



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Evaluación del efecto fitotóxico del extracto
orgánico de la especie fúngica *Acremonium
strictum*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
MANUEL EDUARDO RANGEL GRIMALDO



México, D.F.

2013



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: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Secretario: M. en C. Abraham Madariaga Mazón

1er. Suplente: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2do. Suplente: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 124, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor:

M. en C. Abraham Madariaga Mazón

Sustentante:

Manuel Eduardo Rangel Grimaldo

ÍNDICE

	Pagina
Lista de figuras	III
Lista de cuadros	III
Lista de tablas	IV
Lista de esquemas	IV
Lista de abreviaturas	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Uso de los herbicidas como medio de protección en la industria agroquímica, así como su importancia económica e impacto ambiental.	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Antecedentes sobre el género <i>Acremonium</i> .	7
2.2. Antecedentes sobre la especie <i>Acremonium strictum</i> .	8
2.3. Calmodulina.	12
2.3.1. Calmodulina: estructura e importancia.	12
2.3.2. Inhibición de la CaM como posible modo de acción herbicida.	15
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	18
4. PARTE EXPERIMENTAL	20
4.1. Material fúngico.	20
4.2. Fermentación preliminar en pequeña escala.	20
4.2.1. Preparación de los medios de cultivo.	20
4.3. Fermentación en mediana escala.	21
4.4. Obtención de extractos orgánicos a partir de los cultivos preparados.	21
4.5. Métodos cromatográficos.	22
4.6. Registro de las contantes espectroscópicas.	23

ÍNDICE (continuación)

4.7. Fraccionamiento del extracto orgánico.	24
4.8. Separación de los metabolitos activos presentes en FVI.	24
4.9. Ensayos biológicos.	27
4.9.1. Evaluación del potencial fitotóxico.	27
4.9.2. Determinación del efecto fitotóxico por el método de la bioautografía.	28
4.9.3. Ensayo de fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor fluorescente (<i>hCaM M124C-mBBR</i>).	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1. Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de los metabolitos de interés.	30
5.2. Fermentación en mediana escala.	31
5.3. Aislamiento de los metabolitos activos presentes en el extracto.	31
5.4. Evaluación de las propiedades sobre la CaM.	35
5.5. Análisis preliminar de los espectros de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C del compuesto BFVI.1.	37
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	45
7. BIBLIOGRAFÍA	46

Lista de figuras

Figura		Página
1	Cultivo en medio PDA de <i>Acremonium strictum</i> .	9
2	Compuestos aislados de la especie <i>Acremonium strictum</i> .	10
3	Estructura tridimensional de la CaM sin el ion Ca^{2+} (código PDB 1CFD) (a) y cambio conformacional provocado por la unión al ion Ca^{2+} (código PDB 1CLL) (b) .	13
4	Compuestos de origen fúngico con actividad sobre la CaM.	16
5	Vista lateral (a) y vista frontal (b) de la bioautografía de la fracción de ACN/MeOH. Gel de sílice; CH_2Cl_2 -MeOH (95:5)	33
6	Cromatograma de líquidos de la fracción FVI. Fase móvil: gradiente ACN (0.1% HCOOH, A):H ₂ O (B) [0 min, 70% A; 4 min, 65% A; 10 min, 80% A; 15 min, 70% A]; flujo: 0.4 mL/min; columna Purosphere®STAR RP-18e (5 μm , 4.6 x 250 mm); detección: 225 nm.	34
7	Ensayo de apagamiento de la fluorescencia del biosensor fluorescente <i>hCaMM124C-mBB_r</i> , de la fracción ACN/MeOH (a), fracción FVI (b) y el producto aislado BFVI.1 (c).	36
8	Espectro de RMN- ¹ H del metabolito BFVI.1.	39
9	Espectro de RMN- ¹³ C del metabolito BFVI.1.	40
10	Espectro bidimensional HSQC del metabolito BFVI.1.	41
11	Espectro bidimensional HMBC del metabolito BFVI.1.	42
12	Espectro bidimensional COSY del metabolito BFVI.1.	43
13	Espectro en el infrarrojo del metabolito BFVI.1.	44

Lista de cuadros

Cuadro		Página
1	Especies conocidas de malezas resistentes en México.	3
2	Herbicidas antropogénicos comunes generadores de malezas resistentes.	4

Lista de cuadros

(continuación)

Cuadro		Página
3	Moléculas con actividad fitotóxica de origen natural empleadas como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.	6
4	Ejemplos de compuestos aislados de algunas especies del género <i>Acremonium</i> .	8
5	Composición de los medios de cultivo utilizados.	21
6	Agente revelador usado para la CCD.	22
7	Condiciones cromatográficas empleadas para resolver la fracción FVI.	23
8	Resumen del fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>A. strictum</i> mediante CCA.	26
9	Cantidad de extracto obtenido a partir de los cultivos en pequeña escala.	30

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Condiciones de fermentación para el crecimiento de <i>A. strictum</i> en pequeña escala.	20
2	Método de preparación del medio para la evolución de la actividad fitotóxica de los extractos de hexano y ACN/MeOH.	27
3	Rendimientos obtenidos a partir de la fermentación en mediana escala.	31
4	Desplazamientos y correlaciones observadas a partir de los espectros en RMN para el compuesto BFVI.1.	38

Lista de esquemas

Esquema		Página
1	Fraccionamiento del extracto del medio de cultivo y micelio de <i>A. strictum</i> .	25

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
AcOEt	Acetato de etilo
H ₂ O	Agua
PDA	Agar Papa-Dextrosa
PDB	Caldo Papa-Dextrosa
CaM	Calmodulina
cm	Centímetro
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CPZ	Clorpromazina
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
COSY	Correlación homonuclear
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano

**Lista de abreviaturas
(continuación)**

Abreviatura	Significado
PDE1	Enzima fosfodiesterasa del AMP cíclico
EM	Espectrometría de Masas
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Hz	Hertz
Hex	Hexano
IR	Espectroscopía en el infrarrojo
L	Litros
λ	Longitud de onda
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
min	Minutos
nm	Nanómetros
ppm	Partes Por Millón
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
T _R	Tiempo de retención
UV	Espectroscopía en el ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Uso de los herbicidas como medio de protección en la industria agroquímica, así como su importancia económica e impacto ambiental.

La palabra “plaga” es un término ampliamente utilizado para designar a varias formas de vida no deseadas por el ser humano, ya que crecen de forma descontrolada o se desarrollan fuera de su hábitat natural y compiten por algún recurso, como el alimento o el espacio. Afectan directa o indirectamente a los cultivos agrícolas, reduciendo la calidad y el valor de las cosechas, además de atacar bienes materiales como la madera o los granos y otros alimentos almacenados. Las plagas incluyen organismos (en formas activas o de resistencia) tales como insectos, ácaros, nemátodos, babosas, caracoles, protozoarios, hongos, bacterias, virus, malezas, roedores y otros grupos de animales o plantas (Wang *et al.*, 2010).

El término plaguicida define a un conjunto amplio de sustancias o mezclas de sustancias que son formuladas con la finalidad de destruir, repeler, atraer, regular o prevenir el crecimiento y reproducción de las poblaciones de organismos considerados como plagas, incluyendo aquellos que causan daños e interfieren con la producción agrícola, pecuaria y forestal.

Los plaguicidas pueden ser sustancias sintéticas, tanto orgánicas como inorgánicas, o productos naturales (Cebrián, 2007).

En este contexto, la agricultura ha enfrentado a lo largo de su historia muchos problemas, de particular importancia, los provocados por las plantas que crecen de manera indeseable en campos o jardines y que interfieren con el crecimiento y calidad de los cultivos. Las malezas, como se le denomina a este tipo de plantas, sirven como refugio de algunos insectos y otros organismos patógenos, además

de que provocan pérdidas significativas en los cultivos de importancia económica, lo cual puede poner en riesgo el abastecimiento de alimento o incluso llegar a provocar problemas de salud (Singh *et al.*, 2003).

Los herbicidas, son productos fitosanitarios que constan de una o varias sustancias, que se emplean con la finalidad de eliminar o inhibir el crecimiento de plantas consideradas como indeseables (Mendoza Cantú, 2011). En la actualidad, la industria agroquímica ha demostrado gran interés en la exploración de materias primas de origen vegetal y microbiano para el descubrimiento de nuevos productos útiles para el desarrollo de agentes herbicidas más eficaces y potentes. Esta búsqueda se ha enfocado principalmente en compuestos fitotóxicos de origen microbiano, prestando especial atención a aquellos provenientes de microorganismos no patógenos aislados a partir de diferentes ecosistemas (Beliën, 2005; Bautista-Rosales, 2013).

Los herbicidas se clasifican, en los siguientes grupos principales:

- *Ácidos fenoxialifáticos* (derivados de los ácidos fenoxiacético y fenoxibutírico)
- *Nitroanilinas* (amina aromática)
- *Ureas sustituidas*
- *Carbamatos*
- *Tiocarbamatos* (análogos sulfurados de los carbamatos)
- *Triazinas* (compuestos heterocíclicos nitrogenados)
- *Derivados del fenol*
- *Dinitrofenoles, entre otros.*

En los últimos años, se ha tomado conciencia sobre la amenaza que representa tanto a la salud como al medio ambiente el uso indiscriminado de las sustancias químicas tóxicas, particularmente, aquellas de origen sintético (antropogénico) y que requieren tiempos prolongados para que se degraden en el ambiente. El uso inadecuado y excesivo de herbicidas puede ocasionar graves daños al medio

ambiente, ya que si estas sustancias se aplican irracionalmente pueden contaminar al suelo, ríos, lagos, mares y pozos de agua subterránea. Asimismo, pueden introducirse en la cadena alimenticia y llegar a través de ella hasta los humanos. Estas sustancias pueden causar además, la muerte de organismos silvestres, como peces, reptiles, aves y mamíferos, o afectar su crecimiento, desarrollo y reproducción; alterar su comportamiento y su fisiología; destruir a sus crías o producir malformaciones y disminuir su capacidad para combatir infecciones y parásitos.

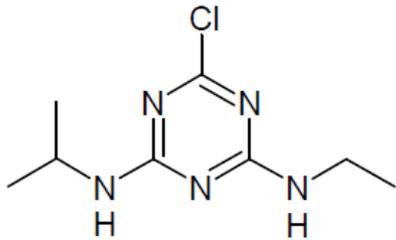
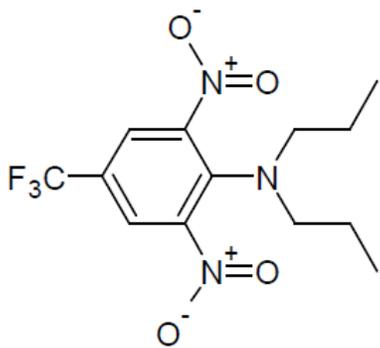
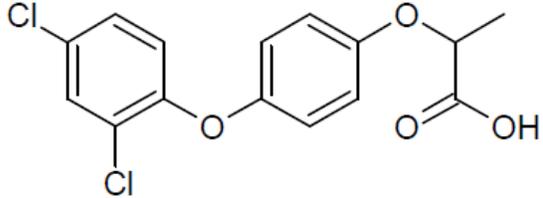
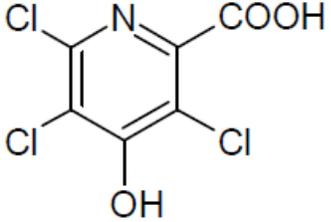
El uso desmedido de herbicidas puede generar además resistencia, la cual se puede definir como la capacidad heredada de un biotipo de malezas a la acción de algunos agentes herbicidas proporcionando la habilidad para sobrevivir a la aplicación de éstos a concentraciones normalmente letales para la población original (CPRH, 2011). Aproximadamente el 12% de la flora representa alrededor de 3000 especies de las 23,000 especies de plantas superiores registradas en México se consideran malezas. Se estima que hoy en día existen más de 300 biotipos de malezas resistentes a los herbicidas de mayor uso (**Cuadros 1-2**).

Cuadro 1. Especies conocidas de malezas resistentes en México.

Biotipo	Año	Localidad	Modo de acción	Fuente
<i>Phalaris minor</i>	1996	México	Inhibidores ACAC ¹	HRAC/Sayre, K. D.
<i>Echinochloa</i>	2001	Colona Veracruz y Campeche	Inhibidores del fotosistema II	Bolaños, E. A., Villa, J. T. y Valverde, B. E.
<i>Phalaris paradoxa</i>	1996	México	Inhibidores ACAC	HRAC/Sayre, K. D.
<i>Avena fatua</i>	1998	Guanajuato, Jalisco y Baja California	Inhibidores ACAC	HRAC/Tafoya, R. J. A.
<i>Phalaris spp.</i>	2000	Bajío	ND ²	Medina, C. T.
<i>Euphorbia heterophylla</i>	2007	Guerrero	Inhibidor del fotosistema II	Aguilar, C. A., Bolaños, E. A., Aguilar, M. I. y Valverde, B. E.
<i>Sorghum halepense</i>	2009	Veracruz	Inhibidores de ALS ³	HRAC/Tafoya, R. J.A., Ocampo, R. A. y Carrillo, M. R. M.

¹ACAC: acetil coenzima A carboxilasa, ²ND: no definido, ³ALS: acetolactato sintetasa.

Cuadro 2. Herbicidas antropogénicos comunes generadores de malezas resistentes.

Estructura	Nombre	Año de introducción/Año de reporte de resistencia
	Atrazina	1958/1968 (Le Baron, 1991)
	Trifluralin	1963/1973 (Le Baron, 1991)
	Diocloflop	1977/1982 (Le Baron, 1991)
	Picloram	1963/1988 (Le Baron, 1991)

Para evitar este tipo de interacciones, se han hecho grandes esfuerzos en la tecnología de los herbicidas. Principalmente, en la búsqueda de un herbicida inocuo para los cultivos y eficaz en contra de las principales malezas. Este aspecto se denomina selectividad y puede lograrse por mecanismos físicos o bioquímicos, por otra parte, en el afán por erradicar las prácticas agrícolas tradicionales y los problemas ocasionados por los herbicidas de origen sintético se ha incrementado la búsqueda de nuevas tácticas para el control de las malezas. Actualmente, se siguen cuatro estrategias generales para el descubrimiento de nuevos herbicidas:

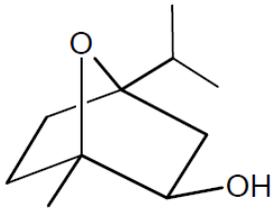
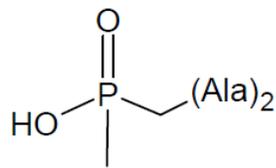
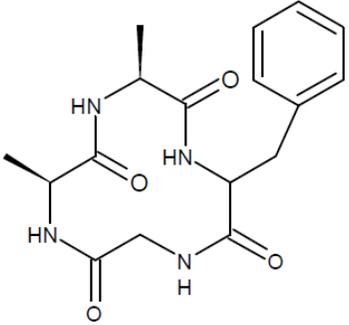
- síntesis de productos novedosos, mediante la síntesis total o modificación de estructuras conocidas con la finalidad de potenciar su actividad y/o disminuir los efectos no deseados,
- diseño bioracional mediante el estudio de las interacciones planta-planta y/o planta-microorganismo y,
- estudio de fuentes naturales diversas para la obtención de nuevos productos

Los herbicidas de origen natural presentan algunas ventajas sobre los de origen sintético ya que son biodegradables, tienen índices de acumulación bajos y sus sitios de acción son a menudo más específicos (Duke *et al.*, 2002).

Muchos compuestos derivados de hongos presentan una gran eficacia para el control de las malezas. Además, estos compuestos presentan una gran diversidad estructural y múltiples mecanismos de acción mediante los cuales pueden ejercer su actividad biológica, entre estos se encuentran la inhibición de la síntesis de aminoácidos, inhibidores de la fotosíntesis, inhibidores de la síntesis de lípidos, inhibidores de la síntesis de pigmentos, regulación de crecimiento de tipo auxínico y la inhibición de la división celular (Mentaberry, 2011). Es por esta razón que los hongos fitopatógenos representan la materia prima idónea para el descubrimiento de nuevos agentes herbicidas. Los hongos endófitos asociados a ciertas plantas

con un potencial alelopático importante comprobado constituyen también fuentes importantes de herbicidas potenciales (Macías *et al.*, 2008) (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Moléculas con actividad fitotóxica de origen natural empleadas como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

Origen	Género	Molécula
Vegetal	<i>Eucalyptus</i> (Macías <i>et al.</i> , 2008)	 1,8-cineol
Microbiano	<i>Streptomyces</i> (Macías <i>et al.</i> , 2008)	 Bialafos
Fúngico	<i>Alternaria</i> (Rivera-Coto, 2007)	 Tentoxina

2. ANTECEDENTES

2.1. Antecedentes sobre el género *Acremonium*.

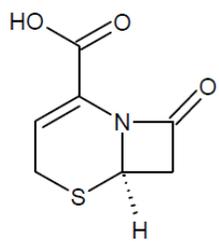
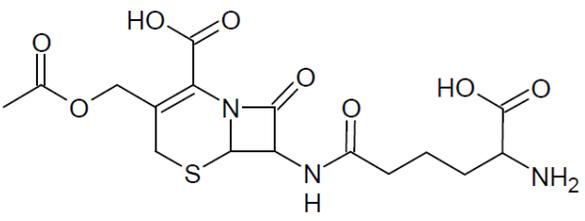
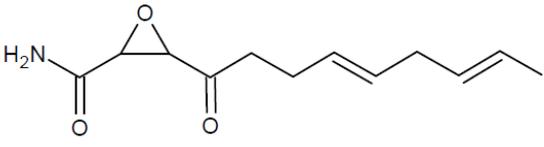
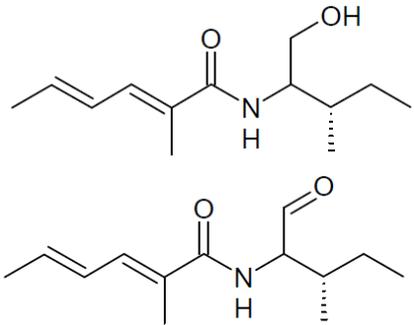
Acremonium, conocido anteriormente como *Cephalosporium*, es un género perteneciente a la familia *Hypocreaceae*. Las especies de este género presentan un lento crecimiento y se caracterizan por crecer formando colonias compactas y húmedas, blancas, grises, rosas o naranjas de textura generalmente, aterciopelada.

Del género *Acremonium* actualmente se conocen cerca de 100 especies, la mayoría son saprófitas, aisladas a partir de material vegetal muerto, suelo y de un grupo reducido de hábitats marinos. La mayoría de las especies de éste género se reproducen con gran facilidad en regiones tropicales y subtropicales.

Muchas especies de *Acremonium* son reconocidas como patógenas oportunistas del hombre y animales, estos incluyen *A. falciforme*, *A. kiliense*, *A. recifei*, *A. alabamensis*, *A. potroni*, *A. chrysogenum*, *A. furcatum* y *A. strictum*, causando en los humanos diversas enfermedades como micetoma, onicomicosis, hialohifomicosis, artritis, osteomielitis, peritonitis, endocarditis, neumonía, encefalitis e infecciones subcutáneas sobre todo en individuos con un sistema inmunológico comprometido (Finscher, 1991). Sin embargo, las infecciones por hongos de este género en los seres humanos son raras (Kwon-Chung, 1992).

Este género se caracteriza por producir cefalosporinas, una clase de antibióticos del tipo de los β -lactámicos, derivados del género *Cephalosporium*. Además incluye a varias especies de considerable interés económico ya que algunas producen una gran variedad de metabolitos bioactivos estructuralmente interesantes y novedosos (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Ejemplos de compuestos asilados de algunas especies del género *Acremonium*.

Especie	Compuesto	Estructura
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Ácido 7-aminocefalosporínico (Cuadra, 2004)	
	Cefalosporina C (Demain y Elander, 1999).	
<i>A. kiliense</i> , <i>A. recifei</i> y <i>A. potroni</i>	Cerulenina (Straub, 2002)	
<i>A. furcatum</i>	Isoleucinol; Isoleucinaldehído (Gallardo, 2006)	

2.2 Antecedentes sobre la especie *Acremonium strictum*.

Acremonium strictum (Figura 1) es un hongo saprófito, además de ser un patógeno oportunista de plantas, animales y humanos. En algunos estudios sobre esta especie fúngica se han logrado caracterizar compuestos estructuralmente únicos y biológicamente activos.



Figura 1. Cultivo en medio PDA de *Acremonium strictum*.

A partir de una cepa de *A. strictum* obtenida de una esponja marina perteneciente al género *Chrostitida*, se aislaron a la acremostictina (**1**) y la cremolina (**2**), una lactona tricíclica con actividad antioxidante y una 1*H*-azarina con leve actividad citotóxica, respectivamente (Julianti *et al.*, 2011; 2012). También de otra cepa de este hongo, se aisló a la cremomanolipina A (**3**), un glucolípido potencial modulador de señales de calcio (Sugiura *et al.*, 2012); el xenovuleno A (**4**), un sesquiterpeno-policétido que actúa como agonista del receptor GABA-benzodiazepina (Ainsworth *et al.*, 1996) y la sapinofuranona B (**5**) metabolito de tipo γ -lactona (Clough, 2000). Otra clase de compuestos aislados a partir de *A. strictum* son los ciclohexadepsipéptidos, beauvenniatinas A-E (**6-10**) (Isaka *et al.*, 2011), la beauvericina (**11**), la beauvericina J (**12**) (Chen *et al.*, 2006) y la enniatina B (**13**) (Meca *et al.*, 2010). Los ciclohexadepsipéptidos presentan una gran variedad de actividades biológicas, tales como insecticida, antihelmíntica, antibacteriana, antifúngica, antimicobacteriana, anticancerígena, inhibitoria de la enzima acil-CoA: colesterol-O-aciltransferasa (ACAT), antimalárica, antituberculosa y citotóxica (Harder *et al.*, 2003; Isaka *et al.*, 2007; Sebastià *et al.*, 2011). Otros compuestos como la bisvertinolona (**14**) actúan como inhibidores de la síntesis del β -1,3-glucano (Kontani, 1994).

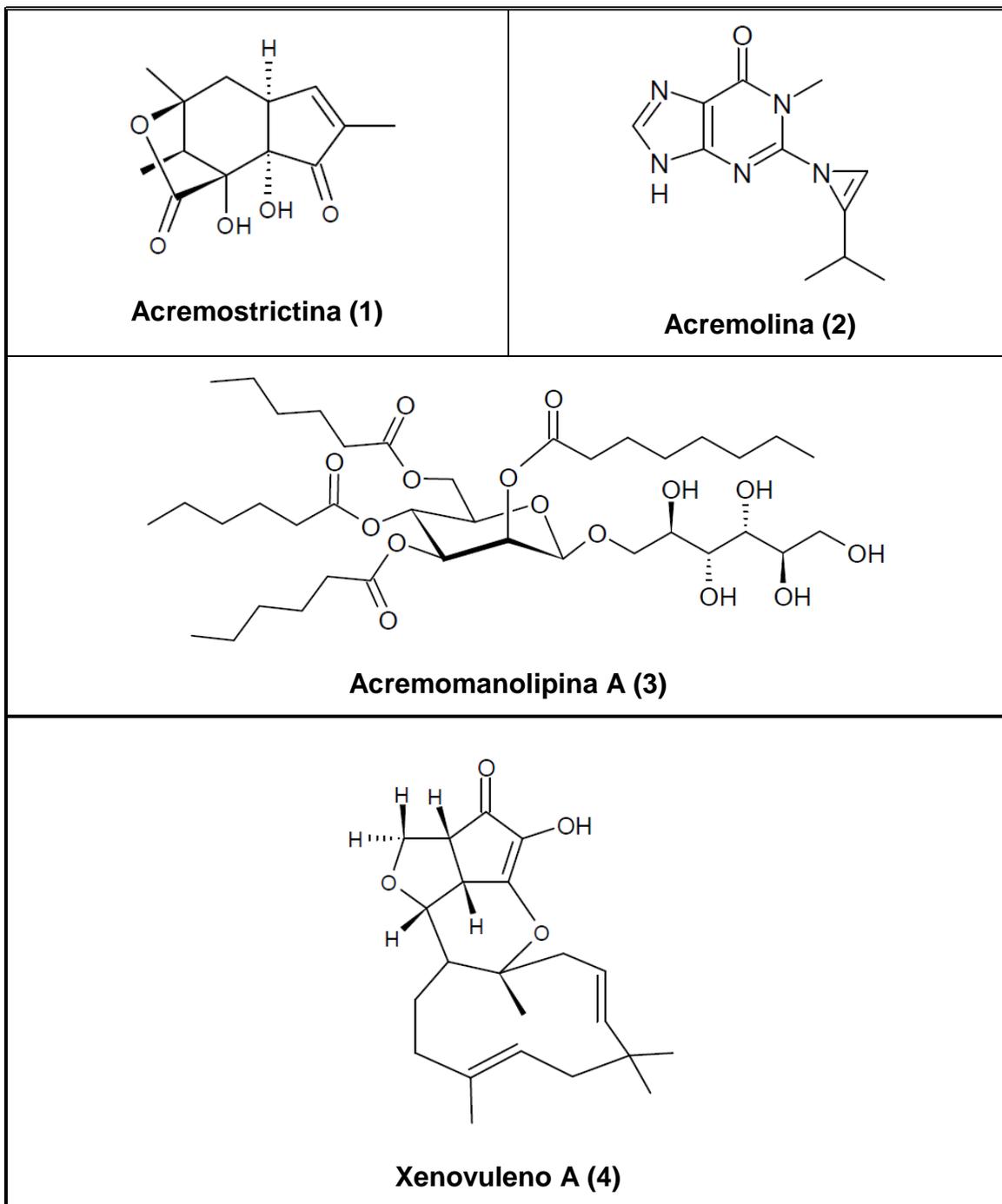
Figura 2. Compuestos aislados de la especie *Acremonium strictum*.

Figura 2. Compuestos aislados de la especie *Acremonium strictum* (continuación).

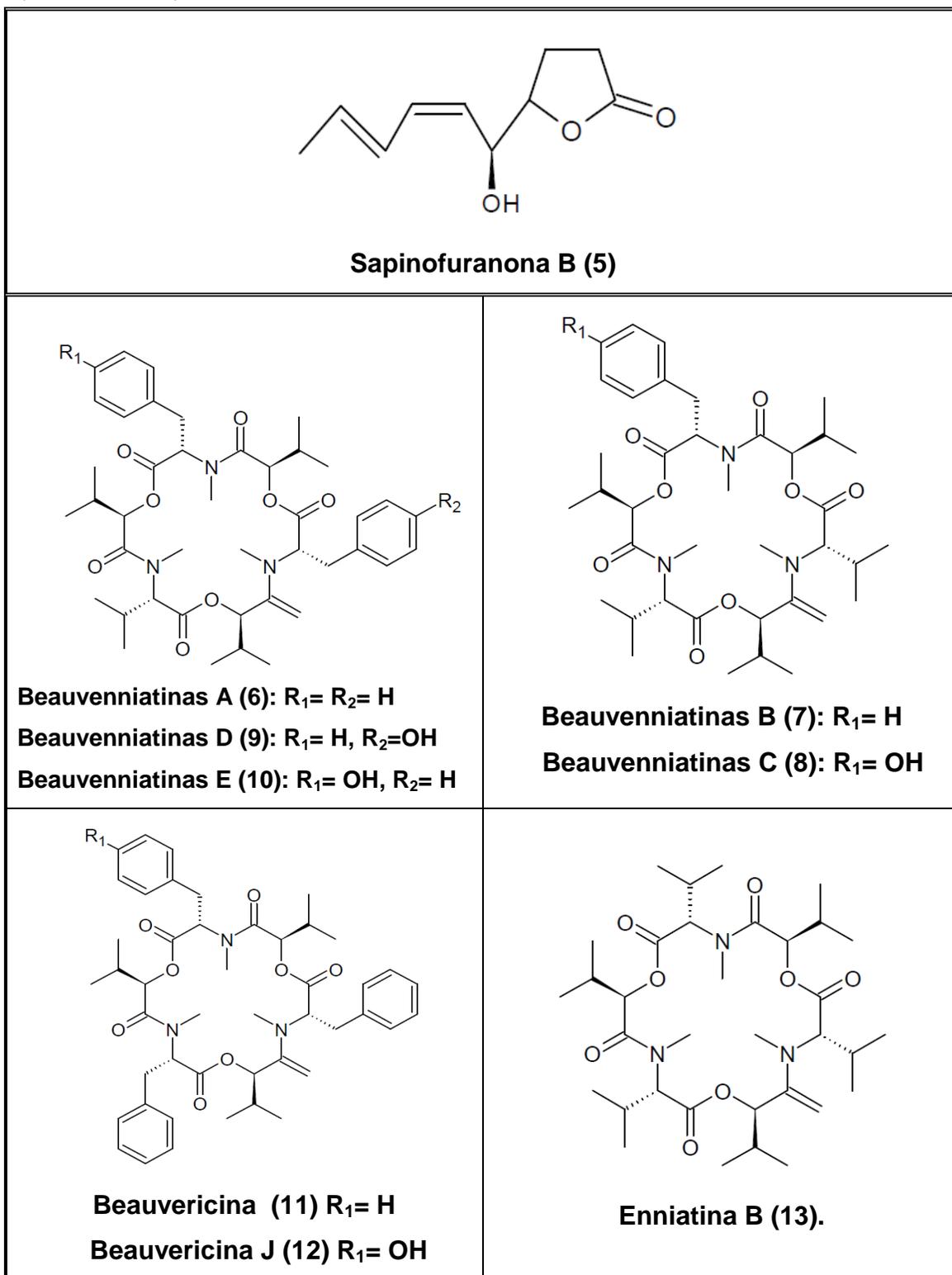
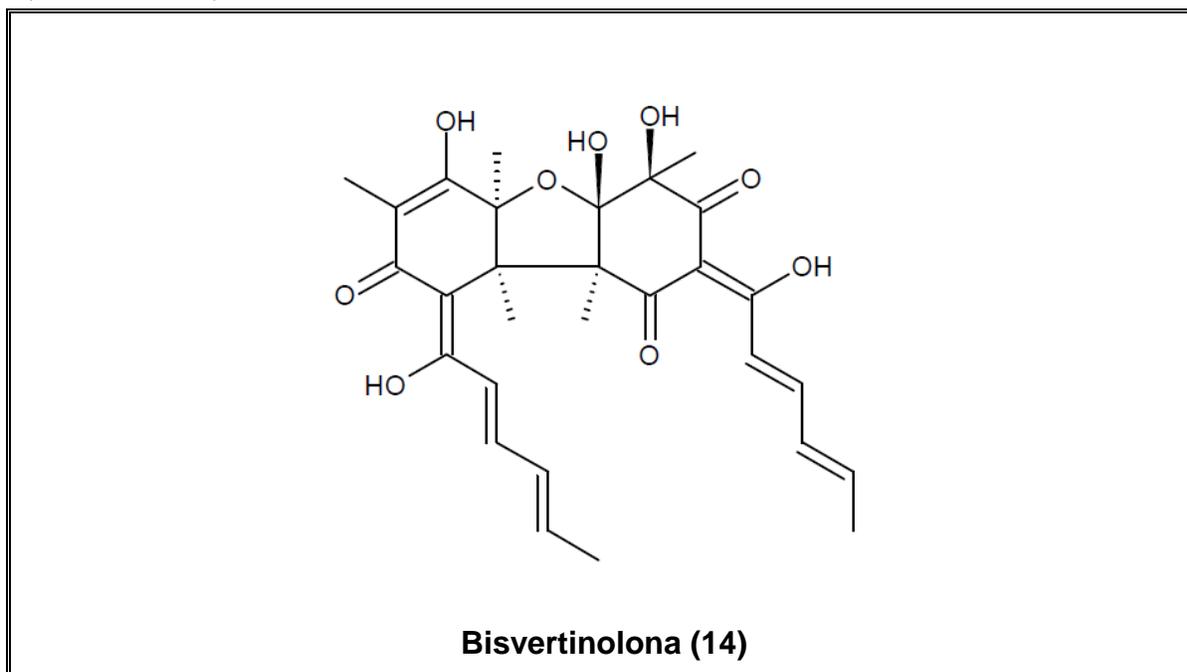


Figura 2. Compuestos aislados de la especie *Acremonium strictum* (continuación).



2.3 Calmodulina.

2.3.1 Calmodulina: estructura e importancia.

La calmodulina (CaM) es una proteína pequeña de 148 aminoácidos (16-18 KDa), arreglados en dos dominios globulares de tipo α -hélice unidas por una larga región flexible. Cada dominio contiene dos sitios de unión al ión calcio (Ca^{2+}). Cuando la CaM se une a cuatro átomos del ion Ca^{2+} (**Figura 3**), su estructura cuaternaria cambia a un estado conformacional en donde expone a sus sitios más hidrofóbicos ricos en metioninas ubicados en la superficie interior de cada uno de sus dominios globulares, permitiendo de esta manera interactuar con una gran variedad de enzimas blanco, o bien moléculas pequeñas (Chin y Means, 2000; Martínez-Luis *et al.*, 2007).

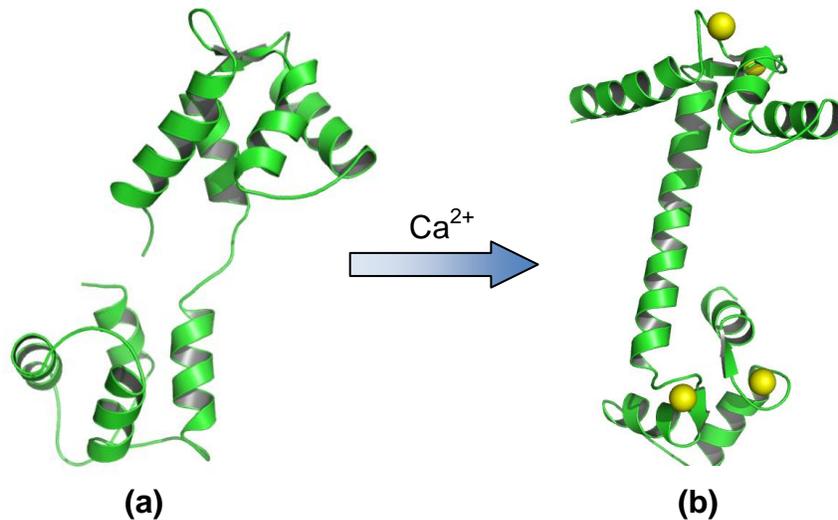


Figura 3. Estructura tridimensional de la CaM sin el ion Ca²⁺ (código PDB 1CFD) (a) y cambio conformacional provocado por la unión al ion Ca²⁺ (código PDB 1CLL) (b).

Aunque la CaM carece de actividad enzimática, actúa como mediadora en el proceso de señalización por Ca²⁺ de muchas enzimas y canales iónicos presentes en las células. Se estima que la CaM puede interactuar con cerca de 100 diferentes enzimas, entre ellas las implicadas en el metabolismo de nucleótidos cíclicos (AC, GC, NOS), la fosforilación y defosforilación de proteínas (PKI, II y III dependiente de CaM y calcineurina respectivamente), la contracción y motilidad del sistema del citoesqueleto (cinasa de cadena ligera de la miocina, dineína ATPasa, proteínas asociadas a microtúbulos, proteína tipo espectrina y caldesmon), metabolismo del calcio (Ca²⁺ ATPasa, SR-ATPasa, IP₃ Cinasa), expresión génica y proliferación celular (proteínas de unión a CaM en núcleo y endonucleasa dependiente de CaM). De esta manera, la calmodulina es capaz de regular numerosas funciones celulares como son la secreción o liberación de sustancias, metabolismo, motilidad, transducción de señales, proliferación y división celular, entre otras (Chin y Means 2000; Sharma, 2003). Entre las enzimas que interactúan con la CaM se encuentran a las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE) que son responsables de finalizar la señalización de

AMPc y GMPc intracelular; estas convierten a los nucleótidos a sus formas inactivas 5'AMP y 5'GMP. Su expresión ubicua en distintos organismos como son mamíferos, plantas y microorganismos, destaca su importancia en la transducción de señales (Goraya y Cooper, 2005).

Los inhibidores de la CaM pueden actuar en diferentes formas, ya sea uniéndose directamente a la proteína, o bien al complejo CaM-enzima. Los inhibidores de la calmodulina han sido detectados utilizando diferentes métodos, la mayoría de ellos *in vitro*. Entre los más usados, se encuentran la cromatografía de afinidad, electroforesis nativa en gel, espectroscopía UV, espectroscopía diferencial UV-DC, fluorescencia intrínseca, resonancia de fluorescencia de transferencia de energía (FRET), resonancia magnética nuclear, difracción de rayos X, métodos enzimáticos funcionales, mutagénesis sitio-dirigida, métodos computacionales y biosensores de fluorescencia.

De los métodos mencionados, aquellos basados en la fluorescencia son los métodos de elección debido a su gran especificidad, bajo costo, selectividad y tiempos de reacción relativamente cortos. Entre los métodos basados en fluorescencia, el uso de CaM marcada con fluoróforos en uno o más sitios específicos ha ganado gran popularidad. Uno de los procedimientos más usados incluye la unión covalente a la CaM de un fluoróforo tiol-reactivo estratégicamente localizado a través de un proceso de mutagénesis de cisteína sitio-dirigidas.

Recientemente, González-Andrade y colaboradores (2009) diseñaron una proteína marcada con un fluoróforo, denominado calmodulina *hCaMM124C-mBBR*, útil para la identificación de inhibidores de la CaM mediante el uso del fluoróforo monobromobirmano (*mBBR*). Este biosensor fue utilizado exitosamente para medir las propiedades inhibitorias sobre la CaM de la clorpromazina (CPZ, **15**), un inhibidor clásico de la CaM, que con propiedades inhibitorias del complejo CaM-PDE1 (Figuroa *et al.*, 2009).

2.3.2. Inhibición de la CaM como posible modo de acción herbicida.

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

El sesterpeno ofiobolina A (**16**), aislado de varios hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Bipolares* y *Drechslera*, es un potente inhibidor de la proteína calmodulina (CaM) y se demostró que el producto tiene un gran potencial para el desarrollo de agentes herbicidas ya que provoca necrosis en distintas especies de malezas, aún a bajas concentraciones (Evidente *et al.*, 2006). La acremomanolipina A (**3**), un glucolípidio aislado de *A. strictum* es un regulador de la señalización de calcio mediante la calcineurina, la cual es una enzima dependiente de calcio y de una proteína fosfatasa estimulada por la calmodulina (Sugiura *et al.*, 2012).

Finalmente, algunas investigaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo han permitido el aislamiento y la caracterización de numerosos compuestos de origen fúngico con actividades fitotóxicas y/o inhibitorias de la proteína calmodulina (**Figura 4**). Los productos más notables obtenidos a través de estos estudios son la malbranqueamida (**17**) y la malbranqueamida B (**18**) aisladas de *Malbranchea aurantiaca*, las cuales pertenecen a un tipo único de alcaloides indólicos que poseen una unidad estructural de tipo biciclo [2.2.2] diazaoctano (Martínez-Luis *et al.*, 2006), el 15-acetil hidrato de tajixantona (**19**), un metabolito secundario de *Emericella 25379* que inhibe moderadamente la activación del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1 (Rivera-Chávez, 2009), las naftopironas I-IV (**20-23**) de *Guanomyces polythrix* (Macías *et al.*, 2000; 2001; Mata *et al.*, 2003), las herbaruminas I-III (**24-26**), y policétidos del tipo de las nonenólidas aislados de *Phoma herbarum* (Rivero-Cruz *et al.*, 2000; 2003). Estos compuestos tienen en

común su efecto inhibitorio del complejo Ca^{2+} -calmodulina-fosfodiesterasa del AMPc (PDE1), un blanco de acción a nivel molecular poco explorado en estudios afines.

Figura 4. Compuestos de origen fúngico con actividad sobre la CaM.

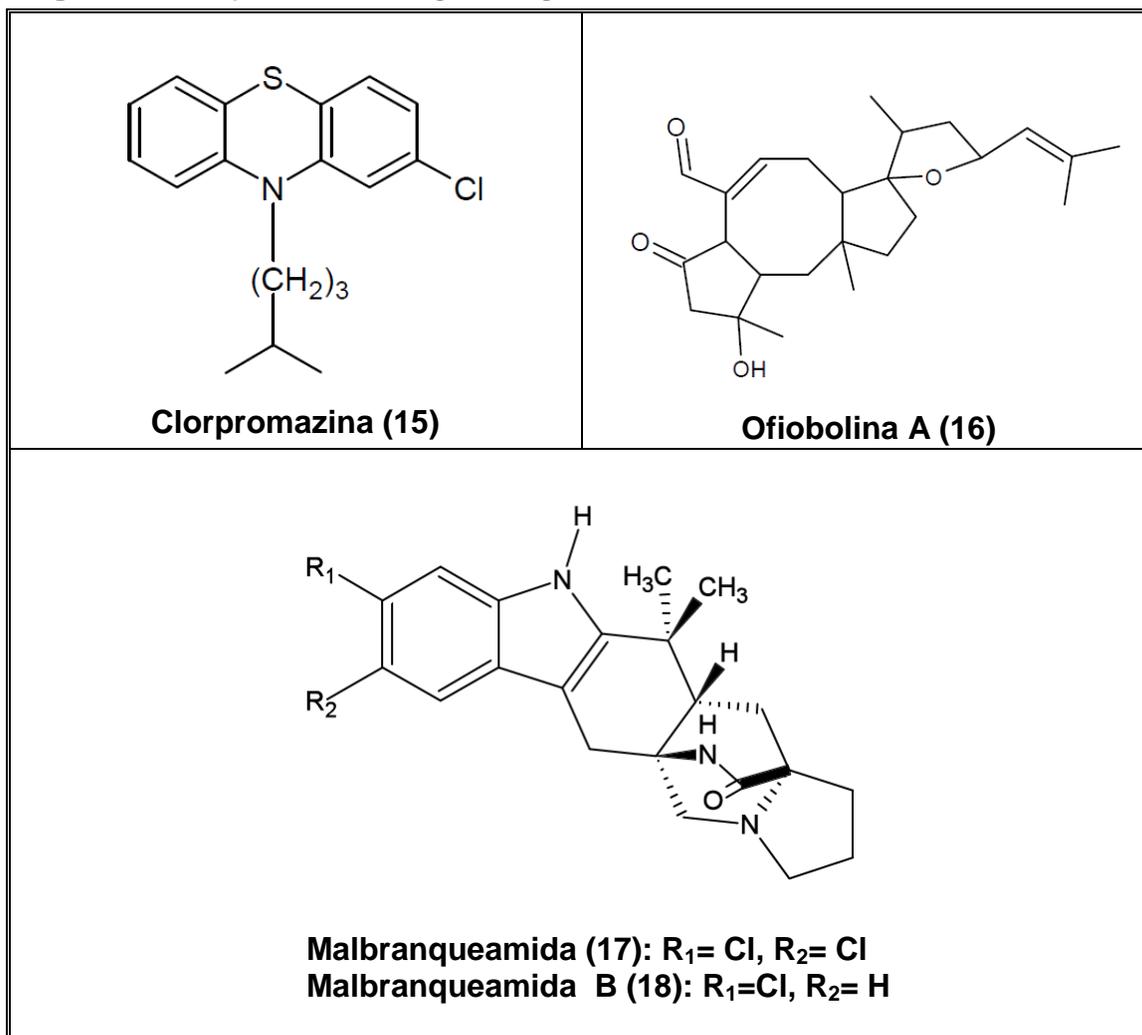
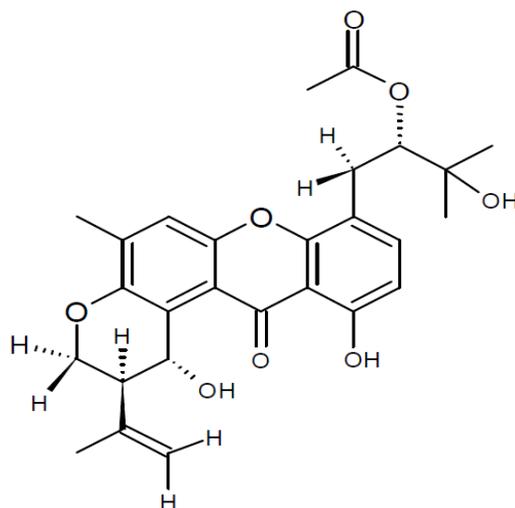
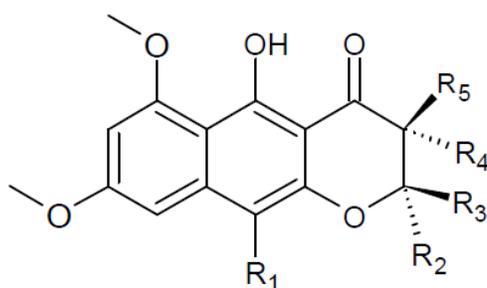


Figura 4. Compuestos de origen fúngico con actividad sobre la CaM (continuación).



15-acetil hidrato de tajixantona (19)

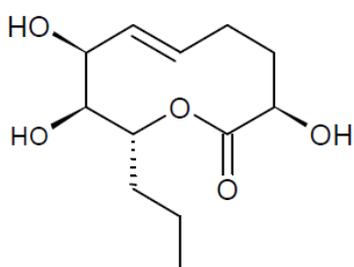


Naftopironas I (20): $R_1=R_3= R_4= H, R_2= R_5= CH_3$

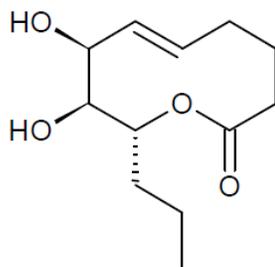
Naftopironas II (21): $R_1= CH_3O, R_2= R_5= CH_3, R_3= R_4= H$

Naftopironas III (22): $R_1= R_3= R_4= R_5= H, R_2= CH_3$

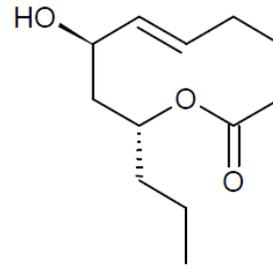
Naftopironas IV (23): $R_1= CH_3O, R_2= CH_3, R_3= R_4= R_5= H$



Herbarumina I (24)



Herbarumina II (25)



Herbarumina III (26)

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La agricultura, actividad indispensable para satisfacer las necesidades alimenticias de la creciente población mundial, ha enfrentado en tiempos recientes distintos problemas como la proliferación de malas hierbas, la aparición de biotipos de malezas resistentes a los herbicidas de uso común, la contaminación de ríos y lagos por elementos presentes en fertilizantes y agentes biocidas, la transformación de ecosistemas naturales, la erosión de terrenos, entre otros (Singh *et al.*, 2003).

Los problemas graves generados principalmente por el uso irracional de los herbicidas sintéticos han despertado un gran interés en la búsqueda de nuevos herbicidas de origen natural. Para ello, el reino fúngico constituye una fuente valiosa de principios fitotóxicos y por ende de moléculas modelo adecuadas para el desarrollo de nuevos herbicidas (Duke *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2001).

Teniendo como escenario la gran diversidad fúngica de México, el descubrimiento de productos biodinámicos como base para nuevos agentes herbicidas, resulta idónea en esta búsqueda. Por estas razones es que actualmente, en la Facultad de Química de la UNAM, se ha desarrollado un programa multidisciplinario destinado a explorar el potencial fitotóxico de especies fúngicas selectas.

De tal manera que el objetivo principal del presente trabajo consiste en el descubrimiento de compuestos fitotóxicos novedosos aislados a partir del organismo fúngico *Acremonium strictum*, que sean de utilidad como moléculas prototipo para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables con mecanismos de acción novedosos.

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

- Cultivar en pequeña escala la especie fúngica *A. strictum*, con la finalidad de encontrar las mejores condiciones de crecimiento. Una vez establecidas estas condiciones, cultivar en mediana escala para generar la biomasa y medio de cultivo necesarios para la obtención de los compuestos fitotóxicos presentes en el extracto.
- Obtener el extracto orgánico a partir del micelio y medio de cultivo en mediana escala.
- Reducir la complejidad química del extracto empleando métodos cromatográficos convencionales con la finalidad de aislar al menos un metabolito secundario fitotóxico a partir del extracto fúngico.
- Evaluar la actividad fitotóxica del extracto orgánico, así como de las fracciones y metabolitos secundarios aislados.
- Determinar la posible interacción de los metabolitos aislados con la proteína calmodulina mediante un ensayo de fluorescencia, con la finalidad de establecer si estos productos afectan las propiedades moduladoras de la CaM.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Material fúngico.

La cepa de *Acremonium strictum* fue proporcionada por la Dra. Genoveva García Aguirre del Instituto de Biología Celular de la UNAM.

4.2. Fermentación preliminar en pequeña escala.

Con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de crecimiento para *A. strictum*, se prepararon cultivos en pequeña escala con diferentes medios de cultivo, tiempo de fermentación y condiciones de agitación, manteniendo las condiciones de luz y sombra normales (**Tabla 1**).

Tabla 1. Condiciones de fermentación para el crecimiento de *A. strictum* en pequeña escala.

Medio de Cultivo	Crecimiento	Cantidad	Temperatura	Periodo de Fermentación (días)
Caldo Papa-Dextrosa (PDB)	Estático	2 L	Ambiente	21/60
	Agitación ¹	2 L		
Arroz	Estático	150 g		21/60

¹Condiciones de agitación a 120 rpm.

4.2.1. Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo se prepararon siguiendo las especificaciones del **Cuadro 5**. Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave con un ciclo de esterilización de 15 minutos, temperatura 121°C y presión 15 psi. Los fermentadores se dejaron enfriar y una vez atemperados, se inocularon con un cubo de aproximadamente 1cm³ de agar papa-dextrosa (PDA) sólido inoculado con el hongo desarrollado anteriormente en cajas de Petri.

Cuadro 5. Composición de los medios de cultivo utilizados.

Medio de cultivo	Composición
PDB (BD Difco®)	Almidón de papa..... 4.0 g Dextrosa..... 20.0 g Agua destilada..... cbp 1 L
PDA (BD Difco®)	Almidón de papa..... 4.0 g Dextrosa..... 20.0 g Agar bacteriológico..... 15.0 g Agua destilada..... cbp 1 L
Arroz	Arroz Morelos®..... 150 g Agua destilada..... 250 mL

4.3. Fermentación en mediana escala.

Para la fermentación en mediana escala se utilizaron 4 matraces Fernbach con capacidad de 2.8 L con 2 L de medio PDB en agitación, 2 matraces Erlenmeyer de 2 L con 1 L de medio PDB y un fermentador de 10 L con 6.5 L de medio PDB en condiciones estáticas (**Cuadro 5**), por un periodo de fermentación de 21 días en condiciones de luz y sombra normales a temperatura ambiente.

4.4. Obtención de extractos orgánicos a partir de los cultivos preparados.

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, a cada fermentador se le adicionó una mezcla diclorometano-metanol (CH₂Cl₂-MeOH) en proporción 9:1. En el caso de los medios líquidos, la biomasa generada se separó del medio de cultivo mediante una filtración simple utilizando gasa. Para el medio acuoso filtrado, se llevó a cabo un proceso de reparto exhaustivo empleando CH₂Cl₂-MeOH (150 mL), la fase orgánica se separó de la fase acuosa y se secó con sulfato de sodio anhidro, por último se concentró *in vacuo* para obtener un extracto seco. Por otro lado, la biomasa se sometió a un proceso de maceración durante 7 días utilizando la misma mezcla de CH₂Cl₂-MeOH, al término de este tiempo se filtró el extracto orgánico y se secó y concentró a sequedad a presión reducida.

Al igual que para los extractos en pequeña escala, la preparación del extracto orgánico del medio de cultivo y el micelio se realizó con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (9:1). Para el caso de los matraces Erlenmeyer, el extracto orgánico se preparó con acetato de etilo (AcOEt). Todos los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida. Los dos extractos concentrados resultantes (micelio y caldo de fermentación) se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCD) y se combinaron con base en su similitud cromatográfica.

4.5. Métodos cromatográficos.

El análisis de los extractos se llevó a cabo mediante CCD, utilizando placas de aluminio de distintos tamaños recubiertas con una capa de 0.25 mm de espesor de gel de sílice 60 F₂₅₄ (tamaño de partícula 10-12 μm , Merck®) y para las CCD preparativas se utilizaron placas de vidrio de 10x10 cm de 1mm de espesor recubiertas con gel de sílice. Para la visualización de los cromatofolios se utilizó un lámpara de luz UV con dos longitudes de onda (254 nm y 365 nm) y se empleó sulfato cérico amoniacal en H_2SO_4 como agente revelador (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Agente revelador usado para la CCD.

Revelador	Composición	Referencia
Sulfato Cérico/ H_2SO_4	Sulfato cérico amoniacal..... 12.0 g Ácido sulfúrico..... 22.5 mL Hielo..... 350 g	Stahl, 1969

Los análisis en cromatografía de columna abierta (CCA) se realizaron utilizando gel de sílice 60 F₂₅₄ (tamaño de partícula 10-12 μm , Merck®) como fase estacionaria y como fase móvil diversos sistemas de elución, utilizando mezclas entre Hex, CH_2Cl_2 y MeOH con incrementos graduales de polaridad.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Waters® (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector UV de arreglo de fotodiodos (PDA 996). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower® versión 2.0 (Waters). El análisis de la fracción FVI se llevó a cabo utilizando una columna empacada de gel de sílice Purospher®STAR Merck, fase reversa (C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5µm), empleando como sistema de elución un gradiente entre acetonitrilo (ácido fórmico, 0.1%) y agua (**Cuadro 7**). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos fueron de 225 y 280 nm.

Cuadro 7. Condiciones cromatográficas empleadas para resolver la fracción FVI.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% ACN (HCOOH 0.1%)	% Agua	Curva
0	0.30	70	30	6
4.0	0.30	65	35	6
10.0	0.30	80	20	6
15.0	0.30	70	30	6

4.6. Registro de las constantes espectroscópicas.

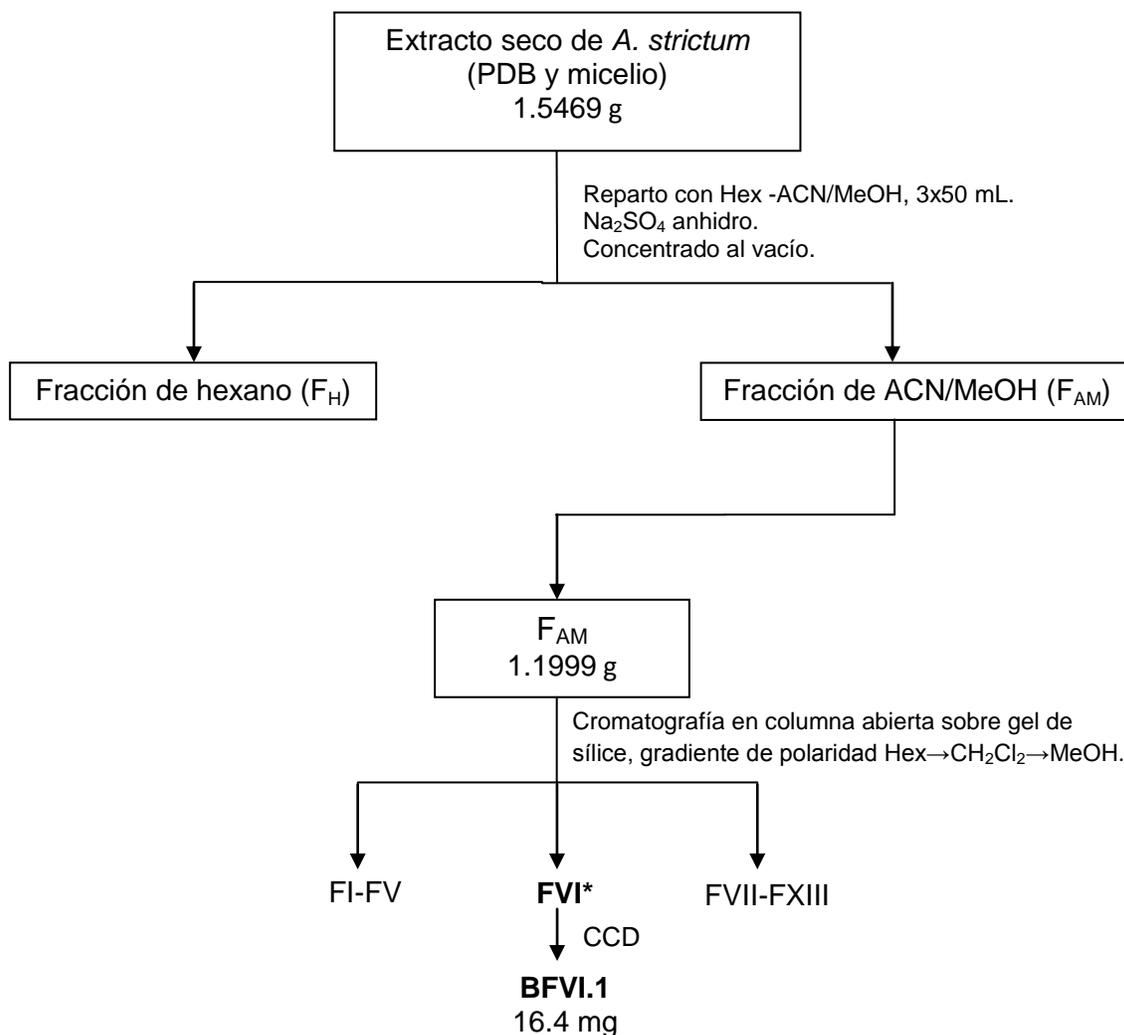
Los espectros en el IR se obtuvieron por reflectancia, en un espectrómetro Perkin Elmer 59913. Los espectros de RMN se registraron en un espectrofotómetro Unity INOVA 400 a 400 MHz (¹H) ó 100 MHz (¹³C). Utilizando CDCl₃ como disolvente y como estándar interno tetrametilsilano (TMS). El registro de los espectros se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI).

4.7. Fraccionamiento del extracto orgánico.

El extracto seco obtenido (1.5469 g) se sometió a un proceso de reparto entre hexano (Hex) y una mezcla de ACN/MeOH (1:1), obteniéndose dos fracciones primarias (F_H y F_{AM}), las cuales se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. La fracción de hexano presentó una consistencia oleosa mientras que la fracción ACN/MeOH era un semisólido. Ambas fracciones se sometieron a la evaluación biológica correspondiente (inciso 4.9), observándose que la actividad inhibitoria del crecimiento radicular se concentro en la fracción F_{AM} . Esta fracción se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una CCA, empleando una columna de vidrio empacada con gel de sílice (160 mL) y un gradiente de elución con incremento gradual de polaridad entre Hex \rightarrow CH₂Cl₂ \rightarrow MeOH. Este proceso generó un conjunto de 17 fracciones primarias (FI-FXVII). Los detalles de este fraccionamiento se resumen en el **Esquema 1** y en el **Cuadro 8**.

4.8. Separación de los metabolitos activos presentes en FVI.

De acuerdo a un análisis cromatográfico en CCD, la fracción secundaria FVI reveló la presencia del(los) compuesto(s) responsables del efecto inhibitorio observado en el ensayo de actividad biológica. A partir de esta fracción, se llevó a cabo la separación del compuesto de interés mediante una cromatografía en capa delgada utilizando un sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH (95:5). Las bandas de interés, se observaron bajo luz UV (254 y 365 nm). Las bandas resultantes se concentraron al vacío y se analizaron mediante CCD.



*Fracción activa.

Esquema 1. Fraccionamiento del extracto del medio de cultivo y micelio de *A. strictum*.

Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento primario del extracto orgánico de *A. strictum* mediante CCA.

Eluyente	Proporción	Numero de fracciones	Fracciones combinadas	Clave de fracción
Hex-CH ₂ Cl ₂	2:8	1-27	1-4	I
	1:9	28-76	5-10	II
CH ₂ Cl ₂	100	77-145	11-26	III
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	146-188	27-46	IV
	9:1	189-208	47-76	V
	85:15	209-231	77-90	VI
	8:2	232-246	91-102	VII
	7:3	247-260	103-159	VIII
			160-169	IX
			170-184	X
			185-206	XI
			207-214	XII
			215-226	XIII
			227-235	XIV
			236-244	XV
			245-252	XVI
			253-260	XVII

4.9. Ensayos biológicos.

4.9.1. Evaluación del potencial fitotóxico.

La determinación del potencial fitotóxico de las fracciones se realizó mediante el bioensayo de germinación y crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura (Anaya, *et al.*, 1990; Castañeda *et al.*, 1996).

El bioensayo se realizó en cajas Petri de 6 cm de diámetro; las fracciones de hexano y ACN/MeOH se disolvieron en etanol y metanol respectivamente. Se preparó agar al 2 % el cual contenía diferentes concentraciones de las muestras a evaluar (100,250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) preparado a partir de una solución de referencia de 30 mg/mL (**Tabla 2**).

Tabla 2. Método de preparación del medio para la evaluación de la actividad fitotóxica de los extractos de hexano y ACN/MeOH.

Muestra	Disolución de la muestra			Vol. de agar 4%
	Stock 30mg/mL	Vol. de disolvente	Vol. de agua	
Blanco Agua	-----	-----	7.5 mL	7.5 mL
Blanco disolvente	-----	600 μL	6.9 mL	7.5 mL
100 $\mu\text{g/mL}$	50 μL	550 μL	6.9 mL	7.5 mL
250 $\mu\text{g/mL}$	125 μL	475 μL	6.9 mL	7.5 mL
500 $\mu\text{g/mL}$	250 μL	350 μL	6.9 mL	7.5 mL
1000 $\mu\text{g/mL}$	500 μL	100 μL	6.9 mL	7.5 mL

Para cada muestra, se manejó un volumen final de 7.5 mL, el cual se mezcló con 7.5 mL de agar al 4% en caliente, y se agitó vigorosamente para homogenizar la mezcla. Una vez preparada la solución, se retiró de la parrilla de calentamiento y se dejó enfriar, cuidando de que no se solidificara el agar. Enseguida 5 mL de cada solución se vertieron en cajas de Petri. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Posteriormente, se colocaron 10 semillas de la especie vegetal de prueba. Las cajas Petri se incubaron a 30 °C y la actividad fitotóxica se registró calculando el porcentaje de inhibición, midiendo la longitud de las radículas a las 48 horas de tratamiento.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético se empleó como control positivo (Pereda-Miranda *et al.*, 1993); el H₂O, el metanol y el etanol se utilizaron como controles.

4.9.2. Determinación del efecto fitotóxico por el método de la bioautografía.

Para monitorear la actividad fitotóxica se empleó la técnica cualitativa de bioautografía (Anaya *et al.*, 1990; 1995). Para ello se emplearon placas de vidrio de 20.0 x 3.0 cm recubiertas de gel de sílice. Se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, obtenidas en un vivero de Xochimilco, las cuales se limpiaron y lavaron con una solución de hipoclorito al 5%, enseguida se realizó un segundo lavado con agua destilada para eliminar el remanente de hipoclorito y se dejaron secar a temperatura ambiente. En cada placa se aplicaron las fracciones de hexano y ACN/MeOH hasta saturación del punto de aplicación; posteriormente se realizó la evaluación de las muestras utilizando una fase móvil de CH₂Cl₂-MeOH (95:5).

Finalizado el proceso de elución, se dejó evaporar el disolvente de la placa, y ésta se cubrió con 10 mL de agar bacteriológico (DIFCO®) al 1%. Una vez solidificado el agar, se colocaron las semillas de *A. hypochondriacus* hasta cubrir completa y homogéneamente la superficie de las placas. A continuación, las placas se incubaron en un ambiente húmedo a 30 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se observan las zonas de inhibición de la germinación y el crecimiento radicular.

4.9.3. Ensayo de fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor fluorescente (*hCaM M124C-mBBr*).

El efecto de la fracción ACN/MeOH y FVI, así como el producto BFVI.1 sobre la proteína calmodulina, se determinó mediante un método espectrofluorimétrico utilizando un biosensor fluorescente (*hCaM M124C-mBBr*) de la CaM de acuerdo al procedimiento descrito por González-Andrade y colaboradores (2009). El experimento se realizó con una concentración de 5 μM de proteína en un volumen final de 2 mL. En cada caso la solución proteínica (amortiguador de acetato de potasio (KAc) 5 mM y 10 mM de CaCl_2 , pH 5.1) se tituló con una solución 2 mM de cada muestra. El cambio en la fluorescencia de la proteína en presencia de las muestras de prueba se registró en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, USA) a 37 °C. Los datos se adquirieron mediante el software VINCI 1.6.SP4 (Experiment & Instrument Control). La λ_{ex} para el biosensor fue de 381 nm y la λ_{em} fue adquirida en un rango entre 400-550 nm, con diez integraciones y en intervalos cada dos nanómetros.

5. Resultados y discusión

5.1. Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de los metabolitos de interés.

Con la finalidad de determinar las mejores condiciones de crecimiento y para la obtención de un mayor rendimiento del extracto orgánico, se decidió cultivar el hongo *A. strictum* variando los medios de cultivo (sección experimental, inciso 4.2), el tiempo de fermentación y las condiciones de agitación (**Tabla 1**). Al cabo de las pruebas en pequeña escala (2 L) en medio PDB comercial en condiciones estáticas y en agitación, y en medio de arroz (250 g), se obtuvieron los extractos del micelio y medio de cultivo, para condición y obteniendo del medio (estático vs agitación y PDB vs arroz). La cantidad de extracto total obtenido del micelio y medio de fermentación se resumen en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Cantidad de extracto obtenido a partir de los cultivos en pequeña escala.

Medio de Cultivo	Crecimiento	Periodo de Fermentación (días)	
		21	60
Agar Papa-Dextrosa	Estático	0.1268g	0.2209g
	Agitación	0.1287g	0.2265g
Arroz	Estático	1.8082g	3.3946g

El análisis cromatográfico en capa delgada de los extractos indicó, que los extractos obtenidos en condiciones de agitación y estáticas eran muy similares, a diferencia del extracto del medio de arroz, cuyos extractos presentaron características físicas muy diferentes. Con base en estas observaciones se concluyó que la fermentación en condiciones de agitación o estáticas, en medio PDB durante 21 días representan las mejores condiciones para la obtención del extracto orgánico en un mayor rendimiento.

5.2. Fermentación en mediana escala.

Una vez establecidas las condiciones apropiadas de crecimiento, se realizó la fermentación del hongo *A. strictum* en mediana escala. Para este propósito, se preparó medio PDB comercial, el cual se inoculó con la especie fúngica objeto de estudio. Una vez transcurrido el tiempo de fermentación (21 días), se realizaron las extracciones del medio de cultivo con CH₂Cl₂-MeOH (9:1) y AcOEt, y se obtuvieron los extractos a partir de la biomasa y del medio de cultivo, los cuales fueron analizados en CCD. Debido a su similitud cromatográfica, se decidió reunir ambos extractos para su posterior estudio químico. Los rendimientos de los extractos obtenidos en este estudio se indican en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Rendimientos obtenidos a partir de la fermentación en mediana escala.

Tipo de fermentador	Crecimiento	Vol. de medio	Disolvente de extracción	Extracto orgánico (g)		Biomasa producida
				Medio	Micelio	
Matraz Fernbach	Agitación	8 L	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)	0.4505	0.1158	11.9773g
Matraz Erlenmeyer	Estático	2 L	AcOEt	0.4370	0.0562	2.4553g
Fermentador	Estático	6.5 L	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)	0.3911	0.0963	6.9918g

5.3. Aislamiento de los metabolitos activos presentes en el extracto.

Un análisis por cromatografía en capa delgada evidenció una composición metabólica similar en los extractos obtenidos, por lo que se decidió reunirlos. El extracto combinado (1.5469 g) se fraccionó mediante un proceso de reparto, utilizando Hex y una mezcla ACN:MeOH, obteniéndose una fracción de hexano (0.3470 g) de consistencia oleosa y otra fracción ACN/MeOH (1.1999 g) semisólida.

La actividad de ambas fracciones se monitoreó mediante el ensayo biológico de fitotóxicidad midiendo la inhibición del crecimiento radicular de la especie vegetal *A. hypochondriacus*. Este ensayo permite determinar una posible actividad herbicida de extractos, fracciones o de alguno de sus componentes mediante una evaluación sencilla, de bajo costo y con resultados confiables y relativamente rápidos. Los resultados evidenciaron que el extracto de hexano carecía de actividad fitotóxica, reflejada en la nula inhibición del crecimiento radicular, por el contrario, el extracto más polar (ACN/MeOH) presentó la mejor actividad biológica a partir de la concentración de 250 ppm.

Una vez seleccionada la fracción activa, se llevó a cabo el ensayo de la bioautografía. Este ensayo biológico permite determinar cualitativamente cual de los componentes presentes en la fracción son los posibles responsables de la actividad observada en el ensayo de inhibición del crecimiento radicular de la muestra analizada. Este ensayo se basa en una difusión en agar de los componentes del extracto/fracción separados por medio de cromatografía en capa delgada preparativa. Los resultados de este ensayo se ilustran en la **Figura 5**.

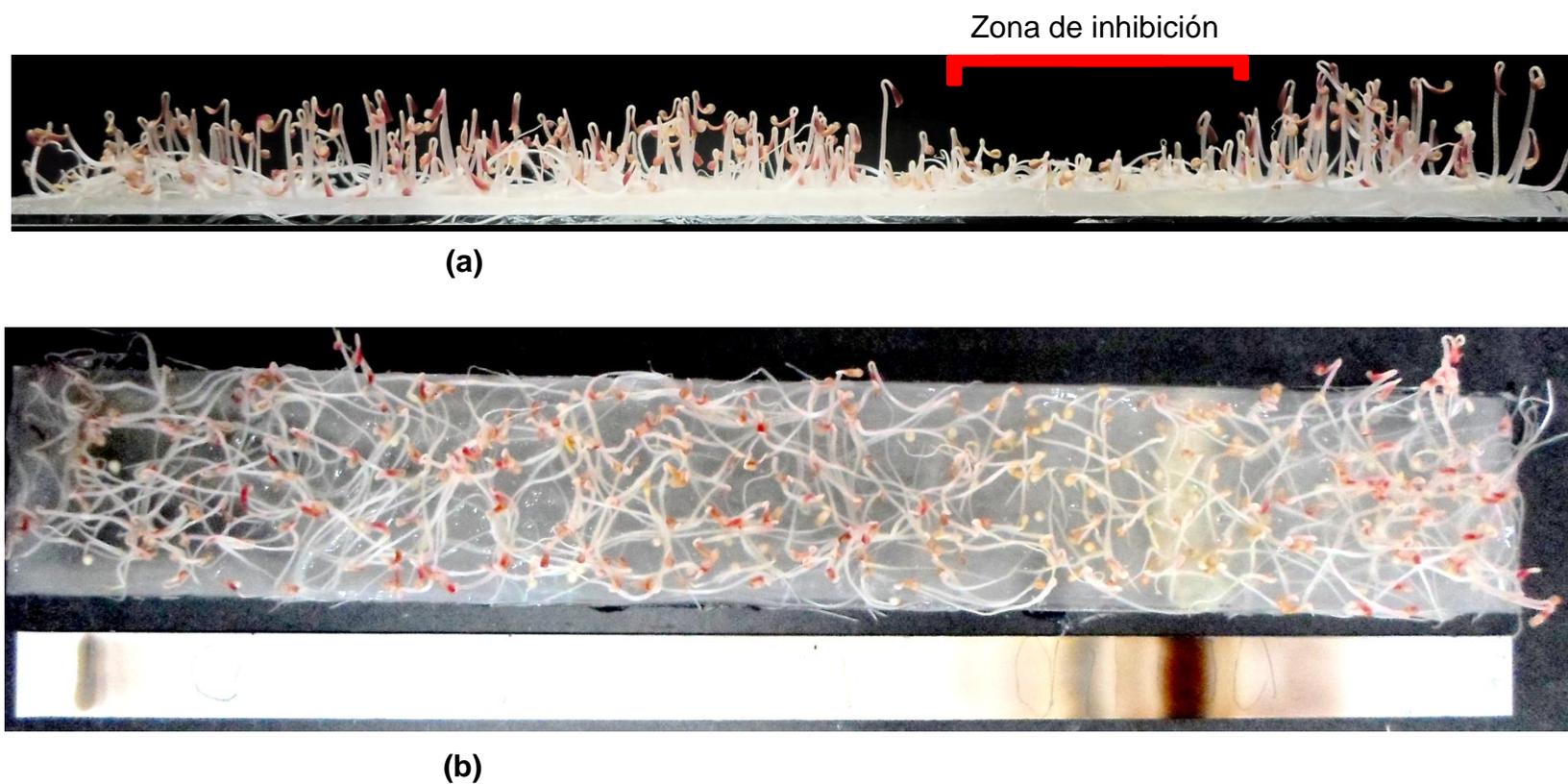


Figura 5. Vista frontal (a) y vista lateral (b) de la bioautografía de la fracción ACN/MeOH.
Gel de sílice; CH₂Cl₂-MeOH (95:5)

De acuerdo con los resultados observados en el ensayo de bioautografía, se identificó una zona de inhibición, con al menos un compuesto mayoritario con posible actividad fitotóxica. Para llevar a cabo el aislamiento de los productos bioactivos, se decidió someter la fracción primaria a un segundo fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta. De éste proceso, se obtuvieron un total de 14 fracciones primarias. Mediante el análisis por cromatografía en capa delgada, se identificó en la fracción FVI la presencia de los metabolitos activos observados en el ensayo bioautográfico.

Esta fracción se resolvió utilizando una cromatografía en capa delgada preparativa, permitiendo la separación de las tres bandas principales. Estas fracciones se analizaron mediante CLAE, en donde se ensayaron diferentes condiciones analíticas (fase reversa y normal, composición de la fase móvil) encontrándose que las mejores condiciones en las que la fracción FVI se resuelve, son las que se presentan en el cromatograma ilustrado en la **Figura 6**.

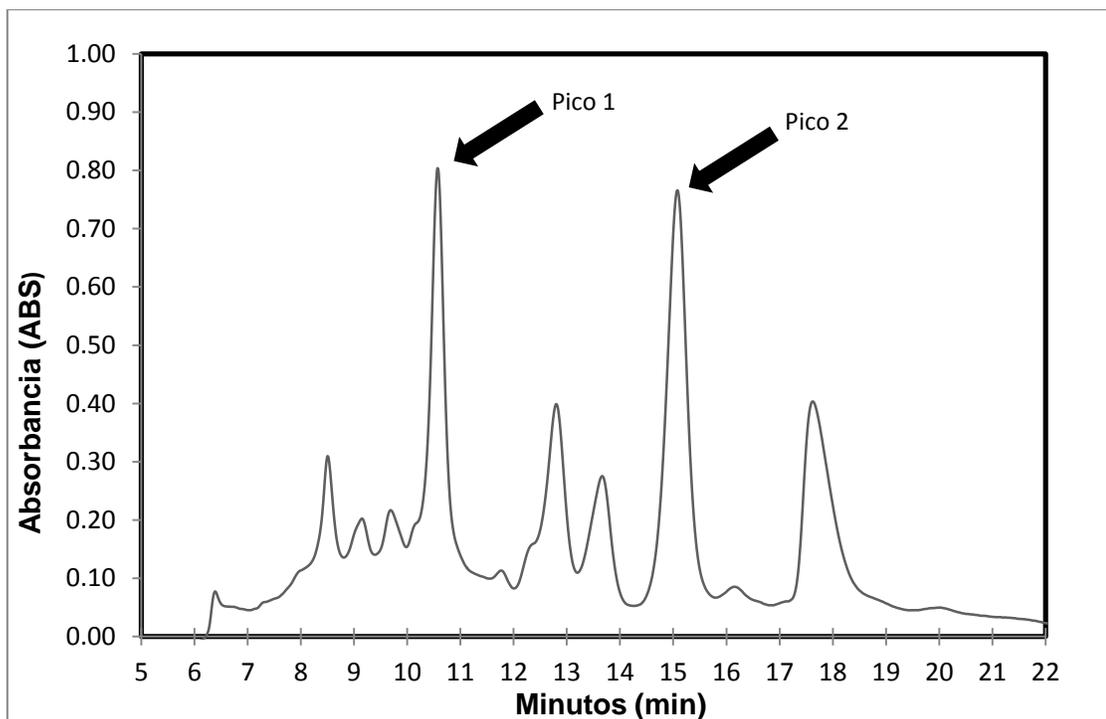


Figura 6. Cromatograma de líquidos de la fracción FVI. Fase móvil: gradiente ACN (0.1% HCOOH, A):H₂O (B) [0 min, 70% A; 4 min, 65% A; 10 min, 80% A; 15 min, 70% A]; flujo: 0.4 mL/min; columna Purosphere®STAR RP-18e (5 µm, 4.6 x 250 mm); detección: 225 nm.

Mediante la coelución de la fracción FVI y de cada una de las bandas separadas por CCD preparativa, se logró identificar a la banda BFVI.1 como el pico 2 con un tiempo de retención 15.2 min (16.4 mg), y a la banda BFVI.2 como el pico 1 con tiempo un de retención 10.6 min (4.2 mg) (**Figura 6**). De estos dos compuestos, solamente al designado como con la clave BFVI.1 se le realizaron los análisis espectroscópicos con el objetivo de caracterizarlo estructuralmente.

5.4. Evaluación de las propiedades inhibitorias sobre la CaM.

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

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

- En las plantas superiores, la CaM es un elemento fundamental en la vía de transducción de señales del Ca^{2+} durante su crecimiento y desarrollo. Ciertamente, más de 50 enzimas y canales iónicos son regulados por CaM en plantas, algunas de las cuales son importantes para su desarrollo (Bouche *et al.*, 2005). Estas enzimas podría ser blancos específicos de herbicidas.
- Algunos herbicidas potenciales como la ofiobolina A (**15**), ejercen su efecto fitotóxico mediante su interacción con la CaM, inhibiendo su habilidad de activar a sus enzimas efectoras (Au *et al.*, 2000; Evidente *et al.*, 2006).
- Finalmente, a diferencia de los animales, las plantas superiores expresan múltiples isoformas. Estas isoformas podrían constituir blancos de acción específicos y novedosos, de algunos inhibidores del crecimiento vegetal con potencial herbicida (Lee *et al.*, 2000; Bouché *et al.*, 2005; Yamniuk y Vogel, 2005).

El efecto de la fracción ACN/MeOH, FVI y del compuesto BFVI.1 sobre la proteína calmodulina, se determinó mediante la metodología descrita en la parte experimental (inciso 4.9.3)

Los resultados obtenidos de esta evaluación se muestran en la **Figura 7**. Ninguna de las fracciones o el producto aislado apaga la fluorescencia extrínseca de la CaM comparada con a la clorpromazina, un antagonista bien caracterizado de la CaM.

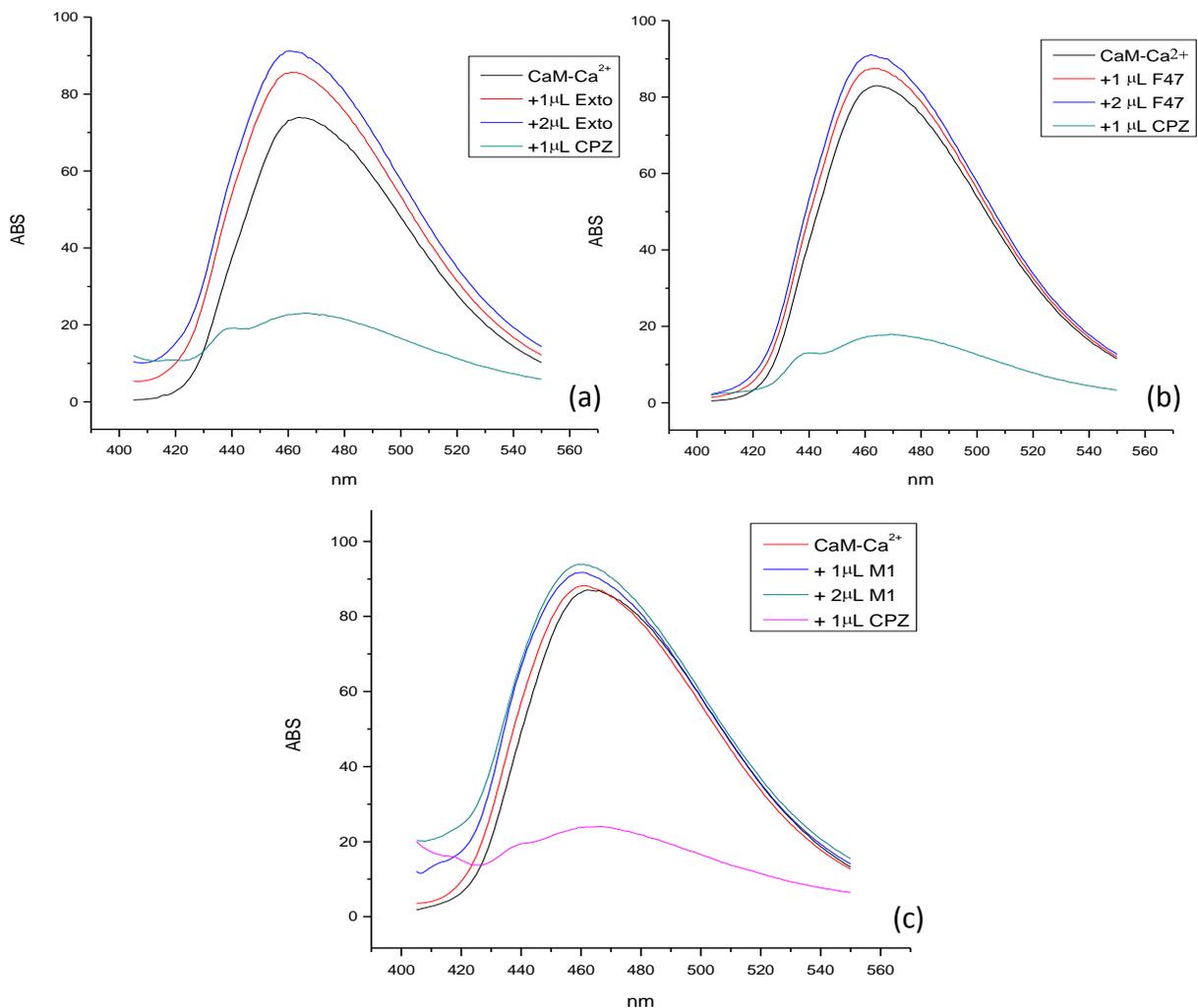


Figura 7. Ensayo de apagamiento de la fluorescencia del biosensor fluorescente *hCaMM124C-mBBr*, de la fracción ACN/MeOH (a), fracción FVI (b) y el producto aislado BFVI.1 (c).

Con base en los resultados observados para este ensayo, podemos concluir que la actividad fitotóxica observada para las muestras analizadas de *A. strictum* no involucra la vía de señalización dependiente de CaM.

5.5. Análisis preliminar de los espectros de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C del compuesto BFVI.1.

Se llevaron a cabo los experimentos unidimensionales y bidimensionales en resonancia magnética protónica y de carbono-13 del compuesto BFVI.1. Si bien la información generada con estos experimentos espectroscópicos permite suponer la presencia de algunos grupos funcionales, como metoxilos, carbonilos, sistemas aromáticos, y la presencia de uno o más heteroátomos como el nitrógeno, la elucidación estructural de la molécula permanece esquiva. Por lo que, se deberían realizar otros experimentos que aporten una mayor información para llevar a cabo éste análisis, tales como espectrometría de masas y en la medida de lo posible, difracción de rayos X. Por lo tanto, en este manuscrito, se presentan solamente los datos espectroscópicos de ^{13}C y ^1H , correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales (HSQC, HMBC y COSY), así como el espectro obtenido en el infrarrojo.

En la **Tabla 4** se presentan los desplazamientos y las correlaciones observadas en RMN para el compuesto BFVI.1.

Tabla 4. Desplazamientos químicos y correlaciones observadas a partir de los espectros en RMN para el compuesto BFVI.1.

#C	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC	COSY
1	14.12	0.88 (1H)		
2	22.69			
3	24.74			
4	27.84	3.42 (3H, s)		
5	29.7	1.25 (6H, s)		
6	31.93			
7	33.54	2.35 (1H, d, $J= 5.3$ Hz)		
8	56.29	4 (3H, s)		
9	60.8	5.7 (1H, dd, $J= 2.67, 8.01$ Hz)	6.90, 4.99, 4.94	6.9, 4.88
10	72.89			
11	74.75	4.89 (1H)	7.90, 4.90	5.4
12	75.01	5.42 (1H, d, $J= 12.32$ Hz)	6.34	5.52
13	78.39		5.42, 3.42	
14	107.54	4.94 (1H, dd, $J= 2.49, 8.22$ Hz)	6.34, 4.89	
15	112.18	7.04 (1H, d, $J= 8.6$ Hz)	6.9	7.9, 7.04
16	112.44		5.7, 4.99, 5.53, 6.90	
17	115.09	6.93 (1H, d, $J= 8.23$)		
18	121.04	7.9 (1H, d, $J=2.27$)	7.79, 5.4, 7.06	
19	122.05	7.77 (1H, dd, $J= 2.31, 5.03$ Hz)	7.78	7.9
20	122.57		7.04	
21	125.48	7.06 (1H, dd, $J= 2.40, 8.49$ Hz)	7.9	
22	126.42	7.79 (1H, dd, $J= 2.31, 8.44$ Hz)	7.77, 5.42	
23	126.55		6.93	
24	138.51	6.34 (1H, dd, $J= 2.50, 8.41$ Hz)	6.91	4.93
25	143.08	6.91 (1H, d, $J= 2.67$ Hz)	6.34, 4.99	
26	145.17		7.9, 7.77	
27	145.24		6.93, 7.06	
28	148.79		7.9, 7.06	
29	154.19		4, 7.79	
30	163.67		5.4	
31	165.11		7.79, 4.89	
32	166.98		3.42	
		5.53 (1H, d, $J= 1.02$ Hz)		

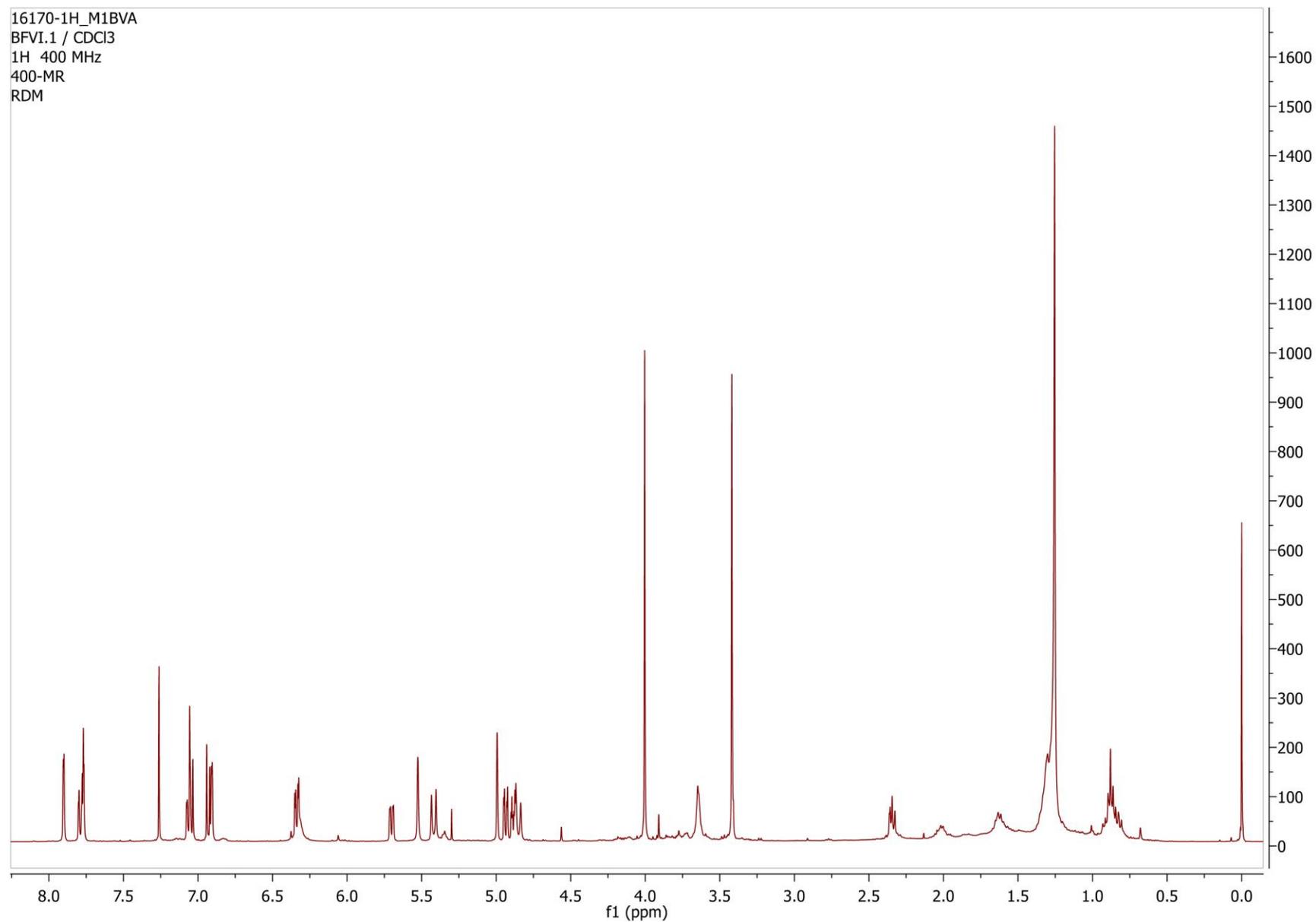


Figura 8. Espectro de RMN-¹H del metabolito BFVI.1.

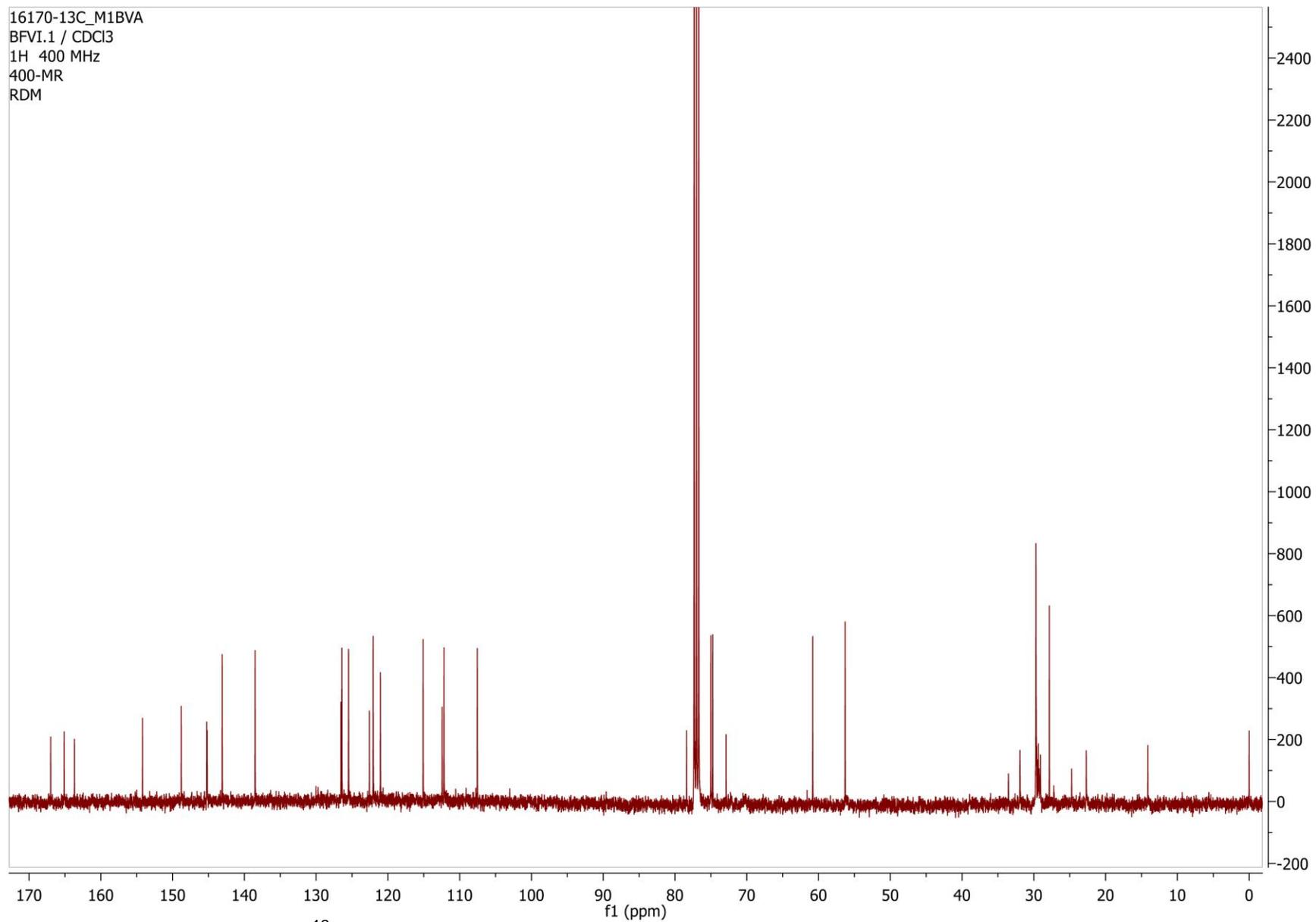


Figura 9. Espectro de RMN-¹³C del metabolito BFVI.1.

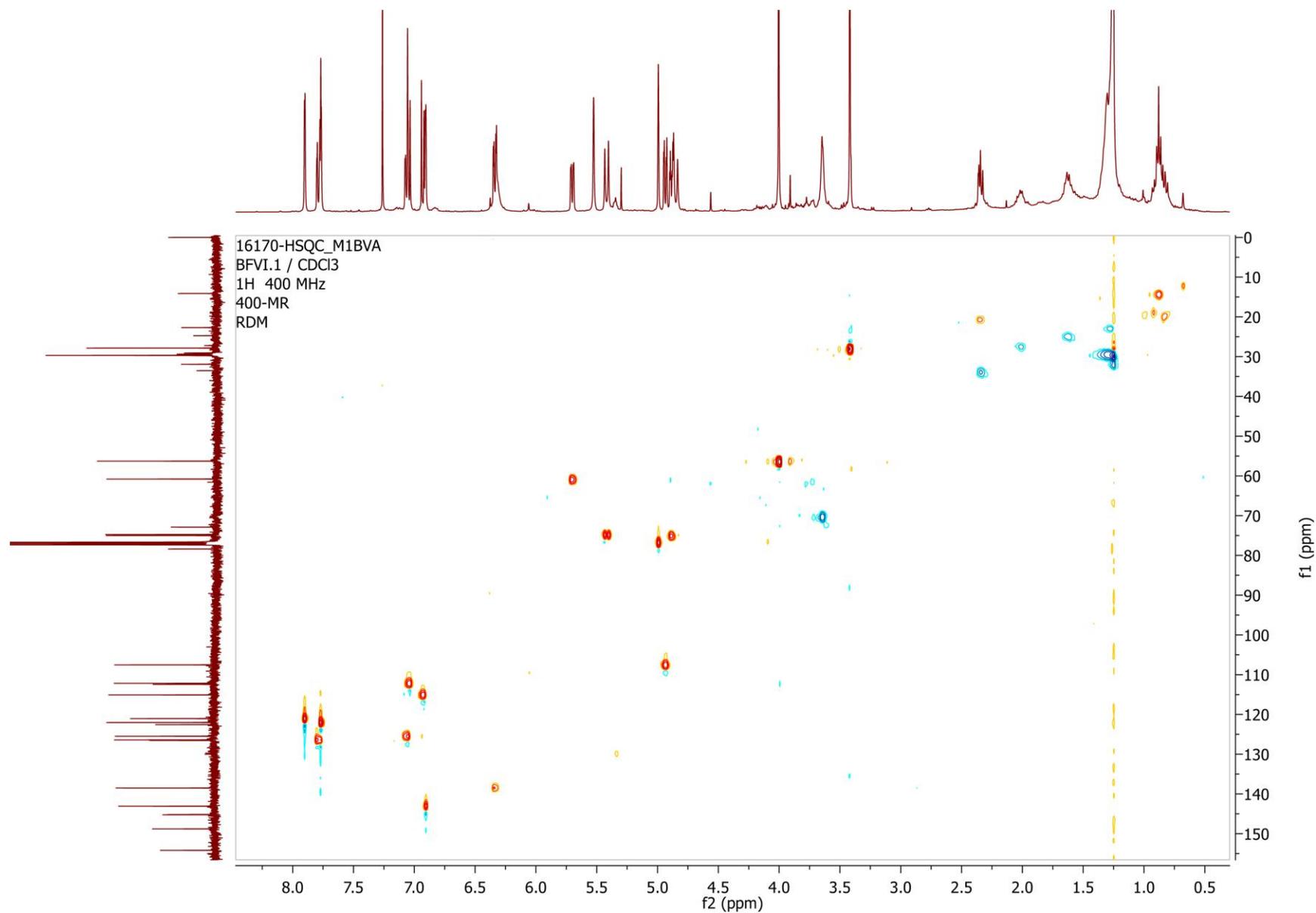


Figura 10. Espectro bidimensional HSQC del metabolito BFVI.1.

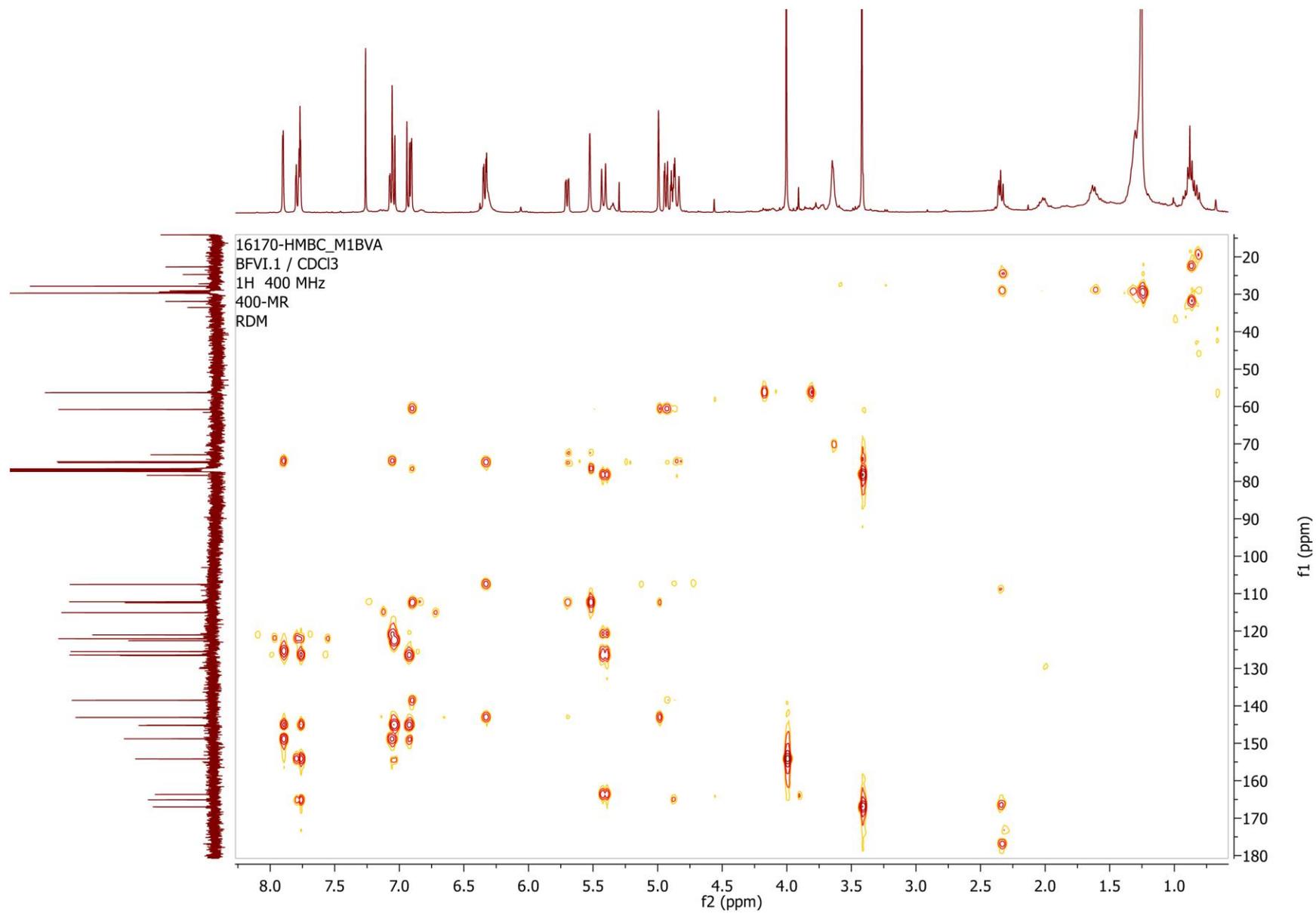


Figura 11. Espectro bidimensional HMBC del metabolito BFVI.1.

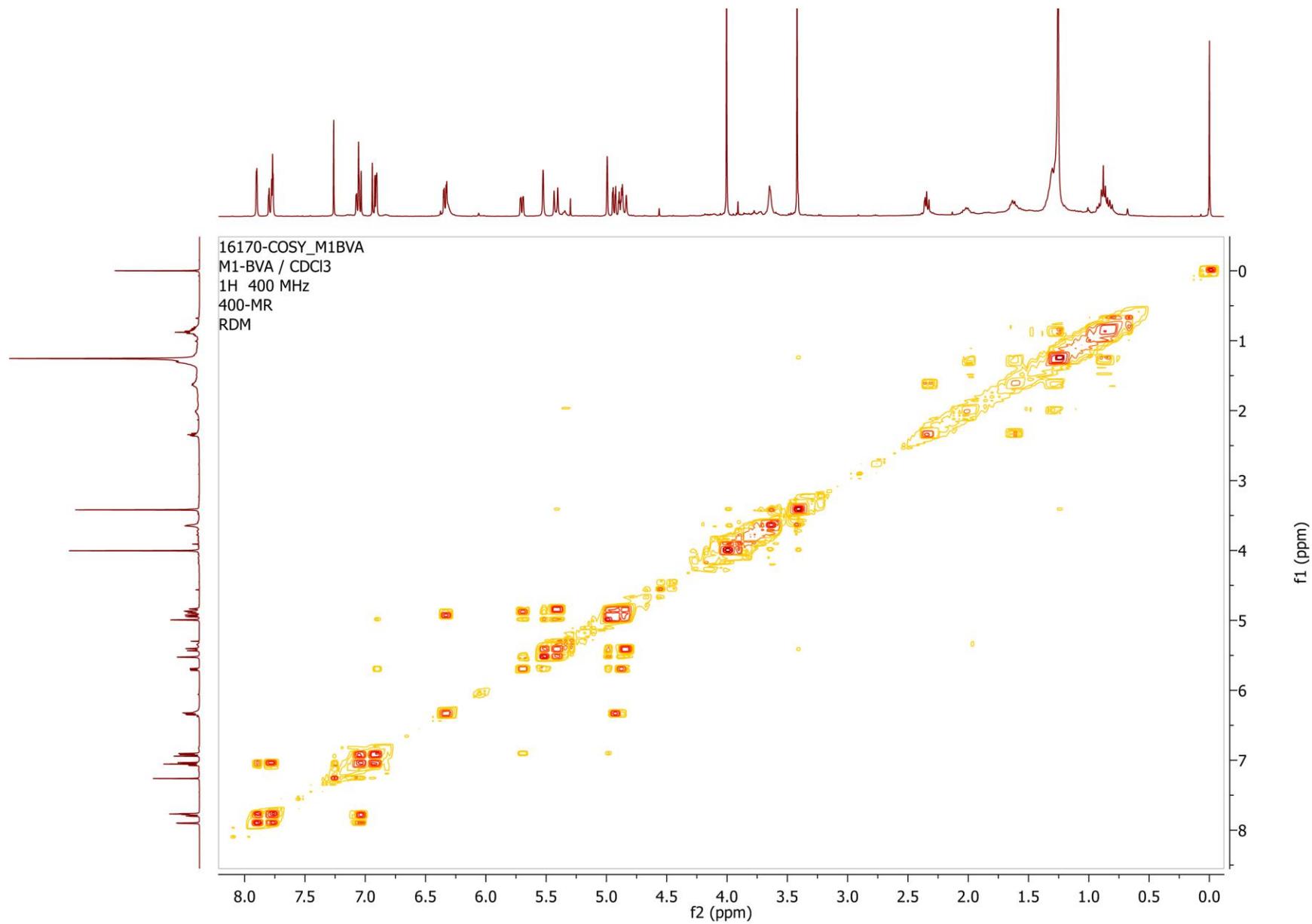


Figura 12. Espectro bidimensional COSY del metabolito BFVI.1.

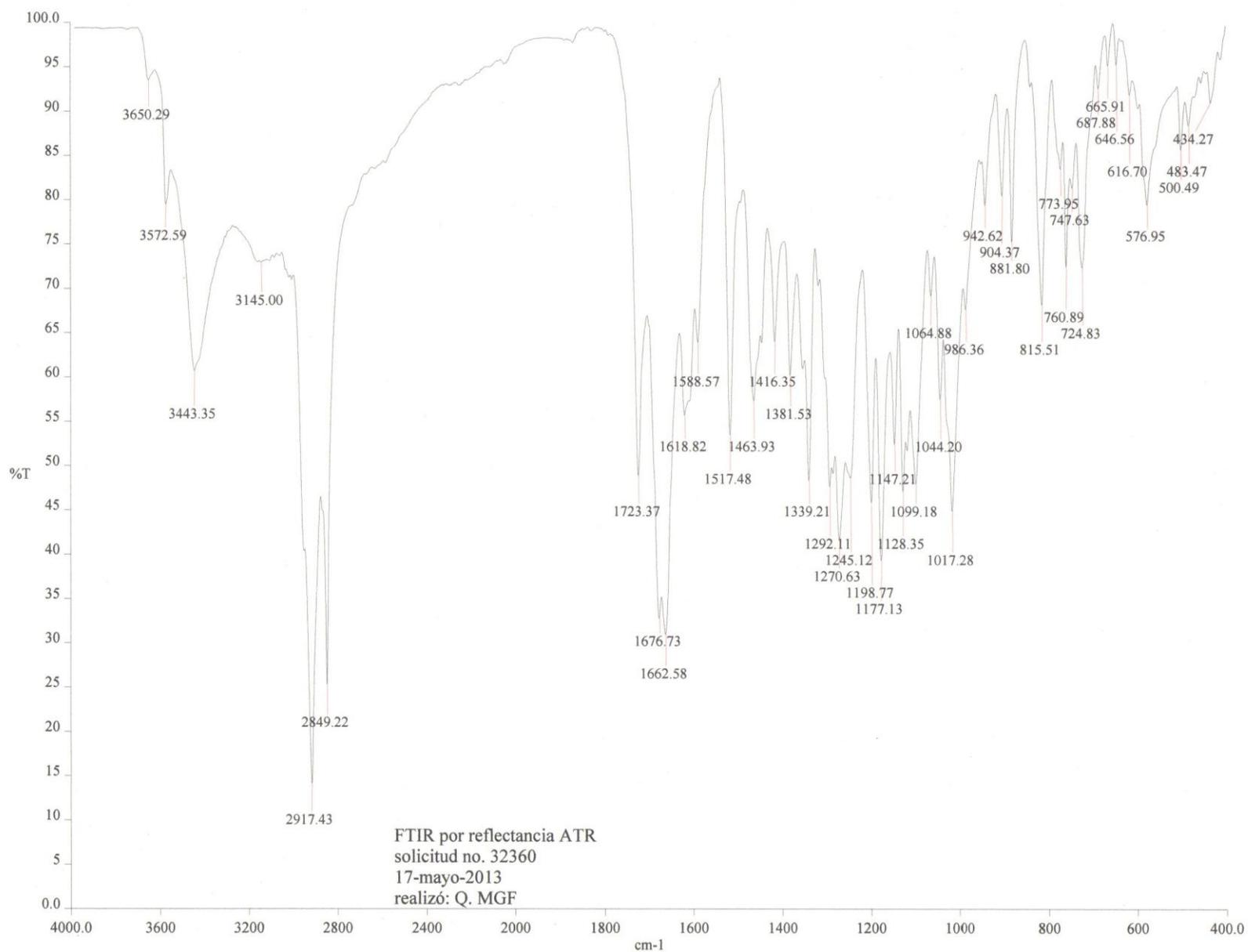


Figura 13. Espectro en el infrarrojo del metabolito BFVI.1.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- El cultivo del hongo *Acremonium strictum* en medio PDB en condiciones estáticas o de agitación, por un periodo de 21 días, permitió establecer las mejores condiciones de fermentación para la obtención de un mayor rendimiento del extracto orgánico.
- El estudio biodirigido realizado sobre el extracto íntegro, permitió la obtención de un metabolito con actividad fitotóxica moderada.
- Mediante un ensayo de fluorescencia se demostró que el metabolito aislado no presentó interacción con la proteína calmodulina, descartando esta vía como probable mecanismo de acción para el efecto fitotóxico observado.
- La información generada por los experimentos espectroscópicos (resonancia magnética nuclear e infrarrojo) resultó insuficiente para caracterizar la estructura del metabolito activo BFVI.1. No obstante, se propone llevar a cabo otros experimentos que proporcionen información complementaria que permita la caracterización inequívoca de este compuesto.
- Finalmente, los resultados globales obtenidos en la presente investigación permitieron generar información acerca de la actividad fitotóxica de este hongo, y en particular del metabolito BFVI.1 aislado, hecho que repercutirá en futuras investigaciones conducidas a la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural con actividad fitotóxica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, M., Chicarelli-Robinson, M. I., Copp, B. R., Fauth, U., Hylands, P. J., Holloway, J. A., Latif, M., O'Beirne, G. B., Porter, N., Renno, D. V., Richards, M., Robinson, N. (1996). Xenovulene A, a novel GABA-Benzodiazepine receptor binding compound produced by *Acremonium strictum*. *The Journal Of Antibiotics*, **48**, 568-573.
- Anaya, A. L., Calera, M. R., Mata, R., Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.*, **7**, 2145-2152.
- Anaya, A. L., Calera, M. R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Hernández-Bautista, B., Lotina-Hennsen, B., Mata. R. (1995). Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana* *Phytochemistry*, **40**, 419-425.
- Au, T.K., Chick, W.S.H., Leung, P.C. (2000). The biology of ophiobolins. *Life Sciences*, **67**, 733-742. Lee, S.H., Johnson, J.D., Walsh, M.P., Van Lierop, J.E., Sutherland, C., Xu, A., Snedden, W.A., Kosk-Kosicka, D., Fromm, H., Narayanan, N., Cho, M.J. (2000). Differential regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca²⁺ concentration. *Biochemical Journal*, **350**, 299-306.
- Bautista-Rosales, P. U., Calderon-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N. A., Ragazzo-Sánchez, J. A. (2013). Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological Control*, **65**, 293-301.

- Beliën, T., Van Campenhout, S., Van Acker, M., Volckaert, G., (2005). Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **327**, 407-414.
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W.A., Fromm, H. (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 435-466.
- Castañeda, P., Gómez, L., Mata, R. (1996). Phyto-growth-Inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 323-326.
- Cebrián Gómez, M. A. (2007). Elaboración de contenidos para materiales de difusión con información sobre sustancias tóxicas y riesgos ecotoxicológicos. Instituto Nacional de Ecología, 17-36.
- Chen, B. F., Tsai, M. C., Jow, W. M., (2006). Induction of calcium influx from extracellular fluid by beauvericin in human leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **340**, 134-139.
- Chin, D., Means, A. R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* **10**, 322-328.
- Clough, S., Raggatt, M. E., Simpson, T. J., Willis, C. L., Whiting, A., Wrigley, S. K. (2000). Structure elucidation and synthesis of (4S,5S,6Z,8E)-5-hydroxydeca-6,8-dien-4-olide (S,S-Sapinofuranone B) - a novel γ -lactone metabolite of *Acremonium strictum*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2475-2481.
- Comité para la prevención de resistencias a herbicidas (CPRH), (2011). La resistencia de las malas hierbas a herbicidas. Unidad de Malherbología, Servicio de sanidad vegetal.

- Cuadra Zelaya, T. E. (2004). Producción de cefalosporina C por fermentación en medio sólido de *Acremonium chrysogenum* C10. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Demain, A. L. y Elander, R. P. (1999). The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek, Kluwer Academic Publishers*. **75**: 5-19.
- Duke S.O., Romagni J.G., Dayan, F.E. (2002). Natural products as source of new mechanism of herbicidal action. *Crop Protection*, **19**, 583-589.
- Evidente A., Andolfi A., Cimmino A., Vurro M., Fracchiolla M., Charudattan R. (2006). Herbicidal Potential of Ophiobolins Produced by *Drechslera gigantea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 1779-1783.
- Figueroa, M. C., González, M. del C., Rodríguez-Sotres, R., Sosa-Peinado, A., González-Andrade, M., Cerda-García-Rojas, C. M., Mata, R. (2009). Calmodulin inhibitors from the fungus *Eremicella* sp. *Bioorg Med. Chem.* **17**, 2167-2174.
- Fincher, R.M., Fisher, J.F., Lovell, R.D., Newman, C.L., Espinel-Ingroff, A., Shadomy, H.J. (1991). Infection due to the fungus *Acremonium (cephalosporium)*. *Medicine*. Department of Medicine, Medical College of Georgia Hospital and Clinics, Augusta. **70 (6)**, 398-409.
- Gallardo, G. L., Butler, M., Gallo, L. M., Rodríguez, M. A., Eberlin, M. N., Cabrera, G. B. (2006). Antimicrobial metabolites produced by an intertidal *Acremonium furcatum*. *Phytochemistry*, **67**, 2403-2410.
- González-Andrade, M., Figueroa, M. (2009). An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophoro-labeled CaM protein. *Analytical Biochemistry*, **387**, 64-70.

- Goraya, T. A., Cooper, D. M. (2005). Ca^{2+} -calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives. *Cell Signaling*, **17**, 789-797.
- Harder, A., Schmitt-Wrede, H. P., Krücken, J., Marinovski, P., Wunderlich, F., Willson, J., Amliwala, K., Holden-Dye, L., Walker, R. (2003). Cyclooctadepsipeptides an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **22**, 318-331.
- Isaka, M., Berkaew, P., Intereya, K., Komwijit S., Sathitkunanon, T. (2007). Antiplasmodial and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia sp.* BCC 8613. *Tetrahedron*, **63**, 6855-6860.
- Isaka, M., Yangchum, A., Sappan, M., Suvannakad, R., Srikitikulchai, P. (2011). Cyclohexadepsipeptides from *Acremonium sp.* BCC 28424. *Tetrahedron*, **67**, 7929-7935.
- Julianti, E., Oh, H., Jang, K., H., Lee, J. K., Lee, S. K., Oh, D. C., Oh, K. B., Shin, J. (2011). Acremostriectin, a Highly Oxygenated Metabolite from the Marine Fungus *Acremonium strictum*. *J. Nat. Prod.*, **74**, 2592-2594.
- Julianti, E., Oh, H., Lee, H. S., Oh, D. C., Oh, K. B., Shin, J. (2012). Acremolin, a new 1*H*-azirine metabolite from the marine-derived fungus *Acremonium strictum*. *Tetrahedron Letters*, **53**, 2885-2886.
- Kohli, R.K., Batish, D.R., Singh, H.P. (2006). Weeds and their management: Rational and approaches. In: Singh, H.P., Batish, D.R., y Kohli, R.K. (eds.), Handbook of sustainable weed management. *Food Products Press*, Binghamton, NY, 1-19.

- Kontani, M., Sakagami, Y., Marumo, S. (1994). First β -1,6-glucan biosynthesis inhibitor, bisvertinolone isolated from fungus, *Acremonium strictum* and its absolute stereochemistry. *Tetrahedron Letters*, **35**, 2577-2580.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. (1992). *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia and London.
- LeBaron H.M. (1991). Distribution and seriousness of herbicide resistant weed infestations world wide. En: *Herbicide Resistance in Weeds and Crop* (Z.C. Casely, G.W. Cussans and R.K. Atkin eds.). *Butterwarth Henemann*, Oxford. 27-55.
- Macías F., Oliveros-Bastidas A., Marin D., Carrera C., Chinchilla N., Molinillo J. (2008). Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *The Phytochemical Society of Europe*, **7**, 179-194.
- Macías, F., Castellano, D., Molinillo, J. (2000). Search for a standard phytotoxic bioassays for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2512-2521.
- Macías, M., Gamboa, A., Ulloa, M., Toscano, R.A., Mata, R. (2001). Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry*, **58**, 751-758.
- Martínez-Luis, S., Pérez-Vásquez, A., Mata, R. (2007). Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry* **68**, 1882-1903.
- Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M. C., Lira-Rocha, A., Mata, R. (2006). Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron*, **62**, 1817-1822.

- Mata, R., Gamboa, A., Macías, M., Santillán, S., Ulloa, M., González, M.C. (2003). Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulindependent activity of the enzymes cAMP phosphodiesterase and NAD-kinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 4559-4562.
- Meca, G., Soriano, J. M., Gaspari, A., Ritieni, A., Moretti, A., Mañes, J. (2010). Antifungal effects of the bioactive compounds enniatins A, A₁, B, B₁. *Toxicon*, **56**, 480-485.
- Mendoza Cantú, A. (2011). Información general sobre los herbicidas. Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional, Instituto Nacional de Ecología, 2-15.
- Mentaberry, A., (2011). Agrobiotecnología: Tolerancia a herbicidas por ingeniería genética. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Buenos Aires.
- Mintz, A., Walter, J. F. (1998). *Acremonium* mycoherbicide for biocontrol of dandelion. US5753592 A, Thermo Trilogy Corporation, Certis Usa, Llc.
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Wickramaratne, D. B., Mihanda, D. B., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. (1993). Tricolorin A, major phyto-growth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *J. Nat. Prod.*, **56**, 571-582.
- Pérez-Vázquez A., Linares E., Bye R., Cerda-García-Rojas C.M., Mata R. (2008). Phytotoxic activity and conformational analysis of thymol analogs from *Hofmeisteria schaffneri*. *Phytochemistry*, **69**, 1339-1347.
- Rivera-Chávez, J. A. (2009). 15-Acetil hidrato de tajixantona, un nuevo metabolito secundario de *Emericella 25379*. Tesis de licenciatura. UNAM, 33-37.

-
- Rivera-Coto, G. (2007). Conceptos introductorios a la fitopatología. EUNED, Costa Rica, 172-173.
 - Rivero-Cruz, J.F., García-Aguirre, G., Cerda-Rojas, C.M., Mata, R. (2000). Conformation behavior and absolute stereostructure of two phytotoxic nonenolides from the fungus *Phoma herbarum*. *Tetrahedron* **56**, 5337-5344.
 - Rivero-Cruz, J F., Macías, M., Cerda-Rojas, C.M., Mata, R. (2003). A new phytotoxic nonenolide from *Phoma herbarum*. *Journal Of Natural Product*, **66**, 511-514.
 - Saxena S., Pandey A.K. (2001). Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 395-403.
 - Sebastià, N., Meca, G., Soriano, J. M., Mañes, J. (2011). Antibacterial effects of enniatins J₁ and J₃ on pathogenic and lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 2710–2717.
 - Sharma, R. K., Wang, J. H. (2003). Diversity of calcium in regulation of mammalian calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Indian Journal of Biochemistry and biophysics*, **40**, 77-91.
 - Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: New possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **22**, 239-311.
 - Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography. Academic Press Inc., p. 478.

-
- Straub, S. G., Yajima, H., Komatsu, M., Aizawa, T., Sharp, G. W. (2002). The effects of cerulenin, an inhibitor of protein acylation, on the two phases of glucose-stimulated insulin secretion". *Diabetes*. **51** Suppl 1 (90001): 91-95.
 - Sugiura, R., Kita, A., Tsutsui, N., Muraoka, O., Hagihara, K., Umeda, N., Kunoh, T., Takada, H., Hirose, D. (2012). Acremomannolipin A, the potential calcium signal modulator with a characteristic glycolipid structure from the filamentous fungus *Acremonium strictum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**, 6735-6739.
 - Villaseñor, J. L. y Espinosa, F. J. (1998). Catálogo de malezas de México. UNAM. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México.
 - Wang, L., Chen L., Nieto Juan J. (2010). The dynamics of an epidemic model for pest control with impulsive effect. *Nonlinear Analysis: Real World Applications*, **11**, 1374-1386.
 - Yamniuk, A.P., Vogel, H.J. (2005). Structural investigation into the differential target enzyme regulation displayed by plant calmodulin isoforms. *Biochemistry*, **44**, 3101-3111.