento molecular de los productos bioactivos de *A. stromatoides* con la finalidad de complementar los resultados experimentales obtenidos de los estudios de apagamiento de la fluorescencia del biosensor *hCaM M124C-mBBr* y de inhibición enzimática de α -glucosidasa.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando las estructuras tridimensionales de ambas proteínas (CaM y α -glucosidasa) y siguiendo la metodología descrita en la sección experimental. De esta forma, para cada ligando analizado, se obtuvieron los principales sitios de interacción con la proteína (grupos totales), el número de veces que el ligando interacciona con cada sitio, la energía libre de unión estimada (kcal/mol), la constante de inhibición estimada (K_i) y los residuos de aminoácidos con los que se lleva a cabo la interacción.

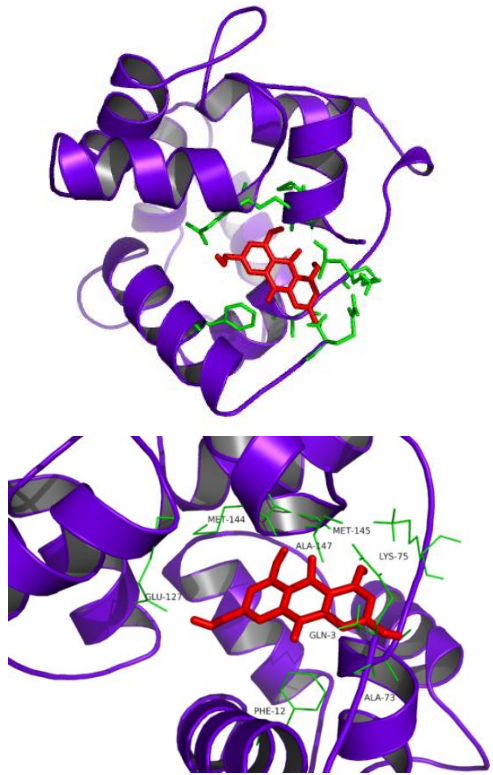
5.10.1 Acoplamiento molecular con CaM

En el Cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos del acoplamiento molecular con CaM para cada ligando analizado.

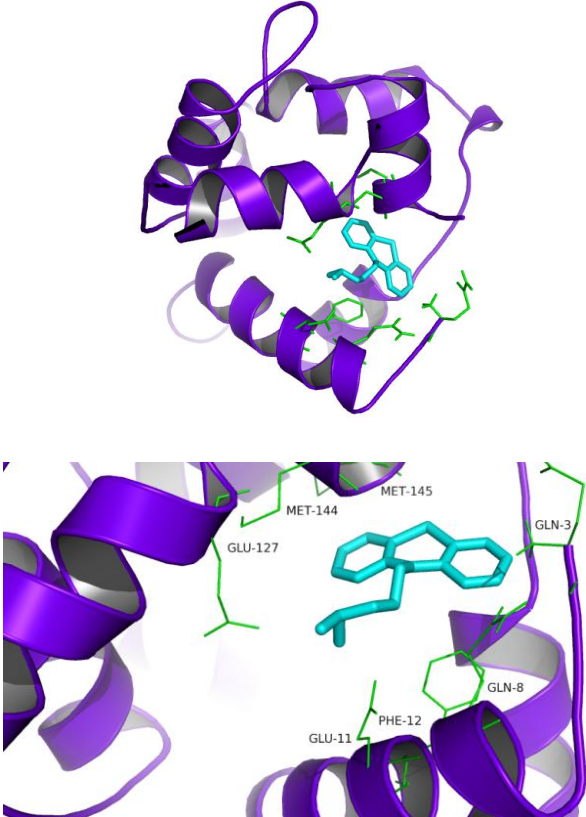
Cuadro 4. Parámetros e información sobre la interacción de los productos fúngicos **107**, **108** y **CPZ** con la CaM generados del estudio de acoplamiento molecular.

Ligando	Energía libre de unión (kcal/mol)	K_i (μM)	Residuos involucrados en la interacción	Modelo de acoplamiento
107	-7.27	4.66	Gln3, Phe12, Ala73*, Arg74*, Lys75, Met144*, Met145, y Ala147 (*Enlaces de H)	

Cuadro 4. Parámetros e información sobre la interacción de los productos fúngicos **107**, **108** y **CPZ** con la CaM generados del estudio de acoplamiento molecular (continuación).

Ligando	Energía libre de unión (kcal/mol)	K_i (μM)	Residuos involucrados en la interacción	Modelo de acoplamiento
108	-7.2	5.26	Gln3, Phe12, Ala73*, Arg74*, Lys75, Glu127, Met144*, Met145 y Ala147 (*Enlaces de H)	

Cuadro 4. Parámetros e información sobre la interacción de los productos fúngicos **107**, **108** y **CPZ** con la CaM generados del estudio de acoplamiento molecular (continuación).

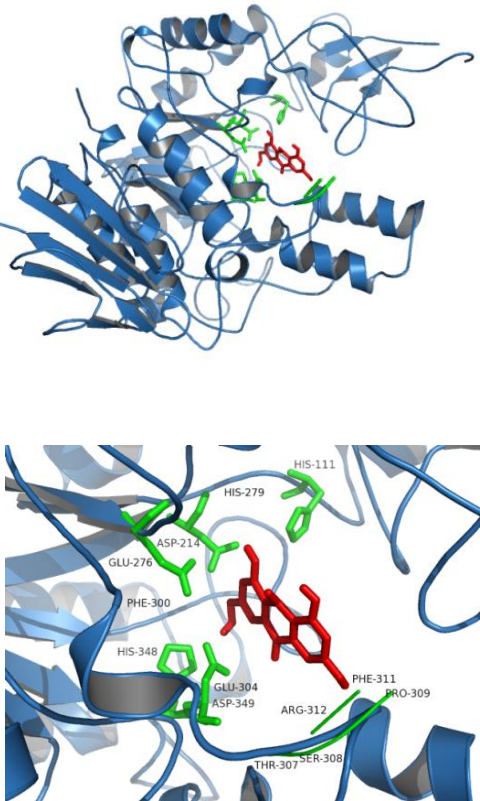
Ligando	Energía libre de unión (kcal/mol)	K_i (μM)	Residuos involucrados en la interacción	Modelo de acoplamiento
CPZ	-7.38	3.87	Gln3, Gln8, Glu11, Phe12, Glu127*, Met144* y Met145 (*Enlaces de H)	

Los resultados obtenidos permiten predecir que la emodina (**107**) y la ω -hidroxiemodina (**108**) se unen en el mismo sitio que el inhibidor clásico CPZ. Ambas antraquinonas, forman tres enlaces de hidrógeno con los residuos alanina⁷³, arginina⁷⁴ y metionina¹⁴⁴, mientras que la CPZ forma dos enlaces de hidrógeno con los residuos de ácido glutámico¹²⁷ y metionina¹⁴⁴, coincidiendo sólo ésta última con uno de los puntos de unión de las antraquinonas. Los resultados obtenidos de las constantes teóricas de unión (K_i) muestran que la CPZ presenta una afinidad similar por la CaM que las antraquinonas, sin embargo, los datos experimentales demuestran que la emodina se une con una mejor afinidad. El nivel de cálculo realizado en el presente trabajo no permite explicar estas diferencias.

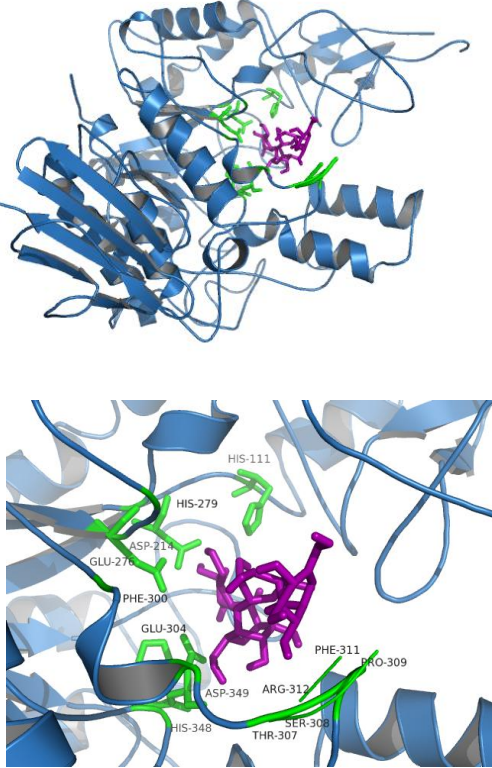
5.10.2 Acoplamiento molecular con α -glucosidasa

En el caso de los resultados obtenidos en los estudios de acoplamiento molecular con α -glucosidasa de levadura, fue posible predecir el sitio de unión tanto de la ω -hidroxiemodina (**108**) como de la acarbosa; ambos compuestos se unen en el sitio catalítico de la enzima, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en los experimentos de cinética de inhibición que permitieron comprobar que son inhibidores competitivos. Las constantes de unión teóricas indican que la ω -hidroxiemodina (**108**) se une con mejor afinidad a la enzima. En el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

Cuadro 5. Parámetros e información sobre la interacción del producto fúngico **108** y acarbosa con la α -glucosidasa generados del estudio de acoplamiento molecular.

Ligando	Energía libre de unión (kcal/mol)	K_i (μ M)	Residuos involucrados en la interacción	Modelo de acoplamiento
108	-6.72	11.9	Phe157, Asp214, Thr215*, Asp349*, Arg439, Asp408* (*Enlaces de H)	

Cuadro 5. Parámetros e información sobre la interacción del producto fúngico **108** y acarbosa con la α -glucosidasa generados del estudio de acoplamiento molecular (continuación).

Ligando	Energía libre de unión (kcal/mol)	K_i (μ M)	Residuos involucrados en la interacción	Modelo de acoplamiento
Acarbosa	-4.29	712.63	Phe300, Glu304, His279, Arg312, Phe311, Pro309*, Thy307* y Ser308* (*Enlaces de H)	

6. CONCLUSIONES

- El estudio químico del extracto orgánico obtenido a partir de *Aspergillus stromatoides* condujo al aislamiento y caracterización de cinco productos previamente descritos en la literatura: la micotoxina citrinina (**67**) como compuesto mayoritario; dos compuestos de tipo antraquinona, la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (**107**) y la 1,3,8-trihidroxi-6-(hidroximetil)-antraquinona (**108**); un compuesto con núcleo xantona caracterizado como 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (**109**); y finalmente la cromona 8-hidoxi-6-metil-2,3-dihidrociclopenta[*b*]cromen-1,9-diona (**110**).
- De acuerdo a los estudios de apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM, las antraquinonas **107** y **108** se unen de manera directa a la proteína con afinidades en el orden nanomolar (K_d de 46.6 y 279.3 nM, respectivamente). La emodina (**107**) fue seis veces más afín que el derivado **108** indicando que el grupo hidroximetileno en la posición C-6 afecta de manera importante la unión de este tipo de productos a la CaM. Del mismo modo, la emodina (**107**) presentó una afinidad treinta veces mayor que el inhibidor clásico CPZ (K_d de 1.2 μ M). Por otro lado, los estudios de acoplamiento molecular permitieron predecir el sitio de unión de los ligandos a la CaM e indicaron que la emodina (**107**) se une a la proteína en el mismo sitio que los inhibidores clásicos. Estos resultados, así como la información encontrada en la literatura sustentan el potencial de la emodina (**107**) para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.
- Los estudios de inhibición enzimática demostraron que la ω -hidroxiemodina (**108**) es un inhibidor competitivo de la α -glucosidasa con una K_{ic} de 0.057 mM, casi seis veces mejor que el fármaco prototipo acarbosa (K_{ic} de 0.326 mM). De igual manera, los estudios de acoplamiento molecular indicaron que ambos inhibidores se unen en el sitio catalítico de la enzima. Estos resultados permiten proponer a la

ω -hidroxiemodina (**108**) como un prototipo estructural para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.

- La información científica originada en el presente trabajo constituye una contribución al conocimiento químico y biológico del género *Aspergillus* y es importante destacar que este estudio representa la primera investigación sobre el metabolismo secundario del ascomiceto *Aspergillus stromatoides*.
- Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación demuestran que los microorganismos marinos, en particular las especies fúngicas, son una valiosa fuente de metabolitos biodinámicos de interés para el tratamiento de enfermedades de alta prevalencia mundial como el cáncer y la diabetes mellitus tipo II.

7. PERSPECTIVAS

- Aislar y caracterizar a los metabolitos minoritarios presentes en el extracto orgánico de la especie fúngica *Aspergillus stromatoides* con el objetivo de completar el perfil metabólico de la especie.
- Resolver la estructura cristalográfica del complejo emodina-Ca²⁺/CaM con la finalidad de corroborar de manera experimental el sitio de unión de la antraquinona **107**.
- Determinar la actividad citotóxica de los compuestos fúngicos obtenidos contra diversas líneas celulares de cáncer con la finalidad de complementar los resultados obtenidos de esta investigación y comprobar si la interacción ligando-CaM está implicada en los procesos de proliferación celular.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Akiyama, K., S. Teraguchi, Y. Hamasaki, M. Mori, K. Tatsumi, K. Ohnishi y H. Hayashi. (2003). "New dimeric naphthopyrones from *Aspergillus niger*." Journal of Natural Products **66**(1): 136-139.
- ❖ Alberts, A. W. (1988). "Discovery, biochemistry and biology of lovastatin." The American Journal of Cardiology **62**(15): 10J-15J.
- ❖ Antia, B. S., T. Aree, C. Kasettrathat, S. Wiyakrutta, O. D. Ekpa, U. J. Ekpe, C. Mahidol, S. Ruchirawat y P. Kittakoop. (2011). "Itaconic acid derivatives and diketopiperazine from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus* CRI322-03." Phytochemistry **72**(8): 816-820.
- ❖ Antony, M., Y. Shukla y K. K. Janardhanan. (2003). "Potential risk of acute hepatotoxicity of kodo poisoning due to exposure to cyclopiazonic acid." Journal of Ethnopharmacology **87**(2-3): 211-214.
- ❖ Asano, N. (2003). "Naturally occurring iminosugars and related compounds: Structure, distribution, and biological activity." Current Topics in Medicinal Chemistry **3**(5): 471-484.
- ❖ Asano, N., K. Ikeda, M. Takahashi, M. Nashida, M. Miyauchi, H. Kizu, Y. Kameda, M. Arisawa, A. A. Watson, R. J. Nash y G. W. Fleet. (2000). "Homonojirimycin analogues and their glucosides from *Lobelia sessilifolia* and *Adenophora* spp. (Campanulaceae)." Carbohydrate Research **323**(1-4): 73-80.
- ❖ Asano, N., M. Nishida, A. Kato, H. Kizu, K. Matsui, Y. Shimada, T. Itoh, M. Baba, A. A. Watson, R. J. Nash, P. M. Q. Lilley, D. J. Watkin y G. W. J. Fleet. (1998). "Homonojirimycin isomers and *N*-alkylated homonojirimycins: Structural and conformational basis of inhibition of glycosidases." Journal of Medicinal Chemistry **41**(14): 2565-2571.
- ❖ Asano, N., K. Oseki, E. Tomioka, H. Kizu y K. Matsui. (1994). "N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities." Carbohydrate Research **259**(2): 243-255.
- ❖ Asano, N., T. Yamashita, K. Yasuda, H. Kizu, Y. Kameda, A. A. Watson, R. J. Nash y G. W. J. Fleet. (2002). "New polyhydroxylated pyrrolidine, piperidine, and pyrrolizidine alkaloids from *Scilla sibirica*." Journal of Natural Products **65**(12): 1875-1881.

- ❖ Bennett, J. W. y M. Klich. (2003). "Mycotoxins." Clinical Microbiology Reviews **16**(3): 497-516.
- ❖ Bermejo, M., I. Gonzalez-Alvarez, M. Gonzalez-Alvarez, D. Oltra-Noguera, V. Merino, N. Tokesi y J. Ovadi. (2009). "Unique pharmacology of KAR-2, a potential anti-cancer agent: Absorption modelling and selective mitotic spindle targeting." European Journal of Pharmaceutical Sciences **36**(1): 11-19.
- ❖ Berridge, M. J. (2004). "Calcium signal transduction and cellular control mechanisms." Biochimica et Biophysica Acta **1742**(1-3): 3-7.
- ❖ Bohnert, M., B. Wackler y D. Hoffmeister. (2010). "Spotlights on advances in mycotoxin research." Applied Microbiology and Biotechnology **87**(1): 1-7.
- ❖ Brindis, F., R. Rodriguez, R. Bye, M. Gonzalez-Andrade y R. Mata. (2011). "(Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor." Journal of Natural Products **74**(3): 314-320.
- ❖ Carvalho, I., E. B. de Melo y A. S. Gomes. (2006). " α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity." Tetrahedron **62**(44): 10277-10302.
- ❖ Cavasotto, C. N. y A. J. W. Orry. (2007). "Ligand docking and structure-based virtual screening in drug discovery." Current Topics in Medicinal Chemistry **7**(10): 1006-1014.
- ❖ Coleman, C. I., O. J. Phung, N. A. Sood y B. E. Sill. (2011). "Oral anti-diabetic drugs for the prevention of type 2 diabetes." Diabetic Medicine **28**(8): 948-964.
- ❖ Chang, C. H., F. Y. Yu, T. S. Wu, L. T. Wang y B. H. Liu. (2011). "Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2/M arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells." Toxicological Sciences: **119**(1): 84-92.
- ❖ Charpentreau, M., K. Jaworski, B. C. Ramirez, A. Tretyn, R. Ranjeva y B. Ranty. (2004). "A receptor-like kinase from *Arabidopsis thaliana* is a calmodulin-binding protein." The Biochemical Journal **379**(Pt 3): 841-848.
- ❖ Choi, E. J., J. S. Park, Y. J. Kim, J. H. Jung, J. K. Lee, H. C. Kwon y H. O. Yang. (2011). "Apoptosis-inducing effect of diketopiperazine disulfides produced by *Aspergillus* sp. KMD 901 isolated from marine sediment on HCT116 colon cancer cell lines." Journal of Applied Microbiology **110**(1): 304-313.

- ❖ Choi, K. S., K. H. Kho y M. Morisawa. (2004). "Role of Ca²⁺ and calmodulin on the initiation of sperm motility in salmonid fishes." Journal of Microbiology and Biotechnology **14**(3): 456-465.
- ❖ Damodharan, U., Ganesan R., y U. C. Radhakrishnan. (2011). Expression of MMP2 and MMP9 (Gelatinases A and B) in human colon cancer cells. Applied Biochemistry and Biotechnology.
- ❖ Dhillon, N. K., S. Sharma y G. K. Khuller. (2003). "Influence of W-7, a calmodulin antagonist on phospholipid biosynthesis in *Candida albicans*." Letters in Applied Microbiology **36**(6): 382-386.
- ❖ Dong, H. Q., M. Li, F. Zhu, F. L. Liu y J. B. Huang. (2012). "Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes." Food Chemistry **130**: 261-266.
- ❖ Dotto, G. P. (2011). "Calcineurin signaling as a negative determinant of keratinocyte cancer stem cell potential and carcinogenesis." Cancer Research **71**(6): 2029-2033.
- ❖ Douglass, P. M., L. L. E. Salins, E. Dikici y S. Daunert. (2002). "Class-Selective drug detection: fluorescently-labeled calmodulin as the biorecognition element for phenothiazines and tricyclic antidepressants." Bioconjugate Chemistry **13**(6): 1186-1192.
- ❖ Du, L., T. Zhu, H. Liu, Y. Fang, W. Zhu y Q. Gu. (2008). "Cytotoxic polyketides from a marine-derived fungus *Aspergillus glaucus*." Journal of Natural Products **71**(11): 1837-1842.
- ❖ Dumont, F. J. (2001). "Immunosuppressive strategies for prevention of transplant rejection." Expert Opinion on Therapeutic Patents **11**(3): 377-404.
- ❖ Duran, R. M., J. W. Cary y A. M. Calvo. (2007). "Production of cycloiazonic acid, aflatoxin, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation." Applied Microbiology and Biotechnology **73**(5): 1158-1168.
- ❖ Fantus, I. G. y A. Y. Y. Cheng. (2005). "Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus." Canadian Medical Association Journal **172**(2): 213-226.
- ❖ Fatmawati, S., K. Shimizu y R. Kondo. (2010). "Ganoderol B: A potent α -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*." Phytomedicine **18**(12): 1053-1055.

- ❖ Feizy, J., S. S. F. Janati, H. R. Beheshti y N. K. Fahim. (2011). "Aflatoxins and ochratoxinin A in bean from Iran." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **87**(2): 194-197.
- ❖ Figueroa, M., M. Gonzalez-Andrade, A. Sosa-Peinado, A. Madariaga-Mazón, F. Del Rio-Portilla, M. C. González y R. Mata. (2011). "Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin." Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry **26**(3): 378-385.
- ❖ Fischer, P. M. y D. P. Lane. (2000). "Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics." Current Medicinal Chemistry **7**(12): 1213-1245.
- ❖ Frankfurt, O. S., E. V. Sugarbaker, J. A. Robb y L. Villa. (1995). "Synergistic induction of apoptosis in breast-cancer cells by tamoxifen and calmodulin inhibitors." Cancer Letters **97**(2): 149-154.
- ❖ Frisvad, J. C., J. Smedsgaard, R. A. Samson, T. O. Larsen y U. Thrane. (2007). "Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(23): 9727-9732.
- ❖ Fujimoto, H., M. Inagaki, Y. Satoh, E. Yoshida y M. Yamazaki. (1996). "Monoamine oxidase-inhibitory components from an ascomycete, *Coniochaeta tetraspora*." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **44**(5): 1090-1092.
- ❖ Fujimoto H., E. Nakamura, E. Okuyama y M. Ishibashi. (2004). "Six immunosuppressive features from an ascomycete, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **52**(8) 1005-1008.
- ❖ Fusetani, N., Y. Nakao, T. Maki, S. Matsunaga y R. W. M. van Soest. (2000). "Penarolide sulfates A(1) and A(2), new α -glucosidase inhibitors from a marine sponge *Penares* sp." Tetrahedron **56**(46): 8977-8987.
- ❖ Fusetani, N., Y. Nakao, T. Uehara, S. Matunaga y R. W. M. van Soest. (2002). "Callyspongynic acid, a polyacetylenic acid which inhibits α -glucosidase, from the marine sponge *Callyspongia truncata*." Journal of Natural Products **65**(6): 922-924.
- ❖ Ge, H. M., Z. G. Yu, J. Zhang, J. H. Wu y R. X. Tan. (2009). "Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*." Journal of Natural Products **72**(4): 753-755.
- ❖ Gonzalez-Andrade, M., M. Figueroa, R. Rodriguez-Sotres, R. Mata y A. Sosa-Peinado. (2009). "An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein." Analytical Biochemistry **387**(1): 64-70.

- ❖ Gugnani, H. C. (2003). "Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli." Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library **8**: s346-357.
- ❖ Gunatilaka, A. A. L., J. X. Zhan, G. M. Gunaherath y E. M. Wijeratne. (2007). "Asperpyrone D and other metabolites of the plant-associated fungal strain *Aspergillus tubingensis*." Phytochemistry **68**(3): 368-372.
- ❖ Hakamata, W., M. Kurihara, H. Okuda, T. Nishio y T. Oku. (2009). "Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitors based on enzymological information." Current Topics in Medicinal Chemistry **9**(1): 3-12.
- ❖ Harvey, A. L. (2008). "Natural products in drug discovery." Drug Discovery Today **13**(19-20): 894-901.
- ❖ He, J., E. M. Wijeratne, B. P. Bashyal, J. Zhan, C. J. Seliga, M. X. Liu, E. E. Pierson, L. S. Pierson H. D. VanEtten y A. A. Gunatilaka. (2004). "Cytotoxic and other metabolites of *Aspergillus* inhabiting the rhizosphere of Sonoran desert plants." Journal of Natural Products **67**(12): 1985-1991.
- ❖ Heperkan, D., F. K. Guler y H. I. Oktay. (2011). "Mycoflora and natural occurrence of aflatoxin, cyclopiazonic acid, fumonisin and ochratoxin A in dried figs." Food Control xxx. P. 1-5.
- ❖ Hirata, K., S. Kataoka, S. Furutani, H. Hayashi y K. Matsuda. (2011). "A fungal metabolite asperparaline A strongly and selectively blocks insect nicotinic acetylcholine receptors: The first report on the mode of action." PLoS ONE **6**(4): Article number e18354
- ❖ Huang, R., X. Zhou, T. Xu, X. Yang y Y. Liu. (2010). "Diketopiperazines from marine organisms." Chemistry & Biodiversity **7**(12): 2809-2829.
- ❖ Ingavat, N., J. Dobereiner, S. Wiyakrutta, C. Mahidol, S. Ruchirawat y P. Kittakoop. (2009). "Aspergillusol A, an α -glucosidase inhibitor from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus*." Journal of Natural Products **72**(11): 2049-2052.
- ❖ Ireland, C. M. y T. S. Bugni. (2004). "Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms." Natural Product Reports **21**(1): 143-163.
- ❖ Ishikawa, K., T. Hosoe, T. Itabashi, D. Wakana, K. Takizawa T. Yaguchi y K. Kawai. (2010). "Novoamauromine and ent-cycloechinulin: Two new diketopiperazine derivatives from *Aspergillus novofumigatus*." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **58**(5): 717-719

- ❖ Jagadeesh, S., T. Padma, H. Parimala, K. H. Chandramouli, C. J. D'Souza y K. N. Thimmaiah. (2006). "Inhibition of calmodulin-dependent cyclic AMP phosphodiesterase by phenoxazines." Biochemical and Biophysical Research Communications **342**(3): 690-701.
- ❖ Junker, J. P. y M. Rief. (2009). "Single-molecule force spectroscopy distinguishes target binding modes of calmodulin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(34): 14361-14366.
- ❖ Kachi, H. y T. Sassa. (1986). "Isolation of moniliphenone, a key intermediate in xantone biosynthesis from *Monilinia fructicola*." Agricultural and Biological Chemistry **50**(6): 1669-1671.
- ❖ Kahl, C. R. y A. R. Means. (2003). "Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways." Endocrine Reviews **24**(6): 719-736.
- ❖ Kamei, K. y A. Watanabe. (2005). "*Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host." Medical Mycology : Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology **43**(1): S95-99.
- ❖ Kato, E., N. Iwano, A. Yamada y J. Kawabata. (2011). "Synthesis and α -amylase inhibitory activity of glucose-deoxynojirimycin conjugates". Tetrahedron **67**(40): 7692-7702
- ❖ Kawabata, J., K. Mizuhata, E. Sato, T. Nishioka, Y. Aoyama y T. Kasai. (2003). "6-hydroxyflavonoids as α -glucosidase inhibitors from marjoram (*Origanum majorana*) leaves." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **67**(2): 445-447.
- ❖ Kensler, T. W., B. D. Roebuck, G. N. Wogan y J. D. Groopman. (2011). "Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology." Toxicological Sciences **120** (1): S28-48.
- ❖ Keusgen, M. (2002). "Biosensors: a new approaches in drug discovery". Naturwissenschaften **89**(10): 433-444
- ❖ Kjer, J., A. Debbab, A. H. Aly y P. Proksch. (2010). "Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products." Nature Protocols **5**(3): 479-490.
- ❖ Klaric, M. S., D. Zeljezic, L. Rumora, M. Peraica, S. Pepeljnjak y A. M. Domijan. (2011). "A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin." Archives of Toxicology.

- ❖ Kong, W. J., J. B. Wang, C. Jin, Y. L. Zhao, C. M. Dai, X. H. Xiao y Z. L. Li. (2009). "Effect of emodin on *Candida albicans* growth investigated by microcalorimetry combined with chemometric analysis." Applied Microbiology and Biotechnology **83**(6): 1183-1190.
- ❖ Kovesi, I., D. K. Menyhard, M. Laberge y J. Fidy. (2008). "Interaction of antagonists with calmodulin: insights from molecular dynamics simulations." Journal of Medicinal Chemistry **51**(11): 3081-3093.
- ❖ Krohn, K., S. F. Kouam, G. M. Kuigoua, H. Hussain, S. Cludius-Brandt, U. Florke, T. Kurtan, G. Pescitelli, L. Di Bari, S. Draeger y B. Schulz. (2009). "Xanthones and oxepino[2,3-*b*]chromones from three endophytic fungi." Chemistry A European Journal **15**(44): 12121-12132.
- ❖ Kupfahl, C., A. Michalka, C. Lass-Flörl, G. Fischer, G. Haase, T. Ruppert, G. Geginat y H. Hof. (2008). "Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains." International Journal of Medical Microbiology **298**(3-4): 319-327.
- ❖ Leung, P. C., W. A. Taylor, J. H. Wang y C. L. Tipton. (1984). "Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin." The Journal of Biological Chemistry **259**(5): 2742-2747.
- ❖ Li, S. F., Y. T. Di, Y. H. Wang, C. J. Tan, X. Fang, Y. Zhang, Y. T. Zheng, L. Li, H. P. He, S. L. Li y X. J. Hao. (2010). "Anthraquinones and lignans from *Cassia occidentalis*." Helvetica Chimica Acta **93**(9): 1795-1802.
- ❖ Lin, W. H., H. B. Liu, E. E. RuAngelie, E. Rainer, Y. Wang, B. Schulz, S. Draeger, W. E. G. Müller, V. Wray y P. Proksch. (2011). "Ophiobolin sesterterpenoids and pyrrolidine alkaloids from the sponge-derived fungus *Aspergillus ustus*." Helvetica Chimica Acta **94**(4): 623-631.
- ❖ Lin, Z., T. Zhu, Y. Fang y Q. Gu. (2008). "¹H and ¹³C NMR assignments of two new indolic enamide diastereomers from a mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp." Magnetic Resonance in Chemistry **46**(12): 1212-1216.
- ❖ Liu, A., H. Chen, W. Wei, S. Ye, W. Liao, J. Gong, Z. Jiang, L. Wang y S. Lin. (2011a). "Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic cancer." Oncology Reports **26**(1): 81-89.
- ❖ Liu, A., H. Chen, H. Tong, S. Ye, M. Qiu, Z. Wang, W. Tan, J. Liu y S. Lin. (2011b). "Emodin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in pancreatic cancer cells via inhibition of nuclear factor-KB." Molecular Medicine Reports **4**(2): 221-227.

- ❖ Lopez-Diaz, T. M. y B. Flannigan. (1997). "Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat." International Journal of Food Microbiology **35**(2): 129-136.
- ❖ Lopez-Gresa, M. P., N. Cabedo, M. C. Gonzalez-Mas, M. L. Ciavatta, C. Avila y J. Primo. (2009). "Terretonins E and F, inhibitors of the mitochondrial respiratory chain from the marine-derived fungus *Aspergillus insuetus*." Journal of Natural Products **72**(7): 1348-1351.
- ❖ Lu, Y., J. H. Yang, K. Hwangbo, S. L. Hwang, Y. Taketomi, M. Murakami, Y. C. Chang, C. H. Kim, J. K. Son y H. W. Chang. (2011). "Emodin, a naturally occurring anthraquinone derivative, suppresses IgE-mediated anaphylactic reaction and mast cell activation." Biochemical Pharmacology **82**(11): 1700-1708
- ❖ Machida, M. y K. Gomi. (2010). "*Aspergillus* Molecular Biology and Genomics". Caister Academic Press: Norfolk, Inglaterra. Capitulo 1, pp. 1-17. ISBN: 978-1-904455-53-0.
- ❖ Macías, M. (2001). Metabolitos fitotóxicos del hongo coprófilo *Guanomyces polytrix* como una fuente potencial de compuestos herbicidas con una actividad sobre la proteína calmodulina y la enzima NAD cinasa dependiente de calmodulina. México D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. **Tesis de doctorado**.
- ❖ Macias, M., A. Gamboa, M. Ulloa, R. A. Toscano y R. Mata. (2001). "Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polytrix*." Phytochemistry **58**(5): 751-758.
- ❖ Mahmud, T. (2003). "The C₇N aminocyclitol family of natural products." Natural Product Reports **20**(1): 137-166.
- ❖ Maresca, M. y J. Fantini. (2010). "Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases." Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology **56**(3): 282-294.
- ❖ Marinho, A. M. R. y E. Rodrigues-Fo. (2011). "Dicitrinol, a citrinin dimer, produced by *Penicillium janthinellum*." Helvetica Chimica Acta **94**(5): 835-841.
- ❖ Martinez-Luis, S., A. Perez-Vasquez, R. Mata. (2007). "Natural products with calmodulin inhibitor properties." Phytochemistry **68**(14): 1882-1903.
- ❖ Mata, R., M. Figueroa, M. del C. Gonzalez, R. Rodríguez-Sotres, A. Sosa-Peinado, M. Gonzalez-Andrade y C. M. Cerda-Garcia-Rojas. (2009). "Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp." Bioorganic & Medicinal Chemistry **17**(6): 2167-2174.

- ❖ Mata, R., A. Gamboa, M. Macias, S. Santillan, M. Ulloa y M. del C. Gonzalez. (2003). "Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulin-dependent activity of the enzymes cAMP phosphodiesterase and NAD-kinase." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(16): 4559-4562.
- ❖ Mata, R., S. Martinez-Luis, R. Rodriguez, L. Acevedo, M. del C. Gonzalez, A. Lira-Rocha. (2006). "Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*." Tetrahedron **62**(8): 1817-1822.
- ❖ Mata, R., M. Gonzalez-Andrade, J. Rivera-Chavez, A. Sosa-Peinado, M. Figueroa y R. Rodriguez-Sotres. (2011). "Development of the fluorescent biosensor *h*Calmodulin (*h*CaM)L39C-monobromobimane(*mBBr*)/V91C-*mBBr*, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium." Journal of Medicinal Chemistry **54**(11): 3875-3884.
- ❖ Matura, H., C. Asakawa, M. Kurimoto y J. Mizutani. (2002). " α -Glucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola frondosa*." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **66**(7): 1576-1578.
- ❖ Mayur, Y. C., S. Jagadeesh y K. N. Thimmaiah. (2006). "Targeting calmodulin in reversing multi drug resistance in cancer cells." Mini Reviews in Medicinal Chemistry **6**(12): 1383-1389.
- ❖ Mehta, G. y S. Ramesh. (2005). "Polycyclitols - Novel conduritols and carbasugar hybrids as new glycosidase inhibitors." Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie **83**(6-7): 581-594.
- ❖ Merino, G., L. Gonzalez-Lobato, R. Real, J. G. Prieto y A. I. Alvarez. (2010). "Differential inhibition of murine Bcrp1/Abcg2 and human BCRP/ABCG2 by the mycotoxin fumitremorgin C." European Journal of Pharmacology **644**(1-3): 41-48.
- ❖ Miyake, Y., K. Minato, S. Fukumoto, K. Yamamoto, T. Oya-Ito, S. Kawakishi y T. Osawa. (2003). "New potent antioxidative hydroxyflavanones produced with *Aspergillus saitoi* from flavanone glycoside in citrus fruit." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **67**(7): 1443-1450.
- ❖ Molnar, A., K. Liliom, F. Orosz, B. G. Vertessy y J. Ovadi. (1995). "Anticalmodulin potency of indol alkaloids in in-vitro systems." European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section **291**(2): 73-82.

- ❖ Morris, G. M., D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew y A. J. Olson. (1998). "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function." Journal of Computational Chemistry **19**(14): 1639-1662.
- ❖ Nakanishi, S., K. Kuroda, K. Osawa y H. Kase. (1990). "Calmodulin antagonistic action of Ks-504a, a novel metabolite of the fungus *Mollisia ventosa*." Agricultural and Biological Chemistry **54**(10): 2697-2702.
- ❖ Nash, R. J., A. A. Watson, G. W. J. Fleet, N. Asano y R. J. Molyneux. (2001). "Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications." Phytochemistry **56**(3): 265-295.
- ❖ Nash, R. J., A. Kato, C. Y. Yu y G. W. Fleet. (2011). "Iminosugars as therapeutic agents: recent advances and promising trends." Future Medicinal Chemistry **3**(12): 1513-1521.
- ❖ Newman, D. J., G. M. Cragg y K. M. Snader. (2003). "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002." Journal of Natural Products **66**(7): 1022-1037.
- ❖ Newman, D. J. y G. M. Cragg. (2007). "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years." Journal of Natural Products **70**(3): 461-477.
- ❖ Nguyen, H. P., D. Zhang, U. Lee, J. S. Kang, H. D. Choi y B. W. Son. (2007). "Dehydrochlorofusarielin B, an antibacterial polyoxygenated decalin derivative from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp." Journal of Natural Products **70**(7): 1188-1190.
- ❖ Oh, K. Y., J. H. Lee, M. J. Curtis-Long, J. K. Cho, J. Y. Kim, W. S. Lee y K. H. Park. (2010). "Glycosidase inhibitory phenolic compounds from the seed of *Psoralea corylifolia*." Food Chemistry **121**(4): 940-945.
- ❖ Osawa, M., M. B. Swindells, J. Tanikawa, T. Tanaka, T. Mase, T. Furuya, M. Ikura. (1998). "Solution structure of calmodulin-W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition." Journal of Molecular Biology **276**(1): 165-176.
- ❖ Ovadi, J., F. Orosz, I. Horvath. (2006). "New anti-mitotic drugs with distinct anti-calmodulin activity." Mini-Reviews in Medicinal Chemistry **6**(10): 1145-1157.
- ❖ Pala, I., A. Srinivasan, P. J. S. Vig y D. Desai. (1999). "Modulation of calmodulin and protein kinase C activities by *Penicillium* mycotoxins." International Journal of Toxicology **18**(2): 91-96.

- ❖ Palmer, T. D., W. J. Ashby, J. D. Lewis y A. Zijlstra. (2011). "Targeting tumor cell motility to prevent metastasis." Advanced Drug Delivery Reviews **63**(8): 568-581.
- ❖ Park, H., K. Y. Hwang, K. H. Oh, Y. H. Kim, J. Y. Lee y K. Kim. (2008). "Discovery of novel α -glucosidase inhibitors based on the virtual screening with the homology-modeled protein structure." Bioorganic & medicinal chemistry **16**(1): 284-292.
- ❖ Parvatkar, R. R., C. D'Souza, A. Tripathi y C. G. Naik. (2009). "Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*." Phytochemistry **70**(1): 128-132.
- ❖ Peterson, S. W. (1995). "Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremeri* and *Wentii*, based on ribosomal DNA-sequences." Mycological Research **99**: 1349-1355.
- ❖ Peterson, S. W. (2008). "Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci." Mycologia **100**(2): 205-226.
- ❖ Pettit, G. R., J. Du, R. K. Pettit, J. C. Knight y D. L. Doubek. (2009). "Antineoplastic agents. 575. The fungus *Aspergillus phoenicis*." Heterocycles **79**(1): 909-916.
- ❖ Raper, K. B. y D. E. Fennell. (1965). "The genus *Aspergillus*". The Williams y Wilkins Co., Baltimore, Md. EU.
- ❖ Rodrigues, A. P., A. S. Carvalho, A. S. Santos, C. N. Alves, J. L. do Nascimento y E. O. Silva. (2011). "Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation." Cell Biology International **35**(4): 335-343.
- ❖ Ryu, H. W., J. K. Cho, H. J. Curtis-Long, H. J. Yuk, Y. S. Kim, S. Jung, B. W. Lee y K. H. Park. (2011). " α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of prenylated xanthenes from *Garcinia mangostana*." Phytochemistry **79**: 2148-2154
- ❖ Sacho, H., K. J. Stead, K. P. Klugman y Z. Lawrence. (1987). "Infection of the human orbit by *Aspergillus stromatoides*. Case report." Mycopathologia **97**(2): 97-99
- ❖ Sharifnabi, B., P. Rahimi, M. Bahar. (2008). "Detection of aflatoxin in *Aspergillus* species isolated from pistachio in Iran." Journal of Phytopathology **156**(1): 15-20.
- ❖ Sharma, R. K. (2003). "Diversity of calcium action in regulation of mammalian calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase." Indian Journal of Biochemistry & Biophysics **40**(2): 77-91.

- ❖ Shim, J. S., J. Lee, K. N. Kim y H. J. Kwon. (2007). "Development of a new Ca^{2+} /calmodulin antagonist and its anti-proliferative activity against colorectal cancer cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **359**(3): 747-751.
- ❖ Son, B. W., Y. Li, X. Li, S. K. Kim, J. S. Kang, H. D. Choi y J. R. Rho. (2004). "Golmaenone, a new diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **52**(3): 375-376.
- ❖ Srinivas, G. S. Babykutty, P. P. Sathiadevan y P. Srinivas. (2007). Molecular mechanism of emodin action: Transition from laxative ingredient to an antitumor agent. Medicinal Research Reviews **27**(5): 591-608.
- ❖ Takada, K., T. Uehara, Y. Nakao, S. Matsunaga, R. W. van Soest y N. Fusetani. (2004). "Schulzeines A-C, new α -glucosidase inhibitors from the marine sponge *Penares schulzei*." Journal of the American Chemical Society **126**(1): 187-193.
- ❖ Tan, W., J. Lu, M. Huang, Y. Li, M. Chen, G. Wu, J. Gong, Z. Zhong, Z. Xu, Y. Dang, J. Guo, X. Chen y Y. Wang. (2011). Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. Chinese Medicine **6**(27).
- ❖ Tepsic, K., N. Gundecimerman y J. C. Frisvad. (1997). "Growth and mycotoxin production by *Aspergillus fumigatus* strains isolated from a saltern." Fems Microbiology Letters **157**(1): 9-12.
- ❖ Tsukamoto, S., H. Kato, M. Samizo, Y. Nojiri, H. Onuki, H. Hirota y T. Ohta. (2008). "Notoamides F-K, prenylated indole alkaloids isolated from a marine-derived *Aspergillus* sp." Journal of Natural Products **71**(12): 2064-2067.
- ❖ Varga, J., E. Kevei, E. Rinyu, J. Teren y Z. Kozakiewicz. (1996). "Ochratoxin production by *Aspergillus* species." Applied and Environmental Microbiology **62**(12): 4461-4464.
- ❖ Varoglu, M. y P. Crews. (2000). "Biosynthetically diverse compounds from a saltwater culture of sponge-derived *Aspergillus niger*." Journal of Natural Products **63**(1): 41-43.
- ❖ Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele y Z. N. Berneman. (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer". Cell Proliferation **36**(3): 131-149

- ❖ Vertessy, B. G., V. Harmat, Z. Bocskei, G. Naray-Szabo, F. Orosz y J. Ovadi. (1998). "Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies." Biochemistry **37**(44): 15300-15310.
- ❖ Villalobo, A. (2007). Enhanced cell proliferation induced by nitric oxide. Dynamic Cell Biology **1**(1): 60-64.
- ❖ Wang, C. C., Y. J. Huang, L. G. Chen, L. T. Lee y L. L. Yang. (2002). Inducible nitric oxide synthase inhibitors of chinese herbs III. *Rheum palmatum*. Planta Medica **68**(10): 869-874.
- ❖ Wang, H. J., J. B. Gloer, J. A. Scott y D. Malloch. (1995). "Coniochaetones A and B: new antifungal benzopyranones from the coprophilus fungus *Coniochaeta saccardoi*." Tetrahedron Letters **36**(33): 5847-5850.
- ❖ Wang, J., Y. Huang, M. Fang, Y. Zhang, Z. Zheng, Y. Zhao y W. Su. (2002). "Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*." FEMS Immunology and Medical Microbiology **34**(1): 51-57.
- ❖ Wang, W., Y. Sun, X. Li, H. Li, Y. Chen, Y. Tian, J. Yi y J. Wang. (2011). "Emodin potentiates the anticancer effect of cisplatin on gallbladder cancer cells through the generation of reactive oxygen species and the inhibition of survivin expression." Oncology Reports **26**(5): 1143-1148.
- ❖ Wang, Z., S. Li, Q. Shi, R. Yan, G. Liu y K. Dai. (2010). "Calmodulin antagonists induce platelet apoptosis." Thrombosis Research **125**(4): 340-350.
- ❖ Wijeratne, E. M., T. J. Turbyville, Z. Zhang, D. Bigelow, L. S. Pierson, H. D. VanEtten, L. Whitesell, L. M. Canfield, A. A. Gunatilaka. (2003). "Cytotoxic constituents of *Aspergillus terreus* from the rhizosphere of *Opuntia versicolor* of the Sonoran Desert." Journal of Natural Products **66**(12): 1567-1573.
- ❖ Wiley, B. J. y D. I. Fennell. (1973). "Ascocarps of *Aspergillus stromatoides*, *A. niveus*, and *A. flavipes*." Mycologia **65**(4): 752-760.
- ❖ Withers, S. G. y B. P. Rempel. (2008). "Covalent inhibitors of glycosidases and their applications in biochemistry and biology." Glycobiology **18**(8): 570-586.
- ❖ Wu, G., V. Berka y A. L. Tsai. (2011). "Binding kinetics of calmodulin with target peptides of three nitric oxide synthase isozymes." Journal of Inorganic Biochemistry **105**(9): 1226-1237

- ❖ Xie, W. y L. Du. (2011). Diabetes is an inflammatory disease: evidence from traditional Chinese medicines. Diabetes Obesity and Metabolism **13**(4): 289-301.
- ❖ Yamamoto, K., H. Miyake, M. Kusunoki y S. Osaki. (2008). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae*." Acta Crystallographica **64**(Pt 11): 1024-1026.
- ❖ Yen, G. C., Y. C. Chang, F. Sheu y H. C. Chiang. (2001). "Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Aspergillus candidus* broth filtrate." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(3): 1426-1431.
- ❖ Yoo, I. D., W. G. Kim, K. M. Cho y C. K. Lee. (2002). "Terreulactone A, a novel meroterpenoid with anti-acetylcholinesterase activity from *Aspergillus terreus*." Tetrahedron Letters **43**(17): 3197-3198.
- ❖ Yoshikawa, M., T. Murakami, H. Shimada, H. Matsuda, J. Yamahara, G. Tanabe y O. Muraoka. (1997). "Salacinol, potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata* in Sri Lanka and India." Tetrahedron Letters **38**(48): 8367-8370.
- ❖ Yoshikawa, M., T. Murakami, K. Yashiro y H. Matsuda. (1998). "Kotalanol, a potent α -glucosidase inhibitor with thiosugar sulfonium sulfate structure, from antidiabetic ayurvedic medicine *Salacia reticulata*." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **46**(8): 1339-1340.
- ❖ Yurimoto, S., N. Hatano, M. Tsuchiya, K. Kato, T. Fujimoto, T. Masaki, R. Kobayashi y H. Tokumitsu. (2009). "Identification and characterization of wolframín, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein." Biochemistry **48**(18): 3946-3955.
- ❖ Zhang, Y., X. M. Li y B. G. Wang. (2007). "Nigerasperones A approximately C, new monomeric and dimeric naphtho-gamma-pyrones from a marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13." The Journal of Antibiotics **60**(3): 204-210.