



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

## **ESPECIES SELECTAS DE HONGOS ENDÓFITOS COMO FUENTES POTENCIALES DE INHIBIDORES DE LA CALMODULINA DE UTILIDAD PARA EL DESARROLLO DE FÁRMACOS Y/O HERRAMIENTAS DE INVESTIGACIÓN**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. en C. MARTHA ADRIANA LEYTE LUGO

TUTORA:

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE: Dr. Alfredo Ortega Hernández  
VOCAL: Dr. Leovigildo Quijano  
VOCAL: Dra. Adela Rodríguez Romero  
VOCAL: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas  
SECRETARIO: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

### **Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:**

Laboratorio 124, Edificio E, Departamento de Farmacia  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

## CONGRESOS

**Hintoniamine, a new calmodulin inhibitor from the endophytic fungus.** Poster. 52nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy (Julio 30 – Agosto 3, 2011), San Diego, California, EUA.

**Vermelhotin and 9S,11R-(+)-ascosalitoxin from an endophytic fungus isolated from *Hintonia latiflora*.** Poster. 53rd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy (Julio 28 – Agosto 1, 2012), New York, New York, EUA.

**Search of calmodulin inhibitors from a new endophytic fungus isolated from *Hintonia latiflora*.** Ponencia. QUIMIUNAM (Noviembre 14 – Noviembre 16, 2012), México D.F., México.

**Calmodulin inhibitors from the endophytic fungus *Sporormiella minimoides*.** Poster. 2013 Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy (Julio 13 – Julio 17, 2013), St. Louis, Missouri, EUA.

## ARTICULO

Leyte-Lugo, M., González-Andrade, M., González, M., Glenn, A. E., Cerda-García-Rojas, C. M., Mata, R. 2012. (+)-Ascosalitoxin and Vermelhotin, a Calmodulin Inhibitor, from an Endophytic Fungus Isolated from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products* **75** (9), 1571–1577.

## AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Químicas y a la UNAM, por permitir ampliar mi formación académica.
- Agradezco especialmente a la *Dra. Rachel Mata* por la oportunidad, la dedicación así como el compromiso en el desarrollo de este trabajo. Gracias.
- Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado (becario 211320), y por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto (CONACyT 99395).
- A la Dra. María del Carmen González Villaseñor del Instituto de Biología (UNAM), por proporcionar el material fúngico para el desarrollo del proyecto.
- Al personal técnico de la USAI (Facultad de Química) por el registro de los espectros de masas, IR, UV y RMN.
- Al Departamento de Supercómputo de la Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (KanBalam-UNAM) por la asignación de recursos computacionales para la realizar los estudios de modelado molecular.
- Al Dr. Carlos Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y de estudios Avanzados (CIVESTAV-IPN), por el registro de espectros de RMN así como por su valiosa asesoría y el apoyo para el desarrollo de este proyecto.
- Al comité tutor: Dr. Rogelio Pereda y Dr. Leovigildo Quijano por sus valiosos comentarios, observaciones y sugerencias durante el desarrollo del proyecto.
- A los miembros del jurado designado, por sus valiosos comentarios y observaciones durante la revisión de este trabajo.
- A la Dra. Araceli Pérez por el apoyo técnico y la asesoría en el desarrollo de proyecto así como su valiosa amistad.
- A la Dra. Isabel Rivero por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este trabajo y por su valiosa amistad.
- Al Dr. Mario Figueroa por el registro de espectros de RMN, por sus observaciones y asesoría.
- Al Dr. Martín González (INMEGEN) por su ayuda y asesoría en la evaluación biológica.

## **DEDICATORIAS**

# INDICE

	<b>página</b>
LISTA DE CUADROS Y TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. ANTECEDENTES	
1.1 Hongos endófitos como fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos	5
1.2 Inhibidores de la CaM	13
1.2.1 Técnicas experimentales utilizadas para la detección y caracterización de la interacción ligante-CaM	16
1.2.2 Inhibidores de origen sintético	17
1.2.3 Inhibidores de origen natural	19
1.3 Antecedentes de las especies endófitas: MEXU 26343 (Pleosporales) y <i>Sporormiella minimoides</i> (Pleosporales)	31
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 Hipótesis	35
2.2 Objetivo	35
2.3 Objetivos Particulares	35
3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Material fúngico	37
3.2 Análisis cromatográficos	38
3.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	38
3.4 Fermentación de las especies fúngicas	39
3.5 Estudio químico de las especies fúngicas	39
3.5.1 Preparación de los extractos orgánicos en mediana escala	39

	<b>página</b>
3.5.2 Establecimiento del perfil cromatográfico del extracto de MEXU 26343	40
3.5.2.1 Obtención de la <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> ) y la 9 <i>S</i> ,11 <i>R</i> -(+)-ascosalitoxina ( <b>83</b> ) a partir del extracto orgánico de la especie endófito MEXU 26343	40
3.5.2.2 Aislamiento, purificación e identificación de la <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> )	40
3.5.2.3 Aislamiento, purificación e identificación de la 9 <i>S</i> ,11 <i>R</i> -(+)-ascosalitoxina ( <b>83</b> )	41
3.5.2.4 Reducción y acetilación de la 9 <i>S</i> ,11 <i>R</i> -(+)-ascosalitoxina ( <b>83</b> )	42
3.5.3 Establecimiento del perfil cromatográfico del extracto orgánico de <i>Sporormiella minimoides</i>	43
3.5.3.1 Obtención de los metabolitos secundarios de la especie endófito <i>S. minimoides</i>	43
3.5.3.2 Aislamiento, purificación e identificación de corimbiferona ( <b>84</b> )	43
3.5.3.3 Fraccionamiento secundario del extracto orgánico de <i>S. minimoides</i>	44
3.5.3.4 Aislamiento, purificación e identificación de ziganein ( <b>85</b> ; 1,5-dihidroxi-3-metilantraquinona)	44
3.5.3.5 Aislamiento, purificación e identificación de 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona ( <b>86</b> )	45
3.5.3.6 Aislamiento, purificación e identificación de brocaenol B ( <b>87</b> )	45
3.5.3.7 Aislamiento, purificación e identificación de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[ <i>de</i> ]isocromen-1,9-diona ( <b>88</b> ) y la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -benzo[ <i>de</i> ]isocromen-9-ona ( <b>89</b> )	46
3.5.3.8 Transformación de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[ <i>de</i> ]isocromen-1,9-diona ( <b>88</b> ) a la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -benzo[ <i>de</i> ]isocromen-9-ona ( <b>89</b> )	47
3.6 Ensayos biológicos	47



	<b>página</b>
3.6.1 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de compuestos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crus-galli</i> , <i>Ipomea purpurea</i> y <i>Medicago sativa</i>	47
3.6.2 Apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM mediante el empleo del biosensor <i>hCaM M124-mBBr</i>	48
3.6.3 Efecto vasorrelajante de la <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> ) sobre las contracciones inducidas por noradrenalina en anillos de aorta de rata	48
3.6.4 Toxicidad aguda de la <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> )	50
3.7 Estudios de Acoplamiento Molecular	50
3.8 Cálculos de Modelado Molecular	51
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1 Selección primaria de las especies fúngicas MEXU 26343 y <i>Sporormiella minimoides</i>	53
4.2 Estudio químico del endófito novedoso MEXU 26343	54
4.2.1 Obtención y caracterización <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> ) y 9 <i>S</i> ,11 <i>R</i> -(+) ascosalitoxina ( <b>83</b> )	55
4.2.2 Elucidación estructural de la 9 <i>S</i> ,11 <i>R</i> -(+)-ascosalitoxina ( <b>83</b> )	62
4.3 Obtención de los metabolitos secundarios de <i>Sporormiella minimoides</i>	71
4.3.1 Caracterización de los metabolitos secundarios aislados de <i>S. minimoides</i> .	72
4.3.2 Elucidación estructural de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona ( <b>86</b> )	72
4.3.3 Elucidación estructural de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[ <i>de</i> ]isocromen-1,9-diona ( <b>88</b> ) y la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -benzo[ <i>de</i> ]isocromen-9-ona ( <b>89</b> )	75
4.4 Análisis CLAE de los extractos de MEXU 26343 y <i>S. minimoides</i>	81
4.5 Estudios de apagamiento de la fluorescencia extrínseca mediante el empleo de los biosensores <i>hCaM M124C-mBBr</i> y <i>hCaM V91C-mBBr</i>	83
4.6 Estudios de acoplamiento molecular	86

	<b>página</b>
4.7 Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos derivados de los estudios químicos de las especies MEXU26343 y <i>S. minimoides</i>	87
4.8 Efecto vasorrelajante de la <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> ) en un modelo <i>in vitro</i>	89
4.9 Toxicidad agua de vermelhotina ( <b>82</b> )	91
5. CONCLUSIONES	93
6. BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	107

## LISTA DE CUADROS Y TABLAS

	página
<b>Cuadro 1.</b> Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos.	6
<b>Tabla 1.</b> Hongos endófitos que producen taxol ( <b>1</b> ) y sus plantas hospederas.	10
<b>Tabla 2.</b> Hongos endófitos que producen podofilotoxina ( <b>2</b> ) y sus plantas hospederas.	11
<b>Tabla 3.</b> Hongos endófitos que producen camptotecina ( <b>3</b> ) y sus plantas hospederas.	12
<b>Tabla 4.</b> Productos naturales con actividad anti-calmodulina.	20
<b>Tabla 5.</b> Datos espectroscópicos de la mezcla isomérica de <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> ) en CDCl <sub>3</sub> ( <sup>1</sup> H a 500 MHz y <sup>13</sup> C a 125 MHz).	56
<b>Tabla 6.</b> Datos espectroscópicos del compuesto <b>82</b> en CDCl <sub>3</sub> +TFA- <i>d</i> ( <sup>1</sup> H a 300 MHz y <sup>13</sup> C a 75 MHz).	59
<b>Tabla 7.</b> Datos espectroscópicos de la 9 <i>S</i> ,11 <i>R</i> -(+)-ascosalitoxina ( <b>83</b> ) en CDCl <sub>3</sub> ( <sup>1</sup> H a 400 MHz y <sup>13</sup> C a 100 MHz).	62
<b>Tabla 8.</b> Energía libre relativa, <sup>a</sup> población, <sup>b</sup> ángulos diedros seleccionados, <sup>c</sup> y valores de [α] <sub>D</sub> calculados con DFT <sup>d</sup> para los veinte conformeros más relevantes de la 9 <i>S</i> ,11 <i>R</i> -(+)-ascosalitoxina ( <b>83a</b> ).	65
<b>Tabla 9.</b> Datos espectroscópicos de los derivados <b>83-1</b> y <b>83-2</b> en CDCl <sub>3</sub> ( <sup>1</sup> H a 300 MHz y <sup>13</sup> C a 75 MHz).	68
<b>Tabla 10.</b> Valores de las constantes de acoplamiento vecinales ( <i>J</i> <sub>H-H</sub> ) teóricas y experimentales, de los diastereoisómeros del producto <b>83-1</b> , y criterio estadístico EMC.	70
<b>Tabla 11.</b> Valores de las constantes de acoplamiento vecinales ( <i>J</i> <sub>H-H</sub> ), teóricas y experimentales, de los diastereoisómeros del producto <b>83-2</b> , y criterio estadístico EMC.	71
<b>Tabla 12.</b> Datos espectroscópicos de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona ( <b>86</b> ) en CDCl <sub>3</sub> ( <sup>1</sup> H a 500 MHz y <sup>13</sup> C a 125 MHz).	73

<b>Tabla 13.</b>	Datos espectroscópicos de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[ <i>de</i> ]isocromen-1,9-diona ( <b>88</b> ) y la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -benzo[ <i>de</i> ]isocromen-9-ona ( <b>89</b> ) en CDCl <sub>3</sub> y DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , respectivamente ( <sup>1</sup> H a 500 MHz y <sup>13</sup> C a 125 MHz).	77
<b>Tabla 14.</b>	Efecto de los compuestos <b>82</b> y <b>83</b> sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>E. crus-galli</i> , <i>M. sativa</i> e <i>I. purpurea</i> .	88
<b>Tabla 15.</b>	Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) y efecto máximo (E <sub>max</sub> ) de la vermelhotina ( <b>82</b> ) en anillos de aorta de rata con y sin endotelio (E+:E-).	90

## LISTA DE FIGURAS

	página
<b>Figura 1.</b> Estructura de la CaM: diferentes conformaciones de la proteína. (a) CaM libre de átomos de $\text{Ca}^{2+}$ (apo-CaM; PDB 1CFD), (b) CaM unida a 4 átomos de $\text{Ca}^{2+}$ , dos iones en cada dominio ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM; PDB 1CLL), (c) CaM unida a un inhibidor clásico, la trifluoperazina ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-TPZ; PDB 1A29), (d) Complejo CaM-Péptido de la Cinasa de Cadena Ligera de la Miosina ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-MLCK, PDB 2K0F).	14
<b>Figura 2.</b> Localización y función de algunas proteínas reguladas por la CaM.	15
<b>Figura 3.</b> Diseño del biosensor <i>hCaM M124C-mBBR</i> .	17
<b>Figura 4.</b> Alcaloides inhibidores de la CaM.	19
<b>Figura 5.</b> Péptidos inhibidores de la CaM.	25
<b>Figura 6.</b> Terpenoides inhibidores de la CaM.	25
<b>Figura 7.</b> Cumarinas, $\gamma$ -pironas y xantonas inhibidores de la CaM.	26
<b>Figura 8.</b> Antraciclinas y antaquinonas inhibidores de la CaM.	27
<b>Figura 9.</b> Lignanós y estilbenos inhibidores de la CaM.	27
<b>Figura 10.</b> Policétidos inhibidores de la CaM.	28
<b>Figura 11.</b> Flavonoides inhibidores de la CaM.	28
<b>Figura 12.</b> <i>Hintonia latiflora</i> (A). Especies endófitas MEXU 26343 (B) y <i>Sporormiella minimoides</i> (C).	37
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática del experimento vasorrelajante de la <i>E/Z</i> vermelhotina (82).	49
<b>Figura 14.</b> Árbol filogenético de MEXU 26343 basado en la subunidad 28S ribosomal.	54
<b>Figura 15.</b> Metabolitos fúngicos aislados de MEXU 26343.	55
<b>Figura 16.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN de la <i>E/Z</i> vermelhotina (82) (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	57

	<b>página</b>
<b>Figura 17.</b> Espectro de HMBC de la <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>80</b> ), mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.	58
<b>Figura 18.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la vermelhotina ( <b>82</b> ) (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> +TFA- <i>d</i> ).	60
<b>Figura 19.</b> Equilibrio isomérico y conformacional de la <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> ).	61
<b>Figura 20.</b> Estructuras de mínima energía de los cuatro posibles diastereoisómeros del producto natural <b>83</b> .	64
<b>Figura 21.</b> Espectro de NOESY de la 9 <i>S</i> ,11 <i>R</i> -(+)-ascosalitoxina ( <b>83</b> ) mostrando la interacción H-9/H-15.	66
<b>Figura 22.</b> Estructuras de mínima energía de los diastereoisómeros <b>83a</b> y <b>83b</b> . Las correlaciones NOESY entre H-5/H-9 y H-9/Me-15 observadas en el espectro están marcadas en el diastereoisómero <b>83a</b> .	66
<b>Figura 23.</b> Transformaciones químicas del producto <b>83</b> para generar los derivados <b>83-1</b> y <b>83-2</b> .	67
<b>Figura 24.</b> Diastereoisómeros de menor energía del derivado <b>83-1</b> .	69
<b>Figura 25.</b> Diastereoisómeros de menor energía del producto <b>83-2</b> .	70
<b>Figura 26.</b> Metabolitos secundarios de <i>Sporormiella minimoides</i> .	71
<b>Figura 27.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona ( <b>86</b> ) [500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	73
<b>Figura 28.</b> Espectro HMBC de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8 metilnaftoquinona ( <b>86</b> ) mostrando las correlaciones más importantes.	74
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN: a) <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) y b) <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>88</b> .	76
<b>Figura 30.</b> Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H modalidad NOESY de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -benzo[ <i>de</i> ]isocromen-9-ona ( <b>89</b> ) mostrando las correlaciones más importantes.	79

	<b>página</b>
<b>Figure 31.</b> Estructuras de mínima energía de los enantiómeros <b>89a</b> y <b>89b</b> y sus valores de rotación óptica calculados en la línea D-sodio.	80
<b>Figura 32.</b> Cromatograma de líquidos obtenido a partir del extracto de MEXU 26343. Fase móvil: gradiente CHCl <sub>3</sub> (A): MeOH (B) [0-5 min, 100% A; 5-25 min, 90% A; 25-30 min, 90% A; 30-32 min, 85% A]; Flujo: 0.6 mL/min; Columna: $\mu$ Porasil; Detección: 273 nm.	81
<b>Figura 33.</b> Cromatograma de líquidos obtenido a partir del extracto de <i>S. minimoides</i> . Fase móvil: gradiente CH <sub>3</sub> CN (A): H <sub>2</sub> O (B) [0-10 min, 30% A; 10-15 min, 60% A; 15-25 min, 60% A; 25-28 min, 100% A]; Flujo: 0.6 mL/min; Columna: Symmetry C18; Detección: 220 nm.	82
<b>Figura 34.</b> Espectro de fluorescencia (izquierda) y curva de titulación (derecha) de hCaM M124C- <i>mBBr</i> con: a) <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> ) [0-7.6 $\mu$ M] y b) CPZ (0-15 $\mu$ M).	84
<b>Figura 35.</b> Espectro de fluorescencia (izquierda) y curva de titulación (derecha) de hCaM V91C- <i>mBBr</i> con: a) compuesto <b>86</b> (0-236 $\mu$ M) y b) CPZ (0-35 $\mu$ M).	85
<b>Figure 36.</b> Estructura del complejo CaM-TFP. La figura izquierda muestra la unión de la CaM con la TFP (morado), el isómero <i>E</i> -vermelhotina ( <b>82a</b> ) [rojo] y el isómero <i>Z</i> -vermelhotina ( <b>82b</b> ) [azul]. La figura de la derecha muestra las interacciones entre los isómeros <i>E</i> y <i>Z</i> con los aminoácidos de la CaM.	86
<b>Figure 37.</b> Estructura del complejo CaM-TFP. La figura izquierda muestra la unión de <b>86</b> con la CaM (sitio IV; rojo), usando la estructura cristalizada del complejo CaM-TFP (sitio I; azul). La figura de la derecha muestra las interacciones entre <b>86</b> y los aminoácidos de la CaM.	87
<b>Figura 38.</b> Efecto de la <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> ) sobre <i>A. hypochondriacus</i> : a) control negativo, b) 50 ppm, c) 100 ppm y d) 500 ppm.	88
<b>Figura 39.</b> Efecto vasorrelajante de la <i>E/Z</i> vermelhotina ( <b>82</b> ) dependiente de la concentración.	90

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
AcOEt	Acetato de Etilo
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
HCl	Ácido Clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
Å	Ångström
NaBH <sub>4</sub>	Borohidruro de Sodio
CaM	Calmodulina
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
<i>q</i>	Cuarteto
$\delta$	Desplazamiento Químico
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de Dobles
EM-FAB	Espectrometría de Masas Modalidad Bombardeo Rápido de Protones
EM-IE	Espectrometría de Masas Modalidad Impacto Electrónico
EM-ESI	Espectrometría de Masas Modalidad Ionización por Electrospray
°C	Grados Celsius
<i>g</i>	Gramo
Hz	Hertz
Hex	Hexano



<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
h	Horas
IR	Infrarrojo
kg	Kilogramos
MHz	MegaHertz
MeOH	Metanol
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{m}$	Micrómetro
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
<i>mBBr</i>	Monobromobimano
nm	Nanómetro
NA	Noradrenalina
ppm	Partes por Millón
PDB	Protein Data Bank
p.f.	Punto de Fusión
DTF	Teoría del Funcional de la Densidad
<i>m/z</i>	Relación Masa-Carga
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Sulfato de Sodio Anhidro
$[\alpha]_{\text{D}}$	Rotación Óptica
$^{13}\text{C}$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
$^1\text{H}$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
s	Singulete
$t_{\text{R}}$	Tiempo de Retención
TPZ	Trifluoperazina
UV	Ultravioleta

## RESUMEN

El presente trabajo forma parte de un proyecto enfocado al descubrimiento de compuestos de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes inhibidores de la proteína calmodulina (CaM), potencialmente útiles para el desarrollo de fármacos y/o herramientas de investigación, a partir de especies fúngicas endófitas obtenidas de plantas medicinales de México. Las dos especies seleccionadas para el desarrollo de la presente investigación comprenden a MEXU 26343 y *Sporormiella minimoides*, que son especies endófitas obtenidas a partir de las hojas de *Hintonia latiflora* (Rubiaceae).

El estudio químico de la nueva especie endófito MEXU 26343 permitió el aislamiento de la mezcla isomérica de la *E/Z* vermelhotina (**82**) y de un nuevo derivado del aldehído salicílico denominado 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**), caracterizados fundamentalmente mediante RMN. La configuración absoluta del compuesto **83** fue establecida mediante cálculos de modelado molecular utilizando DFT a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP, el cual incluyó la comparación entre los valores de rotación óptica ( $[\alpha]_D$ ) teóricos con el experimental y de las constantes de acoplamiento ( $J_{H-H}$ ) de dos derivados químicos del producto natural.

El análisis del extracto del medio de cultivo sólido de *S. minimoides* (Pleosporales) generó tres nuevos compuestos caracterizados por métodos espectroscópicos y espectrométricos como la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**), la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (**88**), y la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**). De manera adicional, los policétidos corimbiferona (**84**), ziganeina (**85**) y brocaenol B (**87**) también fueron identificados. La transformación del compuesto **88** en **89**, se llevó a cabo mediante el tratamiento del primero con MeOH a temperatura ambiente, sugiriendo de esta manera que **89** es un artefacto generado durante el procedimiento de separación.

Para determinar la interacción de los compuesto con la proteína CaM, se realizaron experimentos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca, empleando dos biosensores: *hCaM* M124C-*mBBR* y *hCaM* V91C-*mBBR*, además de estudios de acoplamiento molecular para establecer el posible sitio de unión. Todos los compuestos fueron evaluados como posibles inhibidores de la CaM pero sólo **82** y **86** apagaron la fluorescencia extrínseca con valores de constantes de disociación ( $K_d$ ) de 0.25 y 1.55  $\mu$ M, respectivamente. El estudio de

acoplamiento molecular sugirió que **82** se une en el sitio I y que **84** en el sitio IV de la trifluoperazina en la CaM.

Los estudios de acoplamiento molecular de **82** permitieron predecir que el isómero *Z* muestra interacciones de tipo hidrofóbicas con los aminoácidos Ile100, Leu105, Met124, Ile125, Glu127 y Val136, mientras que el isómero *E* interacciona con Phe92, Met109, Met124, Glu127, Ala128 y Met144, además forma un puente de hidrógeno entre H-1 y Glu127. El análisis del compuesto **86** mostró interacciones hidrofóbicas con Phe19, Met51, Ile52, Ile63, Phe68, Met71 y Met72.

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los compuestos **82** y **83** se realizó mediante el ensayo de inhibición de la germinación y crecimiento radicular de cuatro especies, incluyendo *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli*, *Ipomea purpurea* y *Medicago sativa*, utilizando el método de dilución en agar. El estudio permitió detectar productos más activos que el producto comercial Rival<sup>®</sup>. Los productos activos incluyeron a la *E/Z* vermelhotina (**82**) y la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**), siendo el primero de éstos el más activo.

La evaluación del efecto relajante sobre la contracción inducida por noradrenalina en anillos de aorta de rata, indicó que la *E/Z* vermelhotina (**82**) tiene un efecto inhibitor dependiente de la concentración e independiente de la presencia de endotelio. El efecto de este compuesto fue menos potente con relación a los controles carbacol y nifedipina; sin embargo, la potencia de la vermelhotina (**82**) es significativa.

Finalmente, la evaluación de la toxicidad aguda por el método de Lorke para determinar la capacidad de producir efectos adversos tras la exposición a una sola dosis del compuesto **82** permitió establecer que éste no es tóxico para ratones hasta una dosis de 5000 mg/kg.

## ABSTRACT

The present investigation was undertaken to discover novel CaM-inhibiting agents potentially useful for drug development and/or research tools from *Sporormiella minimoides* and MEXU 26343, endophytic fungal species isolated from *Hintonia latiflora* (Rubiaceae) leaves.

Chemical investigation of MEXU 26343 (Pleosporales) yielded the known polyketide vermelhotin (**82**) and a new salicylic aldehyde derivative, namely 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxin (**83**). The structure and absolute configuration of the new compound **83** were established by NMR spectroscopy and molecular modeling calculations at the DFT B3LYP/DGDZVP level, which included the comparison between theoretical and experimental optical rotation values. In addition, chemical transformations of **83** yielded suitable derivatives for  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR coupling constant analyses, which reinforce the stereochemical assignment for the natural product.

Analysis of the extract from solid cultured of *Sporormiella minimoides* (Pleosporales) yielded three new polyketides, 5-hydroxy-2,7-dimethoxy-8-methylnaphthoquinone (**86**), 3,6-dimethoxy-8-methyl-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isochromene-1,9-dione (**88**), 3-hydroxy-1,6,10-trimethoxy-8-methyl-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isochromen-9-one (**89**), along with three known compounds, corymbiferone (**84**), ziganein (**85**), and brocaenol B (**87**). Indeed, the treatment of **88** with MeOH at room temperature during two days yielded **89**, supporting the possibility of it being an isolation artifact generated by the electrophilic addition of MeOH to **88** in the separation processes.

All isolates were tested as potential human calmodulin (*hCaM*) inhibitors using the fluorescent biosensors *hCaM* V91C-*mBBR* and *hCaM* M124-*mBBR*, but only **82** and **86** quenched significantly the extrinsic fluorescence with dissociation constant ( $K_d$ ) values of 0.25 and 1.55  $\mu\text{M}$ , respectively.

Docking analysis predicted that compound **82** bounds at site **I**, and **86** bounds at site **IV** to the trifluoperazine in the CaM protein. On the other hand, a series of predicted interactions between the compounds and protein were observed: *Z*-isomer of vermelhotin (**82b**) display mainly hydrophobic interactions with Ile100, Leu105, Met124, Ile125, Glu127 and Val136, while its *E*-isomer form one hydrogen bond between H1 and Glu127, in addition

to hydrophobic interactions with Phe92, Met109, Met124, Glu127, Ala128 and Met144. Analysis of complex **86**-CaM, revealed hydrophobic interactions with Phe19, Met51, Ile52, Ile63, Phe68, Met71 and Met72 residues.

Compounds **82** and **83** were evaluated as phytotoxic agents by testing the effects on germination and radicle growth of four seedlings: *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli*, *Ipomea purpurea* and *Medicago sativa*. Both compounds inhibit radicle growth of seedlings *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli*; first was more active than Rival<sup>®</sup>, used as positive control.

Finally, compound **82** displayed a vasorelaxant effect on the endothelium-denuded (E<sup>-</sup>) aortic rings test, and acute toxicity was established in mice according to the Lorke procedure, which was not toxic to mice because the LD<sub>50</sub> was higher than 5000 mg/kg.

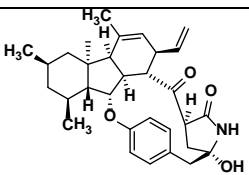
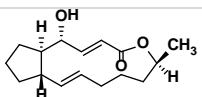
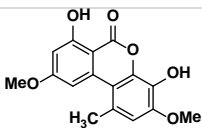
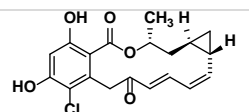
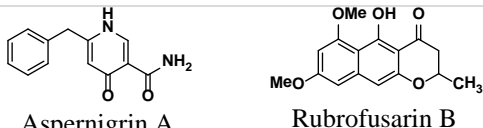
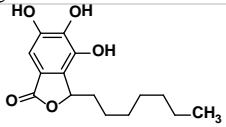
## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Hongos endófitos como fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos

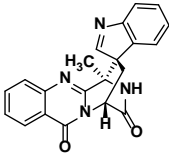
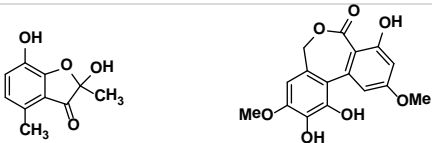
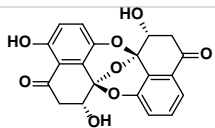
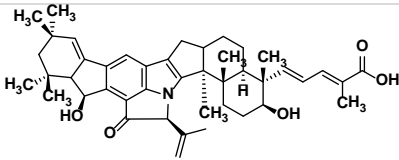
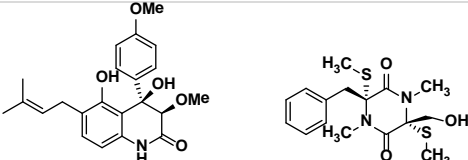
La existencia de alrededor de 300,000 especies de plantas terrestres en el planeta nos da la posibilidad de encontrar en cada una ellas más de una especie de microorganismo endófito, por lo que se estima que el número de éstos asciende a más de un millón de especies (Petrini, 1991). En particular, los hongos endófitos son microorganismos eucariotas relacionados con la planta hospedera de manera simbiótica; estos microorganismos crecen entre los espacios intercelulares de los tejidos de una planta cuyas infecciones son discretas y asintomáticas (Stone *et al.*, 2000). Así, la planta suministra nutrientes y espacio físico necesarios para la supervivencia de los endófitos, en tanto que éstos producen una serie de metabolitos secundarios bioactivos, distintos o similares a los de las plantas hospederas para ayudar a éstas a resistir las tenciones bióticas y abióticas (Tan y Zou, 2001; Strobel y Daisy, 2003).

De esta manera, los hongos endófitos representan una fuente importante y novedosa de productos bioactivos, diversos estructuralmente, con potencial en las industrias agrícola, farmacéutica y alimenticia. De tal forma que se han encontrado compuestos con actividades antimicrobiana, pesticida, citotóxica, inhibidores de enzimas implicadas en procesos patológicos como la enfermedad de Alzheimer, algunos tipos de cáncer y Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), entre otros (Strobel, 2003; Strobel *et al.*, 2004; Selim *et al.*, 2012). En el cuadro 1 se ilustran ejemplos selectos de metabolitos biodinámicos producidos por hongos endófitos.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos.

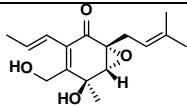
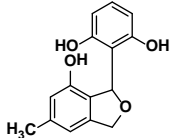
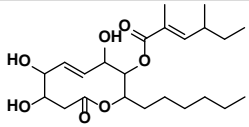
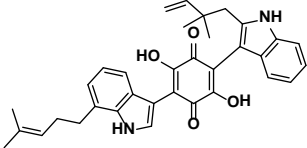
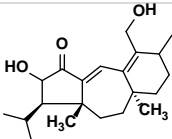
Compuesto	Actividad Biológica	Endófito (cepa)	Planta Hospedera	Referencia
 Pirrocidina A	antibacterial antifúngico	<i>Acremonium zeae</i> (NRRL 13540)	<i>Zea mays</i> L. (Poaceae)	Wicklow <i>et al.</i> , 2002
 Brefeldin A	antifúngico antiviral citotóxico herbicida	<i>Aspergillus clavatus</i> (H-037)	<i>Taxus mairei</i> <i>Torreya grandis</i> (Taxaceae)	Wang <i>et al.</i> , 2002
 Grafislactona A	antioxidante	<i>Cephalosporium</i> sp. (IFB-E001)	<i>Trachelospermum</i> <i>Jasminoides</i> (Apocynaceae)	Song <i>et al.</i> , 2005
 Radicol	citotóxico inhibidor de Hsp90	<i>Chaetomium chiversii</i>	<i>Ephedra fasciculata</i> A. Nels (Ephedraceae)	Turbyville <i>et al.</i> , 2006
 Aspernigrin A      Rubrofusarin B	citotóxico inhibidor de xantina oxidasa	<i>Cladosporium herbarum</i> (IFB-E002)	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (Poaceae)	Ye <i>et al.</i> , 2005 Hiort <i>et al.</i> , 2004
 Citosporona E	antibacterial	<i>Cytospora</i> sp. (CR 200)	<i>Conocarpus erecta</i> L. (Combretaceae)	Brady <i>et al.</i> , 2000

Cuadro 1. Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos (continuación).

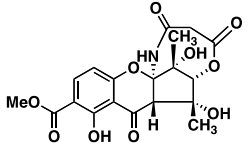
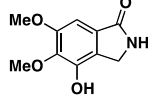
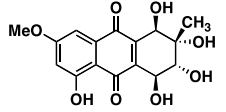
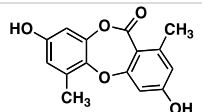
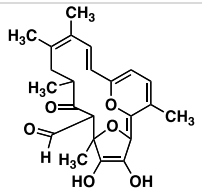
Compuesto	Actividad Biológica	Endófito (cepa)	Planta Hospedera	Referencia
 <p>Alantripinona</p>	citotóxico	<i>Eupenicillium</i> sp.	<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack (Rutaceae)	Barros y Rodríguez-Filho, 2005
 <p>Enalin      Ulocladol</p>	inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE)	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	<i>Pilgerodendron uviferum</i> (Cupressaceae)	Hormazahal <i>et al.</i> , 2005
 <p>Preussomerin L</p>	antibacterial antifúngico	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Atropa belladonna</i> L. (Solanaceae)	Krohn <i>et al.</i> , 2001
 <p>Ácido nodulisporico A</p>	insecticida	<i>Nodulisporium</i> sp. MF 5954	<i>Bontia daphnoides</i> L. (Scrophulariaceae)	Hensens <i>et al.</i> , 1999
 <p>Peniprequinolona      Gliovictin</p>	nematicida acelerador del crecimiento radicular citotóxico	<i>Penicillium janczewskii</i>	<i>Prumnopitys andina</i> (Endl.) Laubenf. (Podocarpaceae)	Schmeda-Hirschmann <i>et al.</i> , 2005 He <i>et al.</i> , 2005



Cuadro 1. Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos (continuación).

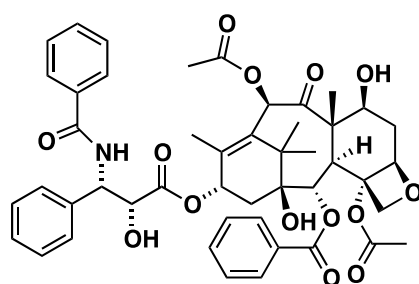
Compuesto	Actividad Biológica	Endófito (cepa)	Planta Hospedera	Referencia
 Jesterona	antifúngico antimicótico	<i>Pestalotiopsis jesteri</i>	<i>Fragraea bodenii</i> Thunb. (Gentianaceae)	Li y Strobel, 2001
 Pestacin	antimicótico antioxidante	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i> L. (Combretaceae)	Harper <i>et al.</i> , 2003
 Fomol	antibacterial antifúngico antiinflamatorio citotóxico	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Erythrina crista-galli</i> L. (Fabaceae)	Weber <i>et al.</i> , 2004
 Demetilasterriquinona B1	activador de receptores de insulina	<i>Pseudomassaria</i> sp.	No identificada	Salituro <i>et al.</i> , 2001
 Guanacastepeno B	antibacterial	No identificado (CR115)	<i>Daphnopsis americana</i> (Miller) J. S. Johnson (Thymelaeaceae)	Brady <i>et al.</i> , 2000

Cuadro 1. Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos (continuación).

Compuesto	Actividad Biológica	Endófito (cepa)	Planta Hospedera	Referencia
 <p>Cryptosporioptido</p>	inhibidor de lipooxigenasas	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	<i>Zanthoxylum leprieurii</i>	Saleem <i>et al.</i> , 2013
 <p>Emerimidina A</p>	antiviral (H1N1)	<i>Emericella</i> sp. (HK-ZJ)	<i>Aegiceras corniculatum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2011
 <p>Altersolanol</p>	angiogénico	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Erythrina variegata</i>	Pompeng <i>et al.</i> , 2013
 <p>Corinesidona A</p>	Inhibidor de la actividad aromatasas	<i>Corynespora cassiicola</i> (L36)	<i>Lindenbergia Philippensis</i> (Scrophulariaceae)	Chomcheon <i>et al.</i> , 2009
 <p>Chaetoglobosin X</p>	citotóxico	<i>Chaetomium globosum</i> (L18)	<i>Curcuma wenyujin</i> Y.H. Chen & C. Ling	Wang <i>et al.</i> , 2012

Entre los metabolitos que son biosintetizados por el hongo y la planta hospedera destacan por su importancia en la terapéutica, el taxol (1), la podofilotoxina (2), la camptotecina (3), la vinblastina (4) y la vincristina (5).

El taxol (1) es un diterpenoide que fue aislado por primera vez de la especie *Taxus brevifolia* (Taxaceae) en 1971. Este compuesto muestra acción eficaz contra el cáncer de próstata, ovario, mama y pulmón; su principal mecanismo de acción está relacionado con su capacidad de alterar el equilibrio dinámico de los microtúbulos y de esta manera inhibir el proceso de mitosis en las células. Este compuesto es biosintetizado por diferentes hongos endófitos aislados a partir de varias especies del género *Taxus*, entre otras (Tabla 1).



(1)

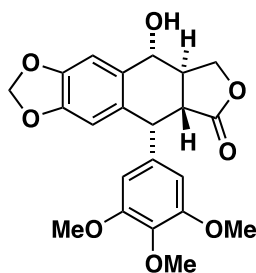
**Tabla 1.** Hongos endófitos que producen taxol (1) y sus plantas hospederas.

Endófito	Planta Hospedera	Referencia
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Ginkgo biloba</i>	Kim <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>Taxi</i>	<i>Taxus cuspidata</i>	Strobel <i>et al.</i> , 1996
<i>Fusarium arthrosporioides</i>	<i>Taxus cuspidata</i>	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Alternaria alternata</i>		
<i>Ectostroma</i> sp.		Tian <i>et al.</i> , 2006
<i>Botrytis</i> sp.		Hu <i>et al.</i> , 2006
<i>Fusarium mairei</i>	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	Guo <i>et al.</i> , 2006
<i>Ozonium</i> sp.		Cheng <i>et al.</i> , 2007
<i>Papulaspora</i> sp.		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Podocarpus</i> sp	Sun <i>et al.</i> , 2008
<i>Botryodiplodia theobromae</i>		
<i>Fusarium lateritium</i>		Strobel <i>et al.</i> , 1996
<i>Monochaetia</i> sp.	<i>Taxus baccata</i>	Venkatachalam <i>et al.</i> , 2008
<i>Pestalotia bicilia</i>		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Taxus media</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2009
<i>Fusarium solani</i>	<i>Taxus celebica</i>	Chakravarthi <i>et al.</i> , 2008
<i>Metarhizium anisopliae</i>		Li <i>et al.</i> , 2009
<i>Mucor rouxianus</i>	<i>Taxus chinensis</i>	Miao <i>et al.</i> , 2009
<i>Periconia</i> sp.	<i>Torreya grandifolia</i>	Li <i>et al.</i> , 1998
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i>	Strobel <i>et al.</i> , 1997

**Tabla 1.** Hongos endófitos que producen taxol (1) y sus plantas hospederas (continuación).

Endófito	Planta Hospedera	Referencia
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus wallachiana</i>	Strobel <i>et al.</i> , 1996
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	<i>Cardiospermum helicacabum</i>	Gangadevi <i>et al.</i> , 2008
<i>Pestalotiopsis terminaliae</i>	<i>Terminalia arjuna</i>	Gangadevi <i>et al.</i> , 2009
<i>Phyllosticta dioscoreae</i>	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Kumaran <i>et al.</i> , 2009
<i>Phyllosticta spinarum</i>	<i>Cupressus sp.</i>	Kumaran <i>et al.</i> , 2008
<i>Pithomyces sp.</i>	<i>Taxus sumatrana</i>	Strobel <i>et al.</i> , 1996
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Stierle <i>et al.</i> , 1993

La podofilotoxina (2) es un lignano del tipo ariltetralina aislado de vegetales de los géneros *Diphylleia* (Berberidaceae), *Dysosma* (Berberidaceae), *Sabina* (*Juniperus*) [Cupressaceae] y *Sinopodophyllum* (*Podophyllum*) [Berberidaceae]. Este lignano tiene propiedades antiviral, anticancerígena, antioxidante, antibacteriana, inmunoestimulante y antiirreumática. De manera adicional, la podofilotoxina es un precursor para la síntesis de fármacos anticancerígenos como el etopósido y el tenipósido. Recientemente, varios investigadores reportaron el aislamiento del lignano a partir de varios hongos endófitos (Tabla 2).

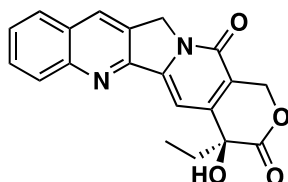


(2)

**Tabla 2.** Hongos endófitos que producen podofilotoxina (2) y sus plantas hospederas.

Hongo Endófito (Cepa)	Planta Hospedera	Referencia
<i>Alternaria sp.</i> (-/SC13)	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	Yang <i>et al.</i> , 2003
	<i>Sabina vulgaris</i>	Lu <i>et al.</i> , 2006
<i>Alternaria neesex</i> (Ty)		Cao <i>et al.</i> , 2007
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	Yang <i>et al.</i> , 2003
<i>Trametes hirsuta</i>		Puri <i>et al.</i> , 2006
<i>Fusarium oxysporum</i> (JRE1)	<i>Sabina recurva</i>	Kour <i>et al.</i> , 2008
<i>Monilia sp.</i>	<i>Dysosma veitchii</i>	Yang <i>et al.</i> , 2003
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Diphylleia sinensis</i>	Yang <i>et al.</i> , 2003
<i>Penicillium implicatum</i> (-/2BNO1)	<i>Dysosma veitchii</i>	Zeng <i>et al.</i> , 2004
		Guo <i>et al.</i> , 2004
<i>Phialocephala fortinii</i> (PPE5/ PPE7)	<i>Sinopodophyllum peltatum</i>	Eyberger <i>et al.</i> , 2006

La camptotecina (**3**) es un alcaloide indol-monoterpenoide aislado por primera vez de la corteza de *Camptotheca acuminata* (Cornaceae) en 1966. La camptotecina y su análogo 10-hidroxicamptotecina son agentes antineoplásicos que actúan inhibiendo la topoisomerasa I, enzima necesaria para la replicación y transcripción del DNA.



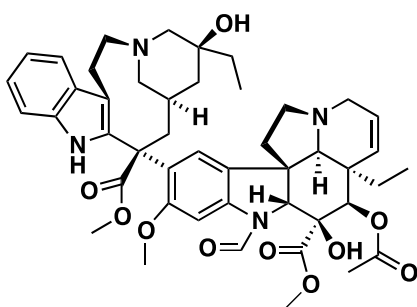
(3)

En 2005, Puri y colaboradores reportaron un hongo endófito aislado de *Nothapodytes foetida* (Icacinaceae), identificado como *Entrophospora infrequens*, el cual tiene la habilidad de producir a la camptotecina. Posteriormente se describieron varias especies endófitas que biosintetizan este metabolito (Tabla 3).

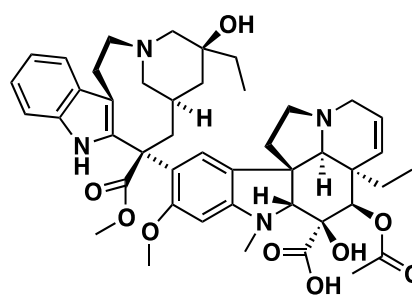
**Tabla 3.** Hongos endófitos que producen camptotecina (**3**) y sus plantas hospederas.

Hongo endófito	Planta Hospedera	Referencia
<i>Entrophospora infrequens</i>	<i>Nothapodytes foetida</i>	Puri <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium solani</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	Kusari <i>et al.</i> , 2009
<i>Fusarium solani</i>	<i>Apodytes dimidiata</i>	Shweta <i>et al.</i> , 2010
<i>Neurospora</i> sp.	<i>Nothapodytes foetida</i>	Rehman <i>et al.</i> , 2008
No identificado	<i>Camptotheca acuminata</i>	Min y Wang, 2009

La vincristina (**4**) y la vinblastina (**5**) son alcaloides indólicos empleados como anticancerígenos y fueron aislados de la especie *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). El mecanismo de acción primario de estos alcaloides es a través de la interferencia con la formación de los microtúbulos y la dinámica del huso mitótico. También interrumpen el transporte intracelular y disminuyen el flujo sanguíneo hacia el tumor, posiblemente debido a un efecto anti-angiogénesis.



(4)

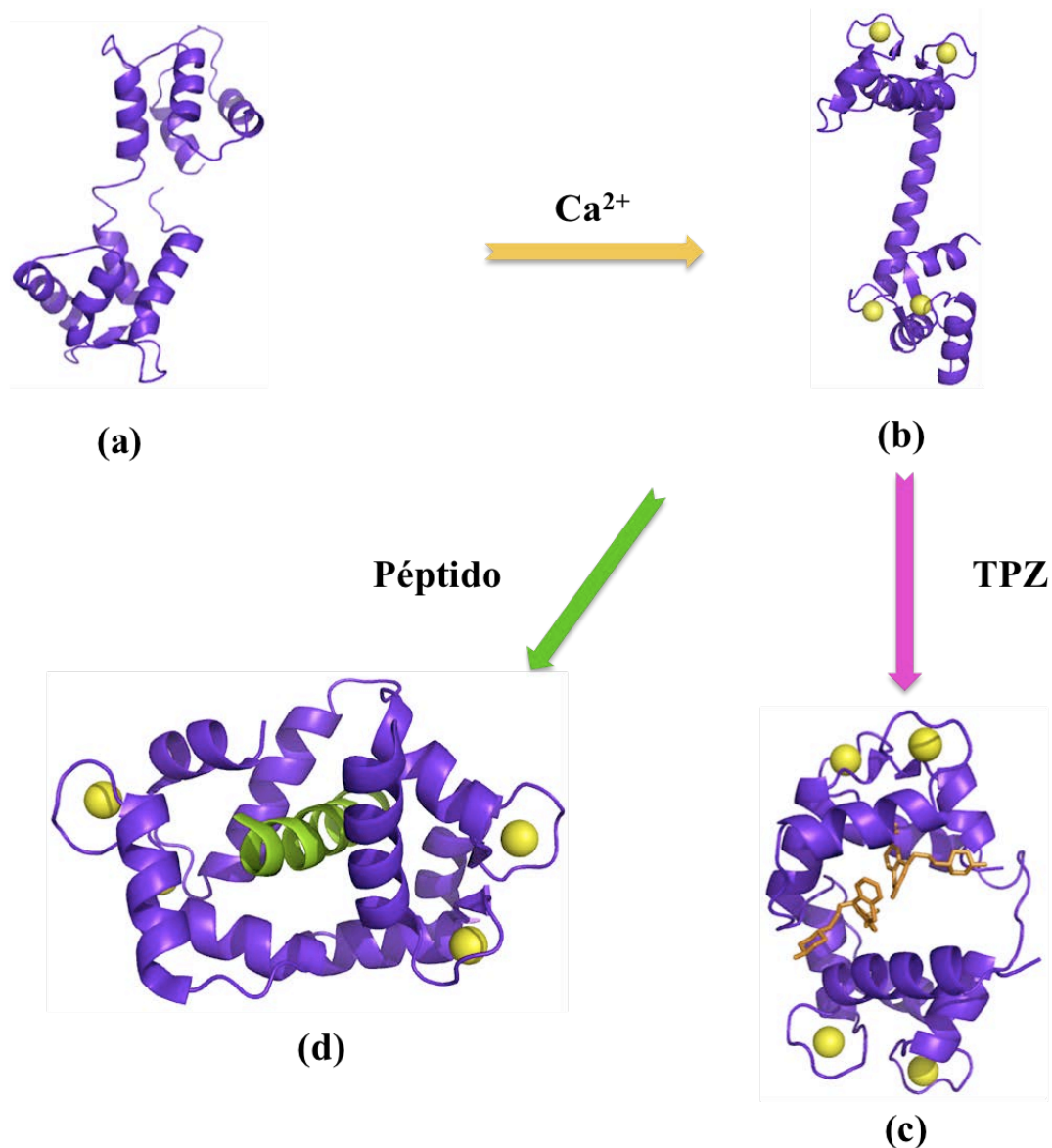


(5)

En 1998 Guo y colaboradores reportaron el aislamiento a partir de la apocinácea de una especie endófitica del género *Alternaria* sp. capaz de producir vinblastina. Por otro lado, Zhang y colaboradores en 2004 aislaron una cepa de *Fusarium oxysporum* a partir del polen de *C. roseus* con la capacidad de biosintetizar vincristina.

## 1.2 Inhibidores de la CaM

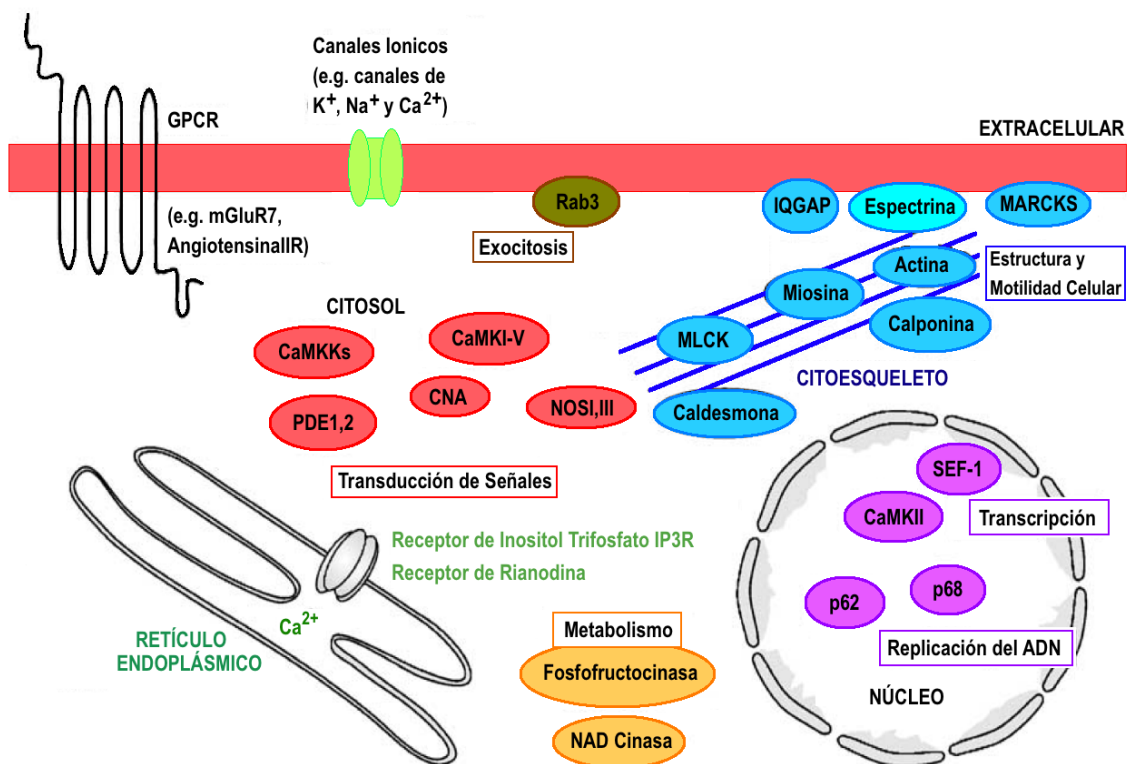
La calmodulina (CaM) es una proteína ubicua de unión a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) fundamental en la regulación de diversos eventos celulares (Bouche *et al.*, 2005). Aunque carece de actividad enzimática, la CaM actúa como mediadora en los procesos de señalización regulados por  $\text{Ca}^{2+}$ . Desde el punto de vista estructural, la CaM es una proteína pequeña de 148 aminoácidos (~17 kD), organizados en dos dominios globulares C- y N-terminales conectados por una larga hélice flexible (Figura 1). Cada uno de los dominios globulares contiene dos sitios funcionales que se unen al ión  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando la CaM tiene unidos sus cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$ , su estructura cuaternaria cambia a un estado conformacional en donde expone sus dos superficies hidrofóbicas ricas en metionina (Met). La flexibilidad de la larga hélice permite que la CaM adopte una gran variedad de conformaciones para interaccionar, activar y/o desactivar diversos blancos enzimáticos. Por lo tanto, en presencia de algún blanco molecular, la CaM adopta una nueva conformación en donde la región flexible se encuentra parcialmente desenrollada, completamente doblada y envolviendo al péptido: esta interacción  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-péptido se lleva a cabo mediante interacciones de tipo hidrofóbicas (Chin y Means, 2000; Bouché *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Estructura de la CaM: diferentes conformaciones de la proteína. (a) CaM libre de átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  (apo-CaM; PDB 1CFD), (b) CaM unida a 4 átomos de  $\text{Ca}^{2+}$ , dos iones en cada dominio ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM; PDB 1CLL), (c) CaM unida a un inhibidor clásico, la trifluoperazina ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-TPZ; PDB 1A29), (d) Complejo CaM-Péptido de la Cinasa de Cadena Ligera de la Miosina ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-MLCK, PDB 2K0F).

La CaM se considera el primer transductor de señales en células eucariontes y es un regulador de eventos celulares por interacción con grupos heterogéneos de proteínas blanco en células tanto animales como vegetales. Cabe mencionar que la secuencia de aminoácidos en la CaM está conservada tanto en animales como en plantas. Se estima que la CaM puede interactuar con aproximadamente 100 diferentes enzimas, incluidas la óxido nítrico sintasa, adenilato ciclasa, algunas fosfodiesterasas, varias cinasas, canales iónicos y fosfatasas, por mencionar algunas (Figura 2). Estas enzimas están involucradas

en la regulación de numerosas funciones celulares como el transporte de iones, la división celular, contracción y relajación del músculo, el aprendizaje, procesos inflamatorios, memoria a largo y corto plazo, humor y ansiedad, procesos virales, transcripción, metabolismo de fosfolípidos, crecimiento y diferenciación celular, ciclo celular, respuesta inmune, entre otras (Bouché *et al.*, 2005; Martínez-Luis *et al.*, 2007; Racioppi y Means, 2008; Kim *et al.*, 2008; Reyes-Ramírez *et al.*, 2011). Por otro lado, esta proteína juega un papel muy importante en la regulación de varios procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo los relacionados con el crecimiento y la defensa (Yang y Poovaiah, 2003; Black *et al.*, 2004; Kortvely y Gulya, 2004).



**Figura 2.** Localización y función de algunas proteínas reguladas por la CaM.

La participación de la CaM en un gran número de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, hacen de esta proteína un blanco de acción atractivo para el descubrimiento de nuevos fármacos, pesticidas o herramientas de investigación. Así, muchos compuestos, naturales y sintéticos interaccionan con la CaM e inhiben sus propiedades moduladoras. Estos productos se pueden unir en forma directa a la proteína o al complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM-enzima. A los productos que se unen a la proteína afectando sus propiedades moduladoras se les conoce como inhibidores clásicos.



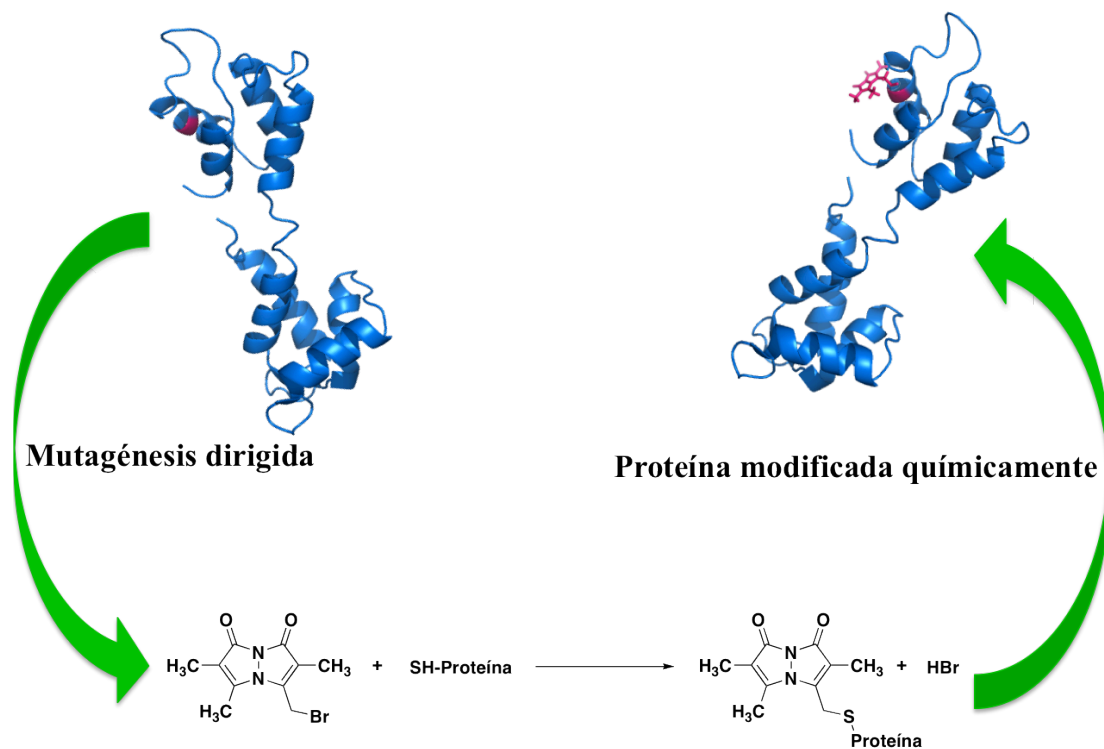
Muchos de los productos que se unen a la CaM han contribuido al conocimiento de sus funciones, regulación y características estructurales, así mismo han permitido el descubrimiento de nuevas proteínas blanco e isoformas, y su papel en la regulación del crecimiento de las plantas y su defensa (Bouché *et al.*, 2005), la contracción y relajación del músculo liso (Somlyo y Somlyo, 2003), el aprendizaje y la memoria, la inflamación (Horikawa *et al.*, 2005), y la ansiedad fisiológica (Du *et al.*, 2004), entre otros procesos.

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

Para la detección de ligantes de la CaM se pueden utilizar diversos métodos, la mayoría de ellos *in vitro*. Los más importantes incluyen la cromatografía de afinidad (Ovádi, 1989; Yurimoto *et al.*, 2009), proteólisis limitada (Ovádi, 1989), espectroscopía UV y dicroísmo circular (Molnar *et al.*, 1995; Vertessy *et al.*, 1998; Harmat *et al.*, 2000; Jaren *et al.*, 2000), electroforesis en gel (Leung *et al.*, 1984), resonancia magnética nuclear (Craven *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 2001), cristalografía de rayos X (Vertessy *et al.*, 1998; Harmat *et al.*, 2000), mutagénesis dirigida (Odom *et al.*, 1997), ensayos enzimáticos funcionales (Sharma *et al.*, 1997; Mata *et al.*, 2003; Rivero-Cruz *et al.*, 2007), tecnologías basadas en la energía de resonancia de fluorescencia (Molnar *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 2004; Gangopadhyay *et al.*, 2004), técnicas basadas en la interacción antígeno-anticuerpos (ELISA) [Liliom *et al.*, 1991; Guerra *et al.*, 2001] y métodos computacionales (Gabdoulline y Wade, 2002; Ladbury y Williams, 2004).

Las técnicas basadas en la energía de resonancia de fluorescencia son muy apreciadas debido a que son altamente específicas, selectivas, de bajo costo y el tiempo de detección es corto. En este caso, la evaluación de la interacción proteína-ligante se da mediante el uso de biosensores marcados con fluoróforos que producen una señal de emisión de energía en el espectro de fluorescencia debido a los cambios conformacionales provocados por la unión de un ligante a la proteína (González-Andrade *et al.*, 2009); estos detectores biológicos contienen uno o más fluoróforos estratégicamente localizados en la proteína, gracias a un proceso de mutagénesis dirigida, que mantienen la capacidad de unirse específicamente al ligante mediante interacciones de tipo no-covalente (Allen *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005; González-Andrade *et al.*, 2009).

González Andrade y colaboradores han generado varios biosensores que permiten detectar ligantes de CaM potencialmente inhibidores o moduladores de sus propiedades reguladoras de cientos de proteínas fisiológicamente activas (González-Andrade *et al.*, 2009; González-Andrade *et al.*, 2011). Así surgieron *hCaM M124C-mBBr* y *hCaM L39C-mBBr/V91C-mBBr* en los que el componente biológico encargado del reconocimiento molecular es la proteína CaM y el componente transductor es el fluoróforo monobromobimano (*mBBr*). En ambos casos el biosensor se generó a través de un proceso de mutagénesis dirigida, mediante la sustitución del aminoácido metionina (Met) 124 o de los aminoácidos leucina (Leu) 39 y valina (Val) 91 por residuos de cisteína (Cis), a las que posteriormente se les unió de manera covalente el fluoróforo monobromobimano (*mBBr*) (Figura 3).



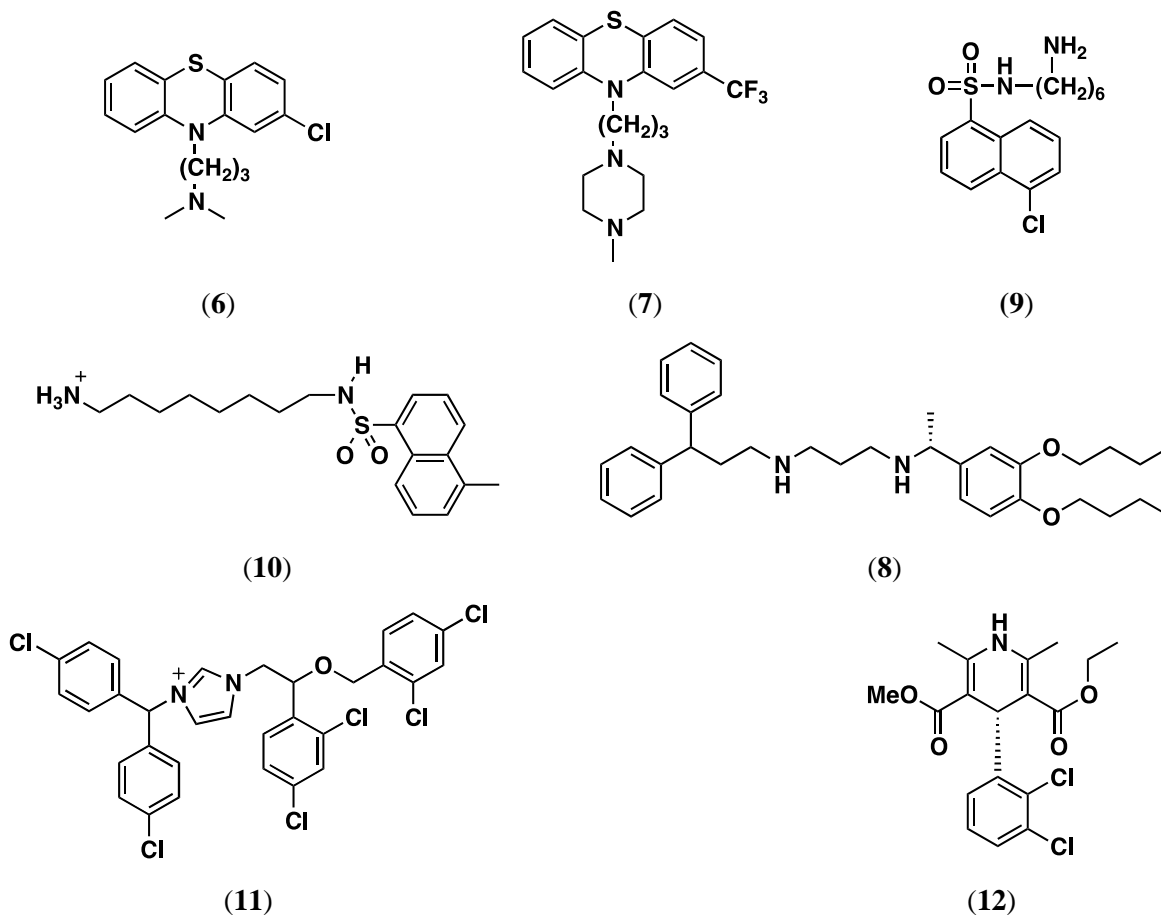
### Marcaje del sitio específico del fluoróforo

**Figura 3.** Diseño del biosensor *hCaM M124C-mBBr*.

#### 1.2.2 Inhibidores de origen sintético

Los inhibidores de la CaM de origen sintético más conocidos pertenecen a las categorías de las fenotiazinas, arilalquilaminas, felodipionas y naftalensulfonamidas, principalmente. Algunos ejemplos de estos compuestos son los antipsicóticos

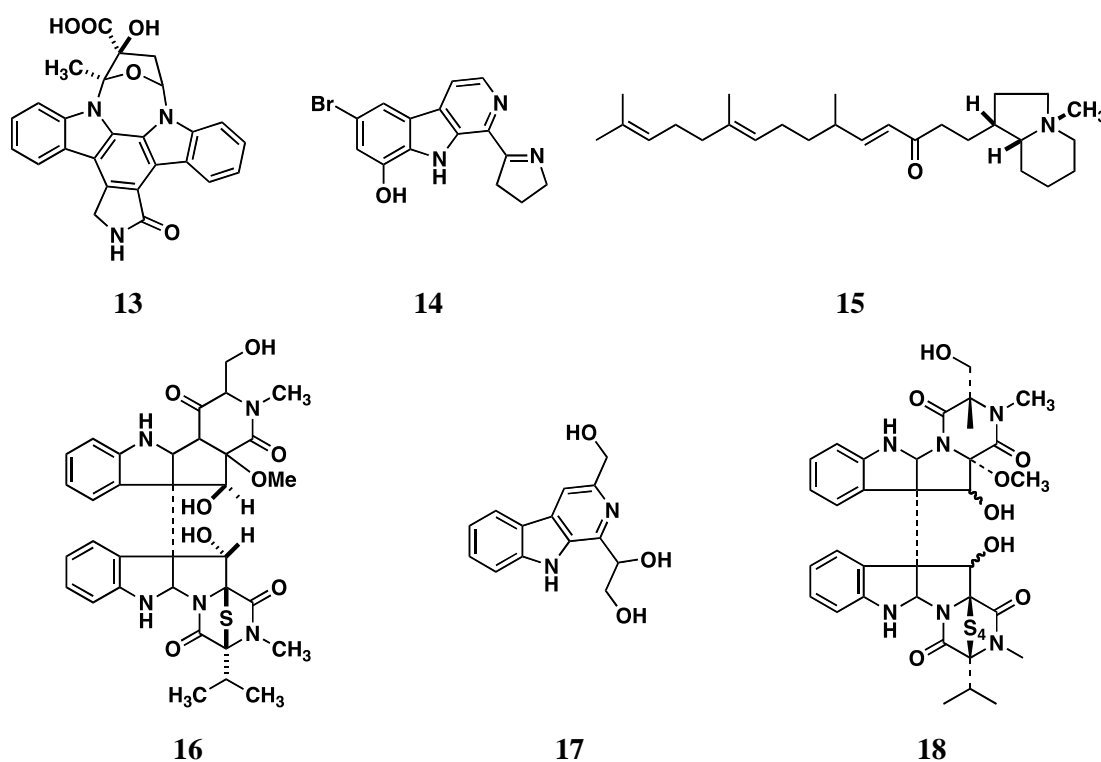
clorpromazina (CPZ; **6**) y la trifluoperazina (TFP; **7**); la arilalquilamina AAA (**8**) y la naftalensulfonamida W7 (**9**), así como el J8 (**10**), el calmidazolio (**11**) y la felodipiona (**12**).



Las técnicas de RMN y cristalografía de rayos X han permitido resolver los complejos formados entre la CaM y sus ligantes; algunos de los inhibidores sintéticos co-cristalizados con la proteína son la CPZ, TFP, W7, J8 y AAA. Estos estudios permitieron observar que la región más hidrofóbica de la proteína es el sitio de unión primario para estos compuestos, y que estos compuestos se unen a la CaM con diferente estequiometría. Frecuentemente, estos compuestos son utilizados como herramientas de investigación en el estudio de los procesos en los que participa esta proteína (Molnar *et al.*, 1995; Craven *et al.*, 1996; Osawa *et al.*, 1998; Vertessy *et al.*, 1998; Harmat *et al.*, 2000; Horváth *et al.*, 2005).

### 1.2.3 Inhibidores de origen natural

De acuerdo a dos revisiones recientes (Martínez-Luis *et al.*, 2007; Mata *et al.*, 2011), numerosos metabolitos secundarios aislados de diversas fuentes naturales, incluidos los hongos microscópicos, antagonizan las propiedades moduladoras enzimáticas de la CaM. Estos compuestos presentan una gran diversidad estructural y pertenecen a diferentes categorías de metabolitos secundarios incluyendo terpenoides, cumarinas, alcaloides, policétidos varios, flavonoides, estilbenoides, peptidos y lignanos, entre otros. En las revisiones recientes se presentan los aspectos más relevantes de sus estructuras, fuentes naturales y afinidad por la proteína CaM o los complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-enzima efectora (Martínez-Luis *et al.*, 2007; Mata *et al.*, 2011). En la tabla 4 se presentan ejemplos selectos de productos naturales que han demostrado una gran afinidad por la CaM. Las estructuras correspondientes se indican en las figuras 4-11.



**Figura 4.** Alcaloides inhibidores de la CaM.

Tabla 4. Productos naturales con actividad anti-calmodulina.

Metabolito Secundario	Fuente Natural	Método de Detección	Referencia
<b>Alcaloides</b>			
Vincristina (4) Vinblastina (5)	<i>Cataranthus roseus</i>	Transferencia Energía de Resonancia de Fluorescencia Dicroísmo Circular	Molnar <i>et al.</i> , 1995
K-252a (13)	<i>Nocardiosis sp</i>	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Kase <i>et al.</i> , 1986 Nakanishi <i>et al.</i> , 1986
Eudistomidina A (14)	<i>Eudistoma glaucus</i>	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Kobayashi <i>et al.</i> , 1990
Esteletamida A (15)	<i>Stelletta sp</i>	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Abe <i>et al.</i> , 1997
Verruculogeno (16)	<i>Penicillium spp</i>	Transferencia Energía de Resonancia de Fluorescencia	Pala <i>et al.</i> , 1999
Piridindolol (17)	<i>Streptoverticillium album</i> K-251	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Matsuda <i>et al.</i> , 1988
Leptosina M (18)	<i>Leptosphaeria sp</i> OUPS-4 <i>Sargassum tortil</i>	Ensayo Enzimático Funcional (CaMKIII, PTK)	Yamada <i>et al.</i> , 2002
<b>Péptidos</b>			
Sanjoinina A (19)			
Sanjoinina Ahl (20)	<i>Zizyphus vulgaris</i> var. spinosus	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1, PKII)	Han <i>et al.</i> , 1993; 2005 Hwang <i>et al.</i> , 2001
Sanjoinina B (21)	<i>Z. jujube</i> var <i>inermis</i> (Rhamnaceae)		
Sanjoinina F (22)			

Tabla 4. Productos naturales con actividad anti-calmodulina (continuación).

Metabolito Secundario	Fuente Natural	Método de Detección	Referencia
<b>Péptidos</b>			
Daechuina S4 (23)			
Sanjoinina (24)	<i>Zizyphus vulgaris</i> var. spinosus <i>Z. jujube</i> var. <i>inermis</i> (Rhamnaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1, PKII)	Han <i>et al.</i> , 1993; 2005 Hwang <i>et al.</i> , 2001
Dihidrosanjoinina A (25)			
Sanjoinina D (26)			
Sanjoinina G1 (27)			
Polimixina B (28)	<i>Bacillus polymyxa</i> (Bacillaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1) Cromatografía de Afinidad Electroforesis Nativa en Gel	Hegemann <i>et al.</i> , 1991
<b>Terpenoides</b>			
Ácido Fasciculico A (29)	<i>Naematoloma fasciculare</i>	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Takahashi <i>et al.</i> , 1989 Kubo <i>et al.</i> , 1985
Ácido Quinovico (30)	<i>Mitragyna stipulosa</i> (Rubiaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Fatima <i>et al.</i> , 2002
Flourensadiol (31)	<i>Flourensia cernua</i>	Electroforesis Nativa en Gel	Mata <i>et al.</i> , 2003
Jujubosido A (32)	Planta Medicinal China	Resonancia Magnética Nuclear	Zhou <i>et al.</i> , 1994
KS-505a (33)	<i>Streptomyces argenteolus</i> (Streptomycetaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1) Electroforesis Nativa en Gel	Nakanishi <i>et al.</i> , 1990 Ichimura <i>et al.</i> , 1996
1-Hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olido (34)	<i>Malbranchea aurantiaca</i> (Myxotrichaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Martínez-Luis <i>et al.</i> , 2005

Tabla 4. Productos naturales con actividad anti-calmodulina (continuación).

Metabolito Secundario	Fuente Natural	Método de Detección	Referencia
<b>Cumarinas, <math>\gamma</math>-pironas y xantonas</b>			
Reticulol (35)	<i>Streptoverticillium album</i>	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Matsuda <i>et al.</i> , 1988
Xantona (36)	<i>Guanomyces polythrix</i> (Chaetomiaceae)	Cromatografía de Afinidad	Macías <i>et al.</i> , 2000, 2001
Rubrofusarina B (37)		Electroforesis Nativa en Gel	
Ácido Secalonico (38)	<i>Penicillium oxalicum</i>	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Pala <i>et al.</i> , 1999
Piranocumarina (39)		Espectroscopía de Fluorescencia	
Lomatin (40)	<i>Prionosciadium watsoni</i> (Umbelliferae)	Electroforesis Nativa en Gel	Valencia-Islas <i>et al.</i> , 2002
(+)- <i>cis</i> -Kelactona (41)			
<b>Antraciclinas y antaquinonas</b>			
K-259-2 (42)	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Matsuda <i>et al.</i> , 1987, 1990
Adriamicina (43)	<i>Streptomyces</i> spp.	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Matsuda y Kase, 1987
Daunorubicina (44)	<i>Streptomyces peucetius</i> <i>Streptomyces galilaeus</i> (Streptomycetaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Nwankwoala y Williams, 1988
Emodina (45)	<i>Guanomyces polythrix</i> (Chaetomiaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Macías <i>et al.</i> , 2001

Tabla 4. Productos naturales con actividad anti-calmodulina (continuación).

Metabolito Secundario	Fuente Natural	Método de Detección	Referencia
<b>Lignanos</b>			
Kobusina (46)	<i>Leucophyllum ambiguum</i> (Scrophulariaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1) Electroforesis Nativa en Gel	Rojas <i>et al.</i> , 2003
Honokiol (47)	<i>Magnolia officinalis</i>	Ensayo Enzimático Funcional (CaMKII)	Lo <i>et al.</i> , 1994 Zhai <i>et al.</i> , 2005
<b>Estilbenoides</b>			
Prenil bibencilos (48 y 49)	<i>Radula kojana</i>	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Asakawa <i>et al.</i> , 1991
Gigantol (50)	<i>Nidema boothii</i> (Orchidaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Hernández-Romero <i>et al.</i> , 2004
Batatasina (51)		Electroforesis Nativa en Gel	Reyes-Ramírez <i>et al.</i> , 2011
<b>Policétidos</b>			
Antibiótico KS-501 (52)	<i>Sporothrix</i> sp. KAC-1985 (Ophiostomataceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Nakanishi <i>et al.</i> , 1990; Yasuzawa <i>et al.</i> , 1990
Herbarumina I (53)	<i>Phoma herbarum</i>	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1) Electroforesis Nativa en Gel	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2003
Citreoviridina (54)	<i>Penicillium</i> spp.	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1) Espectroscopía de Fluorescencia	Pala <i>et al.</i> , 1999
Obscurolido A <sub>1</sub> (55)	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Streptomycetaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Hoff <i>et al.</i> , 1992 Ritzau <i>et al.</i> , 1993

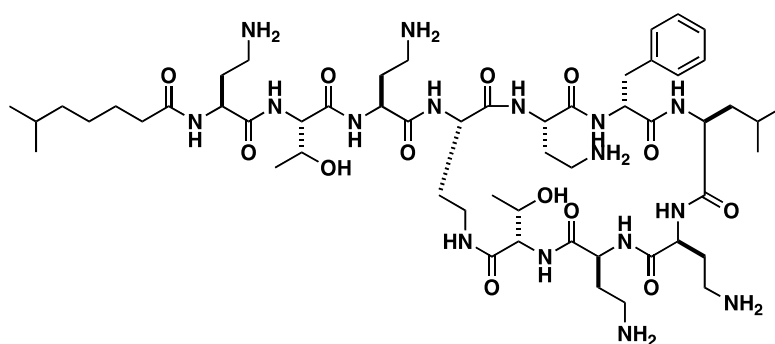


Tabla 4. Productos naturales con actividad anti-calmodulina (continuación).

Metabolito Secundario	Fuente Natural	Método de Detección	Referencia
<b>Flavonoides</b>			
Tectorigenina (56)	<i>Streptovercillium album</i> K-251	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Matsuda <i>et al.</i> , 1988
4-Hidroxiderricina (57)	<i>Angelica keiskei</i> (Umbelliferae)	Espectroscopía de Fluorescencia	Okuyama <i>et al.</i> , 1991
Crisina (58)	<i>Oroxylum indicum</i> (Bignoniaceae)	Estudios Computacionales	Li <i>et al.</i> , 2007
Vitexina (59)	<i>Aloysia citriodora</i> Palau (Verbenaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Ragone <i>et al.</i> , 2007
Diocleina (60)	<i>Dioclea grandiflora</i> (Fabaceae)	Ensayo Enzimático Funcional (PDE1)	Bhattacharyya <i>et al.</i> , 1995 Goncalves <i>et al.</i> , 2009



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>		<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>X</b>
(19)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Phe(S)-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	(25)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Phe(S)-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	H
(20)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Phe(R)-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	(26)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Phe(R)-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	OCH <sub>3</sub>
(21)	N(CH <sub>3</sub> )Phe-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	(27)	N(CH <sub>3</sub> )Phe-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	OH
(22)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Phe-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH(OH)-				
(23)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Leu-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -				
(24)	<i>t</i> -cinamoil-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -				



28

Figura 5. Péptidos inhibidores de la CaM.

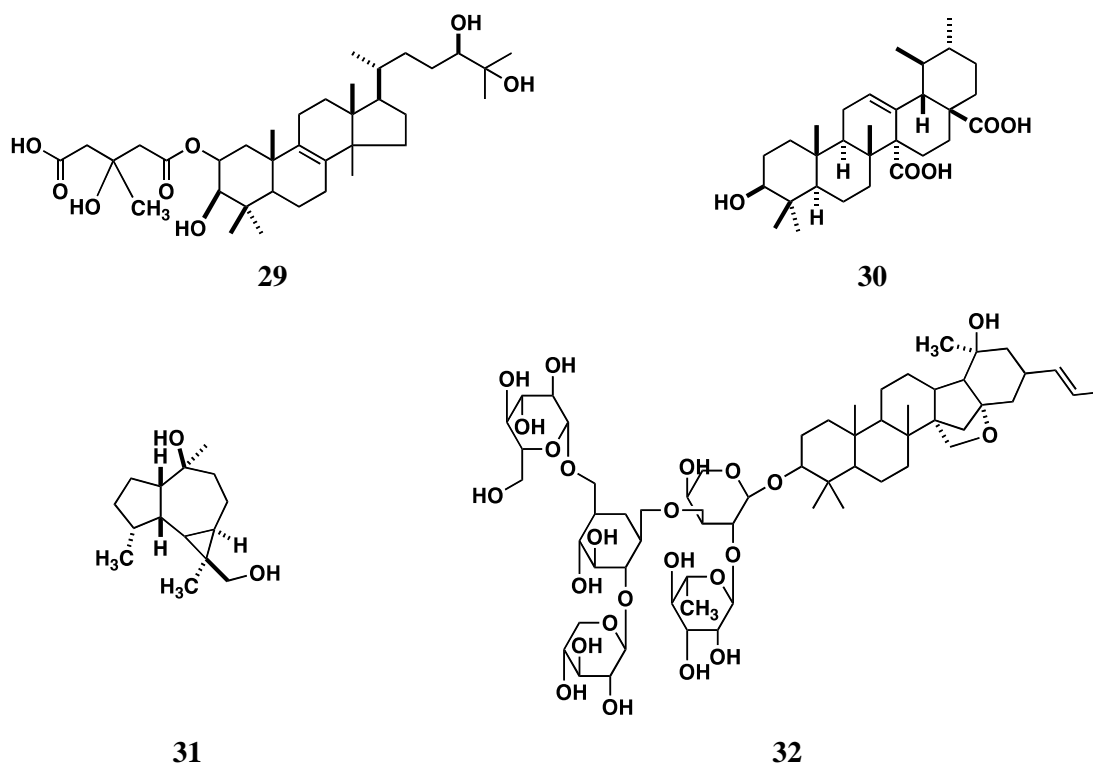
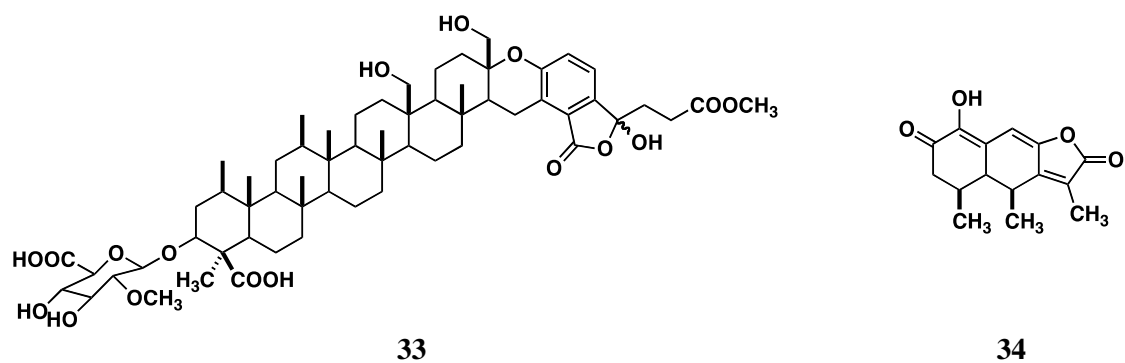
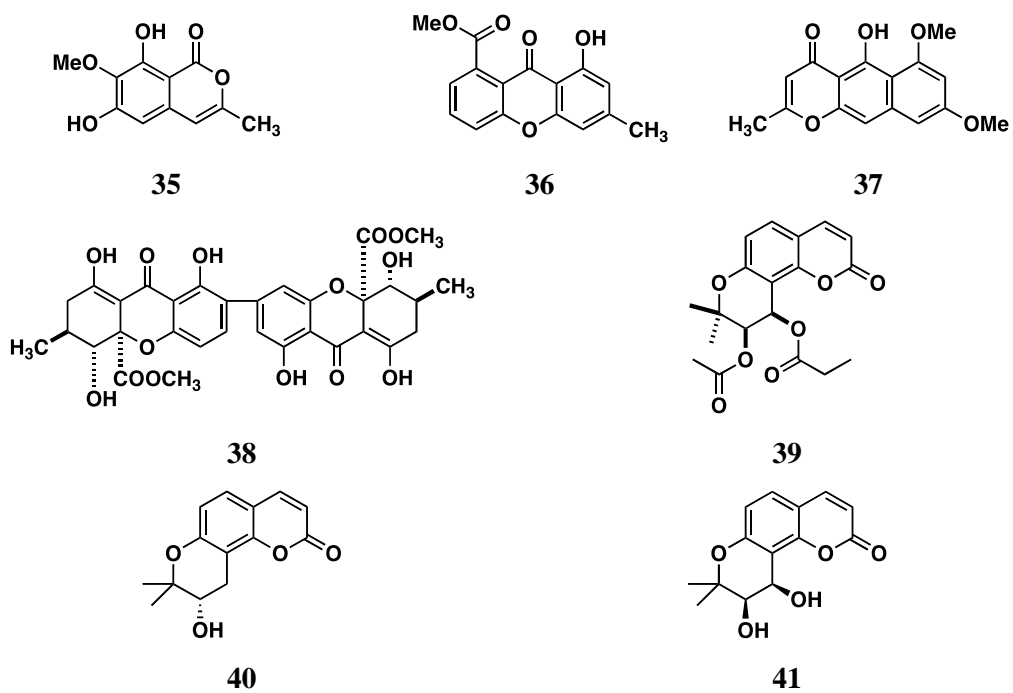


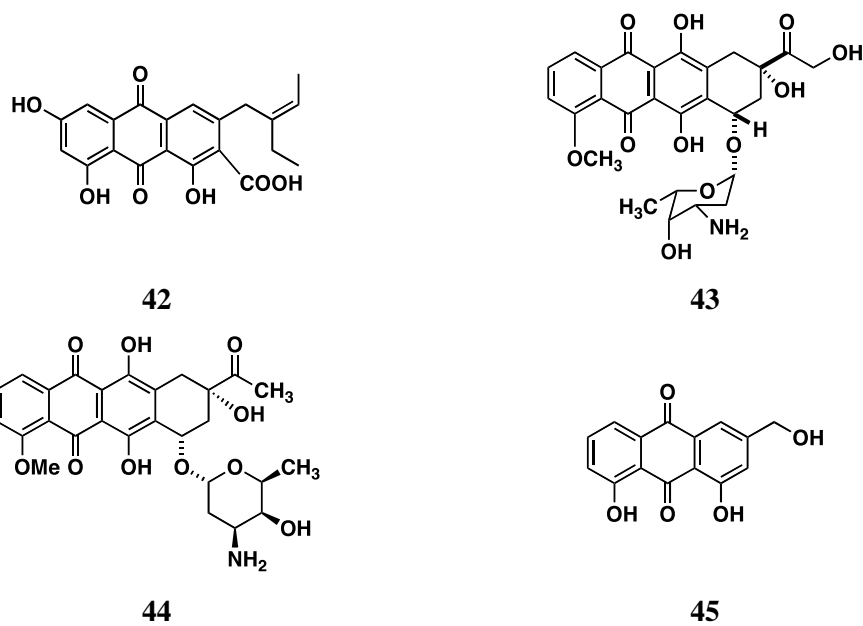
Figura 6. Terpenoides inhibidores de la CaM.



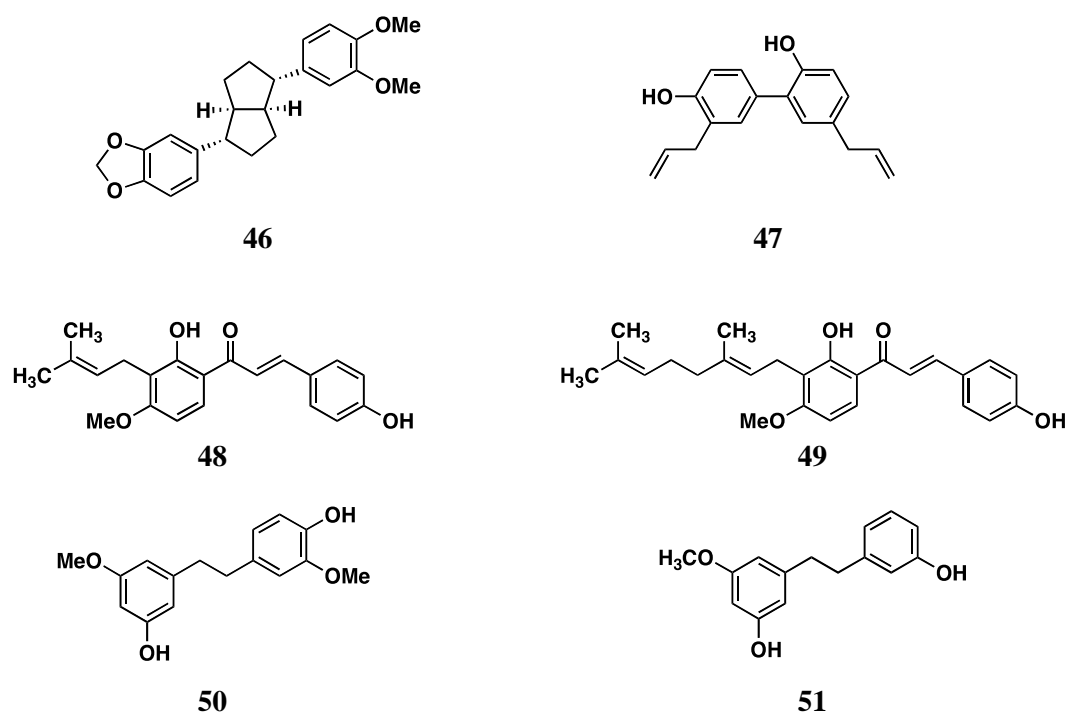
**Figura 6.** Terpenoides inhibidores de la CaM (continuación).



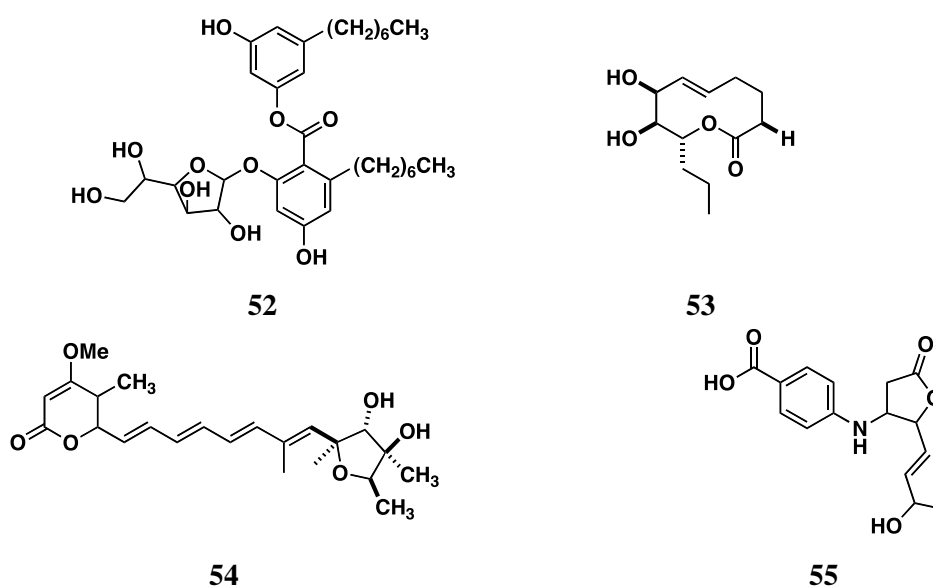
**Figura 7.** Cumarinas,  $\gamma$ -pironas y xantonas inhibidores de la CaM.



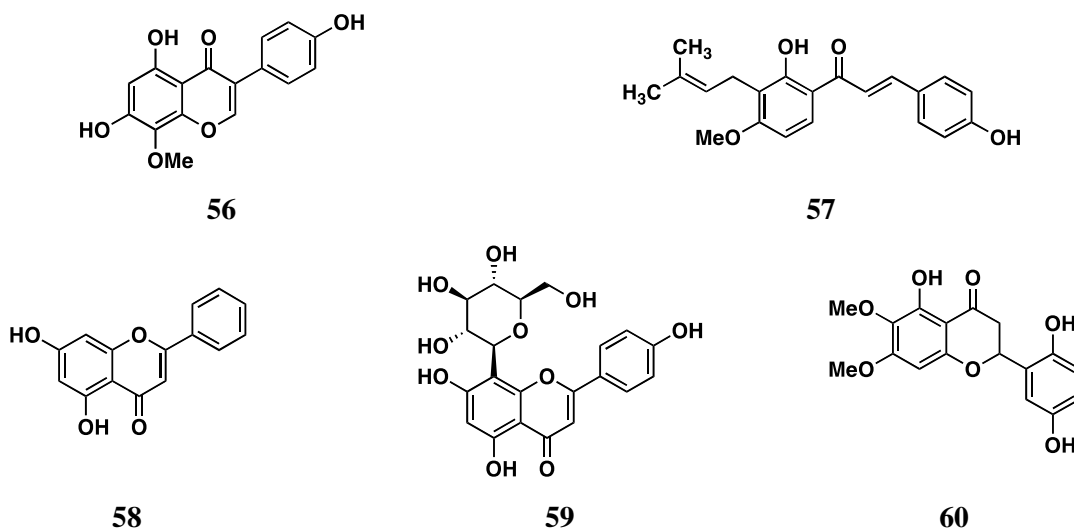
**Figura 8.** Antraciclinas y antaquinonas inhibidores de la CaM.



**Figura 9.** Lignanos y estilbenos inhibidores de la CaM.

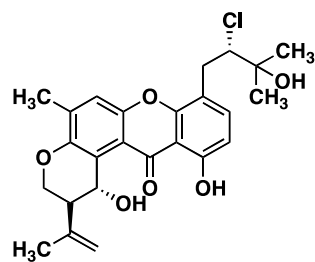


**Figura 10.** Policétidos inhibidores de la CaM.

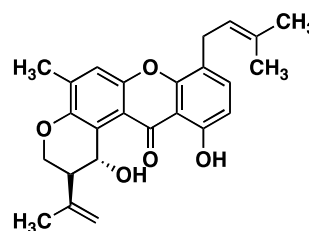


**Figura 11.** Flavonoides inhibidores de la CaM.

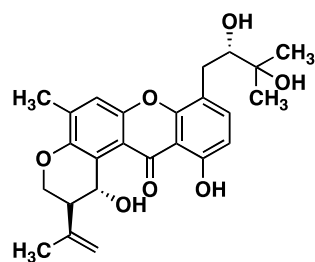
Algunos ejemplos más específicos de inhibidores de la CaM son las xantonas preniladas hidrato de 15-clorotajixantona (**61**), la 14-metoxitajixantona (**62**), la samixantona (**63**) y la hidrato de tajixantona (**64**), biosintetizadas por la especie *Emericella* 25379 aislada del coral *Pacifigorgia rutilia* (Figuroa *et al.*, 2009).



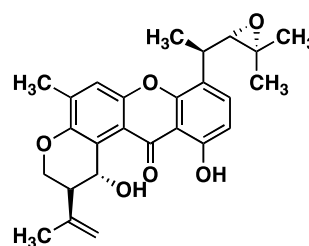
(61)



(62)



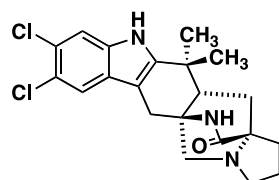
(63)



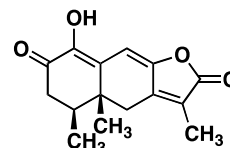
(64)

El efecto de estas xantonas sobre la CaM fue inicialmente evaluado con un ensayo enzimático funcional (PDE1), el cual comúnmente se emplea para detectar antagonistas de la CaM (Sharma y Wang, 1979; Rivero Cruz *et al.*, 2007; Figueroa *et al.*, 2009). Adicionalmente, se evaluó el comportamiento de la CaM en presencia de las xantonas mediante electroforesis en gel de poliacridamida (PAGE) y el apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando un biosensor (*hCaM M124C-mBBr*) diseñado mediante mutagénesis biodirigida.

La malbranqueamida (65), un alcaloide indol monoterpenoide, y el sesquiterpenoide 66 fueron aislado de la especie coprófila *Malbranchea aurantiaca* Singler & Carmich (Myxotrichaceae). Ambos compuestos presentan actividad fitotóxica sobre *Amaranthus hypochondriacus* e inhiben la actividad enzimática de la proteína PDE1 (Martínez-Luis *et al.*, 2005; Martínez-Luis *et al.*, 2006).

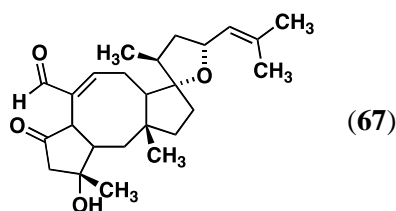


(65)

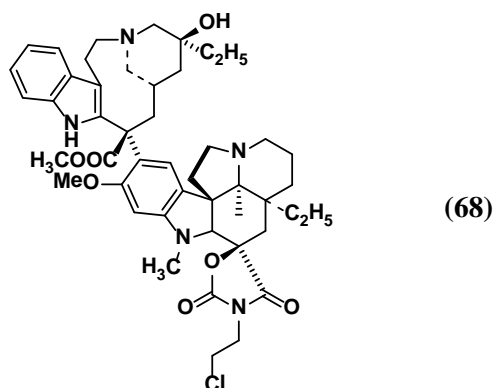


(66)

El sesterterpenoide ofiobolina A (**67**), producto natural aislado del hongo patógeno *Bipolaris oryzae* ha sido ampliamente estudiado por su potente actividad fitotóxica (Leung *et al.*, 1984; Au y Leung, 1998). Este metabolito inhibe la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y la actividad de la enzima  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa involucrada en la síntesis de  $\beta$ -1,3-D-glucano, componente estructural de la pared en hongos. Asimismo, la ofiobolina A es un antagonista de las calmodulinas de maíz y de cerebro de bovino. La interacción de este sesterterpenoide con la CaM se demostró, en un principio, a través de experimentos de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y de la inhibición de la enzima fosfodiesterasa dependiente de CaM (PDE1) [Leung *et al.*, 1984]. Posteriormente se comprobó el efecto anti-CaM mediante el apagamiento de la fluorescencia intrínseca a la tirosina, espectroscopía UV y experimentos de mutagénesis dirigida sobre residuos de lisina en CaM de cerebro de bovino. Adicionalmente, experimentos *in vivo* con raíces de plantas de maíz, estableció que el efecto fitotóxico está parcialmente relacionado con la actividad anti-CaM (Evidente *et al.*, 2006).



De los alcaloides vincristina y vinblastina (Watanabe y West, 1982; Molnar *et al.*, 1995; Martínez-Luis *et al.*, 2007) inhibidores de la CaM, se generó un derivado semisintético, el KAR-2 (**68**), de uso en terapéutica para el tratamiento del cáncer. Este producto se une a la CaM a través de los aminoácidos ubicados en sus dominios N- y C-terminales. La estructura terciaria que se genera es similar al complejo TFP-4-Ca<sup>2+</sup>-CaM, pero los puntos de contacto de ambos ligantes son diferentes. Esta particularidad confiere al KAR-2 una mayor especificidad como agente antimitótico, sin impedir que la CaM se una a sus otras proteínas blanco y así ejercer sus efectos fisiológicos. Aunque la afinidad del KAR-2 por la proteína es grande, los efectos antagónicos a la proteína son menores que los provocados por la TFP, la vincristina, o las arilalquilaminas (Orosz *et al.*, 1997; Horváth *et al.*, 2005; González-Alvárez, *et al.*, 2009).

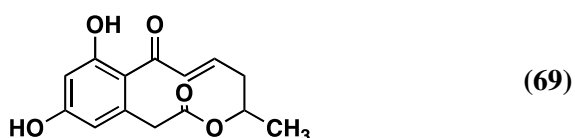


### 1.3 Antecedentes de las especies endófitas: MEXU 26343 (Pleosporales) y *Sporormiella minimoides* (Pleosporales)

MEXU 26343, hongo de estudio del presente trabajo, es una especie fúngica novedosa de origen endófito aislada de la especie *Hintonia latiflora* (Rubiaceae).

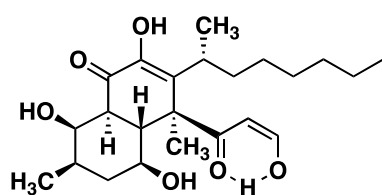
*Sporormiella* es un género con ~80 especies distribuidas en diferentes regiones del mundo. Algunas especies de este género son saprófitas, mientras otras son endófitas de hongos o plantas (Mudur, *et al.*, 2006; Liang-Dong *et al.*, 2008). Los estudios químicos realizados de algunas especies han permitido el aislamiento de varios metabolitos secundarios, con un amplia variedad de estructuras químicas y actividades biológicas.

De *Sporormiella* sp. M5032 (FERM P-9506), un hongo aislado del excremento de oveja, se obtuvo el inhibidor de la fosfodiesterasa del cAMP, esporostatin (**69**) [Kinoshita *et al.*, 1997].

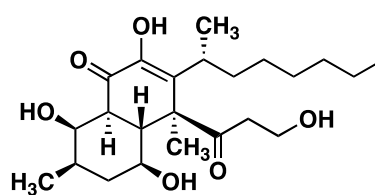


De *S. australis* (Spegazzini) Ahmed & Cain, una especie aislada del excremento de alce recolectado en el Condado de Cook, Estado de Minnesota, EUA, se aislaron los policétidos australifungina (**70**) y el australifunginol (**71**). La australifungina mostró una actividad antifúngica de amplio espectro contra patógenos en humanos. Este compuesto inhibe también la ceramida sintasa, enzima involucrada en la síntesis de esfingolípidos en plantas (Mandala *et al.*, 1994; Abbas *et al.*, 1997).



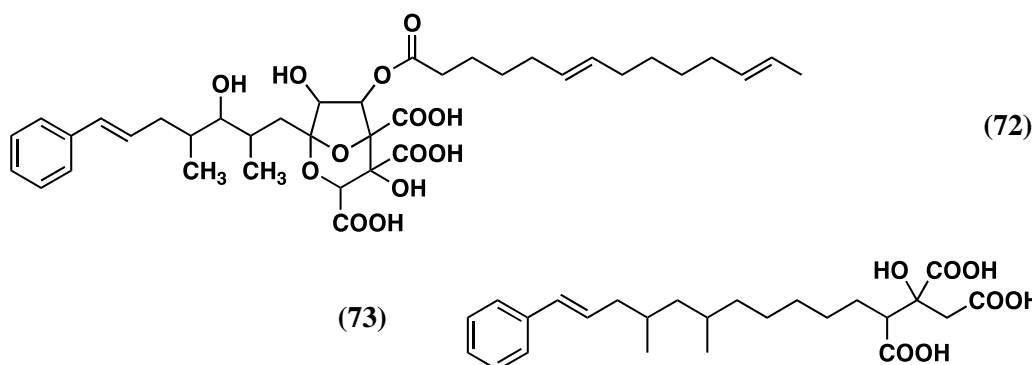


(70)



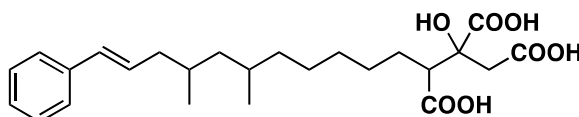
(71)

*S. intermedia* (Auersw.) S. I. Ahmed & Cain ex Kobayasi, especie coprófila aislada del excremento de conejo en Tucson, Arizona, EUA, biosintetiza ácido zaragócico B (72) y el citrato de alquilo L-731,128 (73). Ambos compuestos inhiben la escualeno sintasa, enzima involucrada en la síntesis de colesterol, y poseen propiedades antifúngicas (Bergstrom *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1995).

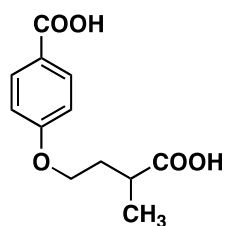


(72)

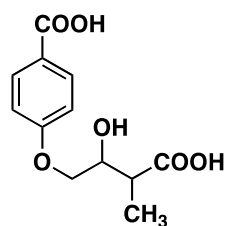
(73)



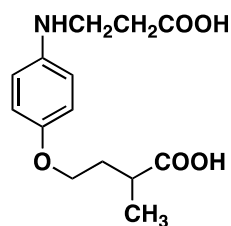
*S. vexans* (Auerswald) Ahmed & Cain (JS 306), otra especie coprófila aislada del excremento del puercoespín en New Brunswick, Canadá, contiene esporovexins A-C (74-76), compuestos derivadas del ácido hidroxibenzoico, y 3'-*O*-desmetil-1-epipreusomerin C (77) (Soman *et al.*, 1999). Tanto la esporovexin A como la 3'-*O*-desmetil-1-epipreusomerin C demostraron actividades antifúngica y antibacterial.



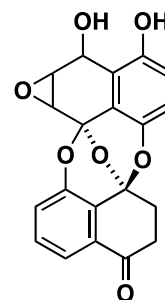
(74)



(75)



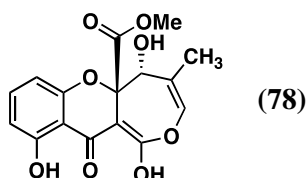
(76)



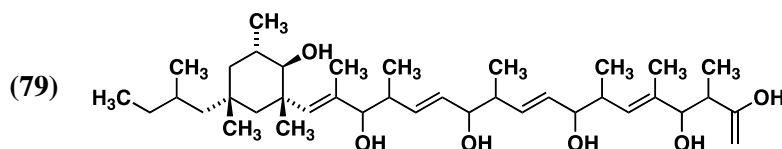
(77)

*S. minimoides* S. I. Ahmed & Cain, es un hongo saprófito ampliamente distribuido; se ha aislado del excremento de jirafa en la región de Namutoni, Namibia; de los tejidos de *Pinus tabuliformis*, un pino nativo del Norte de China; y de los basidiomas de *Trametes hirsutum*, recolectado de una rama de madera en un bosque subalpino seco en Hawaii (Clapp-Shapiro *et al.*, 1998; Bugni *et al.*, 2002; Yu y Liang-Dong, 2004).

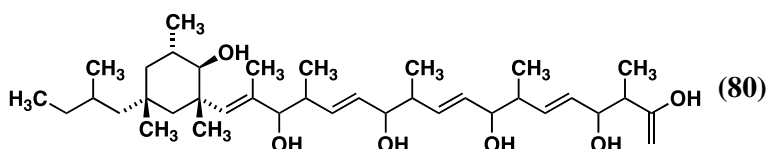
La especie *S. minimoides* ha sido objeto de estudios químicos previos, estos análisis condujeron a la caracterización de varios policétidos incluyendo el brocaenol A (78), la esporminarin A (79), esporminarin B (80) y un depsipéptido (81). Estos tres últimos productos son antifúngicos, mientras que el brocaenol A es un agente citotóxico.



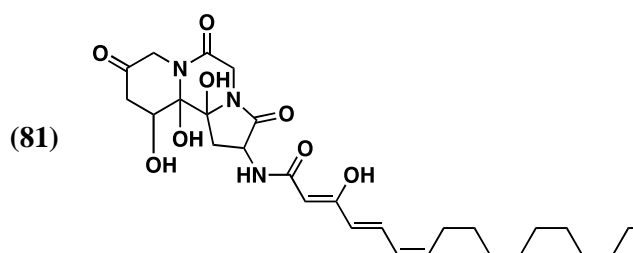
(78)



(79)



(80)



(81)



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

Los microorganismos fúngicos endófitos de plantas medicinales biosintetizan metabolitos secundarios bioactivos, iguales o diferentes a los de la planta hospedera.

La evaluación mediante ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM utilizando los biosensores *hCaM M124C-mBBr* y *hCaM V91C-mBBr* permitirá la detección de principios activos con actividad anti-CaM.

### 2.2 Objetivo

Descubrir nuevos inhibidores de la proteína calmodulina de utilidad para el desarrollo de fármacos, herbicidas y/o herramientas de investigación a partir de hongos endófitos aislados de *Hintonia latiflora*.

### 2.3 Objetivos Particulares

Para el cumplimiento del objetivo general propuesto, se plantearon los siguientes objetivos particular:

- 1.- Aislar al menos dos hongos endófitos a partir de las partes áreas de *H. latiflora* mediante las técnicas microbiológicas adecuadas.
- 2.- Cultivar en pequeña escala las especies fúngicas preseleccionadas y preparar sus extractos orgánicos con el fin de realizar una evaluación preliminar de su efecto anti-CaM.
- 3.- Cultivar en mediana escala las especies fúngicas con efecto anti-CaM, obtener los extractos y proceder al aislamiento y la purificación de los componentes activos en forma pura

y en cantidades apropiadas, para la determinación de sus estructuras químicas y la valoración de su actividad biológica.

4.- Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas y cálculos de mecánica molecular. Es altamente probable que el cumplimiento de este objetivo conduzca a la caracterización de sustancias que representen nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de agentes anti-CaM.

5.- Evaluar la interacción de los principios activos puros con la proteína calmodulina mediante ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca de los biosensores *hCaM M124C-mBBr* y *hCaM V91C-mBBr*. Estos ensayos permitirán la detección de principios activos que afecten las propiedades reguladoras de la calmodulina.

6.- Realizar estudios de acoplamiento molecular para establecer el sitio de unión del ligante en la proteína.

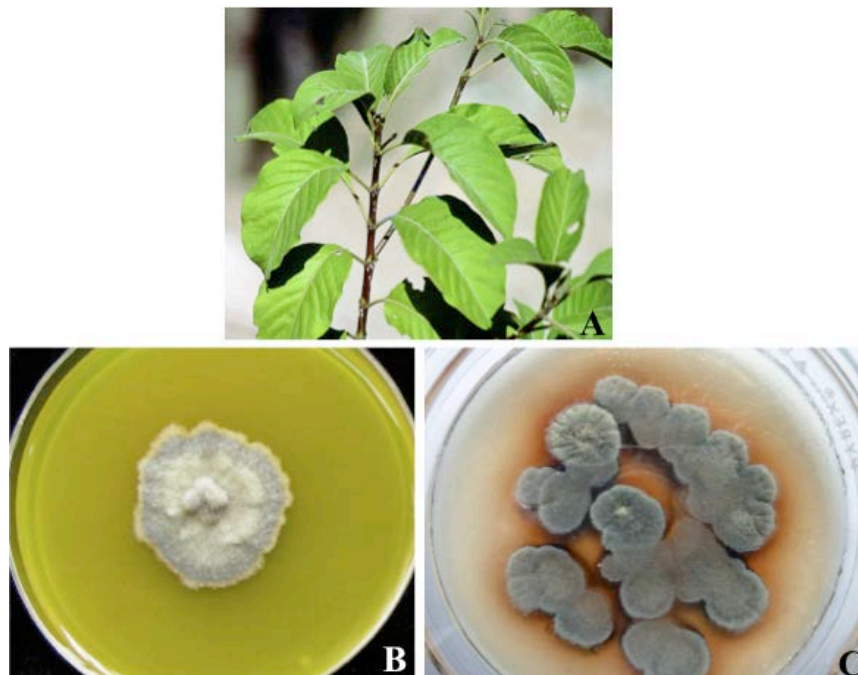
### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material fúngico

La especie fúngica MEXU 26343 (*Pleosporales*) se aisló en forma pura a partir de las hojas sanas de *Hintonia latiflora*, recolectadas por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM) y Sol Cristians (Facultad de Química, UNAM), en Urique (29° 13.143' N, 107°54.832' W; 579 masl), Estado de Chihuahua, México, en 2007.

La segunda especie se caracterizó como *Sporormiella minimoides* Ahmed & Cain (*Sporormiaceae*), y se aisló a partir de una recolecta de la especie en Huetamo (18° 31.709' N, 101° 4.692' W; 221 masl), Estado de Michoacán, México, en 2010.

La identificación y clasificación de las especies fúngicas fue establecida por la Dra. María del Carmen González (Instituto de Biología, UNAM) y el Dr. Anthony E. Glenn (Toxicology & Mycotoxin Research Unit, USDA-ARS, Georgia, EUA). Una muestra de referencia de cada una de las especies está depositada en el Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, UNAM (para la especie del orden Pleosporales la referencia es MEXU 26343; para *Sporormiella minimoides* el No. de referencia es MEXU 26355) (Figura 12).



**Figura 12.** *Hintonia latiflora* (A). Especies endófitas MEXU 26343 (B) y *S. minimoides* (C).

### 3.2 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (silica gel 60 F<sub>254</sub>) y empleando diversos sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV (254 y 356 nm) y como agente cromógeno se utilizó una solución reactiva a base de sulfato cérico (sulfato cérico amoniacal en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron sobre gel de sílice o Sephadex como fases estacionarias (Silica gel 60 o Sephadex LH-20) y diversas mezclas de elución (gradiente de Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH o MeOH, respectivamente).

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Waters. 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). Los análisis cromatográficos se realizaron en columnas empacadas con gel de sílice Waters Nova-Pak Silica 6 $\mu$ m (3.9  $\times$  300 mm, 0.6 mL/min),  $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m (3.9  $\times$  300 mm, 0.6 mL/min), Symmetry C<sub>18</sub> 5 $\mu$ m (3.9  $\times$  150 mm, 0.6 mL/min) y Symmetry Prep C<sub>18</sub> 7 $\mu$ m (7.8  $\times$  300 mm, 1.4 mL/min). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente.

### 3.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se midieron con un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros en el IR se obtuvieron por reflectancia y se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer 400 FT-IR. Los espectros en el UV se registraron utilizando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 2 UV, en MeOH o CH<sub>3</sub>CN. Los análisis de rotación óptica se midieron en un polarímetro Jasco modelo P-1030 a 25 °C, a la longitud de onda de la línea D-sodio (589 nm) en DMSO o CHCl<sub>3</sub>. Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN se obtuvieron en los siguientes espectrómetros: Varian Unity Plus 700 a 700 (<sup>1</sup>H) y 176 MHz (<sup>13</sup>C), Varian Inova-500 a 500 (<sup>1</sup>H) y 125 MHz (<sup>13</sup>C), JEOL ECA 500 a 500 (<sup>1</sup>H) y 125 MHz (<sup>13</sup>C), Bruker Avance III 400 (<sup>1</sup>H) y 100 MHz (<sup>13</sup>C), Varian Mercury 300 a 300 (<sup>1</sup>H) y 75.4 MHz (<sup>13</sup>C), utilizando CDCl<sub>3</sub>, MeOH-*d*<sub>4</sub> o DMSO-*d*<sub>6</sub> como disolvente y TMS como referencia interna; los

desplazamientos químicos fueron registrados en ppm ( $\delta$ ). Los espectros de masas de ionización por electrospray (EM-ESI) e impacto electrónico (EM-EI) se obtuvieron utilizando un espectrómetro LECO Pegasus 4D, en tanto que los espectros de masas por bombardeo por átomos rápidos (EM-FAB) y los espectros de masas de alta resolución por electrospray (EM-AR-ESI) se obtuvieron empleando los espectrómetros Thermo DFS y Orbitrap, respectivamente. El registro de los espectros se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM; el Instituto de Química, UNAM; la UAM Iztapalapa y/o en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, UNCG, Carolina del Norte, EUA.

### **3.4 Fermentación de las especies fúngicas**

La fermentación de ambas especies fúngicas se realizó en cultivos sólidos de arroz húmedo (200 g + 300 mL H<sub>2</sub>O) empleando las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura ambiente con ciclos de luz-oscuridad 12 × 12 horas, durante un periodo de 30 días. El inóculo consistió en cubos de agar papa-dextrosa (PDA) de 1 cm<sup>2</sup> conteniendo el microorganismo desarrollado.

### **3.5 Estudio químico de las especies fúngicas**

#### **3.5.1 Preparación de los extractos orgánicos en mediana escala**

Al término del crecimiento, los extractos orgánicos se prepararon mediante un proceso de maceración exhaustiva de los cultivos sólidos utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como disolvente de extracción. Al cabo de cada maceración, los extractos orgánicos se filtraron y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron al vacío. El rendimiento total del extracto de MEXU 26343 fue de 1.49 g, mientras que el de *S. minimoides* fue de 1.63 g.



### 3.5.2 Establecimiento del perfil cromatográfico del extracto de MEXU 26343

El extracto orgánico fue analizado por CLAE fase normal en una columna de gel de sílice  $\mu$ Porasil y empleando como fase móvil un sistema binario de  $\text{CHCl}_3$  (A) y MeOH (B). Se utilizó un programa de gradiente de 0-5 min, 100% A; 5-25 min 90% A; 25-30 min 90% A; 30-32 min 85% A. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos fueron de 238 y 273 nm.

#### 3.5.2.1 Obtención de la *E/Z* vermelhotina (82) y la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (83) a partir del extracto orgánico de la especie endófito MEXU 26343

El extracto orgánico total (1.49 g) de MEXU 26343 se sometió a un proceso de fraccionamiento mediante CCA utilizando como fase estacionaria Sephadex y como fase móvil MeOH. Este proceso generó un total de cuatro fracciones primarias (F<sub>I</sub>-F<sub>IV</sub>).

#### 3.5.2.2 Aislamiento, purificación e identificación de la *E/Z* vermelhotina (82)

La fracción F<sub>III</sub> (372 mg) fue resuelta por CLAE fase normal en una columna de gel de sílice Nova-Pak, empleando como fase móvil  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (95:5) y un flujo de 0.6 mL/min. El proceso cromatográfico permitió la obtención de 347 mg de un sólido naranja identificado como *E/Z* vermelhotina en una proporción de 6:4 ( $t_R$  8.55 min).

***E/Z* Vermelhotina (82):** UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 232 (4.92), 273 (4.51), 318 (3.89), 437 (4.29) nm; IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$ : 3445, 1701, 1656, 1614, 1499, 1260  $\text{cm}^{-1}$ ; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3428, 1703, 1652, 1610, 1553, 1495  $\text{cm}^{-1}$ ; isómero-*E*:  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8.17 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-7), 7.42 (1H, dq,  $J = 15.3, 7.1$  Hz, H-12), 7.40 (1H, dd,  $J = 9.2, 7.5$  Hz, H-8), 6.29 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-9), 6.17 (1H, dq,  $J = 15.3, 1.7$  Hz, H-11), 5.86 (1H, sa, NH), 3.79 (2H, s, H-5), 2.02 (3H, dd,  $J = 7.1, 1.7$  Hz, H-13);  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 192.7 (C-4), 172.3 (C-2), 165.5 (C-6), 158.7 (C-10), 141.5 (CH-8), 138.6 (CH-12), 122.1 (CH-11), 116.0 (CH-7), 107.6 (CH-9), 98.1 (C-3), 50.4 ( $\text{CH}_2$ -5), 18.9 ( $\text{CH}_3$ -13); isómero-*Z*:  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8.18 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-7), 7.39 (1H,

dq,  $J = 15.3, 7.1$  Hz, H-12), 7.40 (1H, dd,  $J = 9.2, 7.5$  Hz, H-8), 6.28 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-9), 6.16 (1H, dq,  $J = 15.3, 1.7$  Hz, H-11), 5.64 (1H, sa, NH), 3.82 (2H, s, H-5), 2.00 (3H, dd,  $J = 7.1, 1.7$  Hz, H-13);  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 194.8 (C-4), 172.4 (C-2), 166.7 (C-6), 158.8 (C-10), 141.9 (CH-8), 139.3 (CH-12), 122.1 (CH-11), 116.5 (CH-7), 107.5 (CH-9), 97.9 (C-3), 50.9 ( $\text{CH}_2$ -5), 19.0 ( $\text{CH}_3$ -13); EM-AR-ESI  $m/z$  218.0818  $[\text{M}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_3$ , 218.0812).

### 3.5.2.3 Aislamiento, purificación e identificación de la 9S,11R-(+)-ascosalitoxina (83)

La fracción F<sub>II</sub> (357 mg) fue sometida a una purificación mediante CCF tipo preparativa, utilizando placas cromatográficas de vidrio recubiertas de gel de sílice como fase estacionaria y empleando como fase móvil una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (9:1). De este proceso de separación se obtuvieron 84.9 mg de un aceite amarillo identificado como 9S,11R-(+)-ascosalitoxina (83).

**9S,11R-(+)-Ascosalitoxina (83):**  $[\alpha]_{\text{D}}$  +153 ( $c$  0.1,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 221 (4.92) y 296 (4.51) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3387, 2969, 1698, 1622, 1306, 1245  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 12.84 (1H, s, HO-2), 10.24 (1H, s, H-7), 7.63 (1H, s, HO-4), 6.27 (1H, s, H-5), 4.53 (1H, q,  $J = 6.8$  Hz, H-9), 2.50 (1H, tq,  $J = 7.2, 6.8$  Hz, H-11), 2.11 (3H, s, H-8), 1.57 (1H, ddq,  $J = 14.0, 7.5, 6.8$  Hz, H-12), 1.43 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-14), 1.31 (1H, dq,  $J = 14.0, 7.2$  Hz, H-12), 1.09 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-15), 0.67 (3H, t,  $J = 7.5, 7.2$  Hz, H-13);  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 215.5 (C-10), 191.5 (CHO-7), 164.9 (C-2), 162.2 (C-4), 142.8 (C-6), 111.6 (C-1), 110.8 (C-3), 107.5 (CH-5), 46.9 (CH-11), 44.2 (CH-9), 25.4 ( $\text{CH}_2$ -12), 18.8 ( $\text{CH}_3$ -14), 17.5 ( $\text{CH}_3$ -15), 11.6 ( $\text{CH}_3$ -13), 7.1 ( $\text{CH}_3$ -8); EM-IE  $m/z$  264  $[\text{M}]^+$  (10), 246 (6), 208 (46), 180 (100), 162 (40), 85 (76); EM-AR-IE  $m/z$  264.1344  $[\text{M}]^+$  (calcd para  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ , 264.1356).

### 3.5.2.4 Reducción y acetilación de la 9S,11R-(+)-ascosalitoxina (83)

16 mg del compuesto **83** se disolvieron en 1000  $\mu\text{L}$  de MeOH y se adicionó gota a gota (20  $\mu\text{L}$ ) una solución de  $\text{NaBH}_4$  en MeOH (1 mg/mL). La mezcla de reacción permaneció en agitación durante 2 h a temperatura ambiente; posteriormente el MeOH se eliminó mediante una corriente de  $\text{N}_2$ . El crudo de reacción se extrajo con AcOEt ( $3 \times 10$  mL); la fase orgánica resultante se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y el disolvente se evaporó *in vacuo*.

El crudo de reacción resultante fue disuelto en 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{Ac}_2\text{O}$ -piridina (1:1) y se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue diluida con  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) y se realizaron extracciones con AcOEt ( $3 \times 10$  mL); la fase orgánica se lavó sucesivamente con una solución acuosa de HCl ( $3 \times 10$  mL),  $\text{NaHCO}_3$  ( $3 \times 10$  mL) y  $\text{H}_2\text{O}$  ( $3 \times 10$  mL) y finalmente se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. El crudo de reacción se sometió a una purificación por CLAE-FN en una columna semi-preparativa  $\mu\text{Porasil 125 \AA}$ , empleando como fase móvil *n*-hexano-AcOEt (70:30) y un flujo de 1.0 mL/min, obteniéndose al cabo del análisis dos aceites amarillos correspondientes a los compuestos **83-1** (4.5 mg) y **83-2** (1.4 mg).

**Compuesto 83-1:** aceite amarillo;  $[\alpha]_{\text{D}} +5.4$  (*c* 0.34,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7.02 (1H, s, H-5), 5.11 (2H, sa, H-7), 4.99 (1H, dd,  $J = 9.2, 3.9$  Hz, H-10), 3.47 (1H, dq,  $J = 9.2, 7.1$  Hz, H-9), 2.34 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.31 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.04 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 1.92 (3H, s, H-8), 1.78 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 1.23 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz, H-14), 0.92 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-13), 0.87 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-15);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 170.7, 170.3, 168.7, 168.7 (4C,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 150.1 (C-4), 149.3 (C-2), 143.4 (C-6), 124.3 (C-3), 122.0 (C-1), 118.9 (CH-5), 81.4 (CH-10), 57.4 ( $\text{CH}_2$ -7), 35.8 (CH-11\*), 35.7 (CH-9\*), 22.5 ( $\text{CH}_2$ -12), 20.9, 20.8, 20.5, 20.5 (4 $\text{CH}_3$ ,  $\text{COCH}_3$ ), 18.6 ( $\text{CH}_3$ -14), 16.1 ( $\text{CH}_3$ -15), 11.7 ( $\text{CH}_3$ -13), 10.2 ( $\text{CH}_3$ -8); EM-IE  $m/z$  435  $[\text{M} - 1]^+$  (1), 317 (10), 233 (65), 206 (65), 164 (100).

**Compuesto 83-2:**  $[\alpha]_{\text{D}} -3.6$  (*c* 0.1,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 6.87 (1H, s, H-5), 5.55 (2H, d,  $J = 15.5$  Hz, H-7), 3.21 (1H, dd,  $J = 7.4, 4.8$  Hz, H-10), 2.93 (1H, dq,  $J = 7.2, 6.9$  Hz, H-9), 2.32 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.31 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 1.92 (3H, s, H-8), 1.23 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-14), 0.98 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-15), 0.91 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-13);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 169.2, 168.9 (2C,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 148.3 (C-4), 145.0 (C-2), 138.4

(C-6), 125.0 (C-1), 120.6 (C-3), 118.8 (CH-5), 84.1 (CH-10), 62.5 (CH<sub>2</sub>-7), 35.2 (CH-9), 32.6 (CH-11), 22.7 (CH<sub>2</sub>-12), 20.8, 20.3 (2CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>), 18.9 (CH<sub>3</sub>-14), 16.6 (CH<sub>3</sub>-15), 12.0 (CH<sub>3</sub>-13), 9.7 (CH<sub>3</sub>-8); EM-IE  $m/z$  333 [M - 1]<sup>+</sup> (1), 275 (36), 236 (35), 208 (39), 194 (45), 165 (100).

### 3.5.3 Establecimiento del perfil cromatográfico del extracto orgánico de *Sporormiella minimoides*

El extracto orgánico de *S. minimoides* fue analizado por CLAE fase reversa en una columna de Symmetry C<sub>18</sub> y empleando como fase móvil un sistema binario de CH<sub>3</sub>CN (A) y H<sub>2</sub>O (B). Se utilizó un programa de gradiente de 0-10 min, 30% A; 10-15 min, 60% A; 15-25 min, 60% A; 25-28 min, 100% A. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos fueron de 220 y 255 nm.

#### 3.5.3.1 Obtención de los metabolitos secundarios de la especie endófito *S. minimoides*

#### 3.5.3.2 Aislamiento, purificación e identificación de corimbiferona (84)

Al reconstituir el extracto orgánico total (1.63 g) de *S. minimoides* con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> precipitaron espontáneamente 891 mg de un sólido café (F<sub>A</sub>), el cual se sometió a un proceso de purificación por CCA utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil una mezcla binaria (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH) con un incremento gradual de polaridad. Esta metodología generó un total de cinco fracciones (F<sub>A1</sub>-F<sub>A5</sub>). El análisis por CCF permitió corroborar que F<sub>A3</sub> estaba constituida por un solo componente. Al evaporar el disolvente se obtuvieron 511 mg de corimbiferona como un sólido amarillo con punto de fusión superior a los 210 °C (Overy *et al.*, 2005).

**Corimbiferona (84):** UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$ : 212, 245, 276, 364 nm; IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\max}$ : 3474, 3074, 2949, 1741, 1647, 1588, 1561, 1381 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 14.56 (1H, s, OH-8), 8.25 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, s, H-7), 5.92 (1H, s, H-2), 4.06 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-6),

3.96 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-3); <sup>13</sup>C-RMN (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 188.5 (C-1), 170.4 (C-8), 167.5 (C-6), 165.0 (C-3), 156.0 (C-9), 152.1 (C-10), 136.9 (C-4a), 107.9 (C-4), 105.0 (C-8a), 101.3 (C-2), 99.9 (C-7), 99.6 (C-5), 56.9 (OCH<sub>3</sub>-6), 56.3 (OCH<sub>3</sub>-3); EM-AR-FAB *m/z* 275.0530 [M+1]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 275.0550).

### 3.5.3.3 Fraccionamiento secundario del extracto orgánico de *S. minimoides*

Las aguas madres (735 mg) restantes del extracto total se sometieron a un proceso de fraccionamiento por CCA utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyentes, mezclas binarias de disolventes (Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH) con un incremento gradual de polaridad. Este proceso generó un total de ocho fracciones (F<sub>I</sub>-F<sub>VIII</sub>).

### 3.5.3.4 Aislamiento, purificación e identificación de ziganein (85; 1,5-dihidroxi-3-metilantraquinona)

De la fracción F<sub>I</sub> (10.4 mg) precipitó un sólido color naranja (4.1 mg; p.f. 170-171 °C) tras un lavado con hexano (10 mL) identificado como ziganein (85) [Imre *et al.*, 1974].

**Ziganein (85):** UV (MeOH) λ<sub>max</sub>: 224, 256, 287 nm; IR (FTIR-ATR) ν<sub>max</sub>: 3064, 2920, 1726, 1669, 1623, 1455, 1382, 1266 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 12.13 (1H, s, OH-5), 12.02 (1H, s, OH-1), 7.83 (1H, dd, *J* = 0.7, 7.7 Hz, H-8), 7.68 (1H, dd, *J* = 7.7, 8.4 Hz, H-7), 7.30 (1H, dd, *J* = 0.7, 8.4 Hz, H-6), 7.10 (1H, d, *J* = 0.7 Hz, H-2), 2.47 (3H, s, CH<sub>3</sub>-11); <sup>13</sup>C-RMN (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 192.5 (C-10), 182.0 (C-9), 162.7 (C-5), 162.4 (C-1), 149.3 (C-3), 136.9 (C-7), 133.6 (C-8a), 133.3 (C-4a), 124.5 (C-6), 124.4 (C-2), 121.4 (C-4), 119.8 (C-8), 115.3 (C-10a), 113.7 (C-9a), 22.3 (CH<sub>3</sub>-3); EM-AR-ESI *m/z* 254.0579 [M<sup>+</sup>]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>, 254.0571).

### 3.5.3.5 Aislamiento, purificación e identificación de 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (86)

El fraccionamiento secundario de la fracción F<sub>III</sub> (59.9 mg) mediante una CCA sobre Sephadex condujo a la obtención de cuatro fracciones F<sub>III-1</sub>-F<sub>III-4</sub>. La fracción F<sub>III-3</sub> estaba constituida por un sólido naranja (**86**; 18.7 mg; p.f. 165-167 °C).

**5-Hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (86)**: UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 220 (4.51), 265 (4.09), 297 (3.96) nm; IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\max}$ : 3067, 2929, 1678, 1632, 1600, 1434, 1373, 1237  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 13.28 (1H, s, OH-5), 6.63 (1H, s, H-6), 6.02 (1H, s, H-3), 3.90 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -7), 3.88 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -2), 2.52 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -8);  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 189.4 (C-4), 181.2 (C-1), 164.2 (C-7), 162.8 (C-5), 161.0 (C-2), 128.8 (C-8a), 126.8 (C-8), 108.4 (C-5a), 108.3 (C-3), 104.2 (C-6), 56.5 ( $\text{OCH}_3$ -2), 56.2 ( $\text{OCH}_3$ -7), 12.6 ( $\text{CH}_3$ -8); EM-AR-IE  $m/z$  248.0684 (calcd para  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_5$ , 248.0680).

### 3.5.3.6 Aislamiento, purificación e identificación de brocaenol B (87)

El fraccionamiento de la fracción F<sub>V</sub> (35.8 mg) mediante una CCA sobre Sephadex condujo a la obtención de tres fracciones secundarias F<sub>V-1</sub>-F<sub>V-3</sub>. La fracción F<sub>V-3</sub> estaba constituida por un sólido blanco (15.2 mg; p.f. 195-198 °C) identificado como brocaenol B (Bugni *et al.*, 2003).

**Brocaenol B (87)**: UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$ : 233, 271, 313 nm; IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\max}$ : 3483, 3066, 2926, 1748, 1625, 1594, 1474, 1326, 1228  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 12.22 (1H, s, OH-1), 8.13 (1H, s, H-7), 7.49 (H, t,  $J = 8.5$  Hz, H-3), 6.83 (H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2), 6.82 (H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-4), 4.09 (H, s, H-15), 3.83 (1H, s, H-13), 1.80 (1H, s, H-11);  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 197.2 (C-5), 181.9 (C-9), 172.8 (C-7), 165.0 (C-12), 164.9 (C-8), 160.8 (C-1), 152.5 (4a), 134.8 (C-3), 113.8 (C-6), 113.1 (C-2), 108.5 (C-9a), 105.9 (C-4), 96.8 (C-8a), 84.8 (C-10a), 57.0 (C-25), 53.8 (C-13), 5.8 (C-11); EM-AR-IE  $m/z$  346.0685 ( $\text{M}^+$ )<sup>+</sup> (calcd. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_8$ , 346.0688).

### 3.5.3.7 Aislamiento, purificación e identificación de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1H,6H-benzo[de]isocromen-1,9-diona (**88**) y la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1H,3H-benzo[de]isocromen-9-ona (**89**)

La resolución de la fracción F<sub>VI</sub> (21.5 mg) mediante CLAE fase reversa en una columna Symmetry C<sub>18</sub>, empleando como fase móvil un sistema binario isocrático de CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (60:40), permitió el aislamiento de los metabolitos secundarios **88** (sólido blanco; 8.6 mg; p. f. 190-194 °C; *t<sub>R</sub>* 16.5 min) y **89** (sólido amarillo; 1.0 mg; p. f. 218-220 °C; *t<sub>R</sub>* 12.5 min). Las longitudes de onda utilizadas para la detección del compuesto fueron de 252 y 280 nm.

Bajo las mismas condiciones de CLAE, se analizó la fracción F<sub>VII</sub> (31.4 mg) obteniendo 4.4 mg adicionales del compuesto **89**.

**3,6-dimetoxi-8-metil-1H,6H-benzo[de]isocromen-1,9-diona (**88**):** UV (CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 208 (4.47), 251 (4.12) 279 (4.25), 292 (4.24) nm; IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\max}$ : 3474, 2924, 1742, 1651, 1614, 1582, 1465, 1353, 123, 1215 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8.06 (1H, s, H-10), 6.93 (1H, s, H-7), 5.86 (1H, s, H-2), 4.10 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-6), 3.90 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-3), 2.92 (3H, d, *J* = 1.0 Hz, CH<sub>3</sub>-8); <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 185.4 (C-1), 163.7 (C-6), 161.7 (C-3), 156.9 (C-9), 152.8 (C-8), 148.2 (C-10), 136.6 (C-4a), 118.8 (C-8a), 115.2 (C-7), 108.5 (C-4), 105.5 (C-5), 104.1 (C-2), 56.6 (OCH<sub>3</sub>-6), 55.8 (OCH<sub>3</sub>-3), 24.9 (CH<sub>3</sub>-8); EMAR-EI *m/z* 272.0687 (calcd para C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, 272.0684).

**3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1H,3H-benzo[de]isocromen-9-ona (**89**):** UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 218 (4.55), 273 (4.45) and 341 (3.91) nm; IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\max}$ : 3291, 2941, 1743, 1689, 1619, 1590, 1460, 1309 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 10.78 (1H, s, OH-3), 7.01 (1H, s, H-7), 6.61 (1H, s, H-2), 6.18 (1H, s, H-10), 3.93 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-6), 3.83 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-1), 3.31 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-10), 2.83 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8); <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 162.5 (C-6), 160.9 (C-9), 159.9 (C-3), 156.9 (C-1), 147.1 (C-8), 133.7 (C-4a), 113.4 (C-7), 112.8 (C-8a), 102.4 (C-4), 100.8 (C-5), 97.5 (C-10), 95.7 (C-2), 56.8 (OCH<sub>3</sub>-6), 56.3 (OCH<sub>3</sub>-1), 55.5 (OCH<sub>3</sub>-10), 25.8 (CH<sub>3</sub>-8); ESI-MS *m/z* (rel. int.): 304 (5, [M]<sup>+</sup>), 291(8), 273(100); EMAR-ESI *m/z* 304.0947 (calc. for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>, 304.0940).

### 3.5.3.8 Transformación de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (88) a la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (89)

A 4 mg de **88** fueron adicionados 0.7 mL de metanol. La mezcla se dejó en reposo durante 48 h a temperatura ambiente. La solución orgánica se concentró bajo presión reducida obteniéndose un sólido amarillo (4.1 mg). Los datos de <sup>1</sup>H-RMN y EM-ESI para el producto de la reacción fueron idénticos a los del compuesto **89**.

## 3.6 Ensayos biológicos

### 3.6.1 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de compuestos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli*, *Ipomea purpurea* y *Medicago sativa*

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los compuestos se realizó mediante el bioensayo de germinación y crecimiento radicular de cuatro especies de plantas de prueba: *Amaranthus hypochondriacus* L. (Amaranthaceae), *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (Poaceae), *Ipomea purpurea* L. (Convolvulaceae) y *Medicago sativa* L. (Fabaceae), utilizando el método de dilución en agar. Estas especies representan a los dos grandes grupos de plantas superiores: dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Cada uno de los compuestos a evaluar se disolvió en MeOH (~200 µL) y se prepararon disoluciones de agar al 2%, 5 mL de cada una de las disoluciones se adicionaron a cada caja Petri. Los compuestos puros se evaluaron utilizando concentraciones de 25, 50, 75 y 100 µg/mL.

Se sembraron 10 semillas de cada una de las especies de prueba por caja Petri. Las cajas de Petri que contenían las semillas se incubaron en la oscuridad a 29 °C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas y contando el número de semillas germinadas después de 24 horas para el caso de *A. hypochondriacus*, 36 horas para el caso de *I. purpurea*, y 72 horas para el caso de *E. crus-galli* y *M. sativa*. Paralelamente se evaluaron controles positivo y blanco. Como control positivo se utilizó la Tricolorina A a 50, 100, 150 y



500  $\mu\text{g/mL}$  (Pereda-Miranda *et al.*, 1993), así como Rival<sup>®</sup> (Glifosato: sal monoamónica de N-(fosfonometil)glicina) a 100, 250, 500 y 750  $\mu\text{g/mL}$ . Como blancos se utilizaron agar 2% y agar 2%-MeOH. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron como concentraciones inhibitorias medias ( $\text{CI}_{50}$ ), las cuales fueron calculadas por regresión lineal a partir de los porcentajes del crecimiento radicular. Además los resultados fueron analizados mediante la prueba estadística ANOVA ( $p \leq 0.5$ ).

### **3.6.2 Apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM mediante el empleo del biosensor *hCaM M124-mBBr***

A una solución de la proteína *hCaM M124C-mBBr* (1  $\mu\text{M}$ ), obtenida mediante mutagénesis dirigida, se añadió a una solución amortiguadora (10 mM acetato de potasio [pH 5.1] y 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) y el ligante disuelto en DMSO. El espectro de emisión de fluorescencia fue adquirido con ranuras de excitación y emisión de 4 y 8 nm, respectivamente. La longitud de onda de excitación fue de 381 nm y la longitud de onda de emisión para las medidas fue de 415 a 550 nm. El grado de saturación de *hCaM M124-mBBr* con el ligando fue calculado por los cambios en fluorescencia ocasionados por la unión del ligando. El apagamiento de la fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro ISS-PC1, con las muestras en agitación a 37° C.

### **3.6.3 Efecto vasorrelajante de la *E/Z* vermelhotina (82) sobre las contracciones inducidas por noradrenalina en anillos de aorta de rata**

La actividad vasorrelajante se realizó en anillos de aorta de ratas Wistar (200–300 g) adaptadas a las condiciones estándares del bioterio: temperatura de 25 °C, humedad relativa de 45–65%, ciclos de 12 h luz/oscuridad y alimento/agua *ad libitum*.

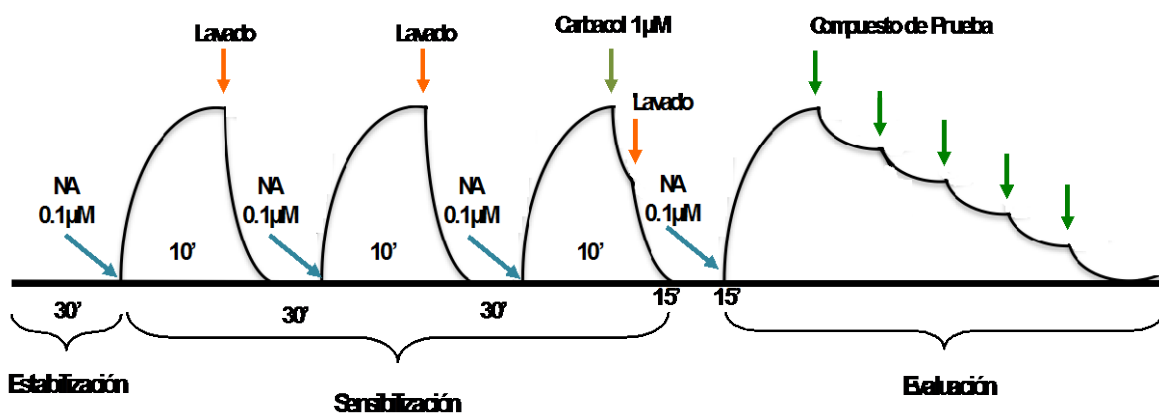
Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y a las recomendaciones realizadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio para Pruebas Farmacológicas y Toxicológicas.

Para la obtención del tejido, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (1 mL/2.5 kg de peso) y sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una

disección en el abdomen del animal para aislar la aorta; luego la aorta torácica se removió, limpió, y cortó en anillos de alrededor de 3–5 mm de longitud. De manera adicional, en algunos de los anillos aórticos se retiró el endotelio mediante procedimientos manuales.

Para determinar el efecto sobre la contracción o relajación en los anillos de aorta, cada pieza de tejido se suspendió en una cámara de órgano aislado que contenía solución de Ringer Krebs (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, EDTA 0.026 mM y glucosa 11.4 mM: pH 7.4) a 37 °C con burbujeo constante de una mezcla gaseosa de  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95:5). Los tejidos se colocaron bajo una tensión de reposo de 3 g y se dejaron estabilizar durante 30 min, realizando lavados cada 15 minutos con la solución de Krebs. Las contracciones se registraron con un transductor de fuerza isométrica Grass Modelo FT 03, conectado a un polígrafo BIOPAC system UIM 100C. Posterior al período de estabilización, se continuó con un periodo de sensibilización del tejido con noradrenalina (0.1  $\mu\text{M}$ ) durante 10 min en tres ocasiones a intervalos de 30 minutos, en cada intervalo los tejidos se lavaron con solución de Krebs fresca. La ausencia o presencia de la capa endotelial se confirmó por la falta de una respuesta relajante inducida por carbacol (1  $\mu\text{M}$ ).

Para determinar el efecto vasorrelajante de vermelhotina, se contrajo con noradrenalina (NA) [1  $\mu\text{M}$ ], y una vez que la contracción es sostenida, se agregaron concentraciones acumulativas del compuesto de prueba (Figura 13).



**Figura 13.** Representación esquemática del experimento vasorrelajante de la *E/Z* vermelhotina (82).

### 3.6.4 Toxicidad aguda de la E/Z vermelhotina (82)

La evaluación de la toxicidad aguda potencial de la vermelhotina (82) se estableció de acuerdo al procedimiento descrito por Lorke (1983). En la primera fase del experimento; doce animales divididos en grupos de tres se trataron vía oral con el compuesto (10, 100 y 1000 mg/kg) y el vehículo. En la segunda fase, aplicando los criterios establecido por Lorke, las dosis administradas fueron 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En cada fase experimental, los animales se observaron durante 14 días y al término del ensayo, todos los animales se sacrificaron por dislocación cervical, para realizar una disección en el abdomen y así aislar los órganos vitales (hígado, riñón, corazón, estómago). Cada órgano fue analizado macroscópicamente con la finalidad de poder observar algún daño o alteración morfológica. Los animales que fallecieron en el transcurso del experimento también fueron sujetos al mismo análisis *post-mortem*. La DL<sub>50</sub> (dosis que produce la mortalidad del 50% de los animales evaluados) se determinó mediante el cálculo de la media geométrica de las dosis ensayadas (Lorke, 1983).

### 3.7 Estudios de Acoplamiento Molecular

El estudio de acoplamiento molecular se llevó a cabo usando la estructura cristalográfica de la proteína CaM con TFP (PDB code 1LIN.pdb). Los compuestos fueron construidos usando el programa HyperChem y optimizados geoméricamente usando el programa Gaussian 09 con un nivel de teoría DTF B3LYP/3-21G. El acoplamiento molecular consistió en la generación de mapas electrostáticos para cada tipo de átomo que participa en el mismo, en una caja de 60×60×60 Å. Un análisis de acoplamiento refinado se llevó a cabo en una caja más pequeña, 30×30×30 Å.

Los programas utilizados para el acoplamiento molecular y su análisis fueron los siguientes: AutoDock 4.2 revision 1.69 (1991-2007), AutoDockTools versión 1.5.0 revisión 7 (1999-2007) y PyMOL (DeLano 2004), sobre un sistema operativo UNIX usando la supercomputadora KANBALAM HP CP 4000, la cual contiene 1368 procesadores AMD Opteron, 3 terabyte de memoria y 160 terabyte de almacenamiento (<http://www.super.unam.mx>).

### 3.8 Cálculos de Modelado Molecular

La construcción y análisis conformacional se llevó a cabo utilizando el programa Spartan '04. Se realizó una búsqueda conformacional Monte Carlo para las estructuras de estudio utilizando el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94 (Molecular Mechanics Force Field). Cada conformero fue geoméricamente optimizado utilizando el funcional de la teoría DFT y el método híbrido B3LYP con el conjunto de funciones de base DGDZVP (B3LYP/DGDZVP). Las estructuras totalmente optimizadas se utilizaron para calcular los parámetros termoquímicos y las frecuencias a 298 K y 1 atm. La selección de conformeros se basó en la diferencia de energía, considerando un intervalo de 0 a 10 kcal/mol, rango seleccionado con el fin de tener una amplia ventana de conformeros en la distribución de Boltzmann.

Las constantes de acoplamiento  $J_{H-H}$  vecinales y los valores de  $[\alpha]_D$  para los conformeros optimizados se calcularon empleando el programa Gaussian 09 utilizando la opción *SpinSpin* durante los cálculos de RMN por el método GIAO. Todos los cálculos de mecánica cuántica, RMN y rotación óptica se realizaron utilizando el programa Gaussian W09, en un sistema operativo Linux a través de la supercomputadora KANBALAM HP CP 4000.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Selección primaria de las especies fúngicas MEXU 26343 y *Sporormiella minimoides*

La presente investigación se desarrolló como parte de un proyecto enfocado al descubrimiento de nuevos inhibidores de la proteína CaM a partir de especies fúngicas endófitas selectas obtenidas de plantas medicinales de México. En este caso los dos aislamientos seleccionados, MEXU 26343 y *Sporormiella minimoides*, se obtuvieron de la especie *Hintonia latiflora* (Rubiaceae).

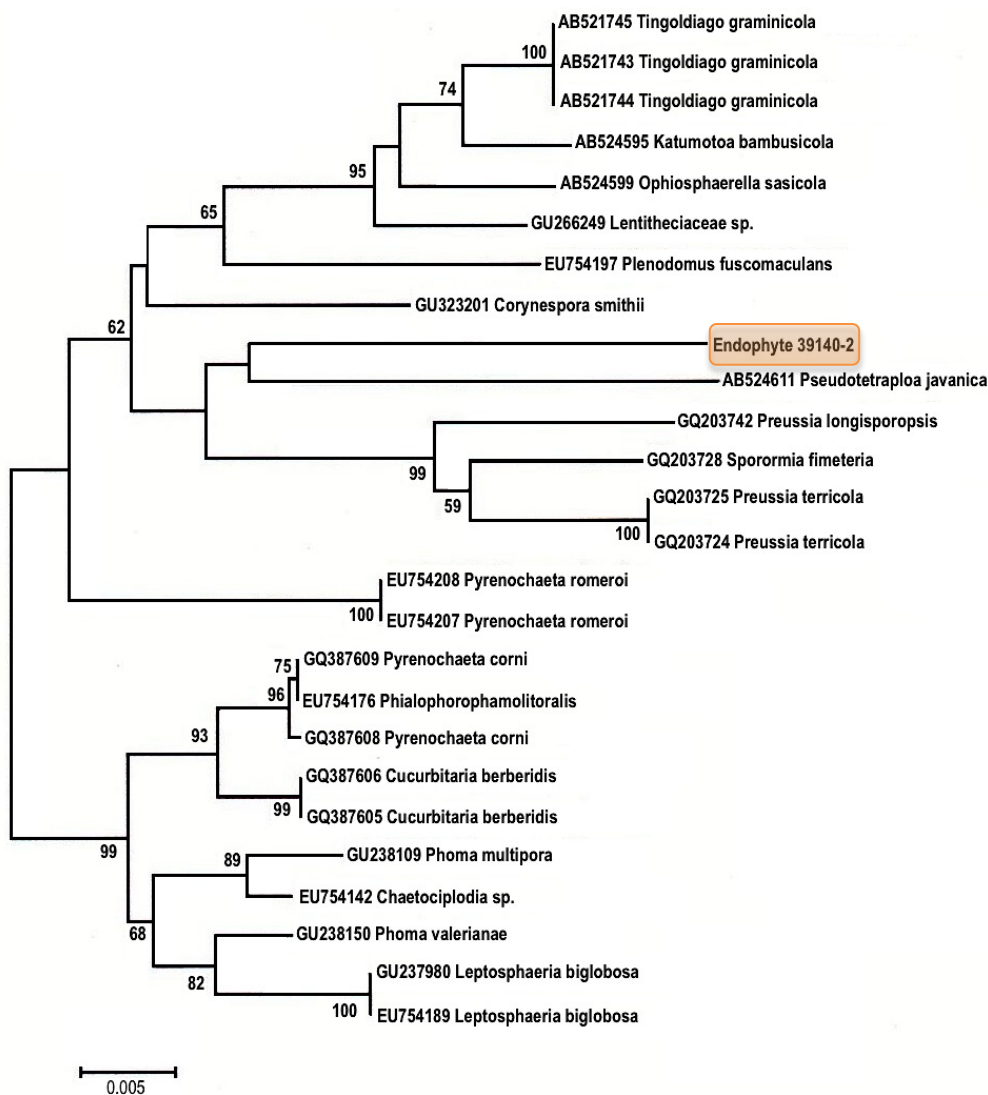
El trabajo se inició con la selección primaria de los dos aislamientos endófitos considerando fundamentalmente los resultados obtenidos al evaluar el efecto de sus extractos orgánicos sobre el apagamiento de la fluorescencia extrínseca de un biosensor de CaM (*hCaM M124C-mBBr*), así como los rendimientos y complejidad de los mismos. El apagamiento de la fluorescencia del biosensor indica *a priori* que los extractos contienen ligantes de CaM. Por otro lado, en el caso de MEXU 26343, además se tomó en cuenta su carácter de especie nueva (*vide infra*).

Las condiciones de cultivo para ambos aislamientos fueron las siguientes: arroz, como medio de cultivo, 30 días de fermentación a temperatura ambiente, y ciclos de luz-oscuridad de 12×12 horas. De tal forma que MEXU 26343 y *Sporormiella minimoides* apagaron la fluorescencia extrínseca del biosensor en un 50 y 30 %, respectivamente.

Posteriormente, el proceso se repitió en mediana escala con la finalidad de obtener un mejor rendimiento de los extractos para la obtención de los principios activos. Una vez purificados, estos productos se caracterizaron estructuralmente por métodos espectroscópicos, químicos y computacionales; a continuación se evaluaron los metabolitos secundarios como inhibidores de la proteína CaM mediante el monitoreo del apagamiento de la fluorescencia de *hCaM M124C-mBBr* y *hCaM V91C-mBBr*; y finalmente los compuestos que resultaron activos se sometieron a estudios de acoplamiento molecular para establecer el posible sitio de interacción con la CaM.

#### 4.2 Estudio químico del endófito novedoso MEXU 26343

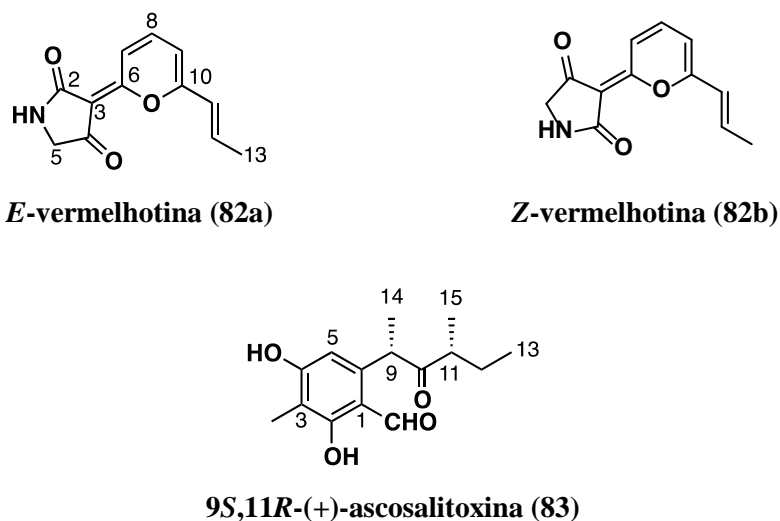
La propuesta de especie nueva de MEXU 26343 se comprobó mediante el análisis de la secuencias de las subunidades ribosomales 28S (28S rARN) e ITS (Espaciador Transcrito Interno), y su posterior comparación con la base de datos del GenBank. Los resultados indicaron que no existía similitud entre las secuencias de MEXU 26343 y las depositadas en el GenBank para otros aislamientos. Sin embargo, fue posible concluir que existía una estrecha relación con especies del orden de los Pleosporales (Figura 14). Los datos de secuencia de MEXU 26343 fueron depositados en el GenBank con los siguientes números de acceso: JN870279 (28S rRNA) y JN870280 (ITS).



**Figura 14.** Árbol filogenético de MEXU 26343 (Endophyte 39140-2) basado en la subunidad 28S ribosomal.

#### 4.2.1 Obtención y caracterización *E/Z* vermelhotina (**82**) y 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**)

Del extracto orgánico activo del cultivo de MEXU 26343 en mediana escala, utilizando varias técnicas cromatográficas, se obtuvieron dos metabolitos secundarios caracterizados como *E/Z* de vermelhotina (**82**) y 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) [Figura 15]. La caracterización de los metabolitos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos (IR, UV, <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-RMN, HSQC, HMBC, NOESY, COSY) y de espectrometría de masas (EM-ESI y EM-IE). El producto **83** se describe por vez primera en la naturaleza, en tanto que los datos espectroscópicos y espectrométricos de la mezcla de *E/Z* de vermelhotina concuerdan con los descritos previamente en la literatura para la *E/Z* vermelhotina (**82**) [Hosoe *et al.*, 2006; Kasetrathat *et al.*, 2008].

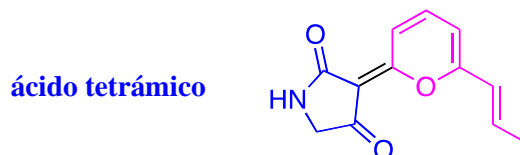


**Figura 15.** Metabolitos fúngicos aislados de MEXU 26343.

El compuesto **82** se obtuvo como un sólido amorfo naranja, soluble en AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, MeOH y H<sub>2</sub>O. Su fórmula molecular se estableció por EM de alta resolución (EM-AR-ESI) como C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> con un índice de deficiencia de hidrógenos de ocho.

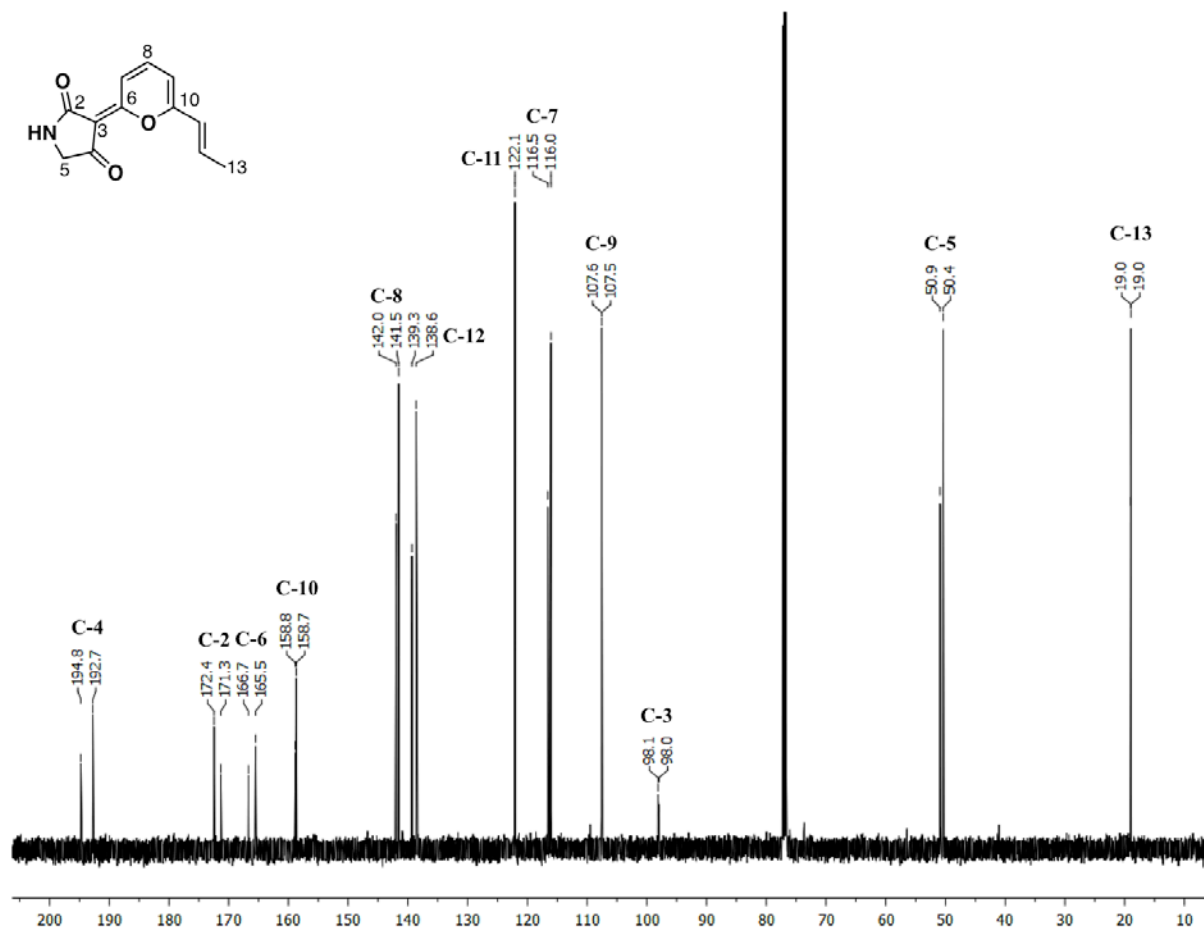


Los espectros de RMN del compuesto **82** se obtuvieron inicialmente en  $\text{CDCl}_3$ , observándose dos conjuntos de señales que se atribuyeron a una mezcla de isómeros *E/Z* en una proporción 6:4 (Figura 16; Tabla 5). El análisis por CLAE-FN permitió corroborar que efectivamente el producto que inicialmente se obtenía puro, se transformaba en una mezcla de isómeros. Cabe mencionar que fue factible detectar la mezcla de isómeros geométricos debido a que la velocidad de interconversión de uno y otro fue menor que el tiempo de registro. El análisis de los espectros de RMN indicó que **82** presenta un fragmento estructural similar al ácido tetrámico (pirrolidina-2,4-diona) [Royles, 2001]: dos grupos carbonilos ( $\delta_{\text{C}}$  172.3 y 192.7), un protón de amida ( $\delta_{\text{H}}$  5.86) y un grupo metileno ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3.79/50.4).



**Tabla 5.** Datos espectroscópicos de la mezcla isomérica de *E/Z* vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3$  ( $^1\text{H}$  a 500 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz).

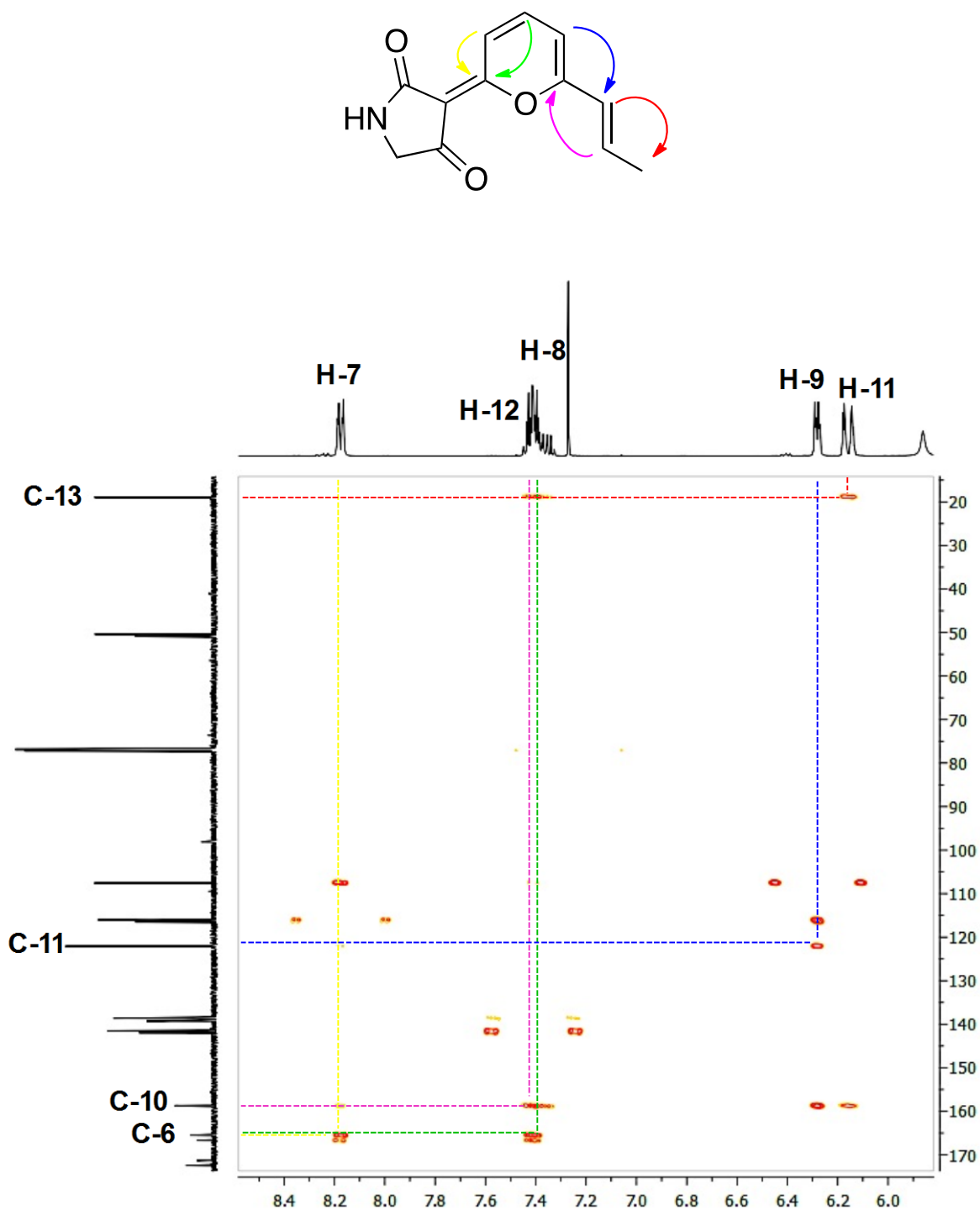
Posición	Isómero <i>E</i>			Isómero <i>Z</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	HMBC	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)
2	172.3			172.4	
3	98.1			97.9	
4	192.7			194.8	
5	50.4	3.79, s	2, 4	50.9	3.82, s (H-5)
6	165.5			166.7	
7	116.0	8.17, d (9.2)	6, 9	116.5	8.18, d (9.2)
8	141.5	7.40, dd (9.2, 7.5)	6, 9, 10	141.9	7.40, dd (9.2, 7.5)
9	107.6	6.29, d (7.0)	7, 10, 11	107.5	6.28, d (7.0)
10	158.7			158.8	
11	122.1	6.17, dq (15.3, 1.7)	9, 10, 12, 13	122.1	6.1, dq (15.3, 1.7)
12	138.6	7.42, dq (15.3, 7.1)	10, 13	139.3	7.39, dq (15.3, 7.1)
13	18.9	2.02, dd (7.1, 1.7)	10, 11, 12	19.0	2.00, dd (7.1, 1.7)
NH		5.86, s			5.64, s



**Figura 16.** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN de la *E/Z* vermelhotina (**82**) (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

También se observaron señales para cinco protones olefínicos, tres de los cuales se acoplan entre sí. Los otros dos corresponden a una cadena lineal de tres carbonos con una doble ligadura *trans* a juzgar por el valor de la constante de acoplamiento de  $J = 15.3$  Hz; el tercer carbono de la cadena se caracterizó como un metilo unido a doble ligadura. El análisis de las correlaciones HMBC permitieron posteriormente generar dos fragmentos con los dos conjuntos de señales recién descritos: un anillo de pirano sustituido por un propenilo. Finalmente, el segundo sustituyente del anillo de pirano que permitiría establecer la estructura de **80** debía ser el ácido tetrámico.

Los cuadros de conectividad observados en el espectro HMBC (Figura 17) permitieron corroborar como se unen los fragmentos estructurales detectados y que el producto aislado corresponde a la mezcla de isómeros *E/Z* vermelhotina.



**Figura 17.** Espectro de HMBC de la *E/Z* vermelhotina (**80**), mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.

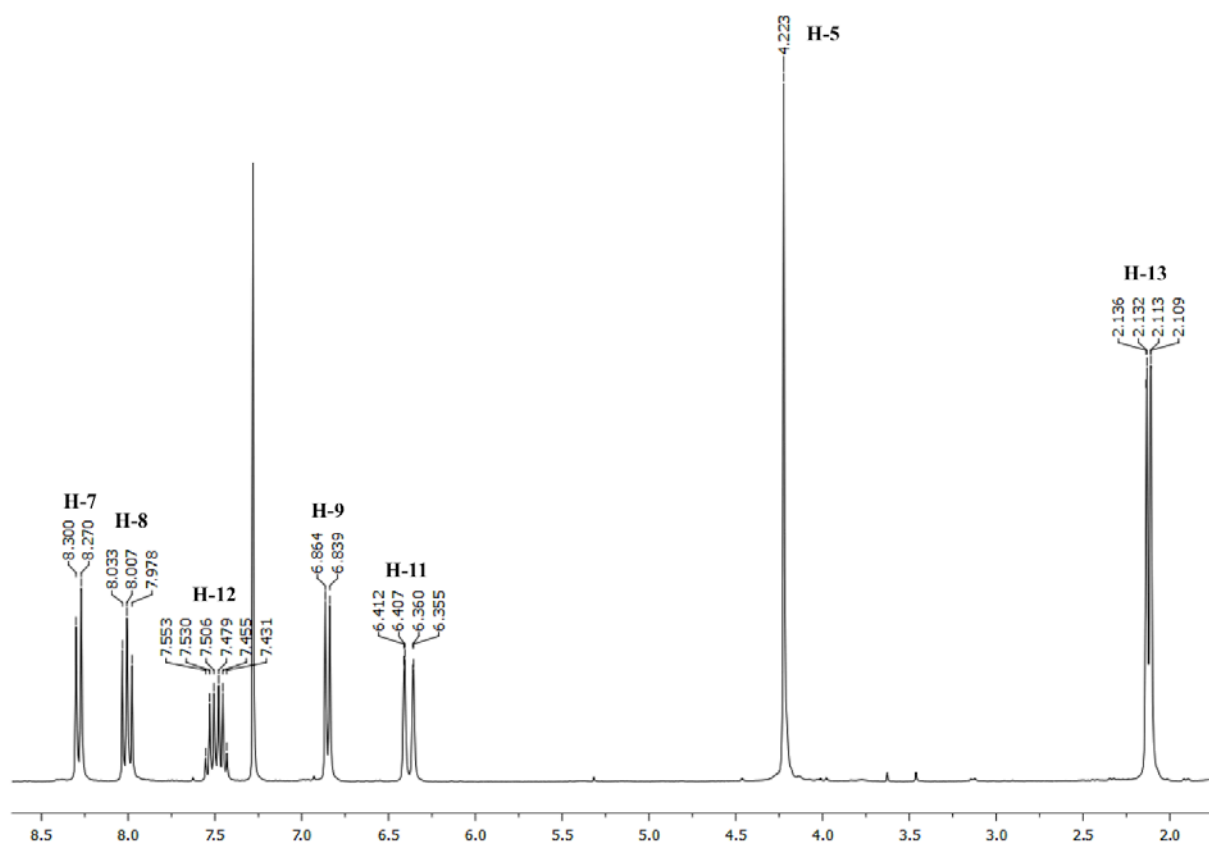
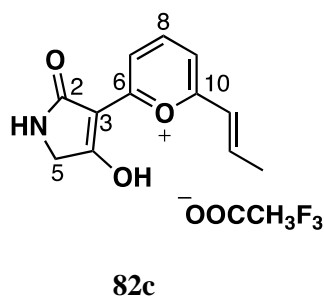
En 2006, Hosoe y colaboradores publicaron la estructura por rayos X de la *E*-vermelhotina (**82a**) y los datos de RMN en CDCl<sub>3</sub> de dicho isómero en esa ocasión; la *E*-vermelhotina se obtuvo a partir de un hongo no identificado IFM 52672 y los autores no hacen mención del equilibrio entre los dos isómeros que debió observarse al registrar los espectros de RMN en CDCl<sub>3</sub> (Hosoe *et al.*, 2006). Posteriormente en 2008 Kasetrathat y colaboradores reportan la *E/Z* vermelhotina en una proporción 1:2 y concluyen que es imposible separar la mezcla por CLAE debido a la rápida interconversión.

En el presente trabajo se registraron también los espectros de RMN en diferentes disolventes con la finalidad de ver el comportamiento de la mezcla de isómeros (Tablas A1 y A2). Cuando los espectros se registraron en presencia de TFA-*d* (Tabla 6) se pudo detectar un solo conjunto de señales (Figura 18).

**Tabla 6.** Datos espectroscópicos del compuesto **82** en CDCl<sub>3</sub>+TFA-*d* (<sup>1</sup>H a 300 MHz y <sup>13</sup>C a 75 MHz).

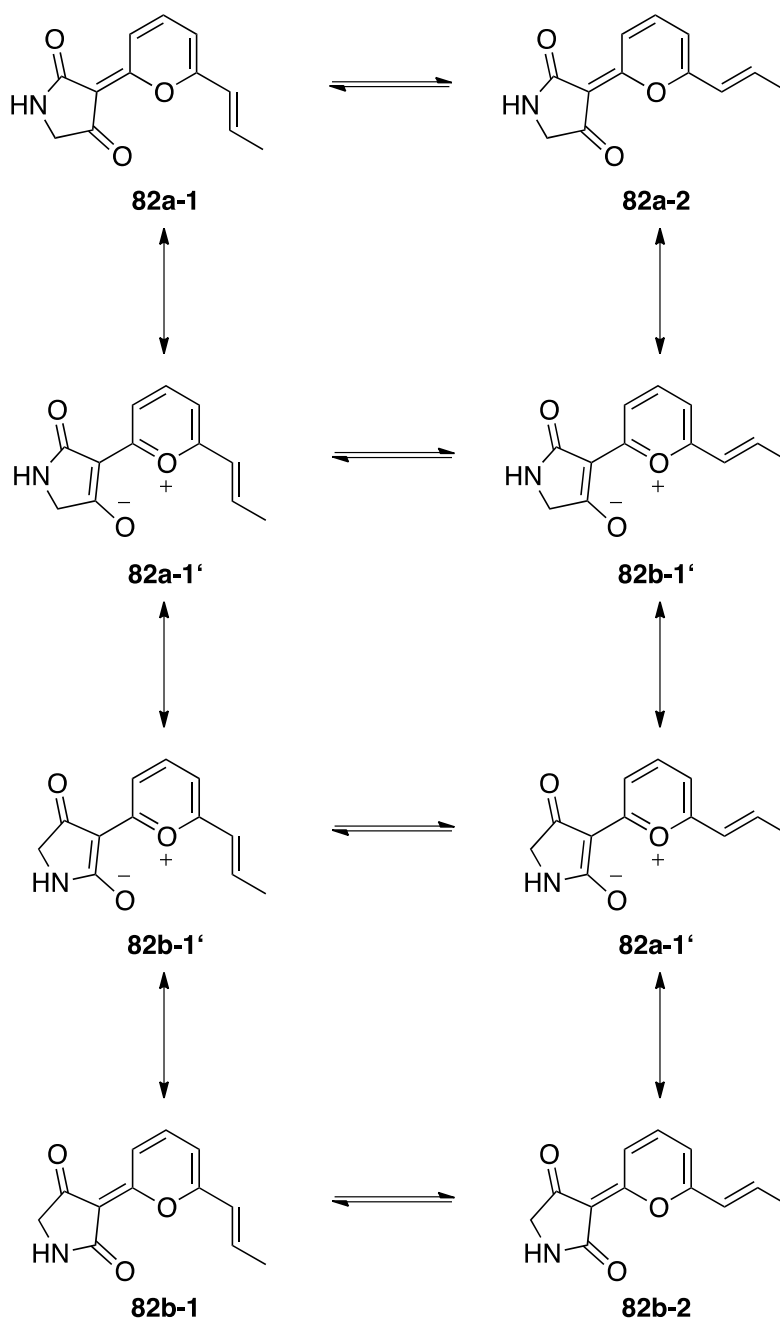
Posición	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> , mult. (J en Hz)	HMBC
2	174.5		
3	95.7		
4	193.8		
5	51.5	4.22, s	2, 4
6	167.9		
7	116.3	8.28, d (9.0)	3, 6, 8, 9
8	148.4	7.99, dd (8.7, 7.8)	6, 7, 10
9	112.2	6.85, d (7.5)	7, 8, 9, 10
10	163.3		
11	121.5	6.38, dd (15.5, 1.5)	9, 10, 13
12	145.1	7.48, dq (15.3, 6.9)	10, 13
13	19.3	2.12, dd (6.9, 1.5)	10, 11, 12

La presencia de un solo conjunto de señales se debe a la formación del trifluoroacetato de pirilio **82c**; en este producto el enlace C3-C6 es sencillo, por lo tanto ya no hay posibilidad de generar isómeros geométricos.



**Figura 18.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la vermelhotina (**82**) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{TFA-d}$ ).

La formación de la sal **82c** o de las especies zwitteriónicas **82a-1'** y **82b-1'** (Figura 19), podrían explicar la solubilidad de vermelhotina en agua; cabe mencionar que en los espectros de RMN registrados en MeOH y  $\text{H}_2\text{O}$ , disolventes próticos, se observan también señales para un solo producto (Espectros A13-A18).



**Figura 19.** Equilibrio isomérico y conformacional de la *E/Z* vermehotina (**82**).

Los cálculos de DFT con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP, establecieron que los conformeros **82a-1** y **82b-1** son los más estables, y que la contribución del isómero *E* respecto al isómero *Z* en la mezcla es de 64.2% y 35.8%, respectivamente, corroborando la información obtenida en los espectros de RMN.

### 4.2.2 Elucidación estructural de la 9S,11R-(+)-ascosalitoxina (83)

El compuesto **83** se aisló como un aceite amarillo (84.9 mg), ópticamente activo. El espectro de masas de alta resolución (EM-AR-IE) permitió establecer la fórmula molecular  $C_{15}H_{20}O_4$  y un índice de insaturación de seis.

El análisis detallado de los espectros de RMN uni y bidimensionales (Tabla 7) permitieron establecer la presencia de un núcleo similar al del aldehído salicílico ( $\delta_C$  191) el cual posee un anillo de benceno pentasustituido ( $\delta_H/\delta_C$  6.27/107.5, 110.8, 111.6, 142.8, 162.2 y 164.9) con dos grupos hidroxilo ( $\delta_H$  7.63 y 12.84), un metilo ( $\delta_H/\delta_C$  2.11/7.1), y una cadena lateral con una función cetona ( $\delta_C$  215). La cadena lateral posee también dos grupos metilo ( $\delta_H/\delta_C$  1.09, d,  $J = 7.2$  Hz/17.5 y 1.43, d,  $J = 6.8$  Hz/18.8). La señal en  $\delta_H$  12.84 es consistente con la presencia de un grupo hidroxilo quelado *orto* al grupo aldehído.

**Tabla 7.** Datos espectroscópicos de la 9S,11R-(+)-ascosalitoxina (**83**) en  $CDCl_3$  ( $^1H$  a 400 MHz y  $^{13}C$  a 100 MHz).

Posición	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ en Hz)	HMBC	NOESY
1	111.6		5, 7, 9	
2	164.9		OH-2, 7, 8	
3	110.8		8	
4	162.2		5, 8	
5	107.5	6.27, s	8, 9	14
6	142.8		9, 14	
7	191.5	10.24, s		9
8	7.1	2.11, s		
9	44.2	4.53, q (6.8)	5, 14	7, 14, 15
10	215.5		9, 14, 15	
11	46.9	2.50, tq (6.8, 7.2)	13, 15	12, 15
12	25.4	1.57, ddq (14.0, 7.5, 6.8) 1.31, dq (14.0, 7.2)	13, 15	13
13	11.6	0.67, t (7.2, 7.5)	11, 12	12
14	18.8	1.43, d (6.8)	9	5, 9
15	17.5	1.09, d (7.2)	11, 12	9, 11
OH-2		12.84, s		
OH-4		7.63, s		

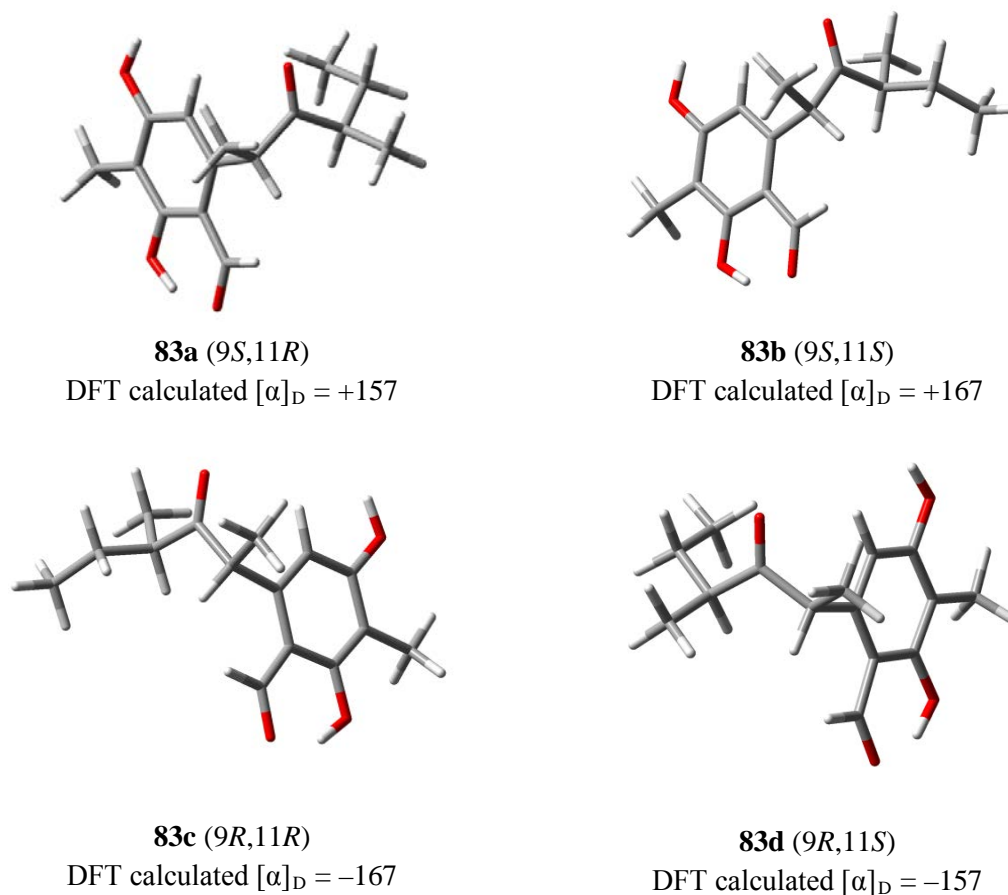
Las correlaciones HMBC de C-2 y C-4 confirmaron la posición de los grupos metilo e hidroxilo en C-3 y C-4, respectivamente. Las correlaciones en los espectros NOESY y HMBC confirman la posición de los sustituyentes en el anillo aromático y en la cadena lateral y por lo tanto la estructura del compuesto **83**. Los datos espectroscópicos fueron idénticos a los reportados para la toxina fúngica ascosalitoxina, aislada de *Ascochyta pisi* var. *pisii*, sin embargo, la configuración absoluta de los centros estereogénicos no fue descrita en esa ocasión (Evidente, *et al.*, 1993).

Para determinar la configuración absoluta en los carbonos C-9 y C-11 de la ascosalitoxina se realizaron transformaciones químicas del producto natural y cálculos de modelado molecular. De esta manera, se inició la búsqueda conformacional de cada uno de los cuatro posibles diastereoisómeros de **83** (**83a** – **83d**); este procedimiento se realizó en el programa Spartan 04 utilizando el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94, seguida de la optimización geométrica de cada conformero con DFT a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP utilizando el programa Gaussian 09 (Figura 20).

Un análisis detallado de cada una de las estructuras de mínima energía permitió descartar las moléculas duplicadas. Para cada uno de los diastereoisómeros se obtuvieron veinte conformeros de mínima energía, seleccionados a partir del valor energético que presentaron (0–3 kcal/mol), y con los cuales posteriormente se calcularon los valores de rotación óptica específica ( $[\alpha]_D$ ). En las tablas 8, A3, A4 y A5 se muestran los valores teóricos de energía libre ( $\Delta G$ ), población ( $P$ ), valores de ángulos diedros y  $[\alpha]_D$  para cada una de las estructuras analizadas.

El primer análisis de los resultados indicó que los diastereoisómeros **83c** (9*R*,11*R*) y **83d** (9*R*,11*S*), que presentaron valores calculados de rotación óptica negativos, fueron descartados como posibles estructuras del producto natural. En tanto que **83a** (9*S*,11*R*) y **83b** (9*S*,11*S*) presentaron un valor teórico de rotación óptica positivo (Tabla 8 y A3; Figura 20), al igual que el producto natural aislado que presentó un valor experimental de  $[\alpha]_D$  de +153. Entre los valores de rotación óptica experimental del producto natural **83** y el valor calculado para **83b** se observó una diferencia significativa, por lo tanto **83a** (9*S*,11*R*) representa la mejor opción estructural para **83**.





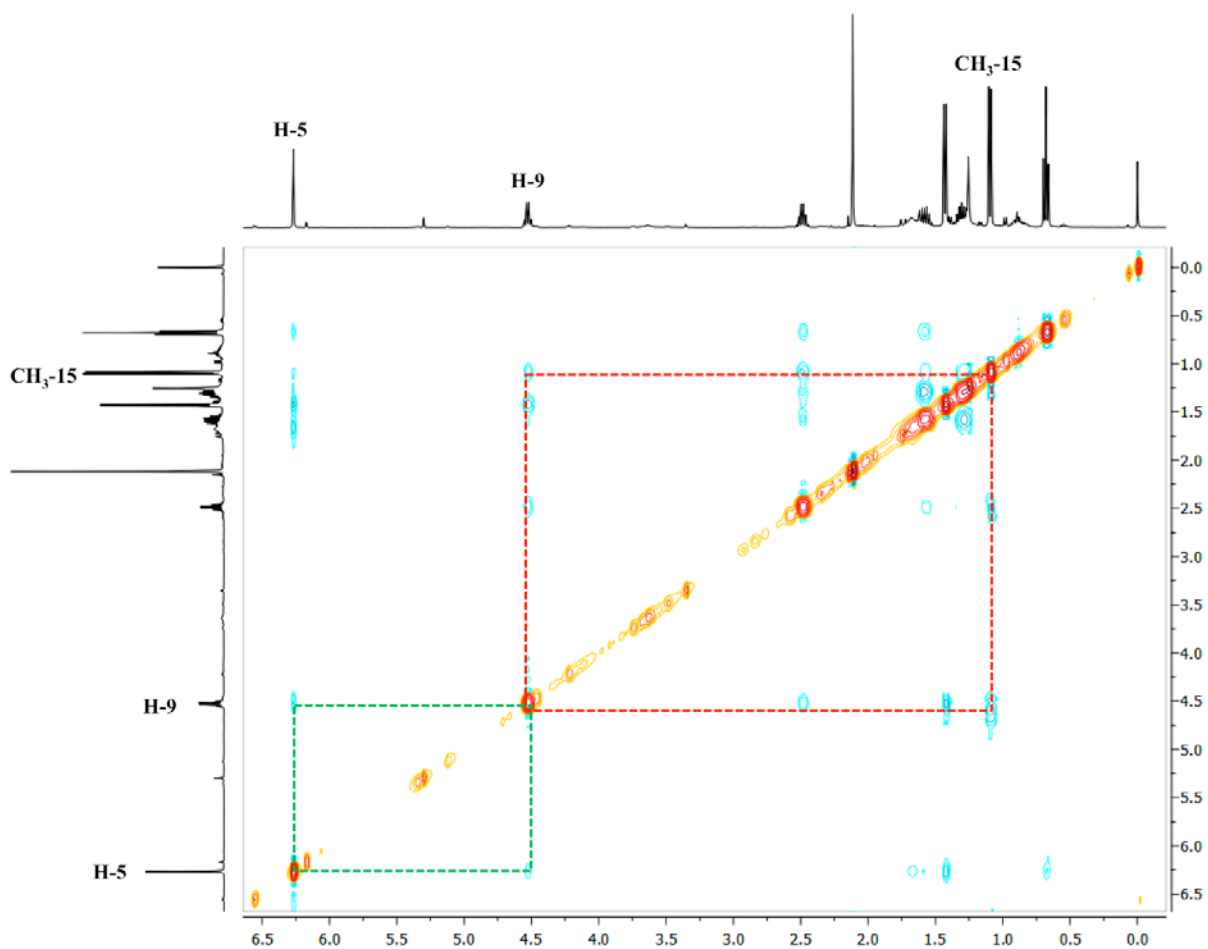
**Figura 20.** Estructuras de mínima energía de los cuatro posibles diastereoisómeros del producto natural **83**.

El análisis detallado del espectro NOESY proporcionó una evidencia en favor del diastereoisómero 9*S*,11*R*, ya que se observa una clara correlación entre los protones H-9 y el CH<sub>3</sub>-15 (Figura 21). Un análisis detallado de las estructuras de mínima energía de los diastereoisómeros **83a** y **83b** indicaron una marcada preferencia para **83a**, dado que los valores de los ángulos diedros para los fragmentos C6–C9–C10–C11 y C9–C10–C11–C12 son alrededor de  $-75^\circ$  y  $+145^\circ$ , respectivamente (Figura 22). Estos valores se pueden observar en los primeros siete conformeros enlistados en la tabla 8. Esto implica que H-9 es muy cercano a los protones del CH<sub>3</sub>-15, con una distancia aproximada de 2.4 Å. En contraste, la distancia entre los mismos protones para el isómero **83b** es de aproximadamente 4.7 Å, eliminando la posibilidad de observar una correlación entre H-9 y CH<sub>3</sub>-15, y a **83b** como la estructura del producto natural.

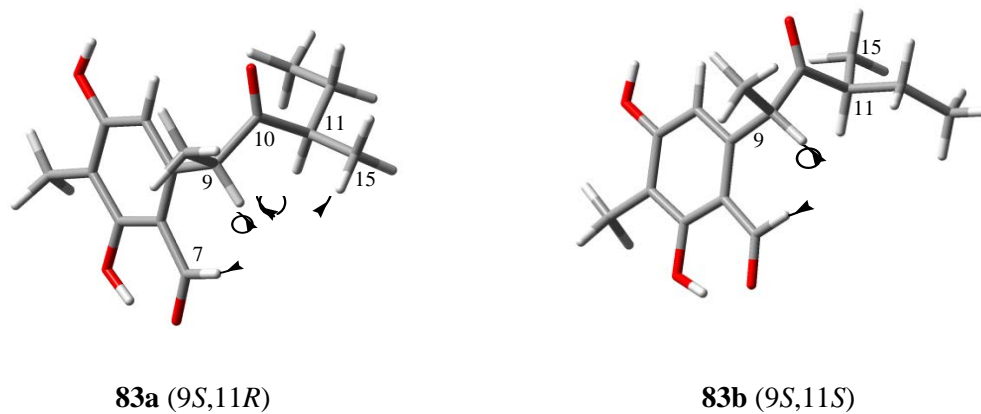
**Tabla 8.** Energía libre relativa,<sup>a</sup> población,<sup>b</sup> ángulos diedros seleccionados,<sup>c</sup> y valores de  $[\alpha]_D$  calculados con DFT<sup>d</sup> para los veinte conformeros más relevantes de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83a**).

Conformero	$\Delta G^a$	$P$ (%) <sup>b</sup>	D1	D2	D3	D4	D5	$[\alpha]_D$
1	0.000	40.96	+180	-53	-86	+150	-68	177.66
2	0.306	24.17	+180	-48	-81	+144	-175	165.56
3	0.527	15.85	0	-53	-81	+149	-68	166.06
4	0.767	10.39	+1	-46	-73	+141	-175	123.81
5	1.782	1.92	-1	+118	-70	+149	-67	59.27
6	2.004	1.40	0	+120	-62	+134	-175	66.04
7	2.191	1.02	-179	+118	-69	+149	-67	63.54
8	2.369	0.74	+180	-47	-107	+65	+67	160.72
9	2.488	0.60	1	-106	61	+118	-174	1.26
10	2.508	0.60	+180	-43	-98	-73	-60	127.62
11	2.612	0.49	0	-46	-74	+141	+73	214.09
12	2.616	0.49	0	-103	+58	+134	-65	-36.19
13	2.709	0.39	0	-42	-95	-75	-60	116.23
14	3.025	0.23	+179	-104	+57	+134	-65	-31.97
15	3.218	0.17	-1	-63	-158	+119	-63	-98.54
16	3.220	0.17	0	+114	-146	+92	-171	-372.28
17	3.223	0.17	0	-45	-103	+68	+68	145.88
18	3.549	0.10	1	+116	-160	+120	-64	-315.68
19	3.635	0.09	0	+118	-60	+114	+67	99.72
20	4.032	0.04	0	+122	-52	+175	+74	156.57
Valor promedio teórico de $[\alpha]_D^e$								157.18
Valor experimental de $[\alpha]_D^f$								153

<sup>a</sup>Energía libre de Gibbs calculada por DFT B3LYP/DGDZVP en kcal mol<sup>-1</sup> relativa al valor absoluto de  $G$  para el mínimo global  $-554,957.611$  kcal mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>En porcentaje a partir de los valores de  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>Ángulos diedros en grados D1: (C3C4OH), D2 (C5C6C9C10), D3 (C6C9C10C11), D4 (C9C10C11C12), D5 (C10C11C12C13). <sup>d</sup>Valores de  $[\alpha]_D$  calculados por DFT B3LYP/DGDZVP en grados [dm g/cm<sup>3</sup>]<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>Calculado con la ecuación  $\sum^i [\alpha]_D^i \times P^i$ , donde  $[\alpha]_D^i$  es el valor de  $[\alpha]_D$  teórico y  $P^i$  es la población para el  $n$ -ésimo conformero. <sup>f</sup>Registrado en CHCl<sub>3</sub>.

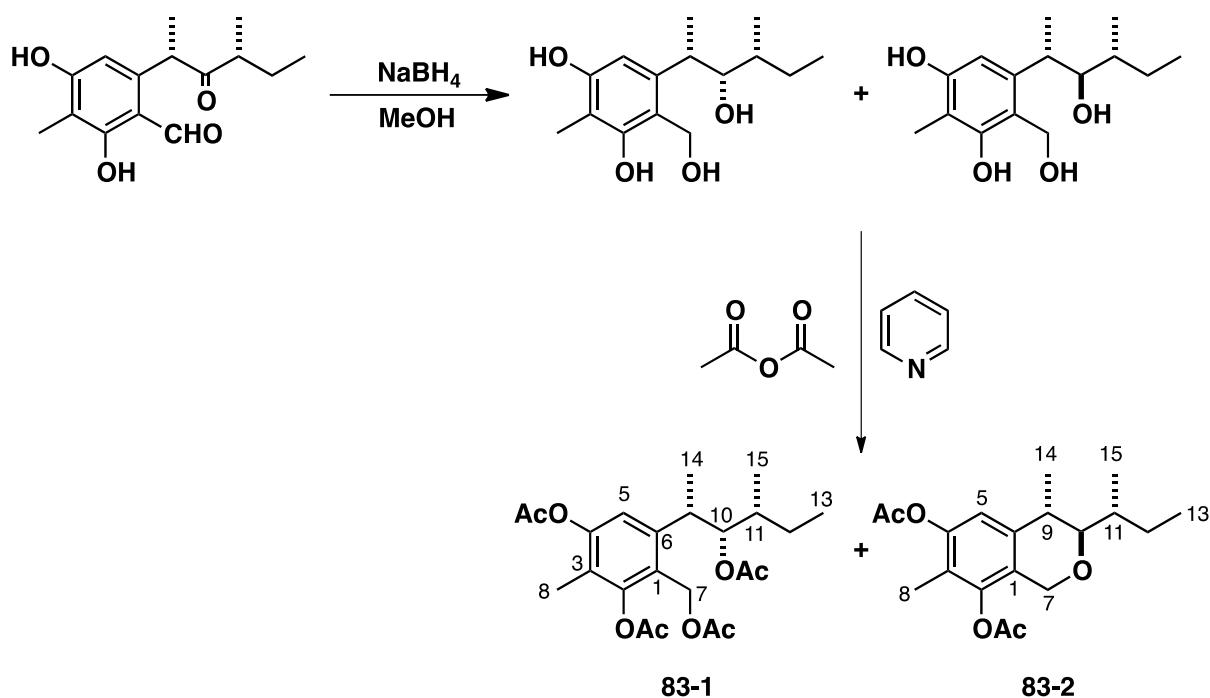


**Figura 21.** Espectro de NOESY de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) mostrando la interacción H-9/H-15.



**Figura 22.** Estructuras de mínima energía de los diastereoisómeros **83a** y **83b**. Las correlaciones NOESY entre H-5/H-9 y H-9/Me-15 observadas en el espectro están marcadas en el diastereoisómero **83a**.

Otra evidencia adicional a favor de la estructura **83a** se obtuvo a partir de la transformación química del compuesto **83** en **83-2** y la comparación de sus constantes de acoplamiento experimentales y teóricas calculadas. Así, la reducción del producto natural con  $\text{NaBH}_4$  y la posterior acetilación de la mezcla de reacción con anhídrido acético y piridina condujo a la obtención del derivado tetraacetilado **83-1** y del éter cíclico **83-2** (Figura 23), este último formado durante la acetilación por un ataque nucleofílico de la función oxigenada en C-10 a C-7.



**Figura 23.** Transformaciones químicas del producto **83** para generar los derivados **83-1** y **83-2**.

La purificación de los compuestos **83-1** y **83-2** se llevó a cabo por CLAE-FR y la caracterización se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN) y de espectrometría de masas (EM-ESI y EM-EI). El compuesto **83-1** se purificó como un aceite amarillo (4.5 mg) ópticamente activo. El espectro de masas de alta resolución permitió establecer su fórmula molecular como  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_8$ . Los espectros de RMN (Tabla 9) permitieron establecer la presencia de señales para un alcohol bencílico acetilado ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  5.11/57.4), un carbinol secundario acetilado ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4.99, dd,  $J = 9.3$  y  $3.9$  Hz/81.4), y cuatro grupos acetilo.

**Tabla 9.** Datos espectroscópicos de los derivados **83-1** y **83-2** en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H a 300 MHz y <sup>13</sup>C a 75 MHz).

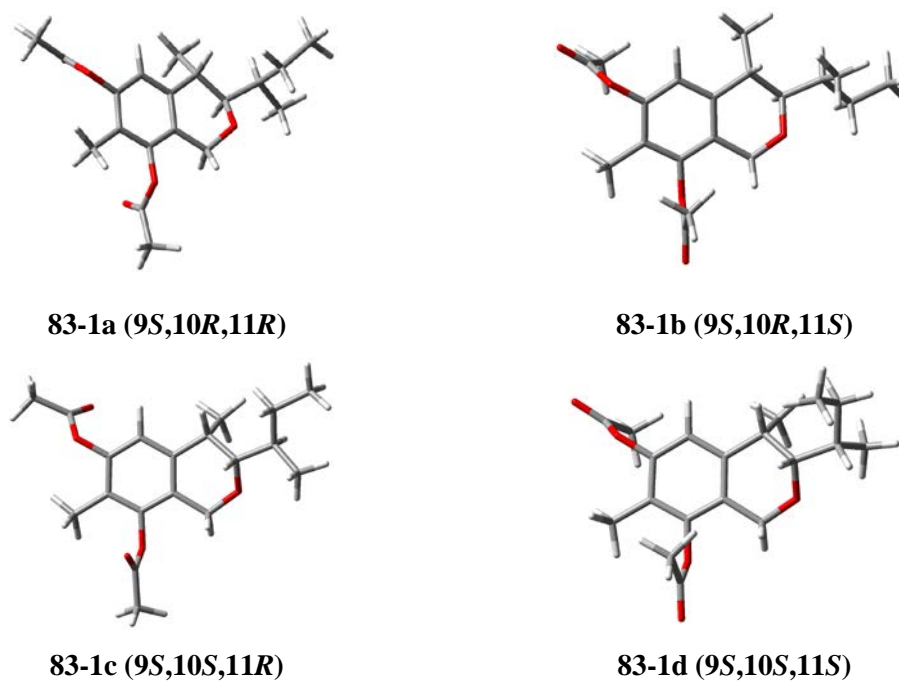
Posición	83-1		83-2	
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	122.0		125.0	
2	149.3		145.0	
3	124.3		120.6	
4	150.1		148.3	
5	118.9	7.02, s	118.8	6.87, s
6	143.4		138.4	
7	57.4	5.11, s	62.5	5.55, d (15.5)
8	10.2	1.92, s	9.7	1.92, s
9	35.7	3.47, dq (9.2, 7.1)	35.2	2.93, dq (7.2, 6.9)
10	81.4	4.99, dd (9.2, 3.9)	84.1	3.21, dd (7.4, 4.8)
11	35.8		32.6	
12	22.5		22.7	
13	11.7	0.92, t (7.3)	12.0	0.91, t (7.5)
14	18.6	1.23, d (7.1)	18.9	1.23, d (6.9)
15	16.1	0.87, d (6.9)	16.6	0.98, d (6.9)
(CH <sub>3</sub> CO)	20.9, 20.8	2.34, 2.31,	20.8	2.32, 2.31
	20.5, 20.5	2.04, 1.78, s	20.3	
CH <sub>3</sub> CO	170.7, 170.3		169.2	
	168.7, 168.7		168.9	

El espectro de masas del derivado cíclico **83-2** (1.4 mg), permitió establecer la fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub> para este producto. El análisis de los espectros de RMN (Tabla 9) permitió detectar las señales de dos grupos acetilo, un metileno bencílico como un sistema AB ( $\delta_H$  4.65 y 4.42, H-7, ecuatorial/axial); dos protones no bencílicos en  $\delta_H$  3.21 (dd,  $J = 7.3$ ; 4.7 Hz) y 2.93 (dq,  $J = 7.2$  and 6.9 Hz) correspondientes a los protones H-10 y H-9, respectivamente. Adicionalmente una correlación NOESY entre H-7<sub>ax</sub> y H-10 confirmó la formación de producto cíclico.

El estudio teórico se realizó con los diastereoisómeros de los dos productos de reacción que consideraban la configuración *S* en el C-9, dado que dicha configuración confiere el signo positivo en el valor de  $[\alpha]_D$  experimental del producto natural; se realizó un análisis conformacional de los diastereoisómeros del compuestos **83-1** y del compuesto **83-2** mediante mecánica molecular (Figura 24 y 25), utilizando el campo de fuerza MMFF94. Posteriormente, cada conformero de mínima energía fue optimizado geoméricamente

mediante DFT a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. A continuación, se calcularon las constantes de acoplamiento vecinales ( $J_{H-H}$ ), para cada uno de los diastereoisómeros, mediante la sumatoria de valores de cada conformero en función de la fracción molar (Cerde-García-Rojas y Pereda-Miranda, 1999; Tabla A6 y A7). Finalmente, se realizó un análisis comparativo entre las constantes de acoplamiento teóricas y las experimentales empleando el estadístico del error medio cuadrático (EMC).

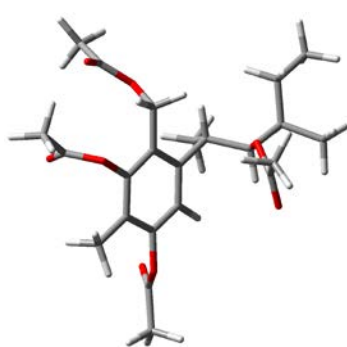
El análisis comparativo de los valores de las constantes de acoplamiento vecinales ( $J_{H-H}$ ) teóricas y los valores experimentales de cada uno de los compuestos, permitió establecer las siguientes conclusiones (Tabla 10 y 11): la menor diferencia significativa entre los valores de las constantes de acoplamiento teóricas respecto a las experimentales se obtuvieron con los diastereoisómeros **83-1a** (9*S*,10*R*,11*R*) y **83-2a** (9*S*,10*R*,11*R*). Estos resultados confirman la configuración absoluta de *S* para el C-9 y *R* para el C-11.



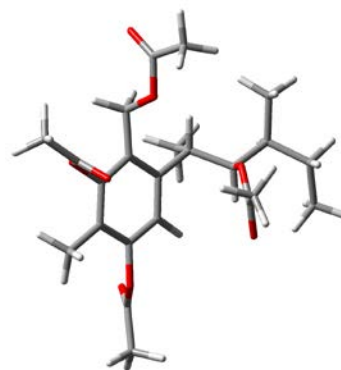
**Figura 24.** Diastereoisómeros de menor energía del derivado **83-1**.

**Tabla 10.** Valores de las constantes de acoplamiento vecinales ( $J_{H-H}$ ) teóricas y experimentales, de los diastereoisómeros del producto **83-1**, y criterio estadístico EMC.

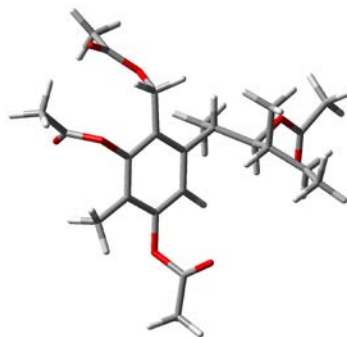
Diastereoisómero	$J_{9-10}$	$J_{10-11}$	EMC
83-1a (9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>R</i> )	9.47	3.16	0.56
83-1b (9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i> )	9.77	1.92	1.43
83-1c (9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,11 <i>R</i> )	9.96	1.74	1.62
83-1d (9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,11 <i>S</i> )	9.07	2.60	0.93
Valor Experimental	<b>9.20</b>	<b>3.90</b>	



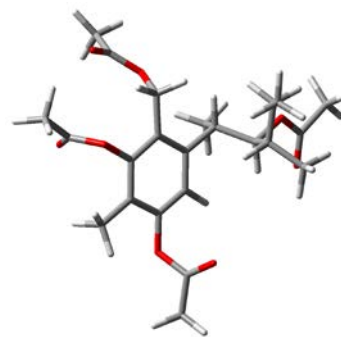
**83-2a (9*S*,10*R*,11*R*)**



**83-2b (9*S*,10*R*,11*S*)**



**83-2c (9*S*,10*S*,11*R*)**



**83-2d (9*S*,10*S*,11*S*)**

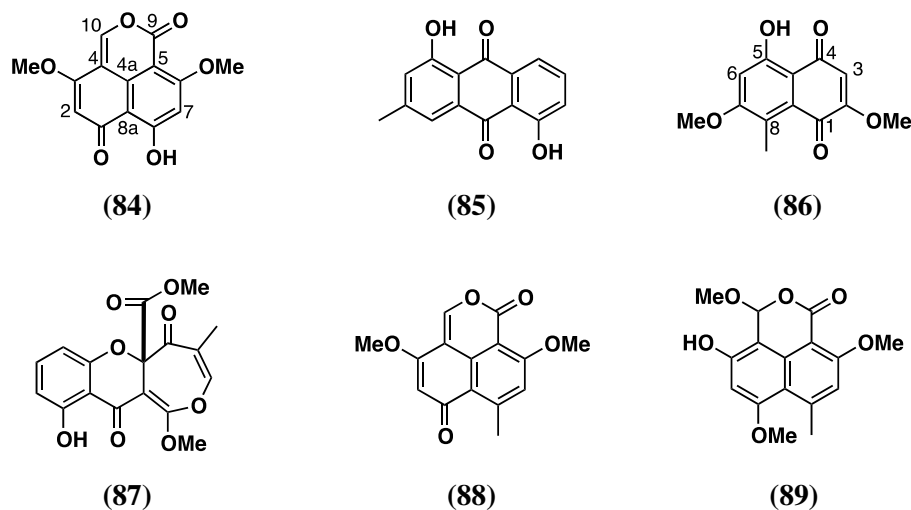
**Figura 25.** Diastereoisómeros de menor energía del producto **83-2**.

**Tabla 11.** Valores de las constantes de acoplamiento vecinales ( $J_{H-H}$ ), teóricas y experimentales, de los diastereoisómeros del producto **83-2**, y criterio estadístico EMC.

Diastereoisómero	$J_{9-10}$	$J_{10-11}$	EMC
83-2a (9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>R</i> )	7.47	2.51	1.62
83-2b (9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i> )	8.88	1.92	2.29
83-2c (9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,11 <i>R</i> )	2.49	8.81	4.48
83-2d (9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,11 <i>S</i> )	2.51	8.93	4.53
Valor Experimental	<b>7.40</b>	<b>4.80</b>	

### 4.3 Obtención de los metabolitos secundarios de *Sporormiella minimoides*

El fraccionamiento preliminar del extracto orgánico (1.63 g) del medio de cultivo, utilizando diversas técnicas cromatográficas condujo al aislamiento y purificación de tres metabolitos secundarios novedosos caracterizados como 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**), 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (**88**), y 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isochromen-9-ona (**89**). De manera adicional, se aislaron y purificaron la corimbiferona (**84**), la ziganeina (**85**) y el brocaenol B (**87**) [Figura 26].

**Figura 26.** Metabolitos secundarios de *Sporormiella minimoides*.



### 4.3.1 Caracterización de los metabolitos secundarios aislados de *S. minimoides*

La caracterización de los metabolitos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos (IR, UV, RMN) y espectrométricos de masas (EM-FAB, EM-ESI y EM-EI). Los resultados obtenidos para los compuestos **84–85** y **87** concuerdan con los descritos previamente en la literatura (Overy, *et al.*, 2005; Imre *et al.*, 1973; Bugni *et al.*, 2002).

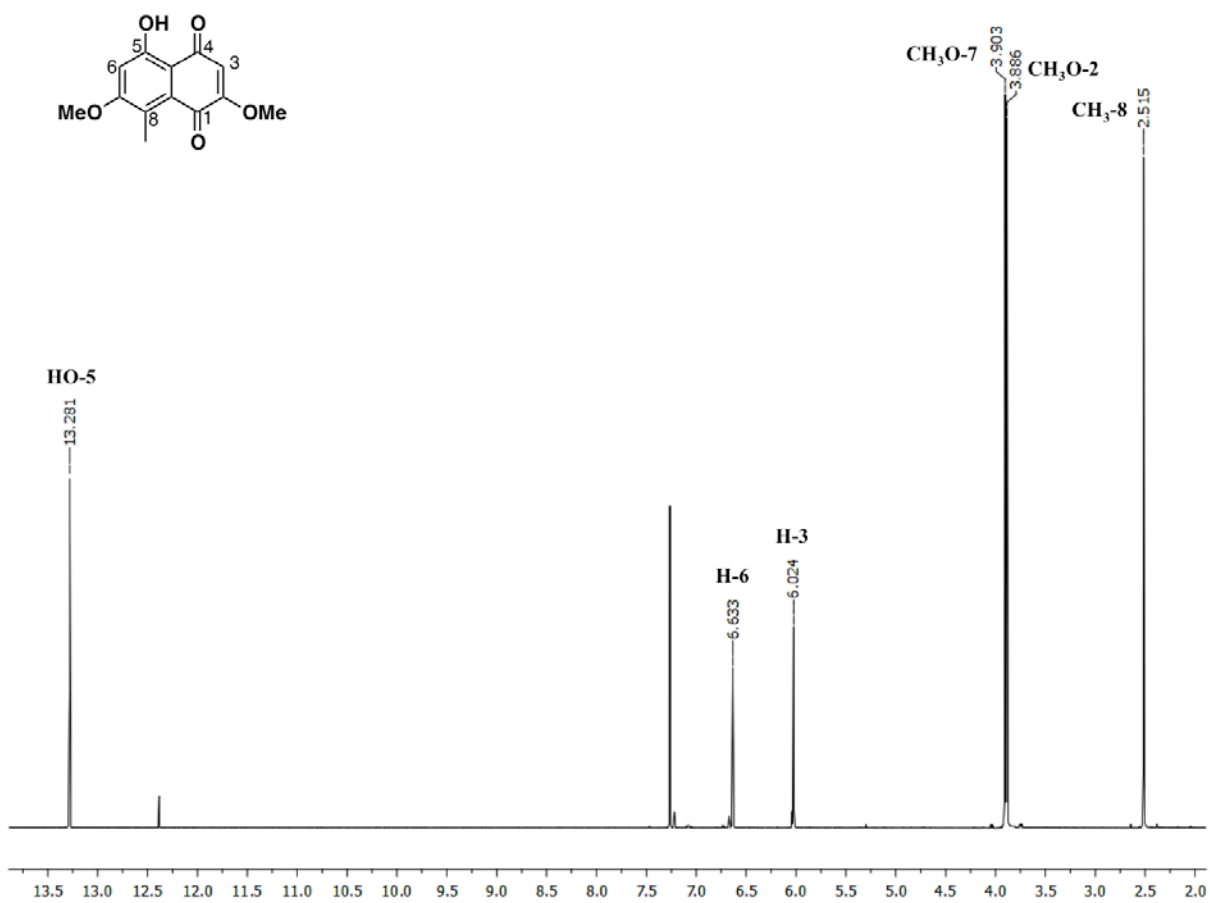
### 4.3.2 Elucidación estructural de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**)

La fórmula molecular del compuesto **86** se estableció por espectrometría de masas de alta resolución (EM-AR-EI) como  $C_{13}H_{12}O_5$ , con un índice de deficiencia de hidrógenos de ocho. Los espectro de RMN (Tabla 12) mostraron señales características para una naftoquinona tetrasustituida (Ioset *et al.*, 1998). De manera adicional, el análisis de los espectros indicó la presencia de dos grupos metoxilo ( $\delta_C/\delta_H$  56.5/3.88 y 56.2/3.90) y un metilo ( $\delta_C/\delta_H$  12.6/2.52), un grupo hidroxilo quelatado ( $\delta_H$  13.28), y dos metinos que absorben en la región aromática ( $\delta_C/\delta_H$  104.2/6.63 y 108.3/6.02) [Figura 27].

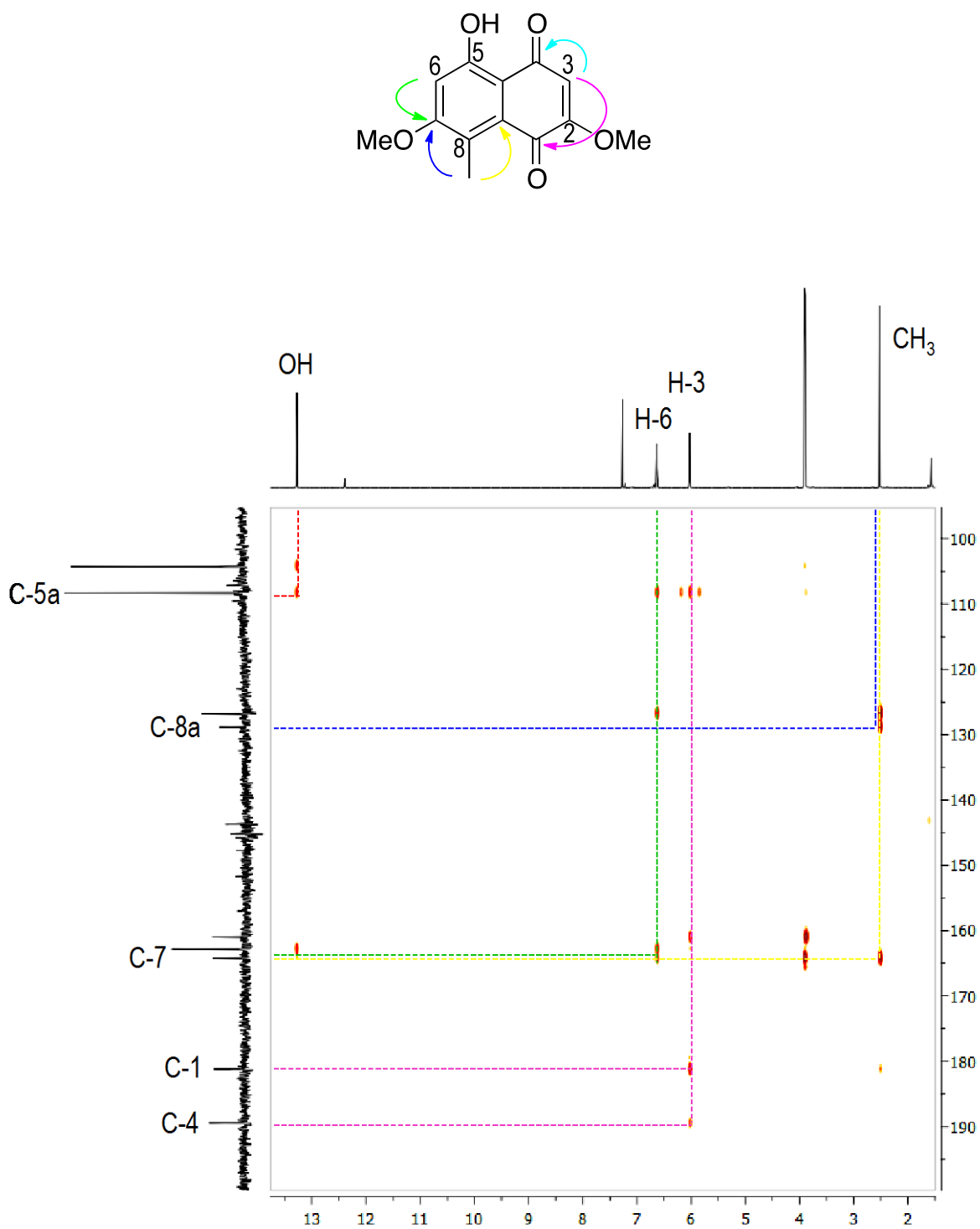
La señal en  $\delta_H$  6.02 fue asignada a un hidrógeno quinonoide (H-3), el cual correlaciona con ambos grupos carbonilo ( $\delta_C$  189.4 y 181.2) en el espectro de HMBC. Las correlaciones HMBC del carbono C-7 ( $\delta_C$  164.2) con el metoxilo  $OCH_3$ -7 y el protón H-6, apoya la posición de uno de los metoxilos. La intensidad de la correlación NOESY entre el protón H-6 y el metoxilo  $OCH_3$ -7 favorece esta propuesta. Por otro lado, las interacciones HMBC entre el protón H-6 y el C-5a, y entre el C-1 y C-7 indican que el hidrógeno aromático se encuentra ubicado entre el hidroxilo quelatado y un grupo metoxilo. Finalmente, los hidrógenos del grupo metilo correlacionaron con los carbonos C-8a y C-7, por lo que el grupo metilo fue situado en el carbono C-1 (Figura 28). Con base en las evidencias presentadas, el compuesto fue caracterizado como 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**).

**Tabla 12.** Datos espectroscópicos de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**) en  $\text{CDCl}_3$  ( $^1\text{H}$  a 500 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz).

Posición	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J)	HMBC <sup>a</sup>	NOESY
1	181.2			
2	161.0			
3	108.3	6.02, s	1, 2, 4	2-OMe
4	189.4			
5	162.8			
5a	108.4			
6	104.2	6.63, s	4, 5, 5a, 7, 8	7-OMe
7	164.2			
8	126.8			
8a	128.8			
2-OMe	56.5	3.88, s	2	
7-OMe	56.2	3.90, s	7	
8-Me	12.6	2.52, s	1, 7, 8, 8a	
5-OH		13.28	5, 5a, 6	



**Figura 27.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**) [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].



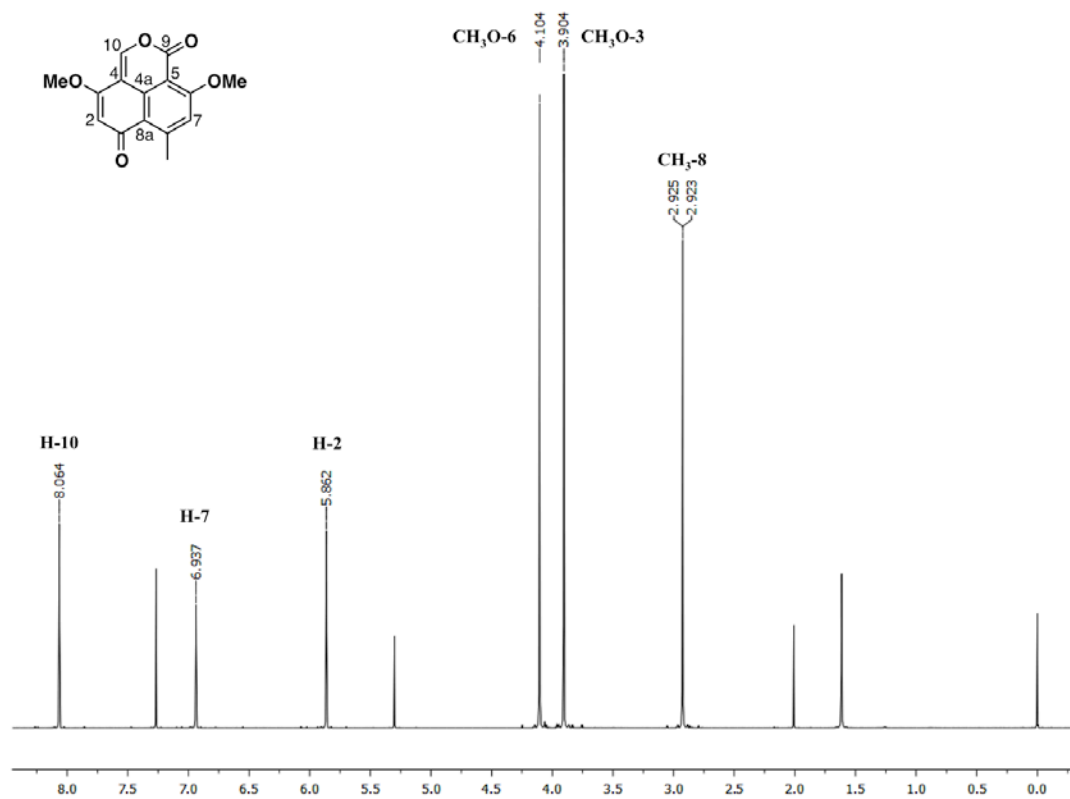
**Figura 28.** Espectro HMBC de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8 metilnaftoquinona (**86**) mostrando las correlaciones más importantes.

### 4.3.3 Elucidación estructural de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (**88**) y la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**)

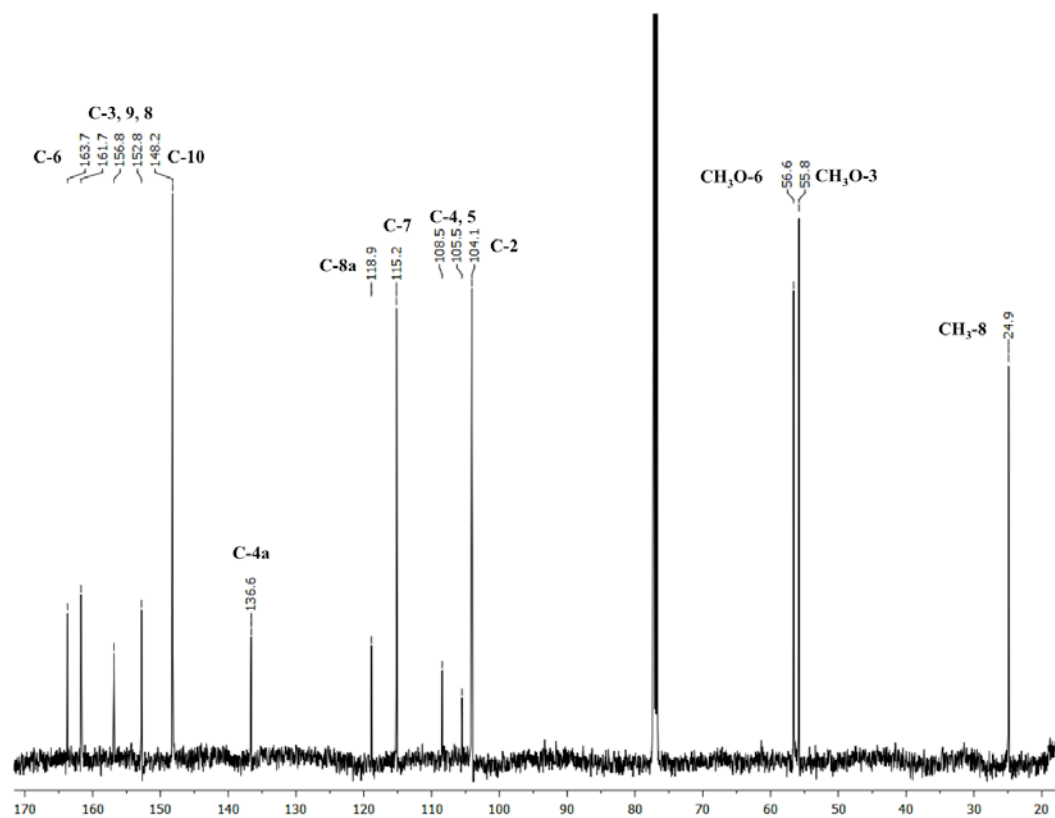
3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (**88**) se obtuvo como un polvo blanco con un punto de fusión de 190–192 °C. Su fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, se determinó por espectrometría de masas de alta resolución (EM-AR-EI). El compuesto **88**, muestra máximos de absorción en el UV similares a los del compuesto **84** en 208, 251, 279 y 292 nm. En tanto que el espectro en el IR fue consistente con la presencia en la molécula de grupos lactona (1742 cm<sup>-1</sup>) y cetona conjugada (1651 cm<sup>-1</sup>). Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-RMN (Tabla 13), mostraron señales similares a las observadas en aquellos de la corimbiferona (**84**), asumiéndose que el esqueleto base de ambos compuestos era igual (Overy *et al.*, 2005). Las diferencias entre los espectros de ambos compuestos se observan principalmente en los desplazamientos de C-8a, C-7/H-7, C-5 y C-8 (Figura 29); las señales correspondientes a los tres primeros núcleos se encuentran paramagnéticamente desplazadas en el producto **88**, como consecuencia del menor efecto protector que resulta de sustituir el grupo hidroxilo por un metilo; éstas se observan en  $\delta_C$  118.8,  $\delta_C/\delta_H$  115.2/6.93, y  $\delta_C$  105.5, respectivamente. Por otro lado, la señal de C-8 se desplaza diamagnéticamente a  $\delta_C$  152.8 por encontrarse ipso al grupo metilo.

Los experimentos de HMBC y NOESY (Tabla 13) proporcionaron evidencias adicionales que respaldan la ubicación del metilo en C-8. En el primer caso con base en las correlaciones que se observan entre los protones del metilo (CH<sub>3</sub>-8) y el carbono C-4a ( $\delta_C$  136.6), C-7 ( $\delta_C$  115.2), C-8 ( $\delta_C$  152.8) y C-8a ( $\delta_C$  118.8); y entre el protón H-7 ( $\delta_H$  6.93) con los carbonos C-5 ( $\delta_C$  105.5), C-8 ( $\delta_C$  152.8) y C-8a ( $\delta_C$  118.8). Finalmente, el espectro NOESY muestra cuadros de conectividad entre H-7, OCH<sub>3</sub>-6 y H-7/ CH<sub>3</sub>-8.

a)



b)



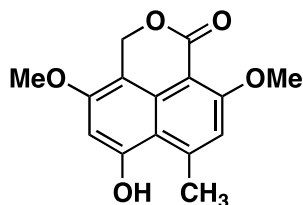
**Figura 29.** Espectro de RMN: a) <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y b) <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **88**.

**Tabla 13.** Datos espectroscópicos de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (**88**) y la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**) en CDCl<sub>3</sub> y DMSO-*d*<sub>6</sub>, respectivamente (<sup>1</sup>H a 500 MHz y <sup>13</sup>C a 125 MHz).

Posición	<b>86</b>				<b>87</b>			
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. (J)	HMBC	NOESY	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. (J)	HMBC	NOESY
1	185.4				156.9			
2	104.1	5.86, <i>s</i>	1, 3, 8, 8a, 10	3-OMe	95.7	6.61, <i>s</i>	1, 3, 4, 8, 8a, 10	1-OMe
3	161.7				159.9			
4	108.5				102.4			
4a	136.6				133.7			
5	105.5				100.8			
6	163.7				162.5			
7	115.2	6.93, <i>s</i>	5, 6, 8, 8a, 9	6-OMe 8-Me	113.4	7.01, <i>s</i>	5, 6, 8, 8a	6-OMe 8-Me
8	152.8				147.1			
8a	118.8				112.8			
9	156.9				160.9			
10	148.2	8.06, <i>s</i>	3, 4, 4a, 9		97.5	6.18, <i>s</i>	4, 4a, 9	10-OMe
1-OMe					56.3	3.83, <i>s</i>	1	
3-OMe	55.8	3.90, <i>s</i>	2, 3, 4	2-H				
6-OMe	56.6	4.10, <i>s</i>	6, 7	7-H	56.8	3.93, <i>s</i>	6	
8-Me	24.9	2.92, <i>d</i> (1.0)	1, 4a, 7, 8, 8a	7-H	25.8	2.83, <i>s</i>	7, 8	1-OMe
10-OMe					55.5	3.31, <i>s</i>	10	
3-OH						10.78	2, 3, 10	2-H, 10-OMe

El producto 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**) se aisló como un sólido amarillo ópticamente inactivo. Su fórmula molecular se estableció como C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> mediante EM-ESI en su modalidad negativa. El espectro en el IR mostró bandas para un éster cíclico (1743 cm<sup>-1</sup>) y para una cetona conjugada (1689 cm<sup>-1</sup>).

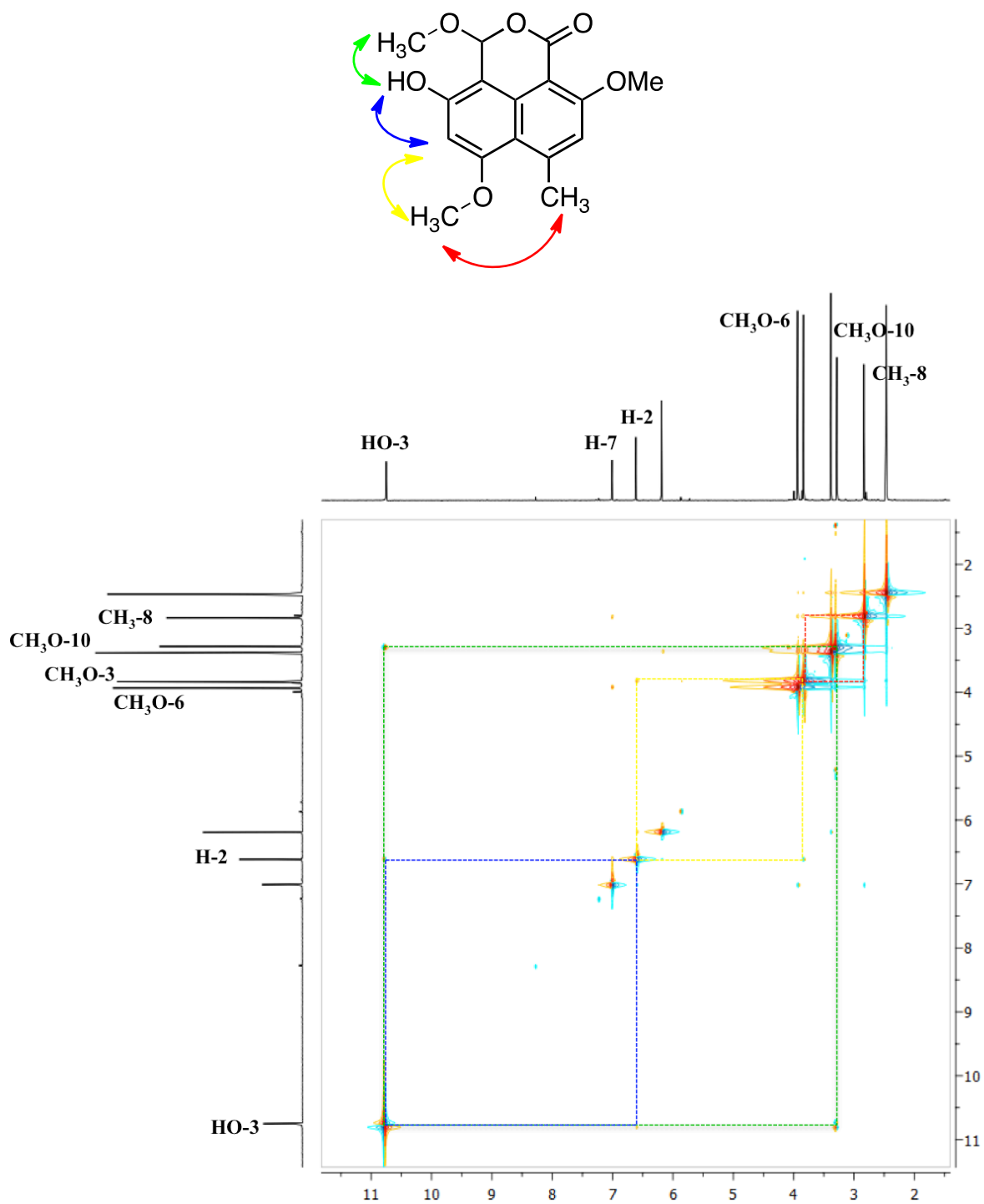
Los espectros de UV y RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de este compuesto, mostraron similitud parcial con el compuesto **84**, sugiriendo de esta manera un núcleo estructural relacionado (Overy *et al.*, 2005). Así, una cuidadosa revisión de la literatura especializada permitió proponer que el producto es un derivado de la lactona del ácido hidroximetil naftalen carboxílico como la corimbiferan lactona D (**90**).



(90)

En congruencia con la propuesta de núcleo base, el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN presentó 15 señales que se asignaron como se indica en la tabla 13 mediante la comparación de los desplazamientos descritos para la corimbiferan lactona D, y los espectros de HSQC y HMBC. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN presentó señales para un grupo hidroxilo en  $\delta_{\text{H}}$  10.78 que se intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ; tres hidrógenos aromáticos en  $\delta_{\text{H}}$  7.01, 6.61. y 6.18; tres grupos metoxilos en  $\delta_{\text{H}}$  3.93, 3.83 y 3.31, los dos primeros unidos a anillos aromáticos, y el tercero a un carbono terciario de naturaleza bencílica; un grupo metilo sobre anillo aromático en  $\delta_{\text{H}}$  2.83. En el espectro HSQC la señal en  $\delta_{\text{H}}$  6.18 correlaciona con la señal en  $\delta_{\text{C}}$  97.5, la cual a su vez muestra una clara correlación con el grupo metoxilo en  $\delta_{\text{H}}$  3.31 en el espectro HMBC, sugiriendo que uno de los hidrógenos del metileno de la corimbiferan lactona D se encuentra sustituido por un metoxilo en el compuesto **89**. De manera adicional, las correlaciones observadas en el espectro HMBC entre C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  160.9) y H-10 ( $\delta_{\text{C}}$  6.18) confirman la posición de este metoxilo en C-10. Entonces el producto **89**, al igual que en el compuesto **90**, solo contiene dos hidrógenos aromáticos. Las señales en ambos espectros del anillo B resultaron idénticas a la de la corimbiferan lactona D. En tanto que las del A resultaron ligeramente diferentes. Esta diferencia resulta de la disposición invertida de los sustituyentes, es decir, en el caso del producto **89** el hidroxilo se encuentra en C-3 y el metoxilo en C-1. Las evidencias que permitieron llegar a esta conclusión fueron las correlaciones NOESY entre  $\text{OCH}_3$ -10 ( $\delta_{\text{H}}$  3.31) con H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  6.18) y OH-3 ( $\delta_{\text{H}}$  10.78);  $\text{OCH}_3$ -1 ( $\delta_{\text{H}}$  3.83) con H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  6.61) y  $\text{CH}_3$ -8 ( $\delta_{\text{H}}$  2.83); y OH-3 ( $\delta_{\text{H}}$  10.78) con H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  6.61) [Figura 30].

Todas estas evidencias en conjunto con el análisis global del cuadro de conectividades observadas en el espectro HMBC permitieron caracterizar al compuesto 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**).

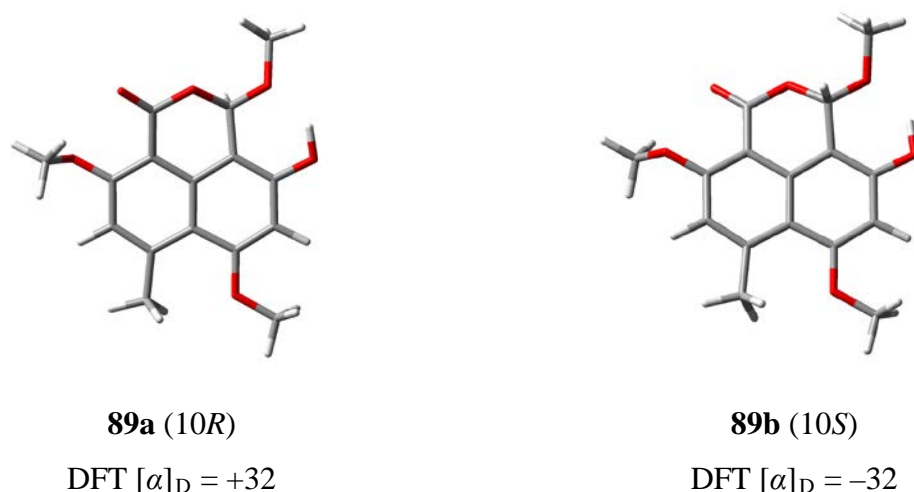


**Figura 30.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  modalidad NOESY de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1H,3H-benzo[de]isocromen-9-ona (**89**) mostrando las correlaciones más importantes.



La carencia de actividad óptica del producto **89** planteó la posibilidad de que éste fuese un artefacto generado por una adición electrofílica del MeOH a la doble ligadura ubicada entre el C-4 y el C-10 del producto **88**. Para comprobar esta hipótesis, el producto natural se trató con MeOH a temperatura ambiente durante 48 horas. Al procesar la mezcla de reacción se encontró que el compuesto **88** se había interconvertido en **89**, proponiendo de esta manera que el producto **89** es un artefacto que se generó durante el proceso de separación de 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (**88**). Esto explica la falta de rotación óptica, ya que durante la generación del artefacto la adición de MeOH tiene lugar por las caras *re* y *si* de la doble ligadura en el compuesto **88**.

Una vez establecida la estructura de **89**, se llevaron a cabo cálculos de modelado molecular para correlacionar la configuración del centro estereogénico (C-10) de los dos posibles enantiómeros (**89a** y **89b**) con el signo de la rotación óptica. Los cálculos se iniciaron con la búsqueda de los conformeros de menor energía para cada enantiómero usando mecánica molecular, seguida de la optimización geométrica para cada uno de los conformeros seleccionados usando DFT a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. Posteriormente, se obtuvieron los valores de rotación óptica teóricos en la línea D-sodio (Tablas A8 y A9) [López-Vallejo *et al.*, 2011]. Los resultados indicaron que el enantiómero **89a** con configuración *R* tiene un valor de  $[\alpha]_D$  positivo, mientras el enantiómero **89b** con configuración *S* muestra un valor  $[\alpha]_D$  teórico negativo (Figura 31).

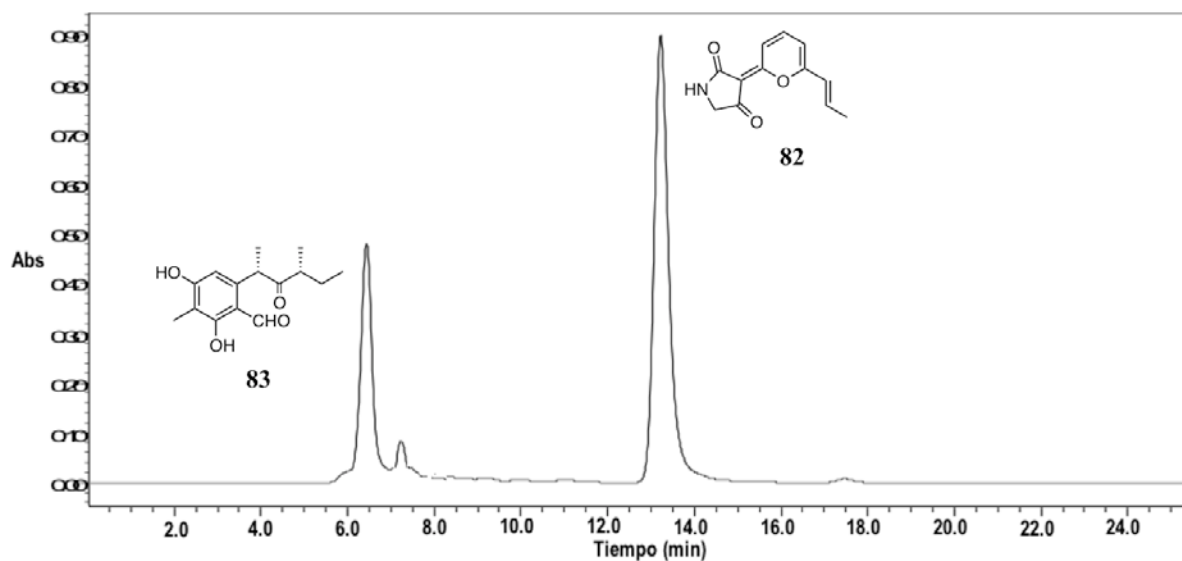


**Figure 31.** Estructuras de mínima energía de los enantiómeros **89a** y **89b** y sus valores de rotación óptica calculados en la línea D-sodio.

#### 4.4 Análisis CLAE de los extractos de MEXU 26343 y *S. minimoides*

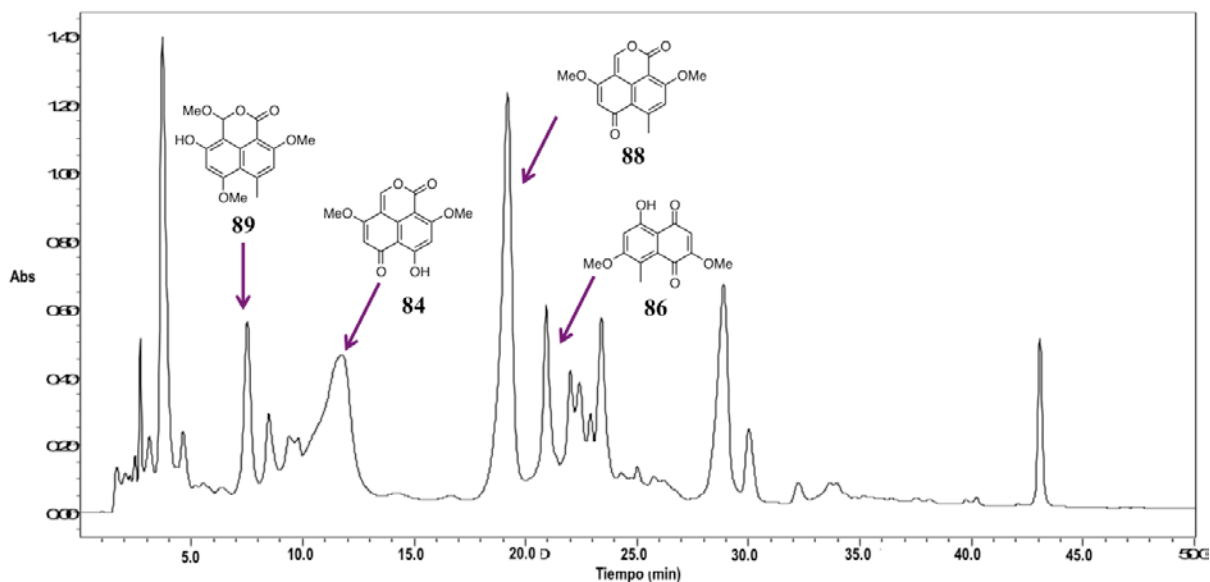
Con la finalidad de analizar la complejidad de los extractos, se procedió a establecer los perfiles cromatográficos por CLAE para las dos especies de estudio. Esta técnica es un método general utilizado en el análisis de diversas matrices biológicas debido a que es relativamente sencilla y versátil, y que permite analizar mezclas de diversa naturaleza química utilizando varios sistemas de detección (detector en el ultravioleta, índice de refracción, detectores de fluorescencia).

Los perfiles cromatográficos para cada uno de los extractos se obtuvieron mediante ensayo y error, utilizando diversas fases estacionarias. En el caso de MEXU 26343 se utilizó una columna cromatográfica fase normal  $\mu$ Porasil ( $3.9 \times 300$  mm,  $10 \mu\text{m}$ ) y Symmetry  $\text{C}_{18}$  ( $3.9 \times 150$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ), así como diferentes mezclas binarias de elución  $\text{CHCl}_3$ -MeOH,  $\text{CH}_3\text{CN}$ - $\text{H}_2\text{O}$ , y en algunos casos acidificadas (ácido fosfórico, ácido acético o ácido tricloroacético). Siguiendo esta estrategia metodológica fue posible establecer el perfil cromatográfico que se ilustra en la **Figura 32 y 33**.



**Figura 32.** Cromatograma de líquidos obtenido a partir del extracto de MEXU 26343. Fase móvil: gradiente  $\text{CHCl}_3$  (A): MeOH (B) [0-5 min, 100% A; 5-25 min, 90% A; 25-30 min, 90% A; 30-32 min, 85% A]; Flujo: 0.6 mL/min; Columna:  $\mu$ Porasil; Detección: 273 nm.

En el primer caso, el perfil cromatográfico del extracto de MEXU 26343 solo muestra dos compuestos mayoritarios, los cuales corresponden a la mezcla isomérica de vermelhotina (**82**) y a 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**), ambos metabolitos secundarios aislados a partir de especies fungicas del orden Pleosporales.



**Figura 33.** Cromatograma de líquidos obtenido a partir del extracto de *S. minimoides*. Fase móvil: gradiente CH<sub>3</sub>CN (A): H<sub>2</sub>O (B) [0-10 min, 30% A; 10-15 min, 60% A; 15-25 min, 60% A; 25-28 min, 100% A]; Flujo: 0.6 mL/min; Columna: Symmetry C18; Detección: 220 nm.

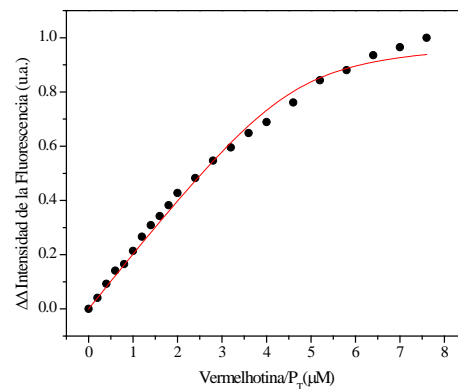
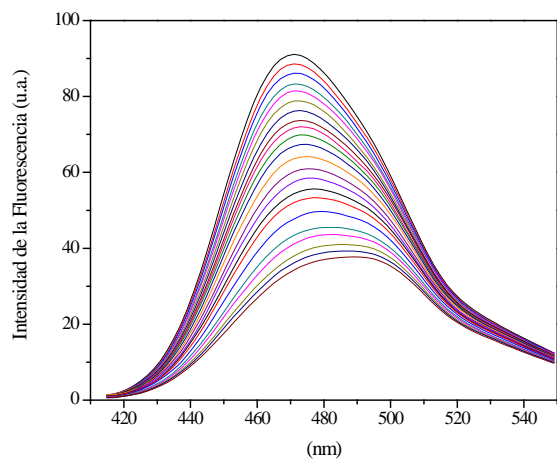
En el segundo caso, el análisis del perfil cromatográfico obtenido del extrato orgánico de *S. minimoides* permitió concluir que es una matriz compleja, y que sólo algunos compuestos lograron aislarse por métodos convencionales de cromatografía. Cabe destacar que ninguno de los tres compuestos conocidos habían sido reportado previamente para la especie en estudio.

#### 4.5 Estudios de apagamiento de la fluorescencia extrínseca mediante el empleo de los biosensores *hCaM M124C-mBBr* y *hCaM V91C-mBBr*

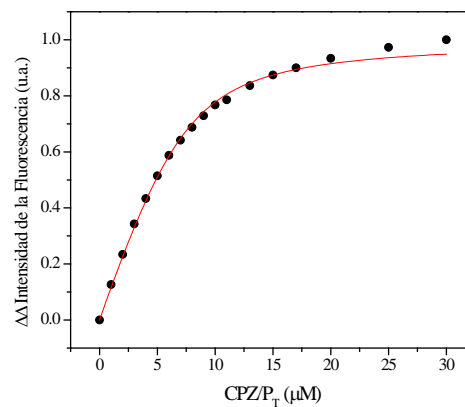
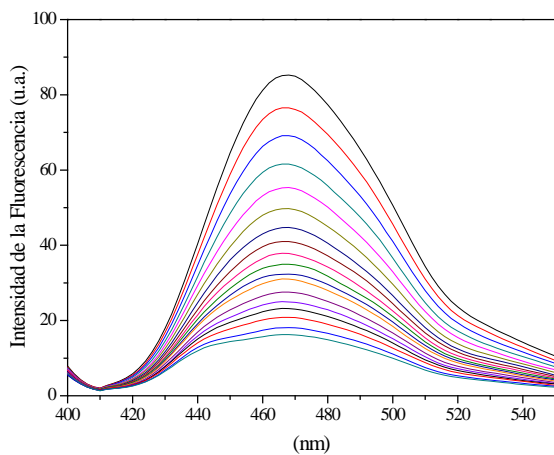
Con la finalidad de determinar si los compuestos obtenidos a partir de las especies fúngicas de estudio MEXU 26343 y *S. minimoides* interactúan con la proteína CaM, se realizaron estudios de apagamiento de la fluorescencia extrínseca. Para la evaluación de cada uno de los compuestos se utilizaron los biosensores *hCaM M124C-mBBr* y *hCaM V91C-mBBr*, descritos en la sección de antecedentes, de tal manera que al titular la proteína marcada con los compuestos se produjo un apagamiento de la fluorescencia debida al cambio conformacional de la misma.

El resultado de la titulación de todos los compuestos aislados de ambas especies, indicó que sólo la *E/Z* vermelhotina (**82**) y la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8 metilnaftoquinona (**86**) obtenidos a partir de los extractos de MEXU 26343 y *S. minimoides*, respectivamente, apagaron de la fluorescencia del biosensor de CaM de una manera dependiente de la concentración. Los espectros de emisión de cada uno de los compuestos se indican en las figuras 34 y 35. De los espectros de emisión obtenidos, se tomaron los valores de los máximos y se graficaron contra la relación  $\text{Compuesto}/\text{Proteína}_{\text{Total}}$ , para generar una gráfica a partir de la cual se calculó la constante de disociación ( $K_d$ ). Los resultados obtenidos demostraron que vermelhotina (**82**) tiene una constante de disociación de 0.25  $\mu\text{M}$ , mientras que la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona de 2.0  $\mu\text{M}$ ; la CPZ ( $K_d = 0.64 \mu\text{M}$ ) fue utilizada como control positivo.

a)

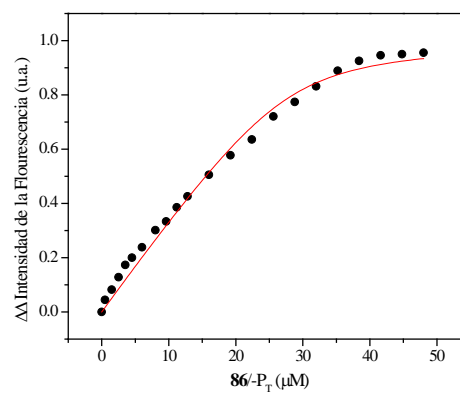
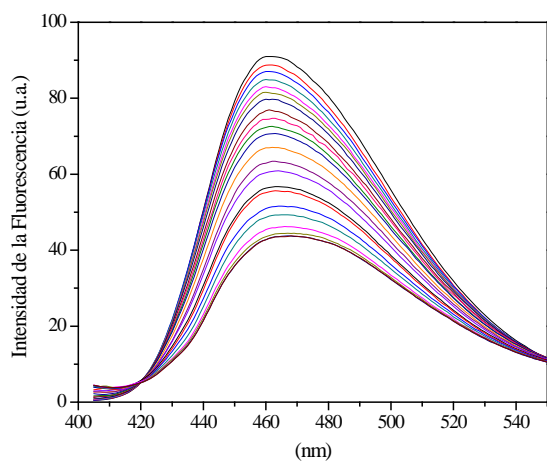


b)

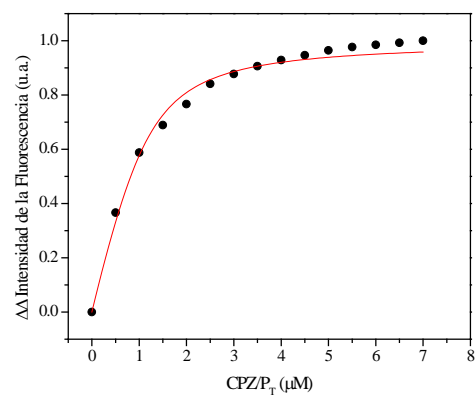
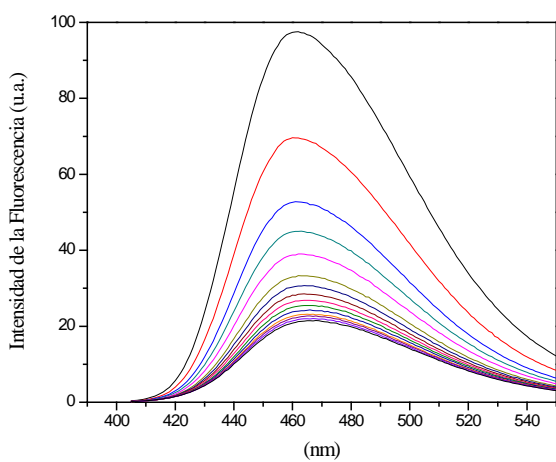


**Figura 34.** Espectro de fluorescencia (izquierda) y curva de titulación (derecha) de *hCaM M124C-mBBR* con: a) *E/Z* vermelhotina (**82**) [0-7.6  $\mu\text{M}$ ] y b) CPZ (0-15  $\mu\text{M}$ ).

a)



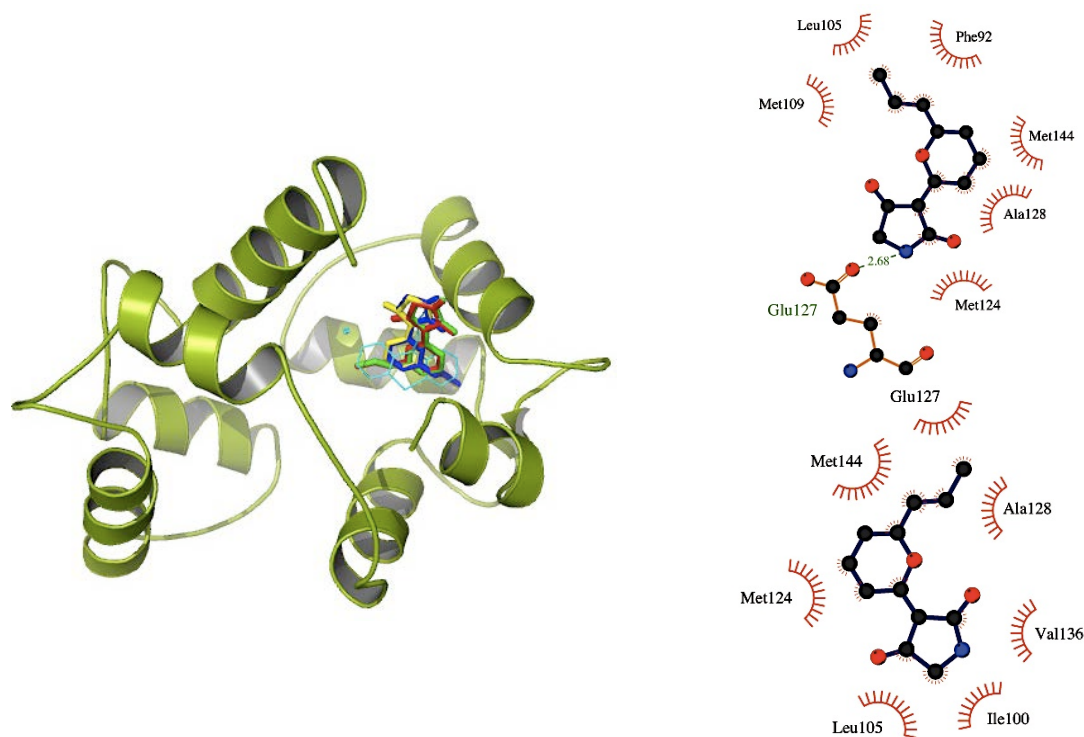
b)



**Figura 35.** Espectro de fluorescencia (izquierda) y curva de titulación (derecha) de *hCaM V91C-mBBr* con: a) compuesto **86** (0-236  $\mu\text{M}$ ) y b) CPZ (0-35  $\mu\text{M}$ ).

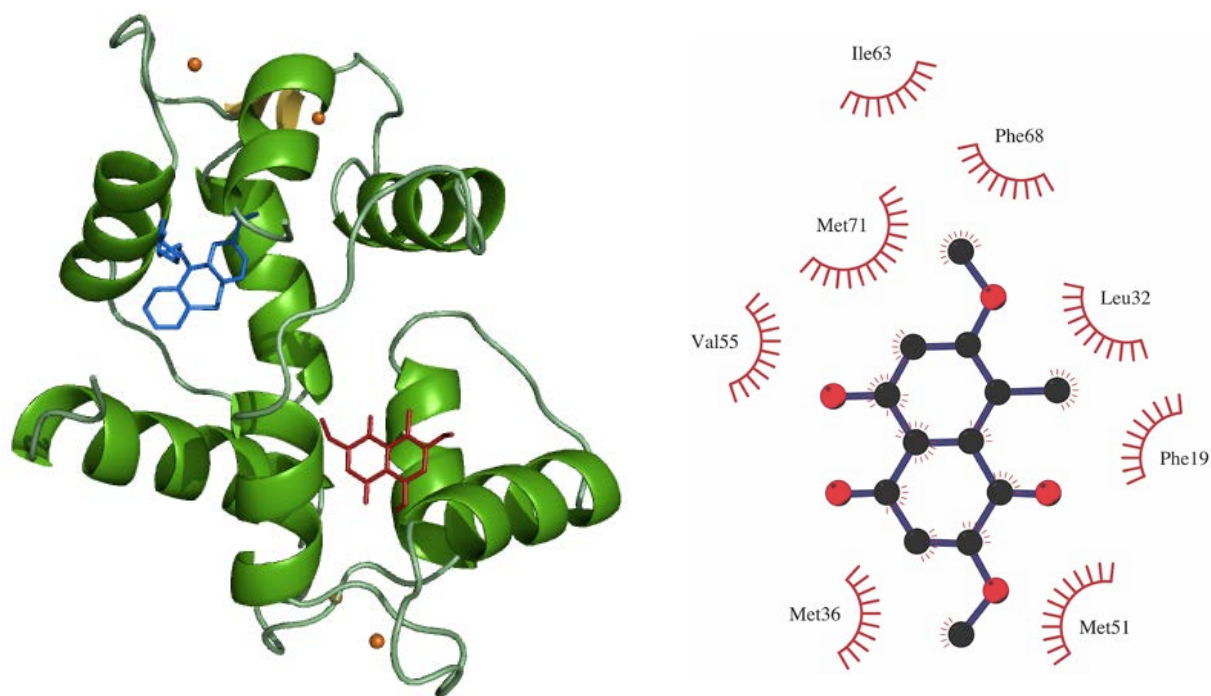
#### 4.6 Estudios de acoplamiento molecular

Para predecir el sitio de unión de los ligantes *E/Z* vermelhotina (**82**) y 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8 metilnaftoquinona (**86**) a la proteína, se realizaron estudios de acoplamiento molecular usando AutoDock 4.2 (Morris *et al.*, 1998; Huey *et al.*, 2007). Éstos estudios iniciaron con la optimización geométrica de las estructuras con DFT a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. Los análisis se llevaron a cabo en toda la proteína (Ca<sup>2+</sup>-CaM-TPZ; PDB 1A29) con la finalidad de determinar la mejor posición, para finalizar con un afinamiento. El estudio indicó que ambos isómeros de vermelhotina se unen a la CaM en el mismo sitio de unión que la TFP, un inhibidor clásico de la proteína. Por un lado, el isómero *Z* muestra interacciones de tipo hidrofóbicas con los aminoácidos Ile100, Leu105, Met124, Ile125, Glu127 y Val136, mientras que el isómero *E*, adicional a la interacciones con los aminoácidos Phe92, Met109, Met124, Glu127, Ala128 y Met 144, forma un puente de hidrogeno entre H-1 y el aminoácido Glu127 (Figura 36).



**Figure 36.** Estructura del complejo CaM-TFP. La figura izquierda muestra la unión de la CaM con la TFP (morado), el isómero *E*-vermelhotina (**82a**) [rojo] y el isómero *Z*-vermelhotina (**82b**) [azul]. La figura de la derecha muestra las interacciones entre los isómeros *E* y *Z* con los aminoácidos de la CaM.

En cuanto al compuesto **86**, el estudio indicó que se une a la proteína en el sitio IV, interaccionando con los aminoácidos Phe19, Met51, Ile52, Ile63, Phe68, Met71 y Met72 (Figura 37). Cabe destacar que dada la interacción del compuesto **86** con los aminoácidos antes descritos, los resultados que se presentaron fueron los obtenidos con el biosensor *hCaM* V91C-*mBBr*, el cual tiene la particularidad de tener el fluoróforo ubicado cerca del sitio IV.



**Figure 37.** Estructura del complejo CaM-TFP. La figura izquierda muestra la unión de **86** con la CaM (sitio IV; rojo), usando la estructura cristalizada del complejo CaM-TFP (sitio I; azul). La figura de la derecha muestra las interacciones entre **86** y los aminoácidos de la CaM.

#### 4.7 Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos derivados de los estudios químicos de las especies MEXU26343 y *S. minimoides*

De acuerdo a la estrategia metodológica planteada en la presente investigación, se efectuaron los ensayos biológicos conducentes a determinar el potencial fitotóxico de los compuestos aislados. De esta manera, se evaluó la actividad fitotóxica de vermelhotina (**82**) y 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**), mediante la determinación de su efecto sobre la germinación y



el crecimiento radicular de cuatro diferentes semillas: *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli*, *Medicago sativa* e *Ipomea purpurea*.

La determinación del efecto de los compuestos **82** y **83** se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección experimental: utilizando como control positivo un producto natural con actividad fitotóxica, la tricolorina, y el herbicida comercial Rival [Glifosato: sal monoamónica de N-(fosfometil)glicina].

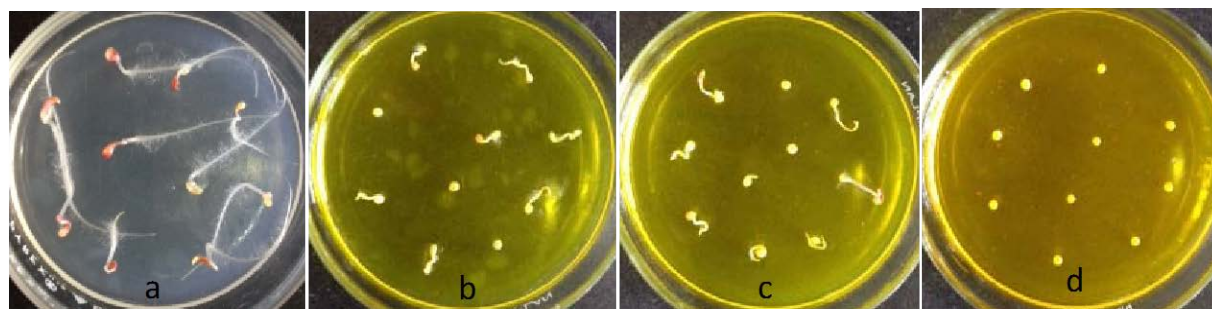
Los resultados obtenidos de este estudio indicaron que ambos compuestos inhibieron de manera significativa la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*, respecto al control positivo Rival® (Figura 39). Los valores de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) del crecimiento radicular se muestra en la tabla 14. Adicionalmente, ambos compuestos afectaron la germinación y el crecimiento radicular de *E. crus-galli*, pero no de una manera significativa respecto al control.

**Tabla 14.** Efecto de los compuestos **82** y **83** sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*, *E. crus-galli*, *M. sativa* e *I. purpurea*.

Compuesto	CI <sub>50</sub> (μM)			
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>	<i>M. sativa</i>	<i>I. purpurea</i>
Vermelhotina ( <b>82</b> )	141.65	49.98	357.81	361.49
Ascosalitoxina ( <b>83</b> )	129.52	112.86	998.99	412.55*
Tricolorina <sup>a</sup>	1.59	2.04	350.37	272.82*
Rival <sup>a</sup>	223.21	12.28	914.32	201.93

IC<sub>50</sub> en mM

<sup>a</sup>Control positivo



**Figura 38.** Efecto de la E/Z vermelhotina (**82**) sobre *A. hypochondriacus*: a) control negativo, b) 50 ppm, c) 100 ppm y d) 500 ppm.

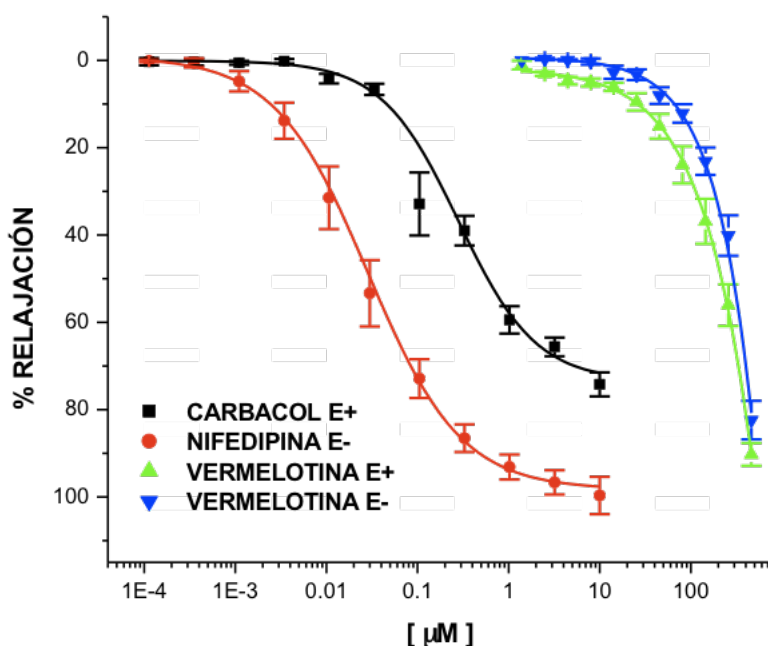
El crecimiento radicular de *I. purpurea* se inhibió en presencia de la *E/Z* vermelhotina (**82**) y Rival<sup>®</sup> de manera similar. En el caso de *M. sativa*, solo la vermelhotina (**82**) inhibió el crecimiento radicular de forma significativa respecto al control comercial, pero con un valor similar de  $CI_{50}$  al de la tricolorina. Estos resultados comprueban el potencial de la *E/Z* vermelhotina (**82**) como agente herbicida.

#### 4.8 Efecto vasorrelajante de la *E/Z* vermelhotina (**82**) en un modelo *in vitro*

El complejo CaM- $Ca^{2+}$  regula la actividad de numerosos elementos estructurales en las células, como el complejo actina-miosina del músculo liso. Las células del músculo liso contienen las proteínas actina, miosina y tropomiosina. La miosina tiene una actividad ATP-asa dependiente de  $Mg^{2+}$  y se activa por la interacción con actina y CaM. La miosina es además la principal proteína de los filamentos gruesos de la célula del músculo liso y se compone de dos subunidades de bajo peso molecular o cadenas ligeras (Voet, 2002; Webb, 2003).

Las interacciones entre actina y miosina en el músculo liso se encuentran reguladas por el ion  $Ca^{2+}$  mediante diferentes mecanismos bioquímicos: al inicio de la contracción, la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular aumenta mediante la activación de canales de  $Ca^{2+}$  membranales y/o mediante la liberación de  $Ca^{2+}$  a partir de depósitos intracelulares. En la regulación de los filamentos gruesos, el  $Ca^{2+}$  se une a la CaM, y el complejo  $Ca^{2+}$ -CaM se une y activa una cinasa de la cadena ligera de miosina, que a su vez fosforila la cadena ligera de la miosina, con la consiguiente estimulación de la actividad ATP-asa del complejo actina-miosina. El enlace a través de puentes generados por la interacción entre la miosina y la actina generan la fuerza contráctil. De lo anterior, se desprende el importante papel que tiene la CaM durante la fase inicial de la contracción. Cuando la concentración de calcio intracelular disminuye y se incrementa la actividad de la miosina fosfatasa de la cadena ligera, el proceso de contracción se revierte automáticamente.

De lo anterior, se desprende la importancia de evaluar el efecto vasorrelajante de la vermelhotina (**82**). Este ensayo se llevó a cabo en anillos de aorta de rata precontraídos con NA; el análisis de los resultados indicaron que este compuesto tiene un efecto sobre la regulación del tono muscular (Figura 39 y Tabla 15).



**Figura 39.** Efecto vasorrelajante de la *E/Z* vermelhotina (**82**) dependiente de la concentración.

**Tabla 15.** Concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) y efecto máximo ( $E_{max}$ ) de la vermelhotina (**82**) en anillos de aorta de rata con y sin endotelio (E+:E-).

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )		$E_{max}$ (%)	
	E+	E-	E+	E-
Carbacol	0.30	-	74	-
Nifedipina	-	0.03	-	99
Vermelhotina ( <b>82</b> )	177	255	90	82

El efecto observado fue dependiente de la concentración de *E/Z* vermelhotina (**82**) e independiente de la presencia de endotelio en los anillos de aorta de rata. Sin embargo, y aunque su efecto fue menos potente que ambos controles positivos utilizados, los valores de potencia del compuesto son significativos (Tabla 15). Al ser independiente de la presencia de endotelio, su mecanismo de acción podría estar relacionado con una posible interacción con canales iónicos (bloqueo de canales de calcio y/o apertura de canales de potasio), aumento o acumulación de segundos mensajeros como GMPc o AMPc (activación guanilato ciclasa o inhibición de fosfodiesterasa), o una posible interacción con el complejo  $Ca^{2+}$ -CaM, principalmente.

#### 4.9 Toxicidad aguda de vermelhotina (82)

Además de las plantas, los microorganismos constituyen una fuente importante de productos naturales con propiedades bioactivas. Por lo tanto, la investigación sobre los hongos se ha acelerado en la última década y más de 20 000 metabolitos bioactivos de origen microbiano se han aislado durante los últimos años (Kronstad, 200; Bérdy, 2005). Los medicamentos existentes de origen fúngico incluyen antibióticos  $\beta$ -lactámicos, griseofulvina, ciclosporina A y lovastatina, por mencionar algunos (Grabley y Sattler, 2003; Mitchell *et al.*, 2008; Stadler y Keller, 2008); de tal modo que su uso obliga a realizar un estudio de toxicidad de los nuevos metabolitos.

La toxicidad aguda de vermelhotina (82) se evaluó para determinar la capacidad de producir efectos adversos tras una sola dosis; estos efectos pueden variar desde una simple irritación cutánea hasta la muerte. La evaluación de su toxicidad por el método de Lorke ofrece una serie de ventajas, incluyendo el hecho de que se realizó en ratones y permitió calcular de manera sencilla la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) utilizando un número pequeño de animales durante un período de tiempo relativamente corto; el tiempo que generalmente se espera para ver si se produce muerte por intoxicación aguda es de 24 horas, sin embargo en ocasiones este efecto puede aparecer mucho más tarde, por lo que se debe de mantener la observación de los animales durante 15 días.

Los resultados de esta prueba indican que vermelhotina (82) no presenta efectos tóxicos agudos para ratones ( $DL_{50} > 5000$  mg/kg) y por lo tanto se pueden considerar seguro para roedores. Por otro lado, durante el periodo de evaluación del compuesto se realizaron observaciones conductuales que permitieron descartar efectos neurotóxicos. De manera adicional, una vez terminado el período de experimentación, los animales fueron sacrificados con la finalidad de realizar un análisis macroscópico de los principales órganos (corazón, pulmón, riñón, bazo, hígado y estómago) para determinar si presentaban alguna anomalía en sus órganos. En todos los casos no se observó daño asociado a la administración del compuesto que sugiriera efectos tóxicos sistémicos. Estos resultados permiten concluir que vermelhotina carece de efectos nocivos para ratones, los cuales sumados al uso que se le quisiera dar, ya sea como herbicida, como agente relajante u otro, permitirían inferir *a priori*

que el compuesto no es tóxico. Sin embargo, de ninguna manera estos resultados sustituyen a los estudios clínicos.

## CONCLUSIONES

**5.1** El estudio químico de la especie novedosa MEXU 26343 permitió la obtención de la mezcla isomérica *E/Z* vermelhotina (**82**) y de un derivado aldehído salicílico novedoso, caracterizado como 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**).

**5.2** Vermelhotina (**82**) se aisló por segunda vez como una mezcla isomérica imposible de separar. El registro de los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  permitió observar dos conjuntos de señales debido a la presencia de ambos isómeros; sin embargo, cuando el espectro de RMN se registró en presencia de TFA-*d* y disolventes próticos se detectó un solo compuesto, una sal de pirilio o un zwitterión más estables que la mezcla isomérica.

**5.3** Se determinó exitosamente la configuración absoluta en los carbonos C-9 y C-11 de la ascosalitoxina (**83**) como *S*, *R*, respectivamente, mediante la comparación de los valores de la rotación óptica experimental y calculada mediante modelado molecular utilizando DFT a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. Esta propuesta se corroboró a través del análisis de las constantes de acoplamiento (teóricas y experimentales) de dos derivados del producto natural. El nivel de cálculo para determinar las constantes de acoplamiento fue el mismo que para determinar la rotación óptica.

**5.4** La investigación química de *S. minimoides*, permitió el aislamiento y la caracterización de tres metabolitos secundarios novedosos: 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**82**), 4-hidroxi-3,6,9-trimetoxi-7-metil-1*H*,3*H*-benzo[de]isocromen-1-ona (**83**) y 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**84**). De manera adicional se aislaron otros tres metabolitos conocidos: la corimbiferona (**85**), la ziganeína (**86**) y el brocaenol B (**87**).

**5.5** La transformación de 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**82**) 4-hidroxi-3,6,9-trimetoxi-7-metil-1*H*,3*H*-benzo[de]isocromen-1-ona (**83**) por tratamiento con MeOH, permitió proponer que **83** es un artefacto formado durante el fraccionamiento primario del extracto.

**5.6** La interacción de **80** y **83** con la proteína CaM se determinó mediante el ensayo de apagamiento de la fluorescencia extrínseca. Estos compuestos provocaron un apagamiento de la fluorescencia del biosensor *hCaM M124C-mBBr* de manera dependiente de la concentración. Cabe destacar que la actividad de vermelhotina (**82**;  $K_d = 0.25 \mu\text{M}$ ) es comparable a la reportada para la clorpromazina ( $0.64 \mu\text{M}$ ), un inhibidor clásico de la CaM.

**5.7** El análisis de acoplamiento molecular de los dos ligantes de CaM obtenidos en este estudio reveló que: el compuesto **80** se une en el sitio I a diferencia del compuesto **83** que se une el sitio IV. Es estos sitios se unen los inhibidores clásicos de la proteína.

**5.8** El estudio del potencial fitotóxico de todos los metabolitos aislados utilizando ensayos de germinación y crecimiento radicular de cuatro semillas, permitió detectar compuestos más activos que el herbicida comercial Rival. Vermelhotina (**80**) y 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**81**), ambos aislados de MEXU 26343, inhibieron no sólo el crecimiento radicular sino también la germinación de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*.

**5.9** Vermelhotina (**82**) tiene efecto relajante en anillos de aorta de rata precontraídos con NA de manera dependiente de la concentración e independiente de la presencia de endotelio.

**5.10** Vermelhotina resultó ser seguro para ratones hasta la dosis de 5000 mg/kg en el ensayo de toxicidad aguda.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H.K., Duke, S.O., Merrill Jr., A.H., Wang, E., Shier, W.T. 1997. Phytotoxicity of australifungin, AAL-toxins and fumonisin B<sub>1</sub> to *Lemna pausicostata*. *Phytochemistry*, **47**: 1509–1514.
- Abe, Y., Saito, S., Hori, M., Ozaki, H., Fusetani, N., Karaki, H. 1997. Stelletamide-A, a novel inhibitor of calmodulin, isolated from a marine sponge. *British Journal of Pharmacology*, **121**: 1309–1314.
- Allen, M.W., Urbauer, R.J., Johnson, C.K. 2004. Single-molecule assays of calmodulin target binding detected with a calmodulin energy-transfer construct. *Analytical Chemistry*, **76**: 3630–3637.
- Asakawa, K., Kondo, K., Tori, M., Hashimoto, T., Ogawa, S. 1991. Prenyl bibenzyls from the liverwort *Radula kojana*. *Phytochemistry*, **30**: 219–234.
- Au, T.K. & Leung, P.C. 1998. Identification of the binding and inhibition sites in the calmodulin molecule for ophiobolin A by site-directed mutagenesis. *Plant Physiology*, **118**: 965–973.
- Barros, F.A.P. & Rodrigues-Filho, E. 2005. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**: 257–268.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *The Journal of Antibiotics*, **58**: 1–26.
- Bergstrom, J.D., Kurtz, M.M., Rew, D.J. 1993. Zaragozaic acids: a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**: 80–84.
- Bhattacharyya, J., Batista, J.S., Almeida, R.N. 1995. Dioclein, a flavanone from the roots of *Dioclea grandiflora*. *Phytochemistry*, **38**: 277–278.
- Black, D.J., Tran, Q.K., Persechini, A. 2004. Monitoring the total available calmodulin concentration in intact cells over the physiological range in free Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium*, **35**: 415–425.
- Bouche, N., Yellin, A., Snedden, W.A. 2005. Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology*, **56**: 435–466.
- Brady, S.F., Wagenaar, M.M., Singh, M.P., Janso, J.E., Clardy, J. 2000. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. *Organic Letters*, **2**: 4043–4046.
- Royles, B. 1995. Naturally occurring tetramic acids: Structure, isolation, and synthesis. *Chemical Reviews*, **95**: 1981–2001.
- Bugni, T.S., Bernan, V.S., Greenstein, M., Janso, J.E., Maiese, W.M., Mayne, C.L., Ireland, C.M. 2002. Brocaenols A-C: Novel polyketides from a marine-derived *Penicillium brocae*. *Journal of Organic Chemistry*, **68**: 2014–2017.
- Cao, L., Huang, J., Li, J. 2007. Fermentation conditions of *Sinopodophyllum hexandrum* endophytic fungus on production of podophyllotoxin. *Food and Fermentation Industries*, **33**: 28–32.
- Cerda-García-Rojas, C. & Pereda-Miranda, R. 1999. Programa FRACMOL para el cálculo de fracciones molares. Departamento de Química, CINVESTAV-IPN; Facultad de Química, UNAM, México.



- Chakravarthi, B.V.S.K., Das, P., Surendranath, K., Karande, A.A., Jayabaskaran, C. 2008. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *Journal of Biosciences*, **33**: 259–267.
- Cheng, L., Ma, Q., Tao, G., Tao, W. 2007. Systemic identification of a paclitaxel-producing endophytic fungus. *Industrial Microbiology*, **37**: 23–30.
- Chin, D. & Means, A.R. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology*, **10**: 322–328.
- Chomcheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Kengtong, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P. 2009. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. *Phytochemistry*, **70**: 407–413.
- Chou, J.J., Li, S., Klee, C.B., Bax, A. 2001. Solution structure of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains. *Nature Structure Biology*, **8**: 990–997.
- Clapp-Shapiro, W.H., Burgess, B.W., Giacobbe, R.A., Harris, G.H., Mandala, S., Polishook, J., Rattray, M., Thornton, R.A., Zink, D.L., Cabello, A., Diez, M.T., Martin, I., Pelaez, F. Antifungal agent from *Sporormiella minimoides*. U.S. Patent 5,801,172, September, 1998.
- Craven, C.J., Whitehead, B., Jones, S.K.A., Thulin, E., Blackburn, G.M., Waltho, J.P., 1996. Complexes formed between Calmodulin and the antagonists J-8 and TFP in solution. *Biochemistry*, **35**: 10287–10299.
- Du, J., Szabo, S.T., Gray, N.A., Manji, H.K., 2004. Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, **7**: 243–248.
- Evidente, A., Capasso, R., Vurro, M., Boltalico, A. 1993. Ascosalitoxin, a phytotoxic trisubstituted salicylic aldehyde from *Ascochyta pisi*. *Phytochemistry*, **34**: 995–998.
- 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.
- Eyberger, A.L., Dondapati, R., Porter, J.R. 2006. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products*, **69**: 1121–1124.
- Fatima, N., Tapondjou, L.A., Lontsi, D., Sondengam, B.L., Atta-Ur-Rahman, Choudhary, M.I. 2002. Quinovic acid glycosides from *Mitragyna stipulosa*-first examples of natural inhibitors of snake venom phosphodiesterase I. *Natural Product Letters*, **16**: 389–393.
- Figueroa, M., González, M.C., Rodríguez-Sotres, R., Sosa-Peinado, A., González-Andrade, M., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R. 2009. Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**: 2167–2174.
- Gabdoulline, R.R. & Wade, R.C. 2002. Biomolecular diffusional association. *Current Opinion in Structural Biology*, **12**: 204–213.
- Gangadevi, V., Murugan, M., Muthumary, J. 2008. Taxol derermination from *Pestalotiopsis pauciseta*, a fungal endophyte of a medicinal plant. *Chinese Journal of Biotechnology*, **24**: 1433–1438.
- Gangadevi, V., Muthumary, J. 2009. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **52**: 9–15.

- Gangopadhyay, J.P., Grabarek, Z., and Ikemoto, N. 2004 Fluorescence probe study of Ca<sup>2+</sup>-dependent interactions of calmodulin with calmodulin-binding peptides of the ryanodine receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **323**: 760–768.
- Goncalves, R.L., Lugnier, C., Keravis, T., Lopes, M.J., Fantini, F.A., Schmitt, M., Cortes, S.F., Lemos, V.S. 2009. The flavonoid dioclein is a selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 1 (PDE1) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) vasorelaxant in human vascular tissue. *European Journal of Pharmacology*, **620**: 78–83.
- Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., Oltra-Noguera, D., Merino, V., Tökési, N., Ovádi, J., Bermejo, M. 2009. Unique pharmacology of KAR-2, a potential anti-cancer agent: Absorption modelling and selective mitotic spindle targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **36**: 11–19.
- González-Andrade, M., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R, Mata, R., Sosa-Peinado, A. 2009. An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein. *Analytical Biochemistry*, **387**: 64–70.
- González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Sosa-Peinado, A., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R, Mata, R. 2011. Development of the fluorescent biosensor *h*Calmodulin (*h*CaM)L39C-*monobromobimane* (*mBB*r)/V91C-*mBB*r, a novel tool for discovering new Calmodulin inhibitors and detecting calcium. *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**: 3875–3884.
- Grabley, S. & Sattler, I. 2003. Natural products for lead identification: nature is a valuable resource for providing tools. In: Hillisch A, Hilgenfeld A (eds), *Modern Methods of Drug Discovery*. Birkhauser Verlag, Switzerland, 87–107.
- Guerra, A.P., Vera, V.J., Rojas, M.O., Wasserman, M. 2001. Detección y expresión de una proteína de unión a calmodulina en *Plasmodium falciparum*. *Biomédica*, **21**: 41–52.
- Guo, B., Li, H., Zhang, L. 1998. Isolation of the fungus producing vinblastine. *Journal of Yunnan University* (Natural Science Edition), **20**: 214–215.
- Guo, S., Jiang, B., Su, Y., Liu, S., Zhang, L. 2004. Podophyllotoxin and its analogues from the endophytic fungi derivatived from *Dysosma veitchii*. *Biotechnology*, **14**: 55–57.
- Guo, B.H., Wang, Y.C., Zhou, X.W., Hu, K., Tan, F., Miao, Z.Q., Tang, K.X. 2006. An endophytic taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *African Journal of Biotechnology*, **5**: 875–877.
- Han, Y.N., Kim, G.Y., Hwang, K.H., Han, B.H. 1993. Binding of sanjoinine-A (frangufoline) to calmodulin. *Archives of Pharmacal Research*, **16**: 289–294.
- Han, Y.N., Hwang, K.H., Han, B.H. 2005. Inhibition of calmodulin-dependent protein kinase II by cyclic and linear peptide alkaloids from *Zizyphus* species. *Archives of Pharmacal Research* **28**: 159–163.
- Harmat, V., Bocskei, Z., Naray-Szabo, G., Bata, I., Csutor, A.S., Hermeicz, I., Aranyi, P., Szabo, B., Liliom, K., Vertessy, B.G., Ovadi, J. 2000. A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies. *Journal of Molecular Biology*, **297**: 747–755.
- Harper, J.K., Arif, A.M., Ford, E.J., Strobel, G.A., Porco, J.A., Tomer, D.P., O'Neill, K.L., Grant, D. M. 2003. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*, **59**: 2471–2476.

- Harris, G.H., Dufresne, C.; Joshua, H., Koch, L.A., Zink, D.L., Salmon, P.M., Goklen, K.E., Kurtz, M.M., Rew, D.J., Bergstrom, J.D., Wilson, K.E. 1995. Isolation, Structure Determination and Squalene Synthase Activity of L-731,120 and L-731,128, Alkyl Citrate Analogs of Zaragozic Acids A and B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **5**: 2403–2408.
- He, J., Lion, U., Sattler, I., Gollmick, F.A., Grabley, S., Cai, J., Meiners, M., Schunke, H., Shaumann, K., Dechert, U., Krohn, M. 2005. Diastereomeric Quinolinone Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium janczewskii*. *Journal of Natural Products*, **68**:1397–1399.
- Hegemann, L., van Rooijen, L.A., Traber, J., Schmidt, B.H. 1991. Polymyxin B is a selective and potent antagonist of calmodulin. *European Journal of Pharmacology*, **207**: 17–22.
- Hensens, O.D., Ondeyka, J.G., Dombrowski, A.W., Ostlind, D.A., Zink, D.L. 1999. Isolation and structure of nodulisporic acid A1 and A2, novel insecticides from a *Nodulisporium* sp. *Tetrahedron Letters*, **40**: 5455–5458.
- Hiort, J., Maksimenka, K., Reichart, M., Peroviae-Ottstadt, S., Lin, W.H., Wray, V., Steube, K., Schaumann, K., Weber, H., Proksch, P., Ebel, R., Müller, W.E.G., Bringmann, G. 2004. New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, **67**: 1532–1543.
- Hoff, H., Drautz, H., Fiedler, H.P., Zahner, H., Schultz, J.E., Keller-Schierlein, W., Philipps, S., Ritzau, M., Zeeck, A. 1992. Metabolic products of microorganisms. 261. Obscurolides, a novel class of phosphodiesterase inhibitors from streptomyces. I. Production, isolation, structural elucidation and biological activity of obscurolides A1 to A4. *Journal of Antibiotics*, **45**: 1096–107.
- Horikawa, N., Suzuki, T., Uchiumi, T., Minamimura, T., Tsukada, K., Takeguchi, N., Sakai, H., 2005. Cyclic AMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion induced by thromboxane A2 in isolated human colon. *Journal of Physiology*, **562**: 885–897.
- Hormazahal, E., Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L., Rodriguez, J., Theoduloz, C.Z. 2005. Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea* (Bonord.) Hohn, an Endophytic Fungus of *Pilgerodendron uviferum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **60 C**: 11–21.
- Hosoe, T., Fukushima, K., Takizawa, K., Itabashi, T., Yoza, K., Kawai, K. 2006. A new pyrrolidine-2,4-dione derivative, vermelhotin, isolated from unidentified fungus IFM 52672. *Heterocycles*, **68**: 1949–1953.
- Hernández-Romero, Y., Rojas, J.I., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R. 2004. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *Journal of Natural Products*, **67**: 160–167.
- Horváth, I., Harmat, V., Perczel, A., Pálfi, V., Nyitray, L., Nagy, A., Hlavanda, E., Náráy-Szabó, G., Ovádi, J. 2005. The structure of the complex of Calmodulin with KAR-2. A novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**: 8266–8274.
- Hu, K., Tan, F., Tang, K., Zhu, S., Wang, W. 2006. Isolation and screening of endophytic fungi synthesizing taxol from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Journal of Southwest China Normal University* (Natural Science Edition), **31**: 134–137.
- Hwang, K.H., Han, Y.N., Han, B.H. 2001. Inhibition of calmodulin-dependent calcium-ATPase and phosphodiesterase by various cyclopeptides and peptide alkaloids from the *Zizyphus* species. *Archives of Pharmacal Research*, **24**: 202–206.

- Ichimura, M., Eiki, R., Osawa, K., Nakanishi, S., Kase, H. 1996. KS-505a, an isoform-selective inhibitor of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemical Journal*, **316**: 311–316.
- Imre, S., Öztunç, A., Büyüktimkin, N. 1974. Ziganein und ziganein-1-methyläther: zwei neue anthrachinone aus *Digitalis schischkinii*. *Phytochemical Reports*, **13**: 681–682.
- Jaren, O.R., Harmon, S., Chen, A.F., Shea, M.A. 2000. Paramecium calmodulin mutants defective in ion channel regulation can bind calcium and undergo calcium-induced conformational switching. *Biochemistry*, **39**: 6881–6890.
- Kase, H., Iwahashi, K., Matsuda, Y. 1986. K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *Journal of Antibiotics*, **39**: 1059–1065.
- Kasetrathat, C., Ngamrojanavanich, N., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P. 2008. Cytotoxic and antiplasmodial substances from marine-derived fungi, *Nodulisporium* sp. and CRI247-01. *Phytochemistry*, **69**: 2621–2626.
- Kim, S.U., Strobel, G.A., Ford, E. 1999. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* and *Taxus cuspidata* in Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**: 97–99.
- Kim, H.U., Kim, T.Y., Lee, S.Y. 2008 Metabolic flux analysis and metabolic engineering of microorganisms. *Molecular BioSystems*, **4**: 113–120.
- Kinoshita, K., Sasaki, T., Awata, M., Takada, M., Yaginuma, S. 1997. Structure of sporostatin (M5032), an inhibitor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. *Journal of Antibiotics*, **50**: 961–964.
- Kobayashi, J., Cheng, J., Ohta, T., Nozoe, S., Ohizumi, Y., Sasaki, T. 1990. Eudistomidins B, C, and D: Novel antileukemic alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*. *Journal of Organic Chemistry*, **55**: 3666–3670.
- Kortvely, E. & Gulya, K. 2004. Calmodulin, and various ways to regulate its activity. *Life Sciences*, **74**: 1065–1070.
- Kour, A., Shawl, A.S., Rehman, S., Sultan, P., Qazi, P.H., Suden, P., Khajuria, R.K., Verma, V. 2008. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**: 1115–1121.
- Krohn, K., Flörke, U., John, M., Root, N., Steingröver, K., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S., Simonyi, M., Zsila, F. 2001. Biologically active metabolites from fungi. Part 16: New preussomerins J, K and L from an endophytic fungus: structure elucidation, crystal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculations. *Tetrahedron*, **57**: 4343–4348.
- Kronstad, J.W. 2000. Fungal Pathology. Springer, 404.
- Kubo, I., Matsumoto, A., Kozuka, M., Wood, W.F. 1985. Calmodulin inhibitors from the bitter mushroom *Naematoloma fasciculare* (Fr.) Karst. (Strophariaceae) and absolute configuration of fasciculols. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **33**: 3821–3825.
- Kumaran, R.S., Muthumary, J., Hur, B.K. 2008. Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the Angiosperm *Citrus medica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **106**: 103–106.

- Kumaran, R.S., Muthumary, J., Kim, E.K., Hur, B.K. 2009. Production of taxol from *Phyllosticta dioscoreae*, a leaf spot fungus isolated from *Hibiscus rosa-sinensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **14**: 76–83.
- Kusari, S., Zühlke, S., Spitteller, M. 2009. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *Journal of Natural Products*, **72**: 2–7.
- Ladbury, J.E. and Williams, M.A. 2004. The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, **14**: 562–569.
- Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., Tipton, C.L. 1984. Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, **259**: 2742–2747.
- Li, J.Y., Sidhu, R.S., Ford, E.J., Long, D.M., Hess, W.M., Strobel, G.A. 1998. The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **20**: 259–264.
- Li, L., Wei, D.Q., Wang, J.F., Chou, K.C. 2007. Computational studies of the binding mechanism of calmodulin with chrysin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **358**: 1102–1107.
- Li, C.T., Li, Y., Wang, Q.J., Sung, C.K. 2008. Taxol production by *Fusarium arthrosporioides* isolated from yew, *Taxus cuspidata*. *Journal of Medicinal Chemistry*, **27**: 454–458.
- Li, J.Y. & Strobel, G.A. 2001. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*, **57**: 261–265.
- Liang-Dong, G., Guo-Rui, H., Yu, W. 2008. Seasonal and Tissue Age Influences on Endophytic Fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**: 997–1003.
- Liliom, K., Orosz, F., Horváth, L., Ovádi, J. 1991. Quantitative evaluation of indirect ELISA effect of calmodulin antagonists on antibody binding to calmodulin. *Journal of Immunological Methods*, **143**: 119–125.
- Liu, K., Ding, X., Deng, B., Chen, W. 2009. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*, **36**: 1171–1177.
- Lo, Y.C., Teng, C.M., Chen, C.F., Chen, C.C., Hong, C.Y. 1994. Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, **47**: 549–553.
- Lorke, D. 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, **54**: 275–287.
- Lu, L., He, J., Yu, X., Li, G., Zhang, X. 2006. Studies on isolation and identification of endophytic fungi strain SC13 from harmaceutical plant *Sabina vulgaris* ant. and metabolites. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, **15**: 85–89.
- Macías, M., Ulloa, M., Gamboa, A., Mata, R. 2000. Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Journal of Natural Products*, **63**: 757–761.
- Macías, M., Gamboa, A., Ulloa, M., Toscano, R.A., Mata, R. 2001. Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry*, **58**: 751–758.
- Mandala, S.M., Thornton, R.A. Frommer, B.R., Curotto, J.E., Rozdilsky, W., Kurtz, M.B., Giacobbe, R.A., Bills, G.F., Cabello, M.A., Martín, I., Peláez, F., Harris, G.H. 1994. Discovery of Australifungin, a Novel Inhibitor of Sphinganine TV-Acyltransferase from *Sporormiella australis*

- Producing Organism, Fermentation, Isolation, and Biological Activity. *Journal of Antibiotics*, **48**: 349–356.
- Martínez-Luis, S., González, M.C., Ulloa, M., Mata, R. 2005. Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry*, **66**: 1012–1016.
  - Martínez-Luis, S., Pérez-Vásquez, A., Mata, R. 2007. Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry*, **68**: 1882–1903.
  - Mata, R., Gamboa, A., Macias, M., Santillan, S., Ulloa, M., Gonzalez, M.C. 2003. Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulin-dependent activity of the enzymes cAMP phosphodiesterase and NAD-kinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 4559–4562.
  - Mata, R., Bye, R., Linares, E., Macias, M., Rivero-Cruz, I., Perez, O., Timmermann, B.N. 2003. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **64**: 285–291.
  - Mata, R., Figueroa, M., Rivero-Cruz, I., González-Andrade, M. 2011. Recent advances in the search of novel calmodulin inhibitors from selected mexican plants and fungi. In: Bioactive compounds from natural sources, Corrado Tringali (Eds) CRC Press, Florida, 451–496.
  - Matsuda, Y. & Kase, H. 1987. KS-619-1, a new inhibitor of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptomyces californicus*. *Journal of Antibiotics*, **40**: 1104–1110.
  - Matsuda, Y., Asano, K., Kawamoto, I., Kase, H. 1987. K-259-2, a new inhibitor of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Micromonospora olivasterospora*. *Journal of Antibiotics*, **40**: 1092–1100.
  - Matsuda, Y., Asano, K., Kawamoto, I., Yasuzawa, T., Shirahata, K., Sano, H., Kase, H. 1988. K-251 compounds, inhibitors of Ca<sup>2+</sup> and Calmodulin-dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from *Streptoverticillium album*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**: 3211–3213.
  - Matsuda, Y., Nakanishi, S., Nagasawa, K., Kase, H. 1990. Inhibition by new anthraquinone compounds, K-259-2 and KS-619-1, of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemical Pharmacology*, **39**: 841–849.
  - Miao, Z., Wang, Y., Yu, X., Guo, B., Tang, K. 2009. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **45**: 81–86.
  - Min, C. & Wang, X. 2009. Isolation and identification of the 10-hydroxycamptothecin-producing endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* Decne. *Acta Botanica Boreali- Occidentalia Sinica*, **29**: 0614–0617.
  - Mitchell, A.M., Strobel, G.A., Hess, W.M., Vargas, P.N., Ezra, D. 2008. *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Anans ananassoides* in the Bolivian Amazon. *Fungal Diversity* **31**: 37–43.
  - Molnar, A., Liliom, K., Orosz, F., Vertessy, B.G., Ovadi, J., 1995. Anticalmodulin potency of indole alkaloids in in-vitro systems. *European Journal of Pharmacology*, **291**: 73–82.
  - Mudur, S.V., Gloer, J.B., Wicklow, D.T. 2006. Sporminarins A and B: Antifungal Metabolites from a Fungicolous Isolate of *Sporormiella minimoides*. *Journal of Antibiotics*, **59**: 500–506.
  - Nakanishi, S., Matsuda, Y., Iwahashi, K., Kase, H. 1986. K-252b, c and d, potent inhibitors of protein kinase C from microbial origin. *Journal of Antibiotics*, **39**: 1066–1071.
  - Nakanishi, S., Katsuhiko, A., Kawamoto, I., Kase, H. 1990. KS-501 and KS-502, a new inhibitors of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent cyclicnucleotide phosphodiesterase from *Sporothrix* sp. *Journal of Antibiotics*, **42**: 1049–1055.

- Nwankwoala, R.N.P. & William, L. 1988. Inhibition of  $\alpha$ -tocopherol- and calcium calmodulin-stimulated phosphodiesterase activity in vitro by anthracyclines. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **15**: 805–814.
- Odom, A., Del Poeta-Pala, I., Srinivasan, S., Vig, P.V.S., Desaiyah, D. 1999. Modulation of Calmodulin and protein kinase C activities by *Penicillium* mycotoxins. *International Journal of Toxicology*, **18**: 91–96.
- Okuyama, T., Takata, M., Takayasu, J., Hasegawa, T., Tokuda, H., Nishino, A., Nishino, H., Iwashima, A. 1991. Anti-tumor-promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*. *Planta Medica*, **57**: 242–246.
- Orosz, F., Vértessy, B. G., Salerno, C., Crifo, C., Capuozzo, E., Ovádi, J. 1997. The interaction of a new anti-tumour drug, KAR-2 with calmodulin. *British Journal of Pharmacology*, **121**: 955–962.
- Osawa, M., Swindells, M.B., Tanikawa, J., Tanaka, T., Mase, T., Furuya, T., Ikura, M. 1998. Solution structure of Calmodulin-W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition. *Journal of Molecular Biology*, **276**: 165–176.
- Ovadi, J. 1989. Effects of drugs on calmodulin-mediated enzymatic actions. In: Jucker, E. (Ed.), In: Progress in Drug Research, Birkhäuser Verlag, Basel, **33**: 353–395.
- Overy, D.P. & Blunt, J.W. 2004. Corymbiferan Lactones from *Penicillium hordei*: Stimulation of Novel Phenolic Metabolites Using Plant Tissue Media. *Journal of Natural Products*, **67**: 1850–1853.
- Pala, I., Srinivasan, A., Vig, P., Desaiyah, D. 1999. Modulation of calmodulin and protein kinase C activities by *Penicillium* mycotoxins. *International Journal of Toxicology*, **18**: 91–96.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial ecology of leaves, Andrews J, Hirano S (Eds). Springer, New York Berlin Heidelberg, 179–197.
- Pompenga, P., Sommitb, D., Sriubolmasb, N., Ngamrojanavanichc, N., Matsubarad, K., Pudhom, K. 2013. Antiangiogenic effects of anthranoids from *Alternaria* sp., an endophytic fungus in a Thai medicinal plant *Erythrina variegata*. *Phytomedicine*, *In press*
- Puri, S.C., Verma, V., Amna, T., Qazi, G.N., Spitteller, M. 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *Journal of Natural Products*, **68**: 1717–1719.
- Puri, S.C., Nazir, A., Chawla, R., Arora, R., Riyaz-Ul-Hasan, S., Amna, T., Ahmed, B., Verma, V., Singh, S., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Sharma, R.K., Qazi, G.N. 2006. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin ligands. *Journal of Biotechnology*, **122**: 494–510.
- Racioppi, L. & Means, A.R. 2008. Calcium/calmodulin-dependent kinase IV in immune and inflammatory responses: novel routes for an ancient traveller. *Trends Immunology*, **29**: 600–607.
- Ragone, M.I., Sella, M., Conforti, P., Volonte, M.G., Consolini, A.E. 2007. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedron) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**: 258–266.
- Rehman, S., Shawl, A.S., Kour, A., Andrabi, R., Sudan, P., Sultan, P., Verma, V., Qazi, G.N. 2008. An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **44**: 203–209.
- Reyes-Ramírez, A., Leyte-Lugo, M., Figueroa, M., Serrano-Alba, T., González-Andrade, M., Mata, R. 2011. Synthesis, biological evaluation, and docking studies of giganol analogs as calmodulin inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46**: 2699–2708

- Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R. 2007. Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry*, **68**: 1147–1155.
- Ritzau, M., Philipps, S., Zeeck, A., Hoff, H., Zahner, H. 1993. Metabolic products of microorganisms. 268. Obscurolides, a novel class of phosphodiesterase inhibitors from streptomyces. II. Minor components belonging to the obscurolide B to D series. *Journal of Antibiotics*, **46**: 1625–1628.
- Rojas, S., Acevedo, L., Macias, M., Toscano, R.A., Bye, R., Timmermann, B., Mata, R. 2003. Calmodulin inhibitors from *Leucophyllum ambiguum*. *Journal of Natural Products*, **66**: 221–224.
- Saleem, M., Tousif, M. I., Riaz, N., Ahmed, I., Schulz, B., Ashraf, M., Nasar, R., Pescitelli, G., Hussain, H., Jabbar, A., Shafiq, N., Krohn, K. 2013. Cryptosporioptide: A bioactive polyketide produced by an endophytic fungus *Cryptosporiopsis* sp. *Phytochemistry, In Press*.
- Salituro, G.M., Pelaez, F., Zhang, B.B. 2001. Discovery of a Small Molecule Insulin Receptor Activator. *Recent Progress in Hormone Research*, **56**: 107–126.
- Selim, S.A., Mousa, W.M., Mohamed, Kh.F. Ashgan, M.H., Al-Arafaj A.A., Moussa, I.M. 2012. Evaluation of the synergistic haemolytic activity of phospholipase D produced by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *African Journal of Microbiology Research*, **46**: 7306–7313.
- Schmeda-Hirschmann, G., Hormazabal, E., Astudillo, L., Rodriguez, J., Theoduloz, C. 2005. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**: 27–32.
- Sharma, R.K. & Wang, J.H. 1979. Preparation and assay of the Ca<sup>2+</sup>-dependent modulator protein. *Advances in Cyclic Nucleotide Research* **10**: 187–198.
- Sharma, R.K., Wang, J.H., Wu, Z., 1997. Mechanisms of inhibition of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase by dihydropyridine calcium antagonists. *Journal of Neurochemistry*, **69**: 845–850.
- Sharma, B., Deo, S.K., Bachas, L.G., Daunert, S. 2005. Competitive binding assay using fluorescence resonance energy transfer for the identification of calmodulin antagonists. *Bioconjugate Chemistry*, **16**: 1257–1263.
- Shweta, S., Züehlke, S., Ramesha, B.T., Priti, V., Mohana Kunar, P., Ravikanth, G., Spittler, M., Vasudeva, R., Shaanker, R.U. 2010. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry*, **71**: 117–122.
- Soman, A.G., Gloer, J.B., Koster, B., Malloch, D. 1999. Sporovexins A-C and a New Preussomerin Analog: Antibacterial and Antifungal Metabolites from the Coprophilous Fungus *Sporormiella vexans*. *Journal of Natural Products*, **62**: 659–661.
- Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 2003. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews*, **83**: 1325–1358.
- Song, Y.C., Huang, W.Y., Sun, C., Wang, F.W., Tan, R.X. 2005 Characterization of Graphislactone A as the Antioxidant and Free Radical-Scavenging Substance from the Culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an Endophytic Fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **28**: 506–509.
- Stadler, M. & Keller, N.P. 2008. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. *Mycological Research* **112**: 127–130.



- Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, **260**: 214–216.
- Stone, J.K., Bacon, C.W., White, J.F. 2000. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. In: Microbial Endophytes, Bacon C.W. y J.F. White (Eds.). Marcel Dekker, New York, 3–29.
- Strobel, G.A., Hess, W.M., Ford, E., Sidhu, R.S., Yang, X. 1996. Taxol from fungal endophytes and issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology*, **17**: 417–423.
- Strobel, G.A., Hess, W.M., Li, J.Y., Ford, E., Sears, J., Sidhu, R.S., Summerell, B. 1997. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany*, **45**: 1073–1082.
- Strobel, G. & Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products microbiol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**: 491–502.
- Strobel, G. A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, **5**: 535–544.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, **67**: 257–268.
- Sun, D., Ran, X., Wang, J. 2008. Isolation and identification of a taxol-producing endophytic fungus from *Podocarpus*. *Acta Microbiologica Sinica*, **48**: 589–595.
- Takahashi, A., Kusano, G., Ohta, T., Ohizumi, Y., Nozoe, S. 1989. Fasciculic acids A, B and C as calmodulin antagonists from the mushroom *Naematoloma fasciculare*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **37**: 3247–3250.
- Tan, R. X. & Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, **18**: 448–459.
- Tian, R., Yang, Q., Zhou, G., Tan, J., Zhang, L., Fang, C. 2006. Taxonomic study on a taxol producing fungus isolated from bark of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Journal of Wuhan Botanical Research*, **24**: 541–545.
- Turbyville, T.J., Wijeratne, E.M.K., Liu, M.X., Burns, A.M., Seliga, C.J., Leuvano, L.A., David, C. L., Faeth, S.H., Whitesell, L., Gunatilaka, A.A.L. 2006. Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the Sonoran desert. *Journal of Natural Products*, **69**: 178–184.
- Valencia-Islas, N., Abbas, H., Bye, R., Toscano, R., Mata, R. 2002. Phytotoxic compounds from *Prionosciadium watsoni*. *Journal of Natural Products*, **65**: 828–34.
- Venkatachalam, R., Subban, K., Paul, M. J. 2008. Taxol from *Botryodiplodia theobromae* (BT 115)-an endophytic fungus of *Taxus baccata*. *Journal of Biotechnology*, **136**: S189–S190.
- Vertessy, B.G., Ramat, V., Böcskei, Z., Náráy-Szabó, G., Orosz, F., Ovádi, J., 1998. Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca<sup>2+</sup>-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies. *Biochemistry*, **37**: 15300–15310.
- Wang J, Huang Y, Fang M, Zhang Y, Zheng Z, Zhao Y, Su W. 2002. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **34**: 51–57.
- Webb, C.R. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, **27**: 201–206.

- Yu, W. & Liang-Dong, G. 2004. Endophytic Fungi II: New records from pine in China. *Mycosystema*, **23**: 24–27.
- Wanga, Y., Xub, L., Rena, W., Zhaoa, D., Zhua, Y., Wuc, X. 2012. Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. *Phytomedicine*, **19**: 364–368.
- Watanabe, K. & West, W.L. 1982. Calmodulin, activated cyclic nucleotide phosphodiesterase, microtubules and vinca alkaloids. *Federation proceedings*, **41**: 2292–2299.
- Weber, D., Sterner, O., Anke, T., Gorzalczyk, S., Martino, V., Acevedo, C. 2004. Phomol, a new anti-inflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *Journal of Antibiotics*, **57**: 559–563.
- Wicklow, D.T., Roth, S., Deyrup, S.T., Gloer, J.B., 2005. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, **109**: 610–618.
- Yamada, T., Iwamoto, C., Yamagaki, N., Yamanouchi, T., Minoura, K., Yamori, T., Uehara, Y., Andoh, T., Umemura, K., Numata, A., Nasahara, T. 2002. Leptosins M-N1, cytotoxic metabolites from a *Leptosphaeria* species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities. *Tetrahedron*, **58**: 479–487.
- Yang, X., Guo, S., Zhang, L., Shao, H. 2003. Selection of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant. *Natural Product Research and Development*, **15**: 419–422.
- Yang, T., Poovaiah, B.W., 2003. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*, **8**: 505–512.
- Ye, Y.H., Zhu, H.L., Song, Y.C., Liu, J.Y., Tan, R.X. 2005. Structural Revision of Aspernigrin A, Reisolated from *Cladosporium herbarum* IFB-E002. *Journal of Natural Products*, **68**: 1106–1108.
- Yurimoto, S., Hatano, N., Tsuchiya, M., Kato, K., Fujimoto, T., Masaki, T., Kobayashi, R., Tokumitsu, H. 2009. Identification and characterization of wolfram, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein. *Biochemistry*, **48**: 3946–3955.
- Yasuzawa, T., Saitoh, Y., Sano, H. 1990. Structures of KS-501 and KS-502, the new inhibitors of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Journal of Antibiotics*, **43**: 336–343.
- Zeng, S., Shao, H., Zhang, L. 2004. An endophytic fungus producing a substance analogous to podophyllotoxin isolated from *Diphylleia sinensis*. *Journal of Microbiology*, **24**: 1–2.
- Zhai, H., Nakade, K., Oda, M., Mitsumoto, Y., Akagi, M., Sakurai, J., Fukuyama, Y. 2005. Honokiol-induced neurite outgrowth promotion depends on activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2). *European Journal of Pharmacology*, **516**: 112–117.
- Zhang, P., Zhou, P., Yu, L. 2009. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology*, **59**: 227–232.
- Zhang, G., Sun, S., Zhu, T., Lin, Z., Gu, J., Li, D., Gu, Q. 2011. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*, **72**: 1436–1442.
- Zhou, Y., Li, Y., Wang, Z., Ou, Y., Zhou, X. 1994. 1H NMR and spin-labeled EPR studies on the interaction of calmodulin with jujuboside A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **202**: 148–154.



# **ANEXO**

## ANEXO

- Tabla A1.** Datos espectroscópicos de RMN de *E/Z* vermelhotina (**82**) en MeOH-*d*<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H a 500 MHz y <sup>13</sup>C a 125 MHz).
- Tabla A2.** Datos espectroscópicos de RMN de *E/Z* vermelhotina (**82**) en DMSO-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H a 500 MHz y <sup>13</sup>C a 125 MHz).
- Tabla A3.** Energía libre relativa,<sup>a</sup> población,<sup>b</sup> ángulos diedros seleccionados,<sup>c</sup> y valores de  $[\alpha]_D$  calculados con DFT<sup>d</sup> para los veinte conformeros más relevantes y la comparación con el valor experimental de 9*S*,11*S*-(+)-ascosalitoxina (**83b**).
- Tabla A4.** Energía libre relativa,<sup>a</sup> población,<sup>b</sup> ángulos diedros seleccionados,<sup>c</sup> y valores de  $[\alpha]_D$  calculados con DFT<sup>d</sup> para los veinte conformeros más relevantes y la comparación con el valor experimental de 9*R*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83c**).
- Tabla A5.** Energía libre relativa,<sup>a</sup> población,<sup>b</sup> ángulos diedros seleccionados,<sup>c</sup> y valores de  $[\alpha]_D$  calculados con DFT<sup>d</sup> para los veinte conformeros más relevantes y la comparación con el valor experimental de 9*R*,11*S*-(+)-ascosalitoxina (**83d**).
- Tabla A6.** Energía libre relativa calculada con DFT B3LYP/DGDZVP, población, y comparación entre las constantes de acoplamiento vecinales ( $J_{H-H}$ ) teóricas y experimentales de los conformeros más relevantes del diastereoisómero **83-1a** (9*S*,10*R*,11*R*).
- Tabla A7.** Energía libre relativa calculada con DFT B3LYP/DGDZVP, población, y comparación entre las constantes de acoplamiento vecinales ( $J_{H-H}$ ) teóricas y experimentales de los conformeros más relevantes del diastereoisómero **83-2a** (9*S*,10*R*,11*R*).
- Tabla A8.** Energías libres relativa calculadas con DFT B3LYP/DGDZVP, población, ángulos diedros selectos y valores de  $[\alpha]_D$  calculados del enantiómero **89a** (10*R*).
- Tabla A9.** Energías libres relativa calculadas con DFT B3LYP/DGDZVP, población, ángulos diedros selectos y valores de  $[\alpha]_D$  calculados del enantiómero **89b** (10*S*).
- Espectro A1.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la vermelhotina (**82**) en CDCl<sub>3</sub> (500 MHz).
- Espectro A2.** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN de la vermelhotina (**82**) en CDCl<sub>3</sub> (125 MHz).
- Espectro A3.** Espectro de HSQC de la vermelhotina (**82**) en CDCl<sub>3</sub>.
- Espectro A4.** Espectro de HMBC de la vermelhotina (**82**) en CDCl<sub>3</sub>.
- Espectro A5.** Espectro NOESY de la vermelhotina (**82**) en CDCl<sub>3</sub>.

- Espectro A6.** Espectro COSY de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Espectro A7.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$  (300 MHz).
- Espectro A8.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$  (75 MHz).
- Espectro A9.** Espectro de HSQC de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$ .
- Espectro A10.** Espectro de HMBC de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$ .
- Espectro A11.** Espectro de NOESY de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$ .
- Espectro A12.** Espectro de COSY de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$ .
- Espectro A13.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la vermelhotina (**82**) en  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).
- Espectro A14.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la vermelhotina (**82**)  $\text{DMSO-}d_6$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).
- Espectro A15.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la vermelhotina (**82**) en  $\text{MeOH-}d_4$  (400 MHz).
- Espectro A16.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la vermelhotina (**82**) en  $\text{MeOH-}d_4$  (100 MHz).
- Espectro A17.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la vermelhotina (**82**) en  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz).
- Espectro A18.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la vermelhotina (**82**) en  $\text{D}_2\text{O}$  (100 MHz).
- Espectro A19.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).
- Espectro A20.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz).
- Espectro A21.** Espectro de HSQC de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Espectro A22.** Espectro de HMBC de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Espectro A23.** Espectro de NOESY de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Espectro A24.** Espectro de COSY de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Espectro A25.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del derivado **83-1** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).
- Espectro A26.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del derivado **83-1** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).
- Espectro A27.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del derivado **83-2** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).
- Espectro A28.** Espectro de HSQC del derivado **83-2**.
- Espectro A29.** Espectro de HMBC del derivado **83-2**.
- Espectro A30.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la corimbiferona (**84**) en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).
- Espectro A31.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la corimbiferona (**84**) en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).
- Espectro A32.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la ziganeina (**85**) en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).
- Espectro A33.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la ziganeina (**85**) en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).
- Espectro A34.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**) en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).
- Espectro A35.** Espectro de HSQC del 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Espectro A36.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del brocaenol B (**87**) en  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

- Espectro A37.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del brocaenol B (**87**) en  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).
- Espectro A38.** Espectro de HSQC de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (**88**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Espectro A39.** Espectro de HMBC de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (**88**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Espectro A40.** Espectro de NOESY de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (**88**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Espectro A41.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**) en  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz).
- Espectro A42.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**) en  $\text{DMSO-}d_6$  (125 MHz).
- Espectro A43.** Espectro de HSQC de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**) en  $\text{DMSO-}d_6$ .
- Espectro A44.** Espectro de HMBC de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**) en  $\text{DMSO-}d_6$ .

**Tabla A1.** Datos espectroscópicos de RMN de *E/Z* vermelhotina (**82**) en MeOH-*d*<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H a 500 MHz y <sup>13</sup>C a 125 MHz).

Posición	MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> in Hz)
2	175.5	
3	98.7	
4	195.8	
5	54.8	3.74, s
6	162.3	
7	116.5	8.11, s
8	144.7	7.67, dd (9.4, 7.2)
9	109.9	6.61, d (7.2)
10	160.8	
11	123.5	6.35, dq (15.5, 1.6)
12	139.5	7.35, s
13	18.8	2.00, dd (7.2, 1.6)
NH		5.49, s

**Tabla A2.** Datos espectroscópicos de RMN de *E/Z* vermelhotina (**82**) en DMSO-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H a 500 MHz y <sup>13</sup>C a 125 MHz).

Posición	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>			
	<b>82a</b>		<b>82b</b>	
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> in Hz)
2	170.9		169.6	
3	97.8		97.7	
4	192.4		194.8	
5	49.9	3.59, s	50.4	3.63, s
6	163.9		165.3	
7	115.1	8.03, d (9.0)	115.5	8.00, d (9.0)
8	142.1	7.63, dd (9.5, 7.0)	142.8	7.65, dd (9.5, 7.5)
9	108.1	6.62, d (7.0)	108.0	6.62, d (7.0)
10	157.3		157.4	
11	122.7	6.38, dd (15.5, 1.5)	122.8	6.37, dd (15.5, 1.5)
12	136.1	7.47, dd (15.3, 6.9)	136.8	7.47, dd (15.3, 6.9)
13	18.3	1.97, dd (7.5, 1.5)	18.4	1.95 dd (7.0, 1.5)
NH		7.45 s		7.65 s



**Tabla A3.** Energía libre relativa,<sup>a</sup> población,<sup>b</sup> ángulos diedros seleccionados,<sup>c</sup> y valores de  $[\alpha]_D$  calculados con DFT<sup>d</sup> para los veinte conformeros más relevantes y la comparación con el valor experimental de 9S,11S-(+)-ascosalitoxina (**83b**).

Confórmero	$\Delta G^a$	$P$ (%) <sup>b</sup>	D1	D2	D3	D4	D5	$[\alpha]_D$
1	0.000	26.77	+180	-47	-80	-91	+171	185.86
2	0.043	24.09	+179	-49	-74	-110	+63	182.53
3	0.149	19.51	0	-46	-75	-92	+171	161.74
4	0.719	7.55	0	-48	-69	-110	+62	145.03
5	0.744	7.55	+178	-47	-81	-83	-66	190.05
6	0.848	6.11	0	-46	-77	-85	-66	160.5
7	1.529	1.92	0	+120	-62	-97	+171	83.21
8	1.763	1.26	0	+119	-59	-118	+63	66.88
9	1.896	1.02	-179	+119	-59	-118	+63	70.95
10	2.358	0.49	-179	-47	-106	+57	+64	122.18
11	1.904	1.02	-180	+120	-61	-98	+171	86.38
12	2.232	0.60	+180	-43	-98	52	+168	127.49
13	2.303	0.54	0	+120	-64	-88	-66	104.33
14	2.361	0.49	-179	-47	-107	+57	+64	122.18
15	2.529	0.35	0	-105	+60	-116	+174	0.59
16	2.779	0.23	-179	+120	-63	-89	-66	109.23
17	2.899	0.19	+179	-106	+59	-116	+174	4.64
18	3.103	0.14	0	+114	-144	-145	+175	-300.78
19	3.139	0.12	0	-102	+72	-134	+66	18.82
20	3.548	0.07	+179	-102	+71	-134	+66	21.38
Valor promedio teórico de $[\alpha]_D^e$								166.83
Valor experimental de $[\alpha]_D^f$								153

<sup>a</sup>Energía libre de Gibbs calculada por DFT B3LYP/DGDZVP en kcal mol<sup>-1</sup> relativa al valor absoluto de  $G$  para el mínimo global -554,957.611 kcal mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>En porcentaje a partir de los valores de  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>Ángulos diedros en grados D1: (C3C4OH), D2 (C5C6C9C10), D3 (C6C9C10C11), D4 (C9C10C11C12), D5 (C10C11C12C13). <sup>d</sup>Valores de  $[\alpha]_D$  calculados por DFT B3LYP/DGDZVP en grados [dm g/cm<sup>3</sup>]<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>Calculado con la ecuación  $\sum^i [\alpha]_D^i \times P^i$ , donde  $[\alpha]_D^i$  es el valor de  $[\alpha]_D$  teórico y  $P^i$  es la población para el  $n$ -ésimo conformero. <sup>f</sup>Registrado en CHCl<sub>3</sub>.

**Tabla A4.** Energía libre relativa,<sup>a</sup> población,<sup>b</sup> ángulos diedros seleccionados, <sup>c</sup> y valores de  $[\alpha]_D$  calculados con DFT<sup>d</sup> para los veinte conformeros más relevantes y la comparación con el valor experimental de 9*R*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83c**).

Confórmero	$\Delta G^a$	$P$ (%) <sup>b</sup>	D1	D2	D3	D4	D5	$[\alpha]_D$	
1	0.000	26.76	-180	+47	+80	+91	-171	-185.83	
2	0.041	24.08	-179	+49	+74	+110	-62	-182.45	
3	0.151	19.50	0	+46	+75	+91	-171	-161.75	
4	0.715	7.54	0	+48	+69	+110	-62	-144.81	
5	0.740	7.54	-180	+48	+81	+83	+66	-190.10	
6	0.848	6.11	0	+46	+77	+85	+66	-160.53	
7	1.529	1.91	0	-120	+62	+97	-171	-83.22	
8	1.763	1.26	0	-119	+59	+118	-63	-66.82	
9	1.901	0.10	+179	-119	+59	+118	-63	-70.92	
10	2.298	0.54	+179	+47	+106	-59	-65	-121.33	
11	1.904	1.02	+179	-121	+61	+98	-171	-86.4	
12	2.232	0.60	-180	+43	+98	-52	-168	-127.49	
13	2.303	0.54	0	-120	+64	+88	+66	-104.32	
14	2.364	0.49	+179	+47	+106	-57	-64	-122.22	
15	2.529	0.35	0	+105	-60	+116	-174	-0.59	
16	2.777	0.23	+179	-120	+63	+89	+66	-109.27	
17	2.899	0.19	-179	+106	-59	+116	-174	-4.66	
18	3.103	0.14	0	-114	+144	+145	-174	300.77	
19	3.139	0.12	0	+102	-72	+134	-66	-18.81	
20	3.548	0.07	-179	+102	-71	+134	-66	-21.41	
								Valor promedio teórico de $[\alpha]_D^e$	-166.12
								Valor experimental de $[\alpha]_D^f$	153

<sup>a</sup>Energía libre de Gibbs calculado por DFT B3LYP/DGDZVP en kcal mol<sup>-1</sup> relativa al valor absoluto de  $G$  para el mínimo global -554,957.611 kcal mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>En porcentaje a partir de los valores de  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>Ángulos diedros en grados D1: (C3C4OH), D2 (C5C6C9C10), D3 (C6C9C10C11), D4 (C9C10C11C12), D5 (C10C11C12C13). <sup>d</sup>Valores de  $[\alpha]_D$  calculados por DFT B3LYP/DGDZVP en grados [dm g/cm<sup>3</sup>]<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>Calculado con la ecuación  $\Sigma^i [\alpha]_D^i \times P^i$ , donde  $[\alpha]_D^i$  es el valor de  $[\alpha]_D$  teórico y  $P^i$  es la población para el  $n$ -ésimo conformero. <sup>f</sup>Registrado en CHCl<sub>3</sub>.

**Tabla A5.** Energía libre relativa,<sup>a</sup> población,<sup>b</sup> ángulos diedros seleccionados,<sup>c</sup> y valores de  $[\alpha]_D$  calculados con DFT<sup>d</sup> para los veinte conformeros mas relevantes y la comparación con el valor experimental de 9R,11S-(+)-ascosalitoxina (**83d**).

Confórmero	$\Delta G^a$	$P$ (%) <sup>b</sup>	D1	D2	D3	D4	D5	$[\alpha]_D$
1	0.000	40.49	+180	+53	+86	-150	+68	-177.62
2	0.307	23.89	-179	+48	+81	-144	+175	-165.57
3	0.528	15.67	0	+53	+81	-149	+68	-166.07
4	0.767	11.42	0	+46	+73	-141	+175	-123.98
5	1.783	1.90	0	-118	+69	-149	+67	-59.32
6	2.008	1.38	0	-120	+62	-134	+175	-66.06
7	2.189	1.01	+179	-118	+69	-149	+67	-63.62
8	2.369	0.73	+180	+47	+108	-65	-67	-160.67
9	2.489	0.60	0	+106	-61	-118	+174	-1.25
10	2.509	0.60	+180	+43	+98	+73	+60	-127.62
11	2.613	0.48	0	+46	+74	-141	-73	-214.05
12	2.617	0.48	0	+103	-58	-134	+65	36.18
13	2.713	0.39	0	+42	+95	+75	+60	-116.24
14	3.025	0.23	-179	+104	-57	-134	+65	31.92
15	3.213	0.17	0	+63	+158	-119	+63	98.42
16	3.222	0.17	0	-114	+146	-92	+171	372.29
17	3.224	0.17	0	+45	+103	-68	-68	-146.17
18	3.549	0.10	0	-116	+160	-120	+64	315.68
19	3.636	0.09	0	-118	+59	-113	-67	-99.78
20	4.034	0.04	0	-122	+52	-175	-74	-156.71
Valor promedio teórico de $[\alpha]_D^e$								-156.81
Valor experimental de $[\alpha]_D^f$								153

<sup>a</sup>Energía libre de Gibbs calculado por DFT B3LYP/DGDZVP en kcal mol<sup>-1</sup> relativa al valor absoluto de  $G$  para el mínimo global  $-554,957.611$  kcal mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>En porcentaje a partir de los valores de  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>Ángulos diedros en grados D1: (C3C4OH), D2 (C5C6C9C10), D3 (C6C9C10C11), D4 (C9C10C11C12), D5 (C10C11C12C13). <sup>d</sup>Valores de  $[\alpha]_D$  calculados por DFT B3LYP/DGDZVP en grados [dm g/cm<sup>3</sup>]<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>Calculado con la ecuación  $\Sigma^i [\alpha]_D^i \times P^i$ , donde  $[\alpha]_D^i$  es el valor de  $[\alpha]_D$  teórico y  $P^i$  es la población para el  $n$ -ésimo conformero. <sup>f</sup>Registrado en CHCl<sub>3</sub>.

**Tabla A6.** Energía libre relativa calculada con DFT B3LYP/DGDZVP, población, y comparación entre las constantes de acoplamiento vecinales ( $J_{H-H}$ ) teóricas y experimentales de los conformeros más relevantes del diastereoisómero **83-1a** (9*S*,10*R*,11*R*).

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$J_{9-10}$	$J_{10-11}$
1	0.000	0.599	11.11	2.54
2	0.835	0.152	11.23	1.96
3	1.131	0.089	4.72	10.72
4	1.174	0.090	10.86	2.68
Constante de acoplamiento <sup>c</sup>			10.41	3.52
Valores corregidos <sup>d</sup>			<b>9.47</b>	<b>3.16</b>
Valores experimentales <sup>e</sup>			<b>9.20</b>	<b>3.90</b>

<sup>a</sup>Variación de la energía libre ( $\Delta G$ ) en kcal/mol, valor del mínimo global de  $G - 1115.60358$ . <sup>b</sup>Fracción molar a partir de los valores de DG a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> $J_{H-H}$  vecinales en Hz calculadas por DFT-GIAO a partir de las estructuras optimizadas a un nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup>Factor de corrección:  $fH(sp3)-H(sp3) = 0.910$ ;  $fH(sp3)-H(sp2) = 0.929$  y  $fH(sp2)-H(sp2) = 0.977$ . <sup>e</sup>Constante de acoplamiento experimental.

**Tabla A7.** Energía libre relativa calculada con DFT B3LYP/DGDZVP, población, y comparación entre las constantes de acoplamiento vecinales ( $J_{H-H}$ ) teóricas y experimentales de los conformeros más relevantes del diastereoisómero **83-2a** (9*S*,10*R*,11*R*).

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$J_{9-10}$	$J_{10-11}$
1	0.000	0.815	9.79	1.04
2	0.913	0.167	0.73	10.66
3	2.631	0.010	6.46	9.60
4	2.755	0.008	6.61	3.88
Constante de acoplamiento <sup>c</sup>			8.21	2.76
Valores corregidos <sup>d</sup>			<b>7.47</b>	<b>2.51</b>
Valores experimentales <sup>e</sup>			<b>7.40</b>	<b>4.80</b>

<sup>a</sup>Variación de la energía libre ( $\Delta G$ ) en kcal/mol, valor del mínimo global de  $G - 1115.60358$ . <sup>b</sup>Fracción molar a partir de los valores de DG a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> $J_{H-H}$  vecinales en Hz calculadas por DFT-GIAO a partir de las estructuras optimizadas a un nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup>Factor de corrección:  $fH(sp3)-H(sp3) = 0.910$ ;  $fH(sp3)-H(sp2) = 0.929$  y  $fH(sp2)-H(sp2) = 0.977$ . <sup>e</sup>Constante de acoplamiento experimental.

**Tabla A8.** Energías libres relativa calculadas con DFT B3LYP/DGDZVP, población, ángulos diedros selectos y valores de  $[\alpha]_D$  calculados del enantiómero **89a** (10R).

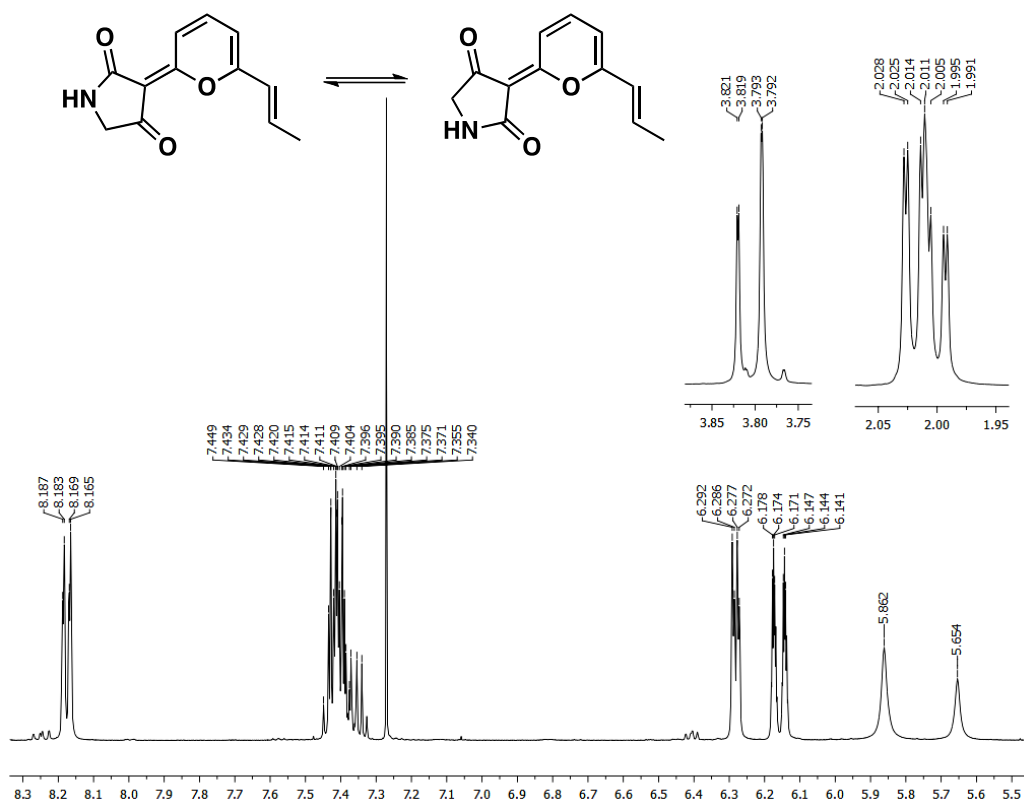
Confórmero	$\Delta G^a$	$P$ (%) <sup>b</sup>	D1	D2	D3	D4	D5	$[\alpha]_D$
1	0.000	46.50	-180	-173	+81	+172	+80	-62.83
2	0.108	38.76	+180	-174	-146	+172	+74	147.05
3	1.010	8.46	+179	-167	+90	-69	+118	-35.65
4	1.268	5.47	+179	-172	-142	-70	+100	151.32
5	2.597	0.58	-180	0	+142	+170	+163	-224.05
6	3.132	0.23	-179	-2	-87	+170	+163	-45.41
Valor promedio $[\alpha]_D$ <sup>f</sup>								31.63

<sup>a</sup>DFT B3LYP/DGDZVP Energías libres de Gibbs en kcal mol<sup>-1</sup> en relación con el valor del mínimo global -554,957.611 kcal mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>Porcentaje a partir de los valores de  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>Ángulos diedros en grados D1: (CH<sub>3</sub>O1C1C8a), D2 (C2C3OH), D3 (CH<sub>3</sub>O6C6C7), D4 (CH<sub>3</sub>O10C10C4), D5 (CH10OC9). <sup>d</sup>Valores de  $[\alpha]_D$  DFT B3LYP/DGDZVP en grados [dm g/cm<sup>3</sup>]<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>Calculado con la ecuación  $\sum_i [\alpha]_D^i \times P^i$ , donde  $[\alpha]_D^i$  es el valor de  $[\alpha]_D$  teórico y  $P^i$  es la población para el  $n$ -ésimo confórmero.

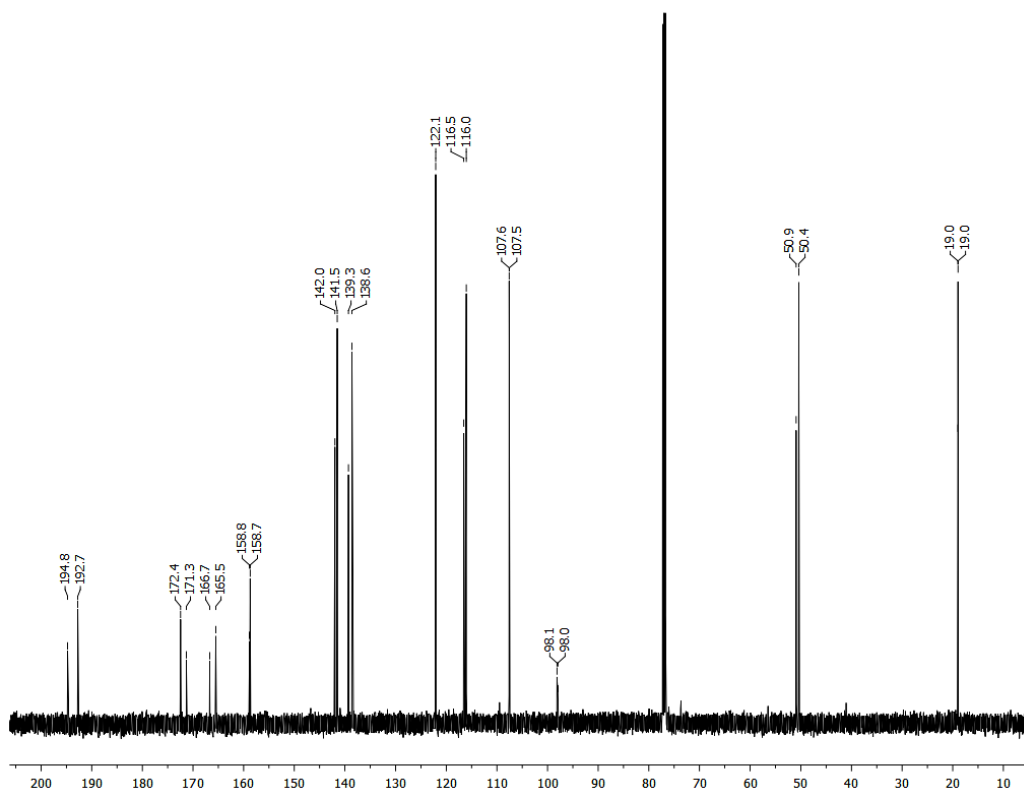
**Tabla A9.** Energías libres relativa calculadas con DFT B3LYP/DGDZVP, población, ángulos diedros selectos y valores de  $[\alpha]_D$  calculados del enantiómero **89b** (10S).

Confórmero	$\Delta G^a$	$P$ (%) <sup>b</sup>	D1	D2	D3	D4	D5	$[\alpha]_D$
1	0.000	46.45	+180	+173	-81	-172	-80	62.83
2	0.107	38.80	-180	+174	+146	-172	-74	-147.03
3	1.009	8.46	-180	+168	-90	+69	-118	35.65
4	1.267	5.47	-179	+172	+142	+70	-100	-151.41
5	2.596	0.58	+180	0	-143	-170	-164	223.35
6	3.130	0.24	+179	+2	+87	-171	-163	45.33
Averaged theoretical $[\alpha]_D$ value <sup>f</sup>								-31.73

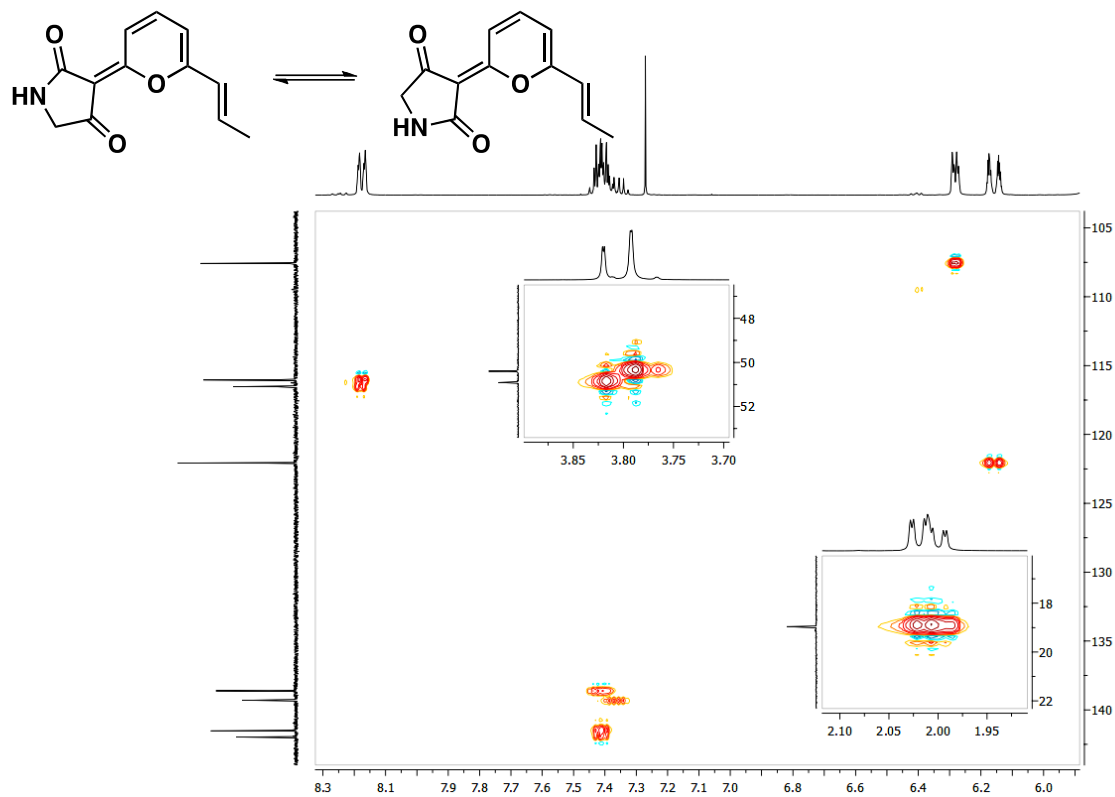
<sup>a</sup>DFT B3LYP/DGDZVP Energías libres de Gibbs en kcal mol<sup>-1</sup> en relación con el valor del mínimo global -554,957.611 kcal mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>Porcentaje a partir de los valores de  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>Ángulos diedros en grados D1: (CH<sub>3</sub>O1C1C8a), D2 (C2C3OH), D3 (CH<sub>3</sub>O6C6C7), D4 (CH<sub>3</sub>O10C10C4), D5 (CH10OC9). <sup>d</sup>Valores de  $[\alpha]_D$  DFT B3LYP/DGDZVP en grados [dm g/cm<sup>3</sup>]<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>Calculado con la ecuación  $\sum_i [\alpha]_D^i \times P^i$ , donde  $[\alpha]_D^i$  es el valor de  $[\alpha]_D$  teórico y  $P^i$  es la población para el  $n$ -ésimo confórmero.



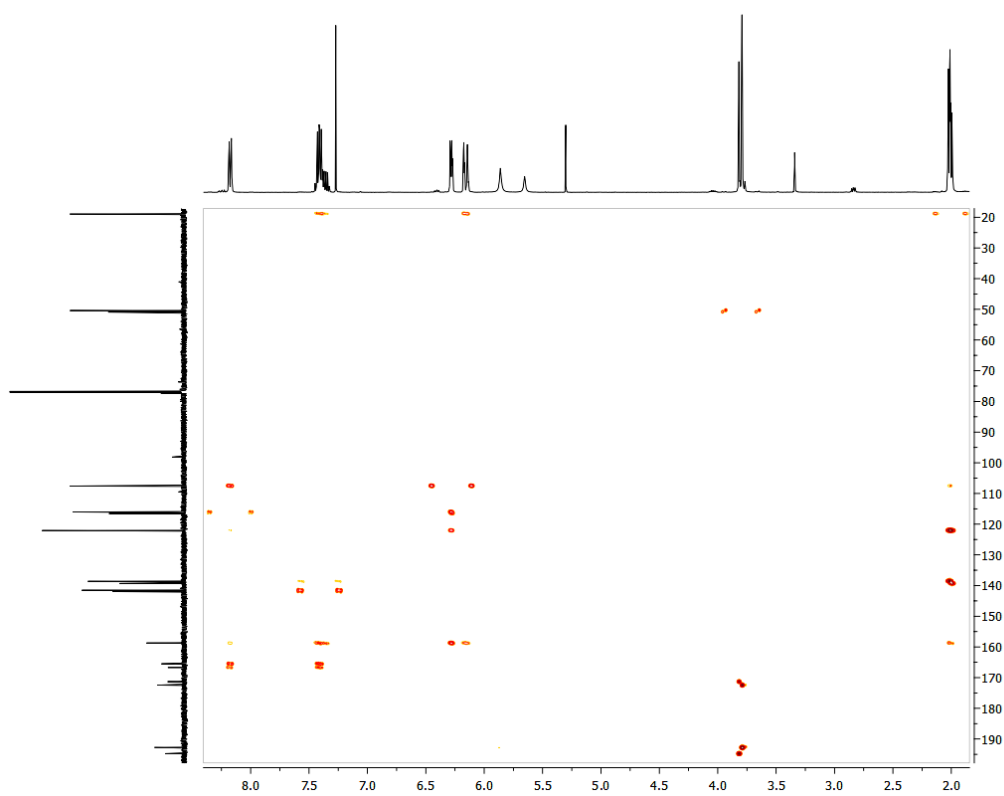
**Espectro A1.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la vermehotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).



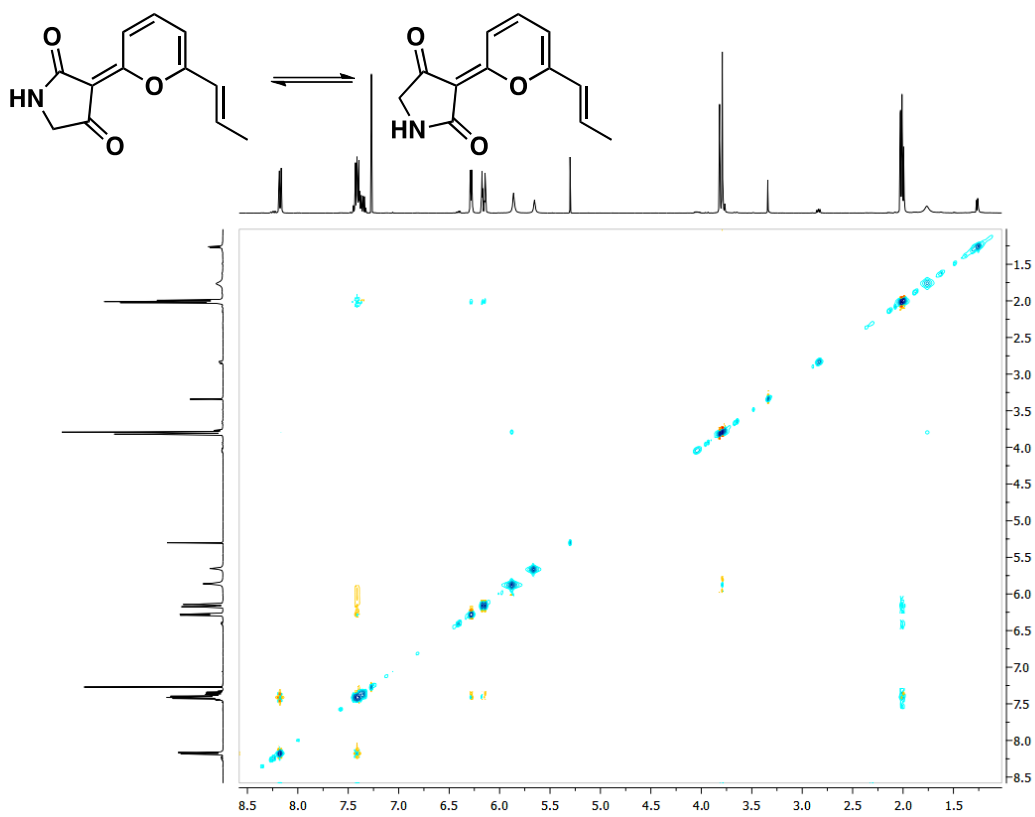
**Espectro A2.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la vermehotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).



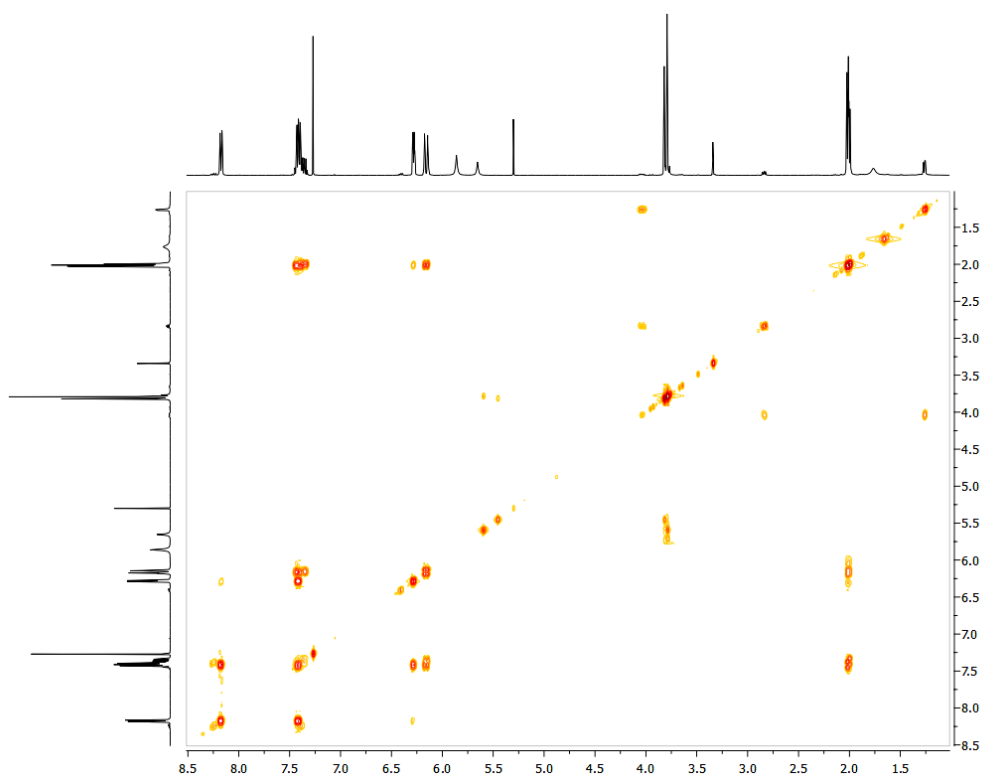
Espectro A3. Espectro de HSQC de la vermehotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3$ .



Espectro A4. Espectro de HMBC de la vermehotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3$ .

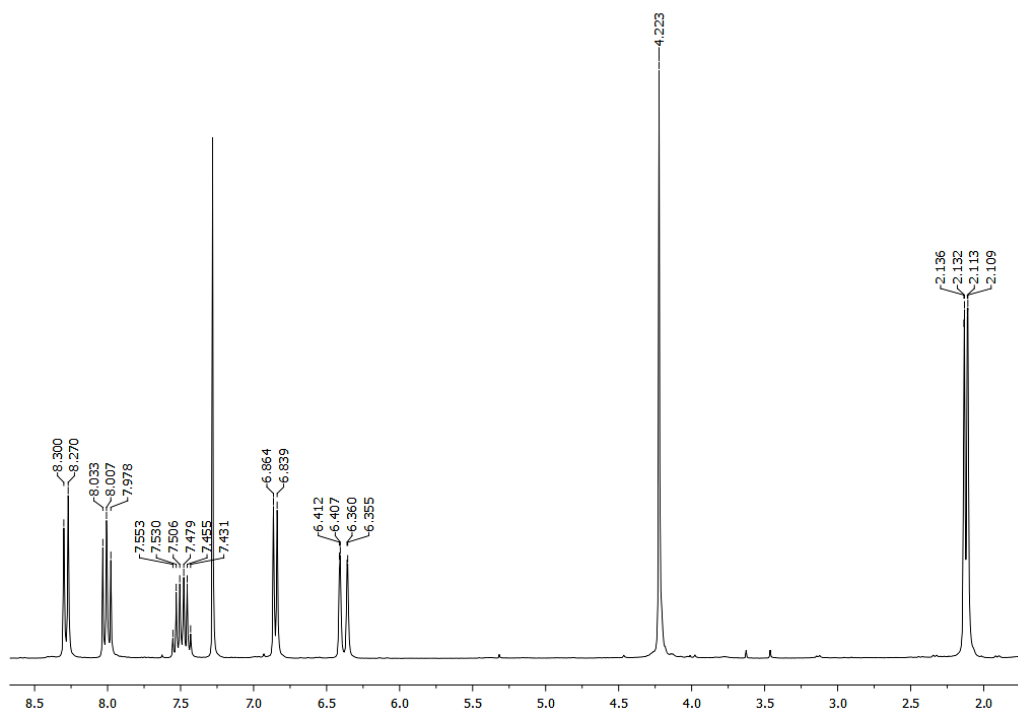


**Espectro A5.** Espectro NOESY de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3$ .

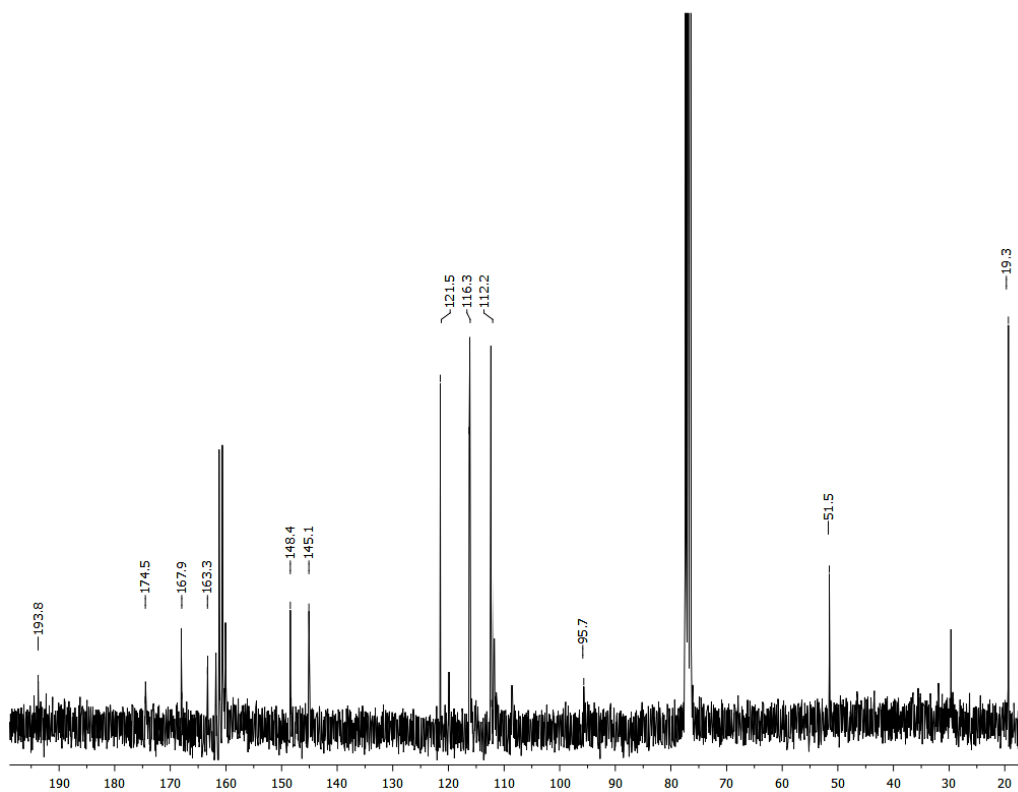


**Espectro A6.** Espectro COSY de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3$ .

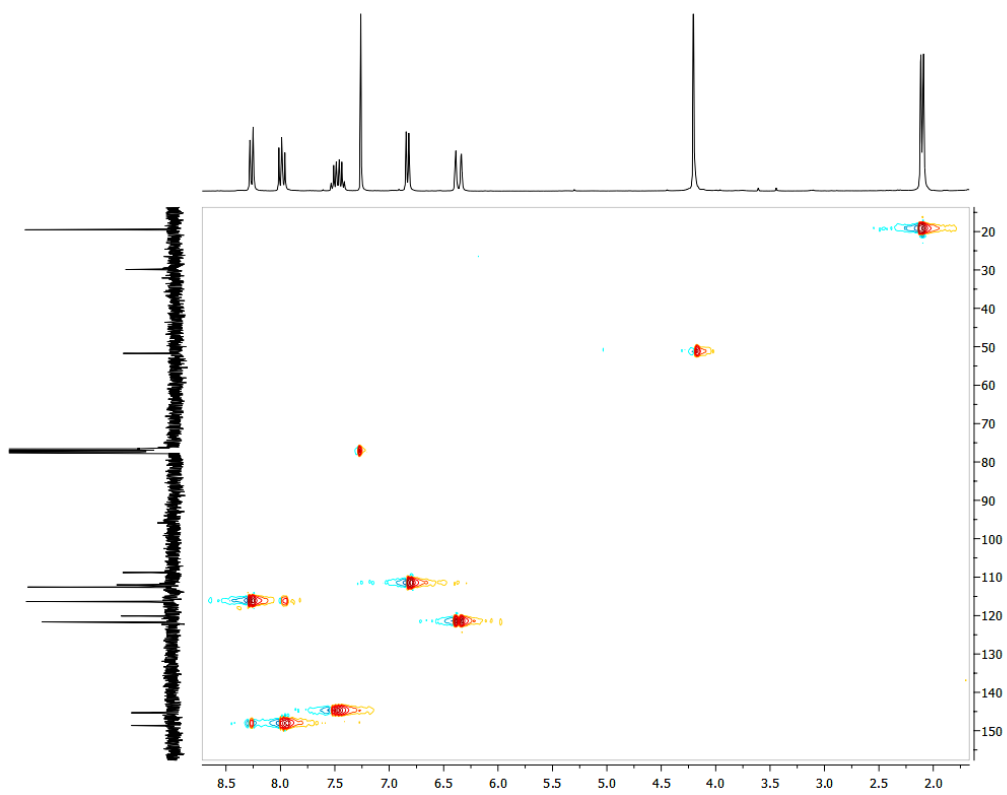




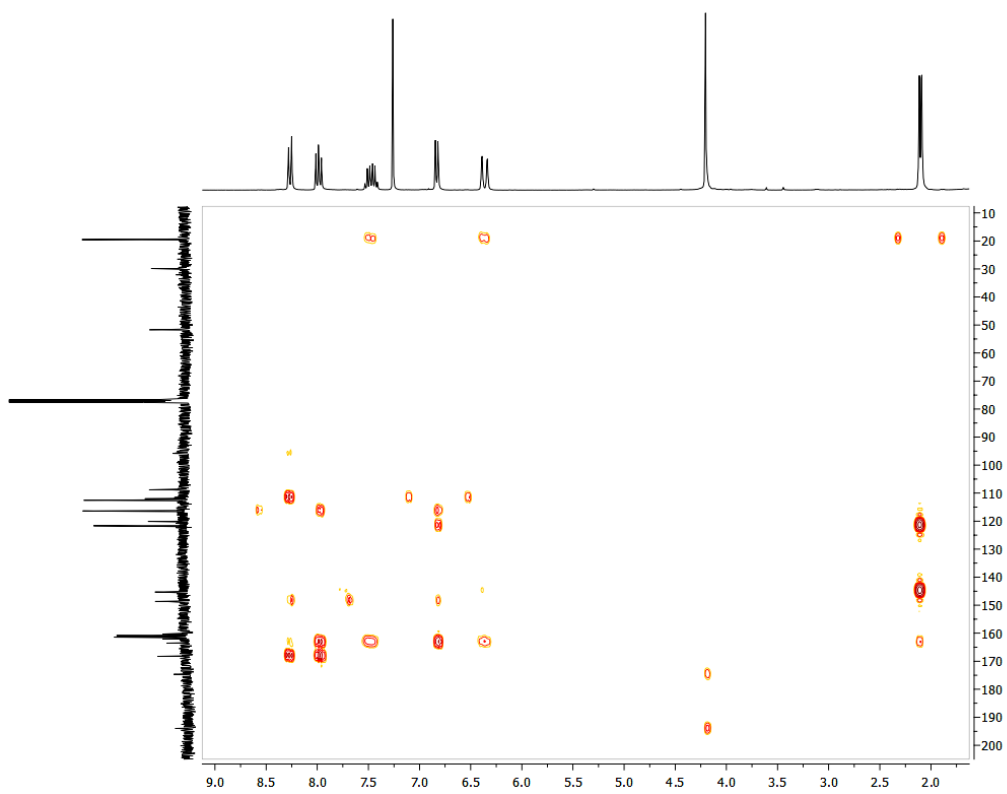
Espectro A7. Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de la vermehotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$  (300 MHz).



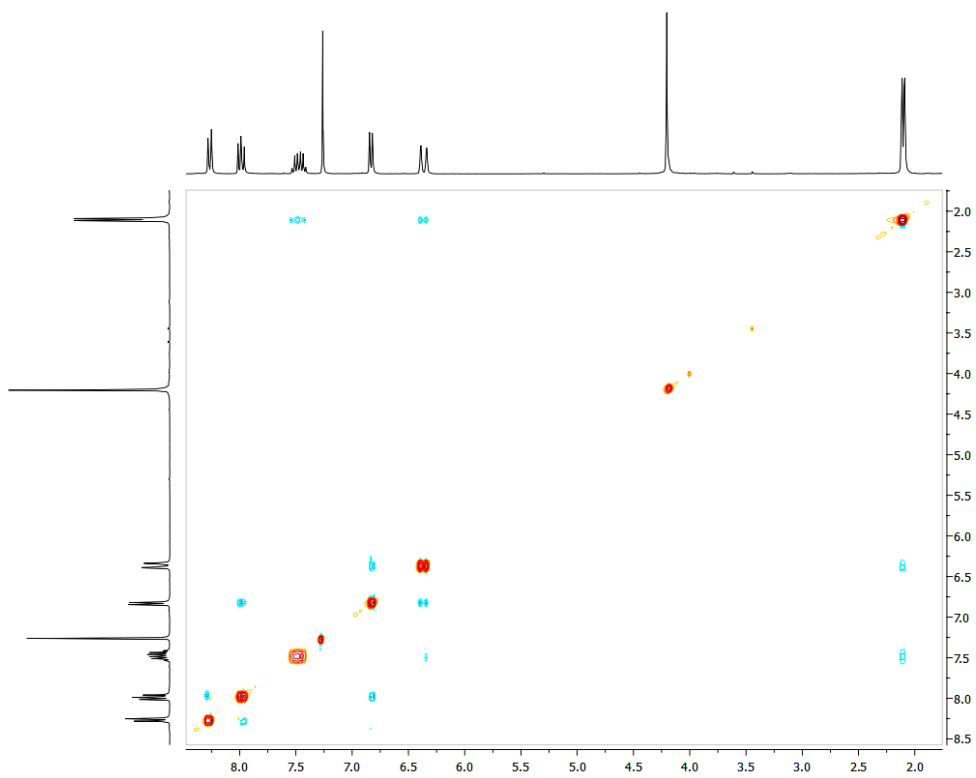
Espectro A8. Espectro de  $^{13}\text{C-NMR}$  de la vermehotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$  (75 MHz).



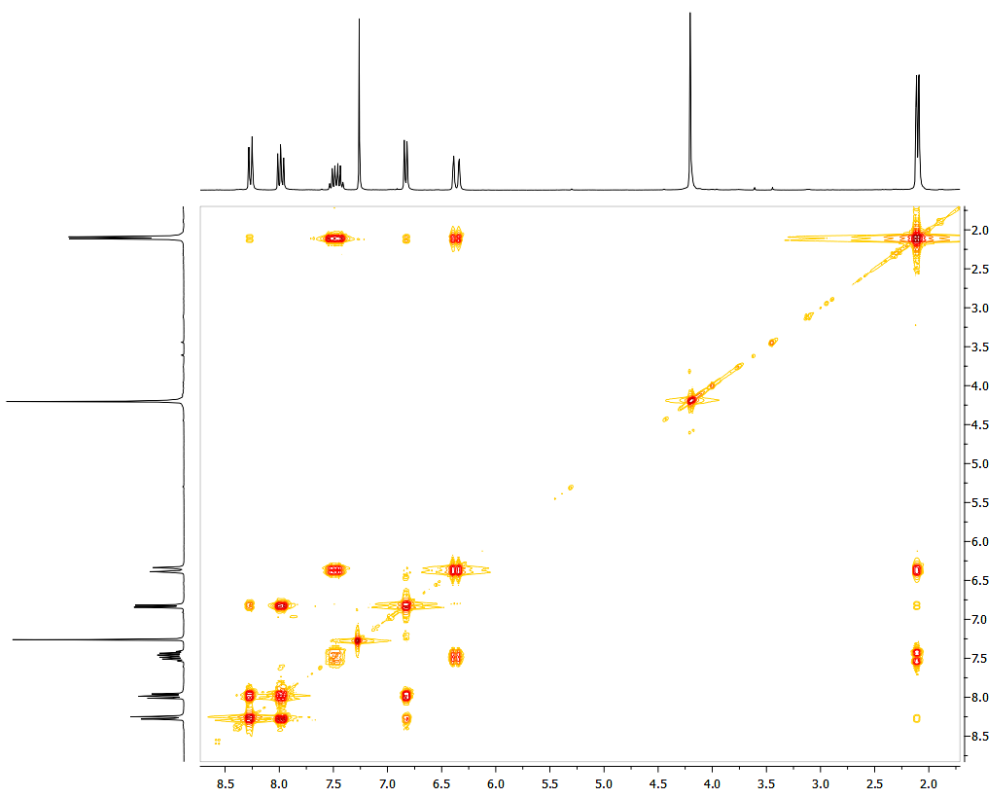
Espectro A9. Espectro de HSQC de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$ .



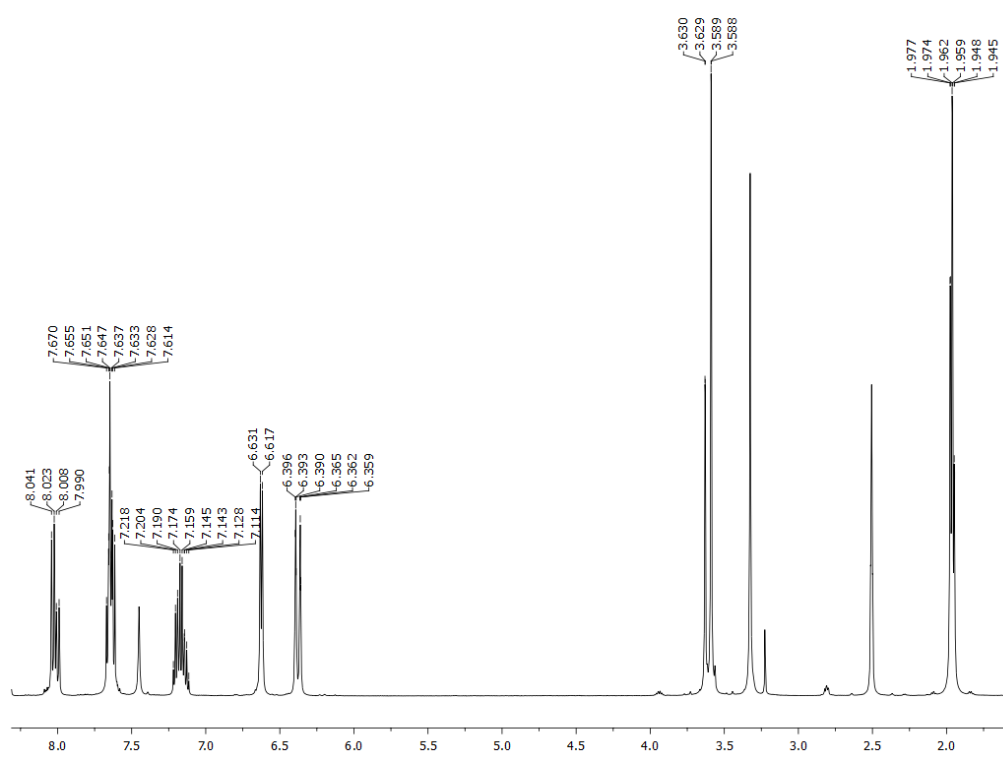
Espectro A10. Espectro de HMBC de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3+\text{TFA-}d$ .



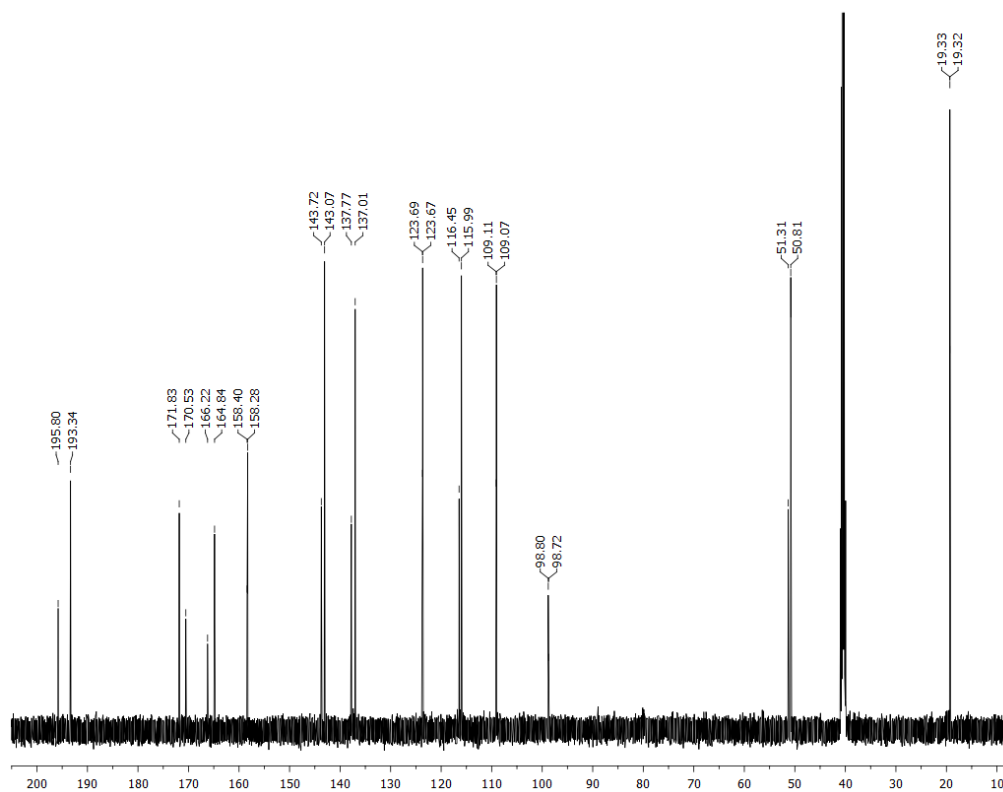
**Espectro A11.** Espectro de NOESY de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3 + \text{TFA-}d$ .



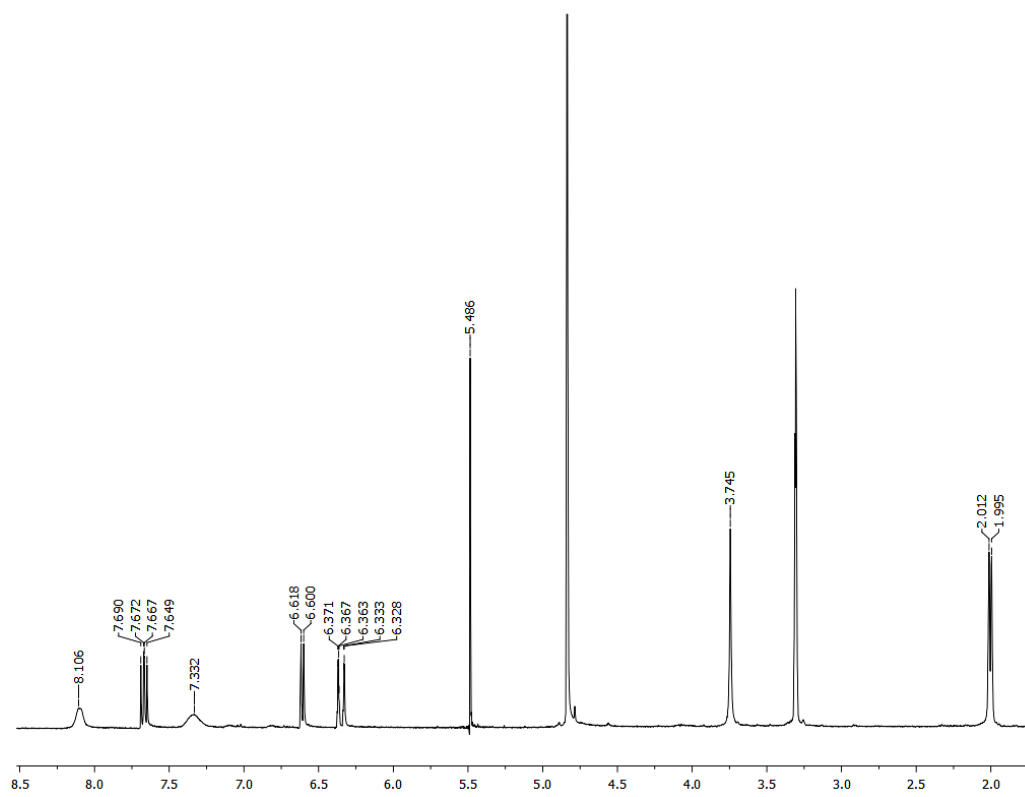
**Espectro A12.** Espectro de COSY de la vermelhotina (**82**) en  $\text{CDCl}_3 + \text{TFA-}d$ .



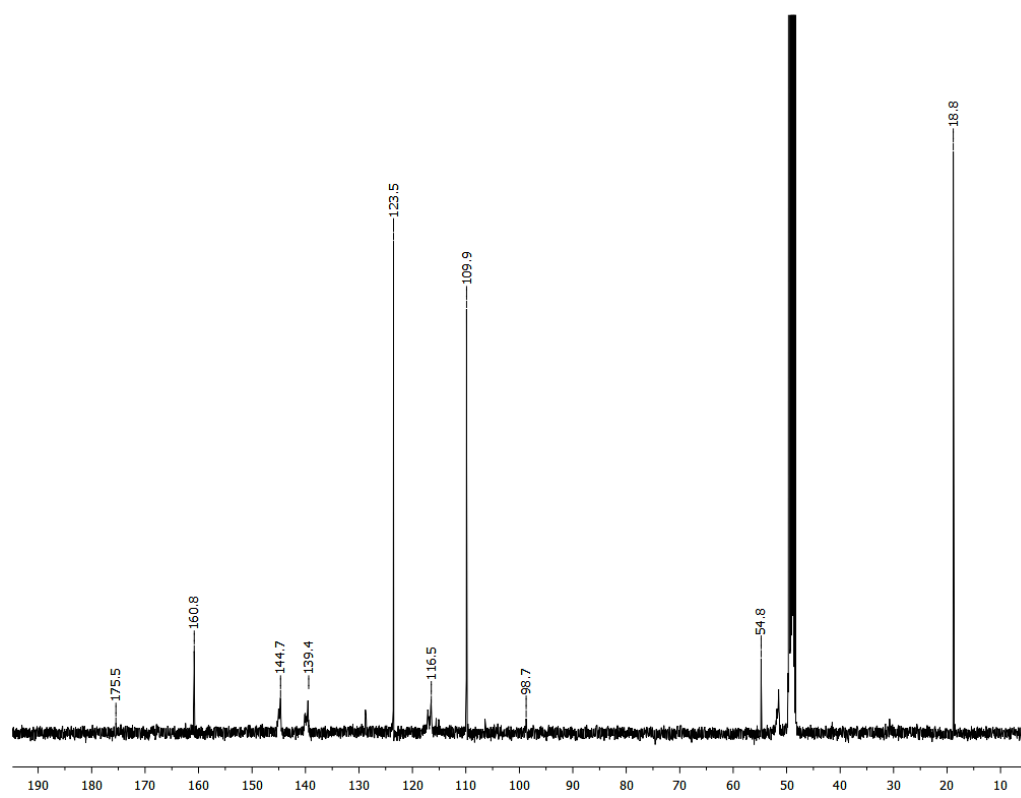
**Espectro A13.** Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de la vermehotina (**82**) en  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



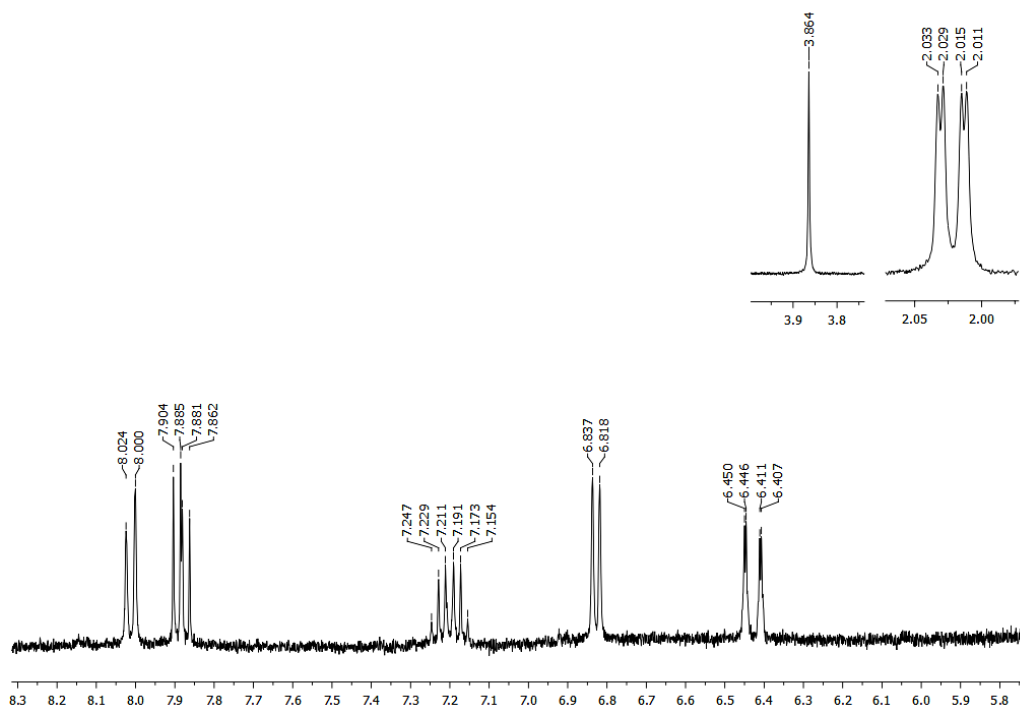
**Espectro A14.** Espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  de la vermehotina (**82**)  $\text{DMSO-}d_6$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



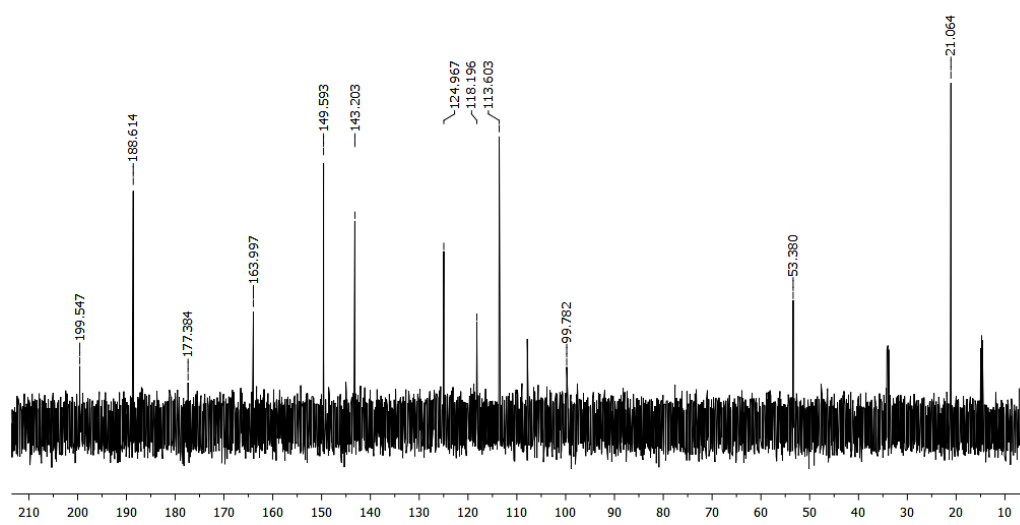
**Espectro A15.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la vermehotina (**82**) en  $\text{MeOH-}d_4$  (400 MHz).



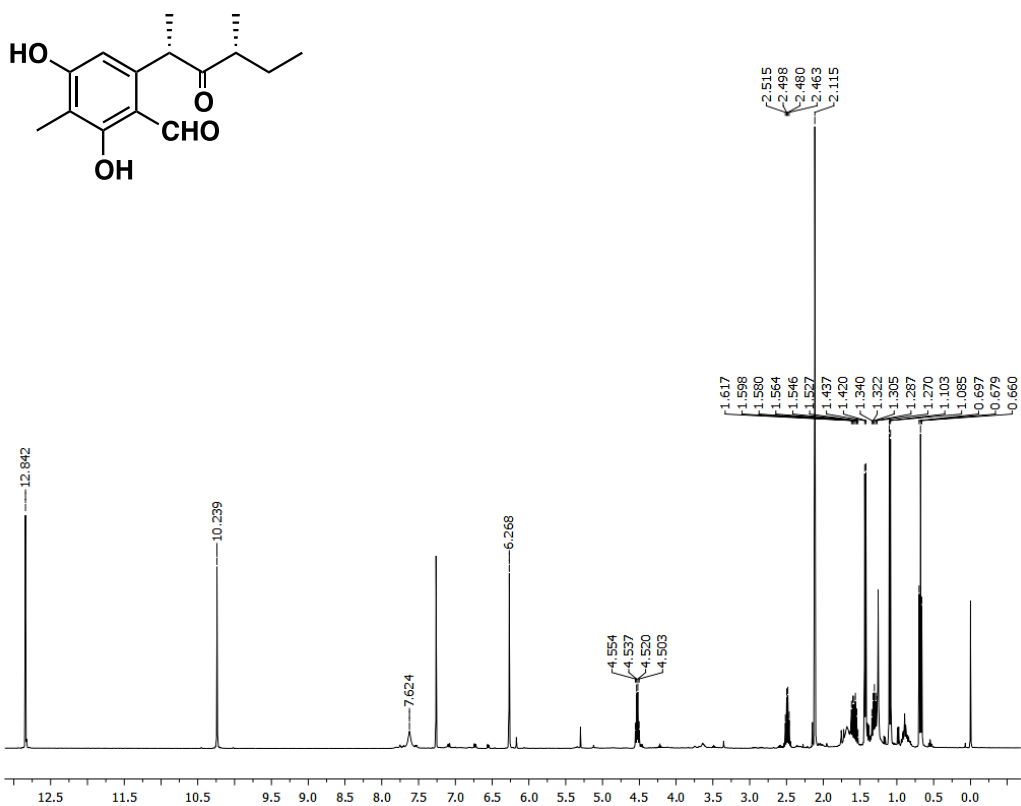
**Espectro A16.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la vermehotina (**82**) en  $\text{MeOH-}d_4$  (100 MHz).



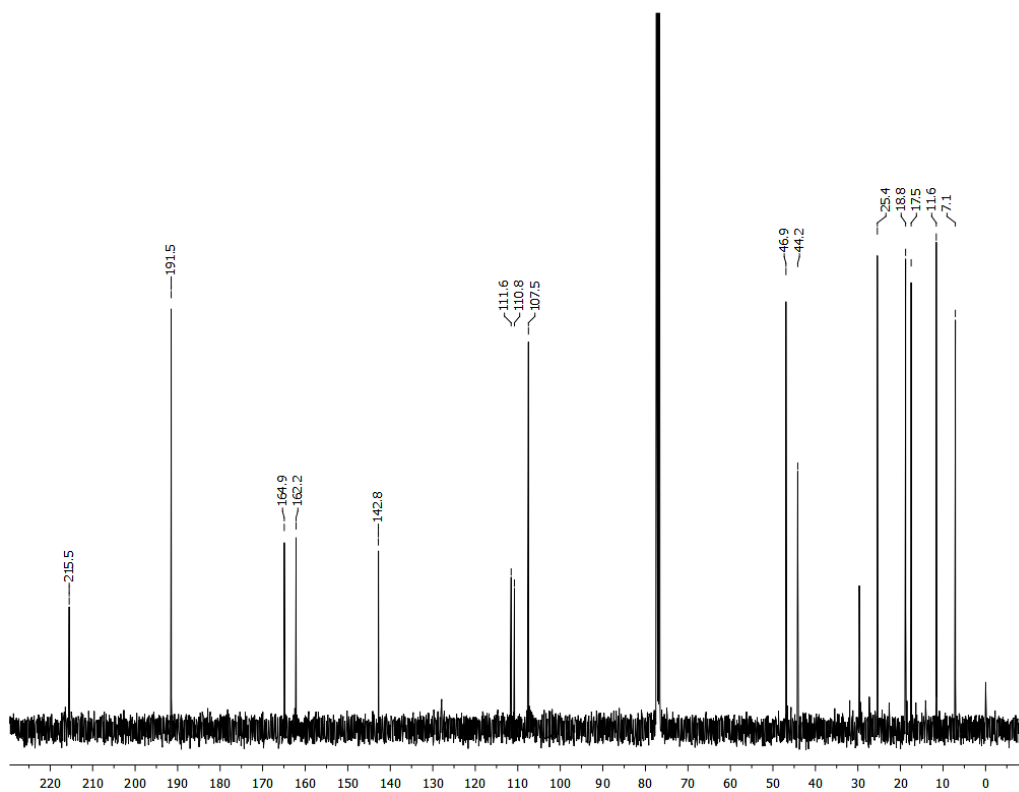
**Espectro A17.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la vermehotina (**82**) en  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz).



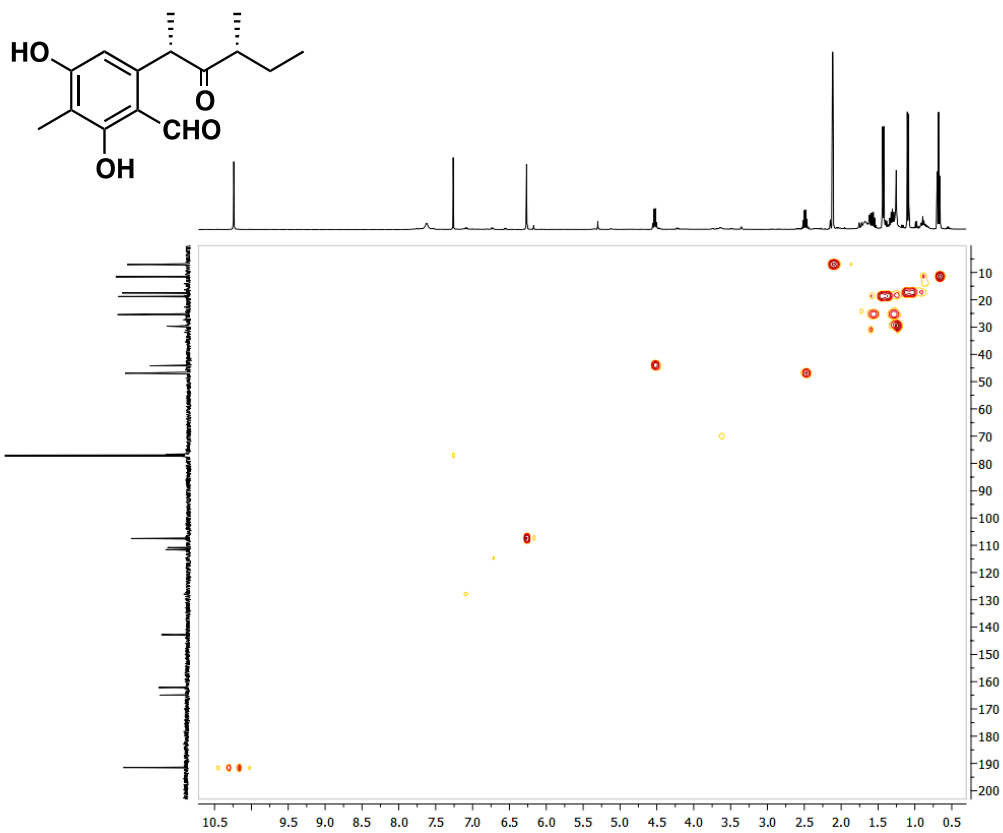
**Espectro A18.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la vermehotina (**82**) en  $\text{D}_2\text{O}$  (100 MHz).



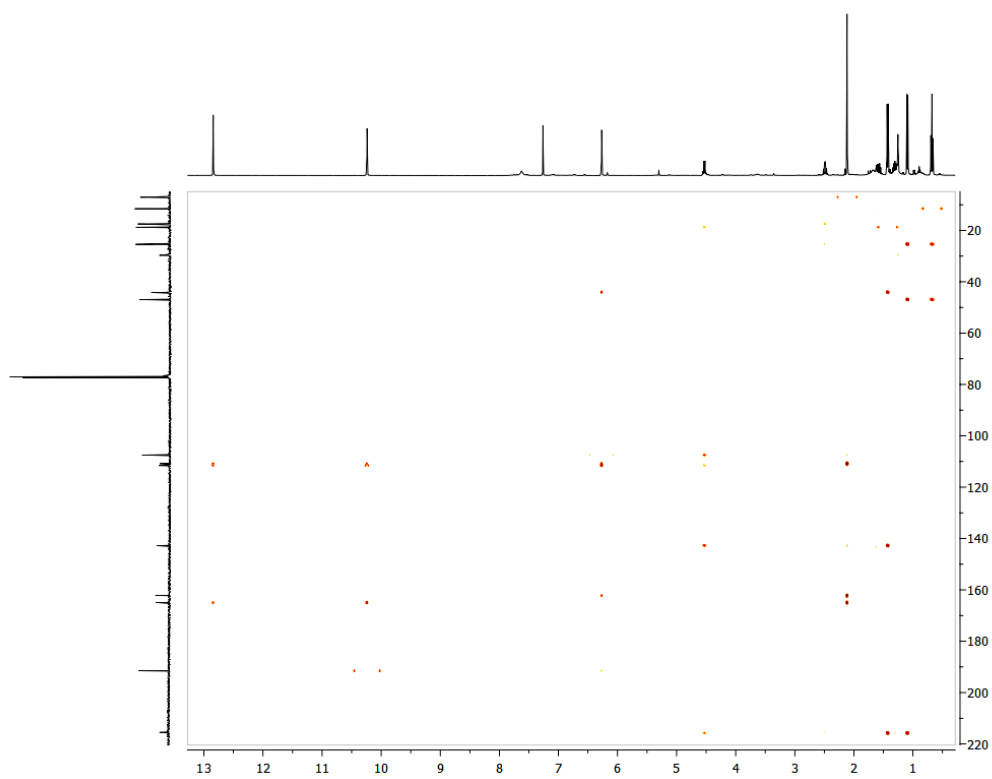
**Espectro A19.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



**Espectro A20.** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en CDCl<sub>3</sub> (100 MHz).

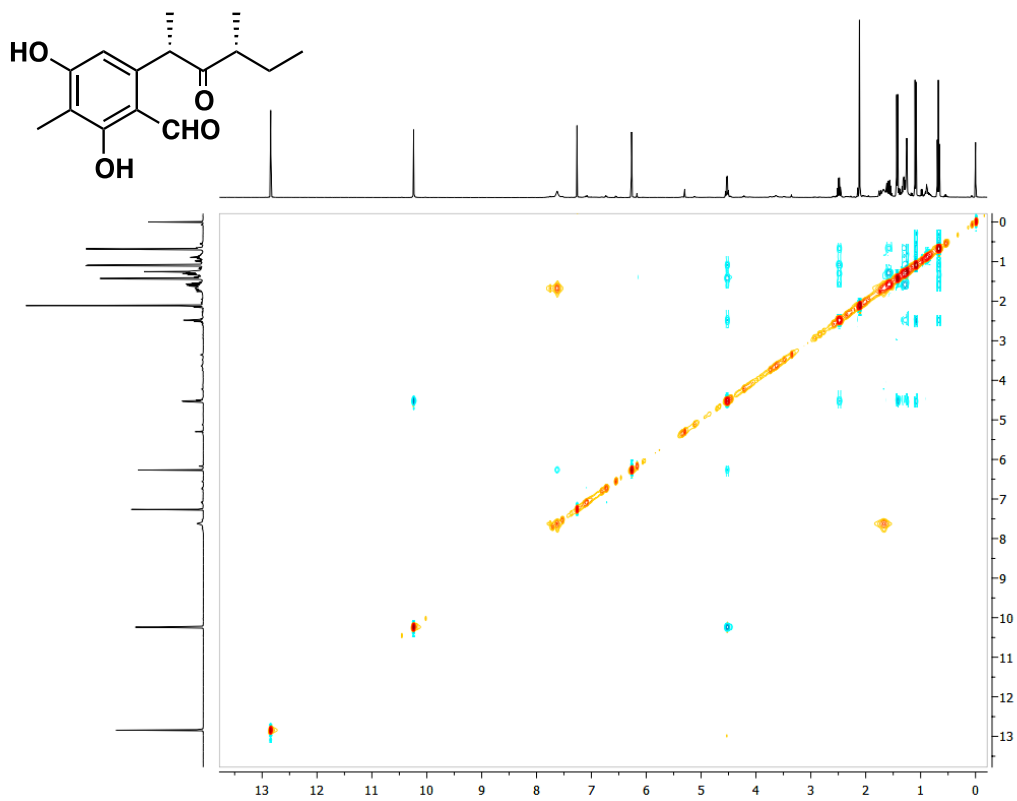


**Espectro A21.** Espectro de HSQC de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en CDCl<sub>3</sub>.

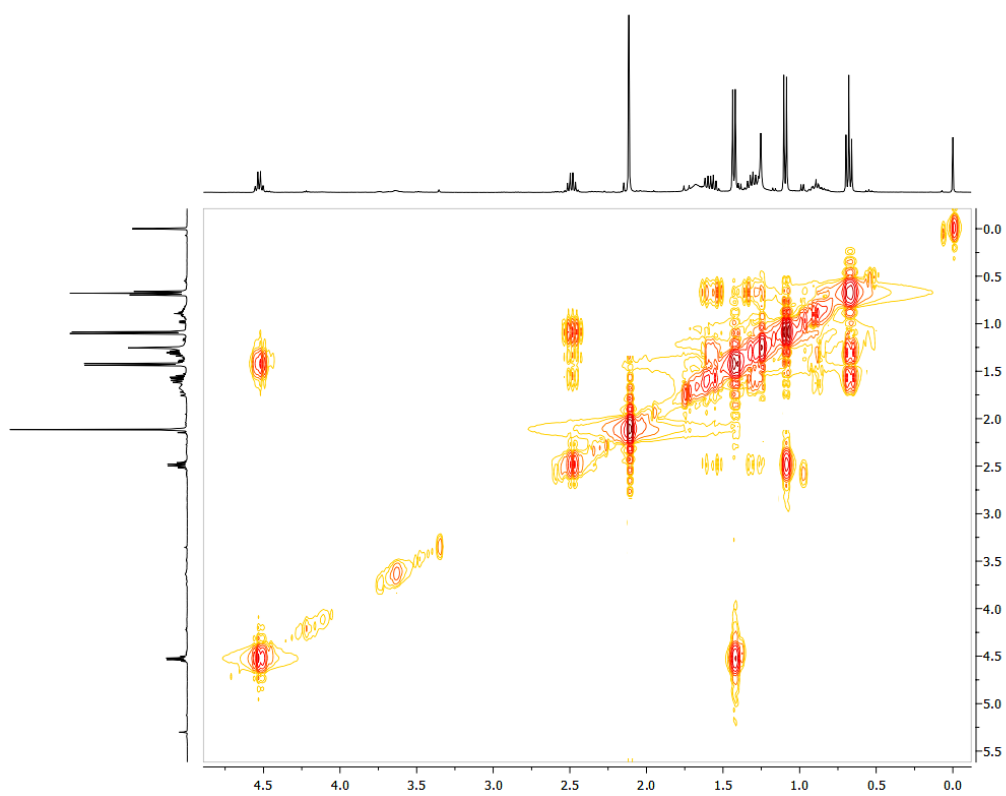


**Espectro A22.** Espectro de HMBC de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en CDCl<sub>3</sub>.



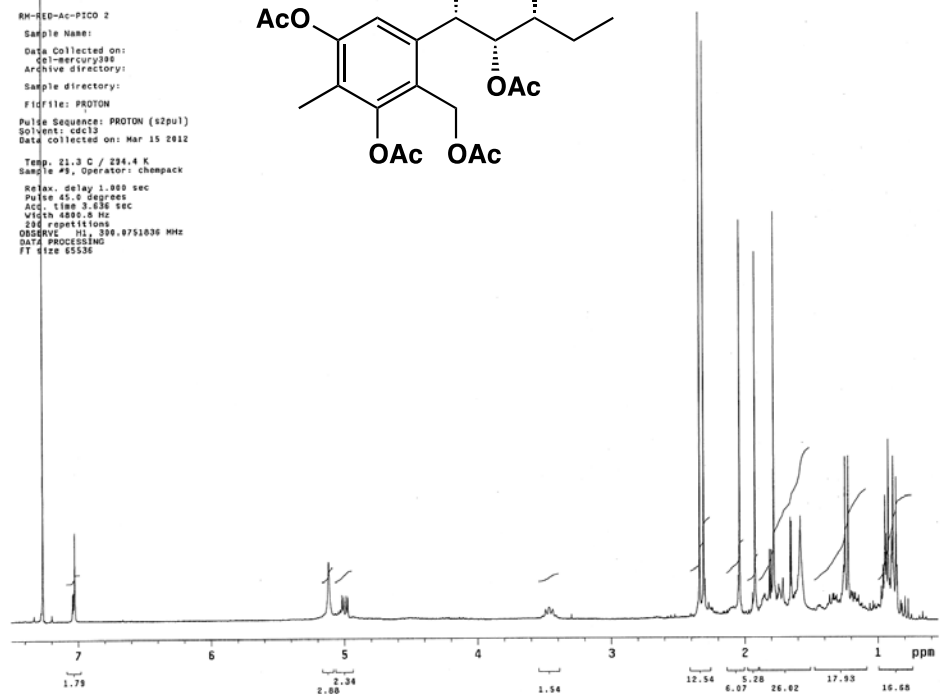
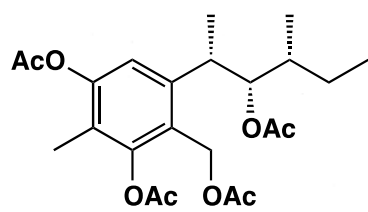


**Espectro A23.** Espectro de NOESY de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en CDCl<sub>3</sub>.



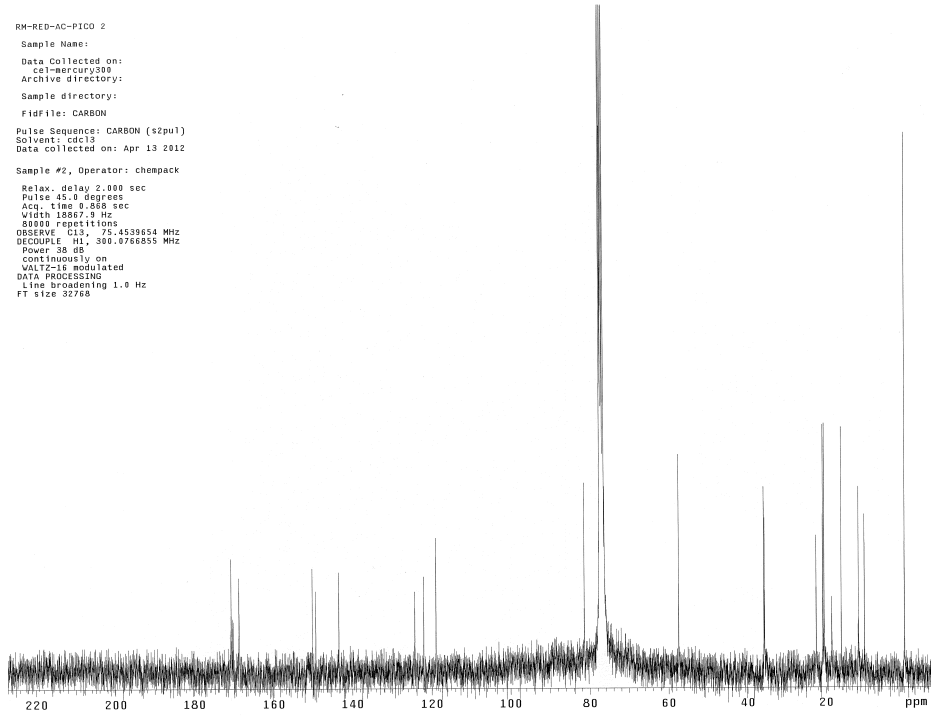
**Espectro A24.** Espectro de COSY de la 9*S*,11*R*-(+)-ascosalitoxina (**83**) en CDCl<sub>3</sub>.

RM-RED-AC-PICO 2  
 Sample Name:  
 Data Collected on:  
 cel-mercury300  
 Archive directory:  
 Sample directory:  
 Fidfile: PROTON  
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Mar 15 2012  
 Temp. 21.3 C / 294.4 K  
 Sample #9, Operator: chempack  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 3.636 sec  
 Width 8880.0 Hz  
 336 repetitions  
 OBSERVE H1, 399.8751036 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 65536



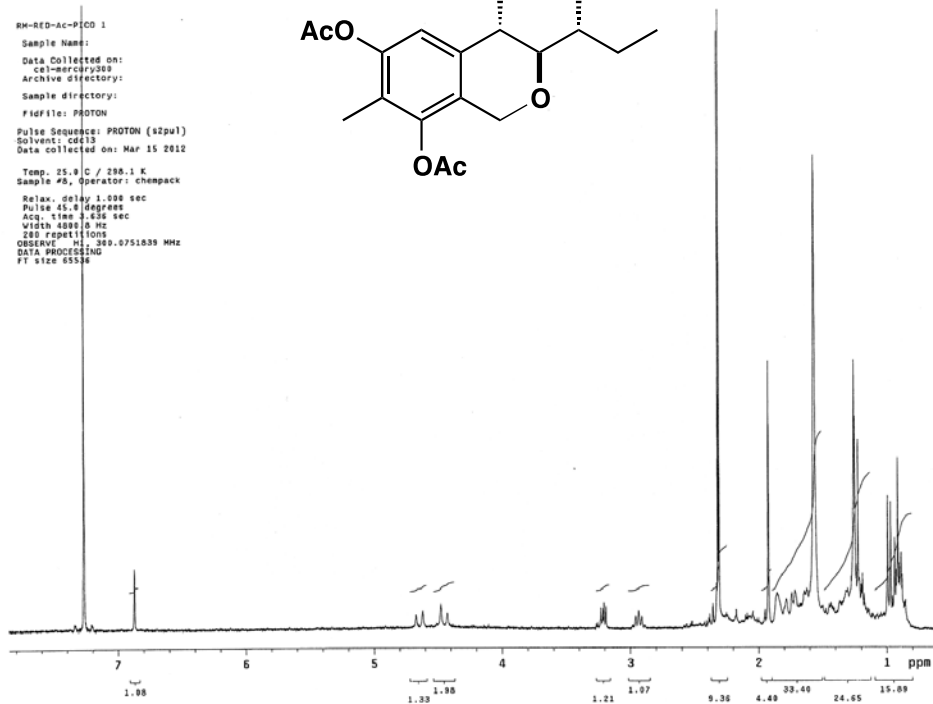
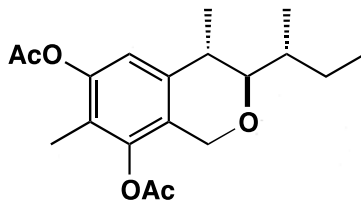
**Espectro A25.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del derivado **83-1** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

RM-RED-AC-PICO 2  
 Sample Name:  
 Data Collected on:  
 cel-mercury300  
 Archive directory:  
 Sample directory:  
 Fidfile: CARBON  
 Pulse Sequence: CARBON (s2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Apr 13 2012  
 Sample #2, Operator: chempack  
 Relax. delay 2.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 0.808 sec  
 Width 18667.0 Hz  
 8000 repetitions  
 OBSERVE C13, 75.4539654 MHz  
 DECOUPLE H1, 399.8760855 MHz  
 Power 38 dB  
 continuously on  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 32768



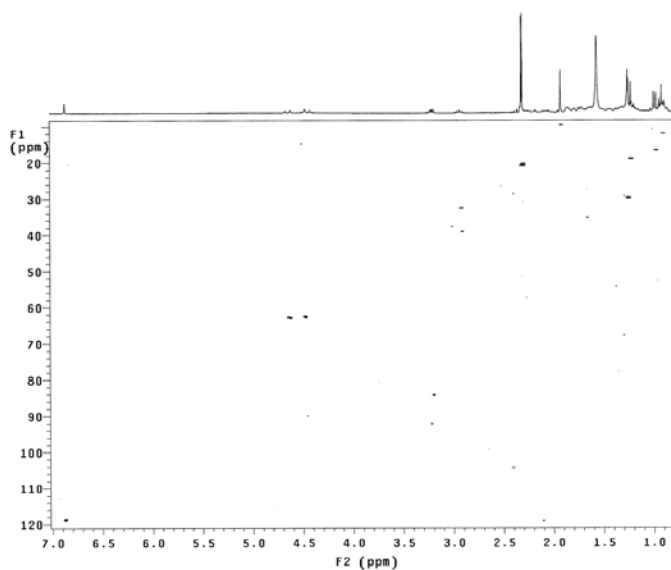
**Espectro A26.** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del derivado **83-1** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

RM-RED-AC-PICO 1  
 Sample Name:  
 Data Collected on:  
 cel-mercury300  
 Archive directory:  
 Sample directory:  
 Fidfile: PROTON  
 Pulse Sequence: PROTON (szpul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Mar 15 2012  
 Temp. 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #6, Operator: chempack  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.636 sec  
 Width 4000.0 Hz  
 285 repetitions  
 OBSERVE: H1, 300.0751839 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 65536



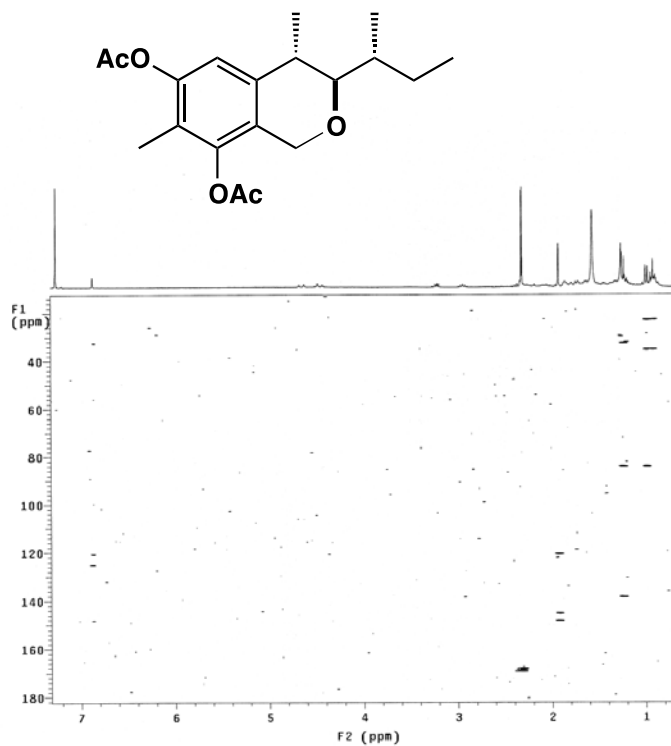
**Espectro A27.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del derivado **83-2** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

RM-RED-AC-PICO 1  
 Sample Name:  
 p1c01  
 Data Collected on:  
 aux111ar-mercury300  
 Archive directory:  
 /home/vnmr1/vnmrSYS/data  
 Sample directory:  
 p1c01\_20120412\_01  
 Fidfile: p1c01\_gHSQC\_01  
 Pulse Sequence: gHSQC  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Apr 12 2012  
 Temp. 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #5, Operator: vnmr1  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 9.158 sec  
 Width 4800.8 Hz  
 2D Width 12865.7 Hz  
 32 repetitions  
 2 x 512 increments  
 OBSERVE: H1, 300.0441671 MHz  
 DECOUPLE: C13, 75.4518248 MHz  
 Power 46.00  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 GAUSS Apodization 0.669 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.637 sec  
 FT size 2048 x 4096  
 Total time 11 hr. 04 min

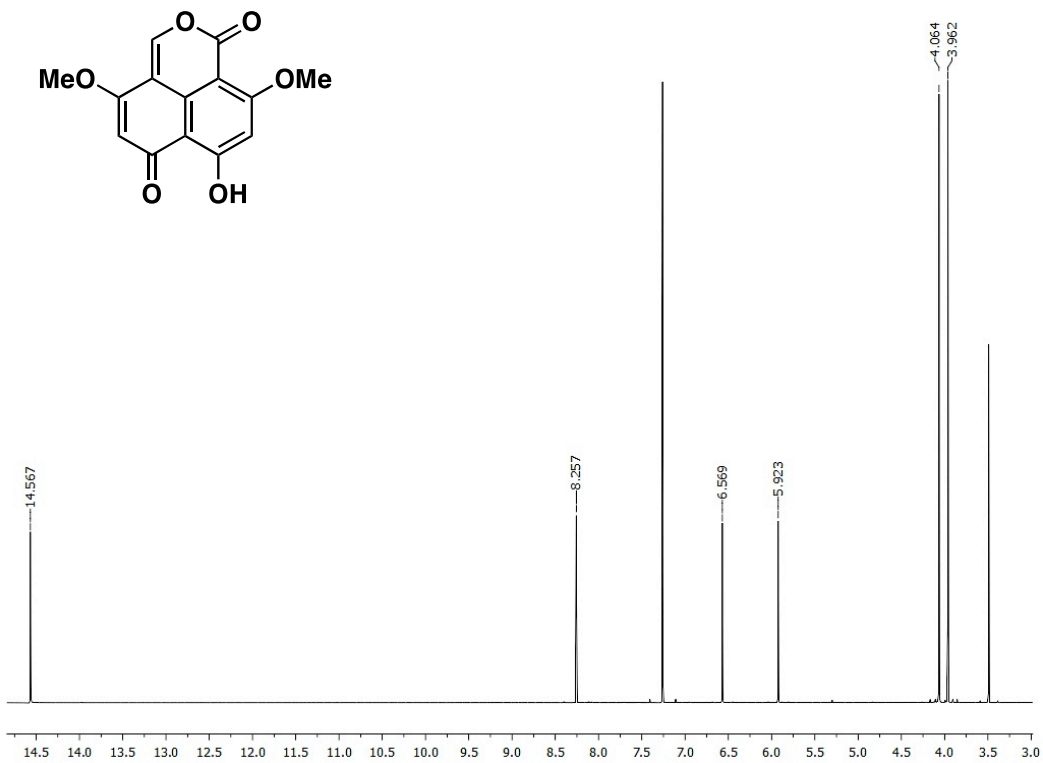


**Espectro A28.** Espectro de HSQC del derivado **83-2**.

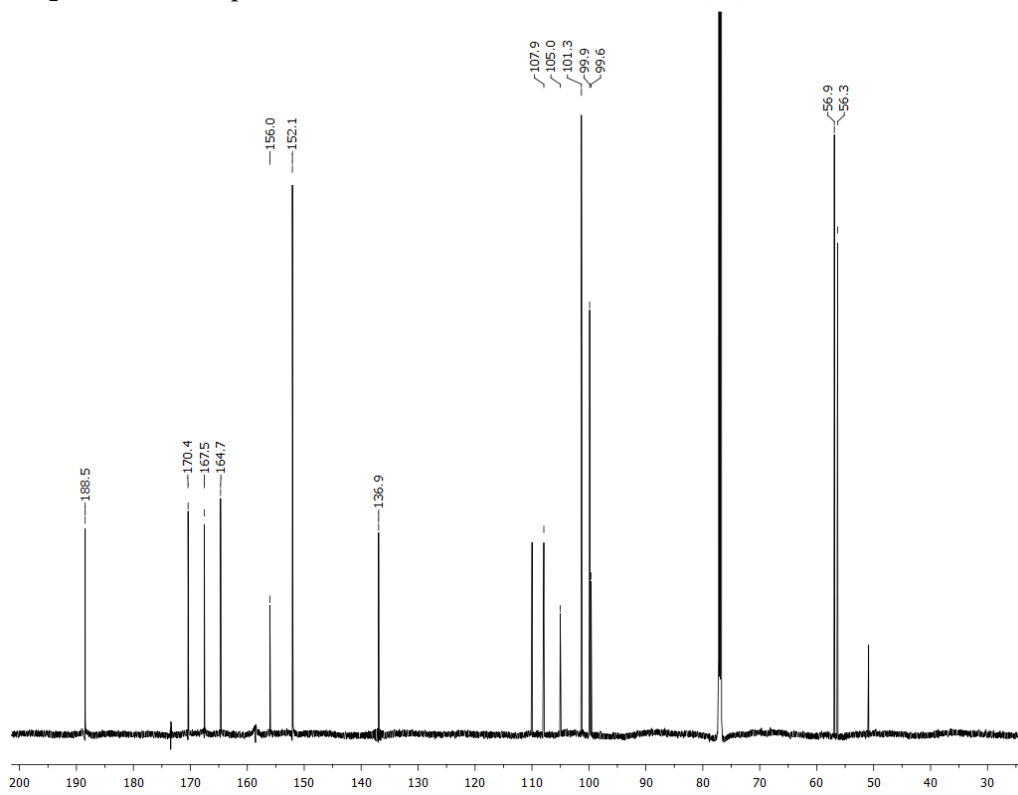
RN-RED-AC-PICO 1  
Sample Name: PICO1  
Data Collected on: aut1tar-mercury350  
Archive directory: /home/vmr1/vmrsys/data  
Sample directory: pico1\_20120412\_01  
Fidfile: pico1\_gHMBC\_01  
Pulse Sequence: gHMBC  
Solvent: cdcl3  
Data collected on: Apr 12 2012  
Temp. 25.0 C / 298.1 K  
Sample #5, Operator: vmr1  
Relax. delay 1.000 sec  
Acq. time 3.190 sec  
Width 4000.0 Hz  
20 Width 18107.7 Hz  
64 repetitions  
2 x 512 increments  
OBSERVE: H1, 380.0441671 MHz  
DATA PROCESSING  
Sf. size 6611 x 0.075 sec  
F1 DATA PROCESSING  
Gauss apodization 0.026 sec  
F1 size 2048 x 4096  
Total time 23 hr, 29 min



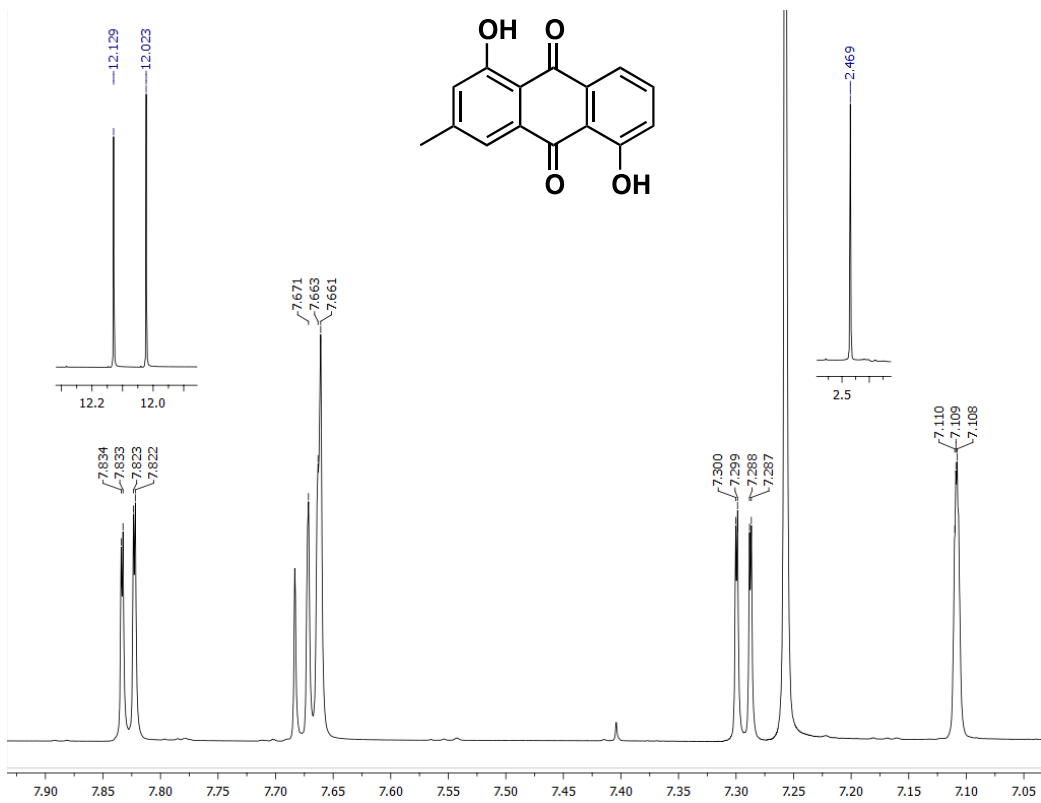
**Espectro A29.** Espectro de HMBC del derivado **83-2**.



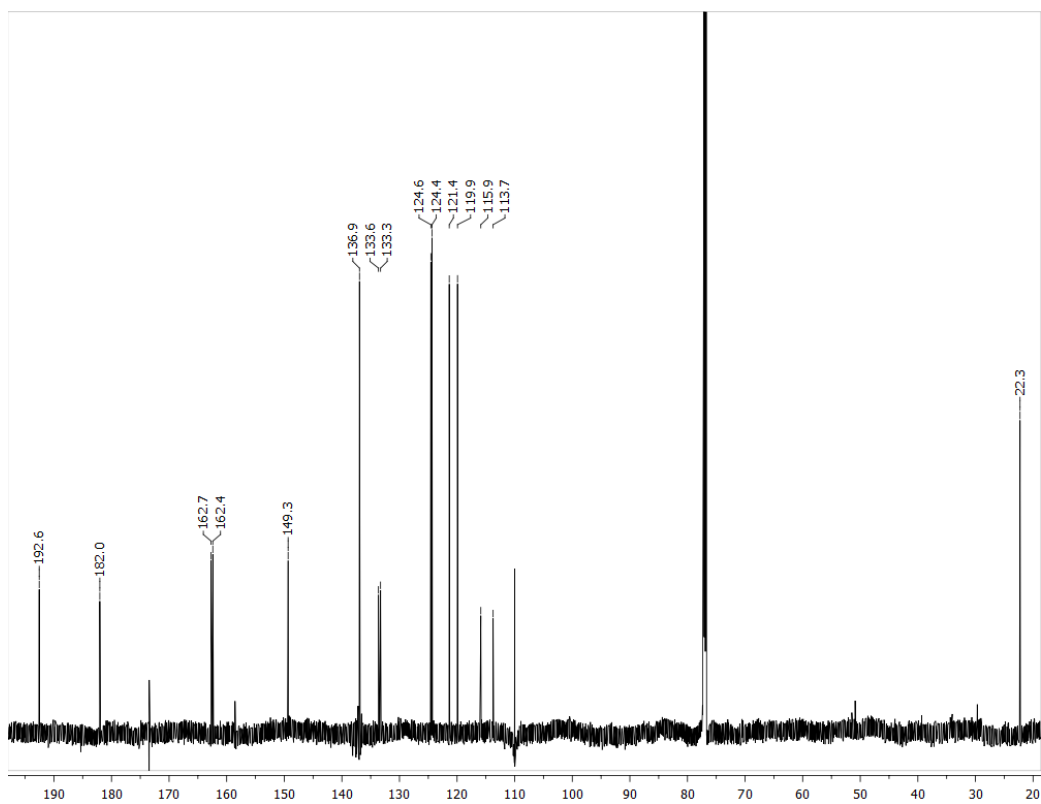
**Espectro A30.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la corimbiferona (**84**) en CDCl<sub>3</sub> (700 MHz).



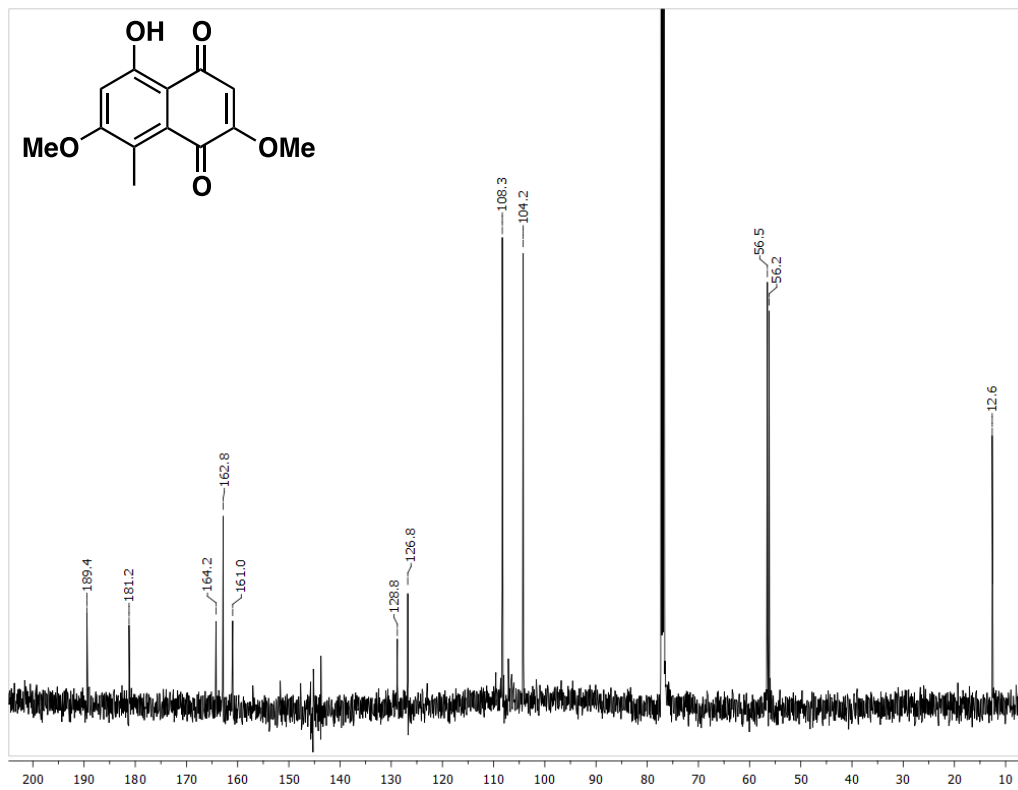
**Espectro A31.** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN de la corimbiferona (**84**) en CDCl<sub>3</sub> (175 MHz).



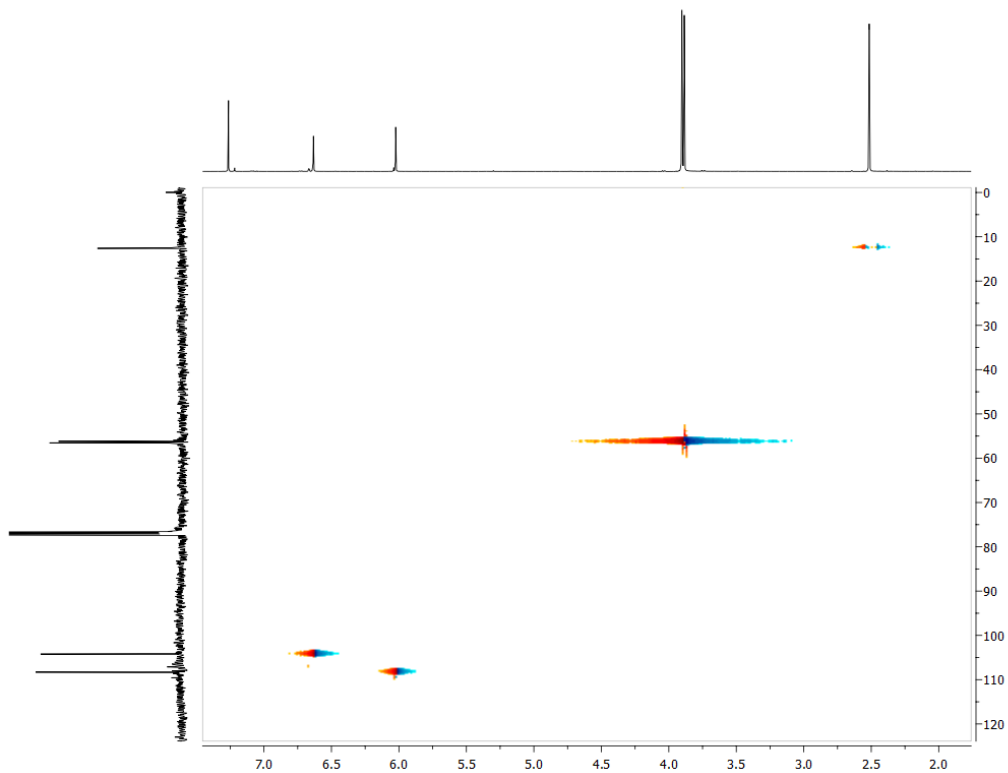
**Espectro A32.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la ziganeina (**85**) en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).



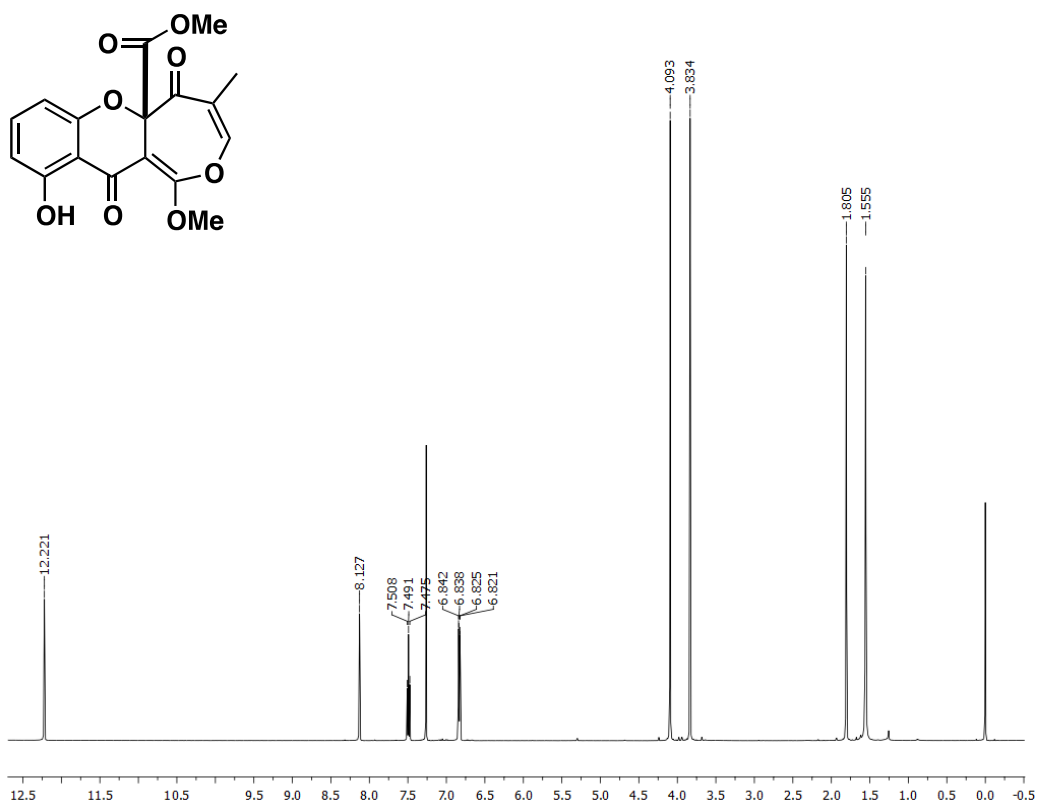
**Espectro A33.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la ziganeina (**85**) en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).



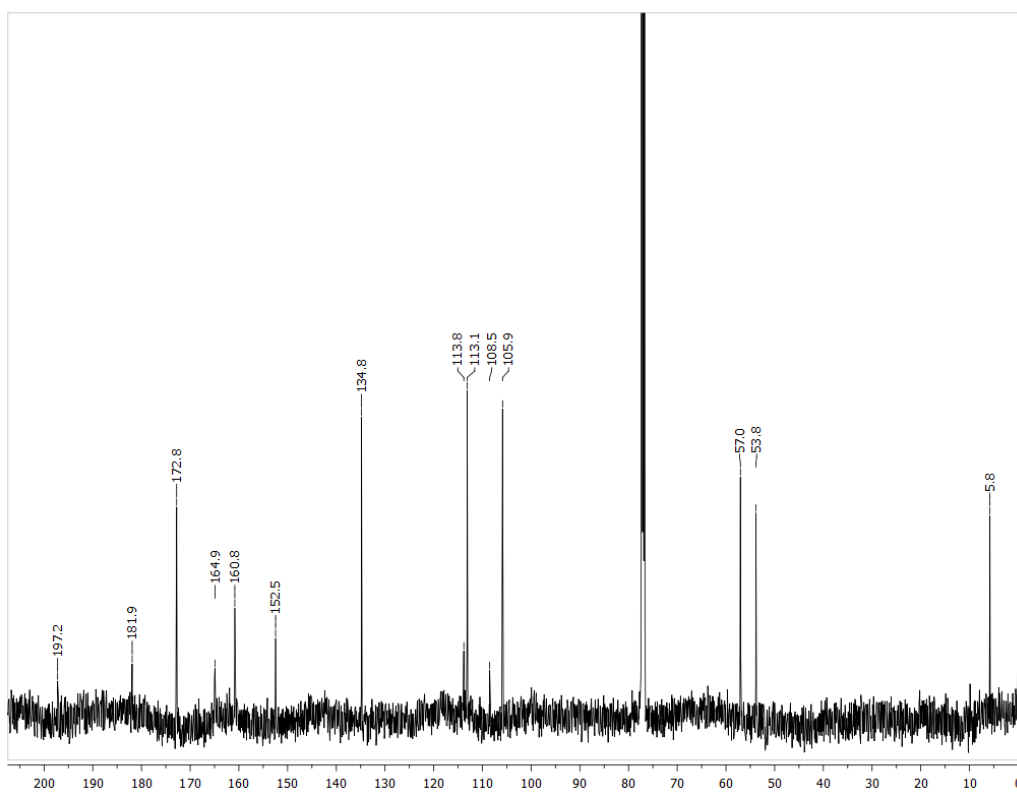
**Espectro A34.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**) en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).



**Espectro A35.** Espectro de HSQC del 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**86**) en  $\text{CDCl}_3$ .

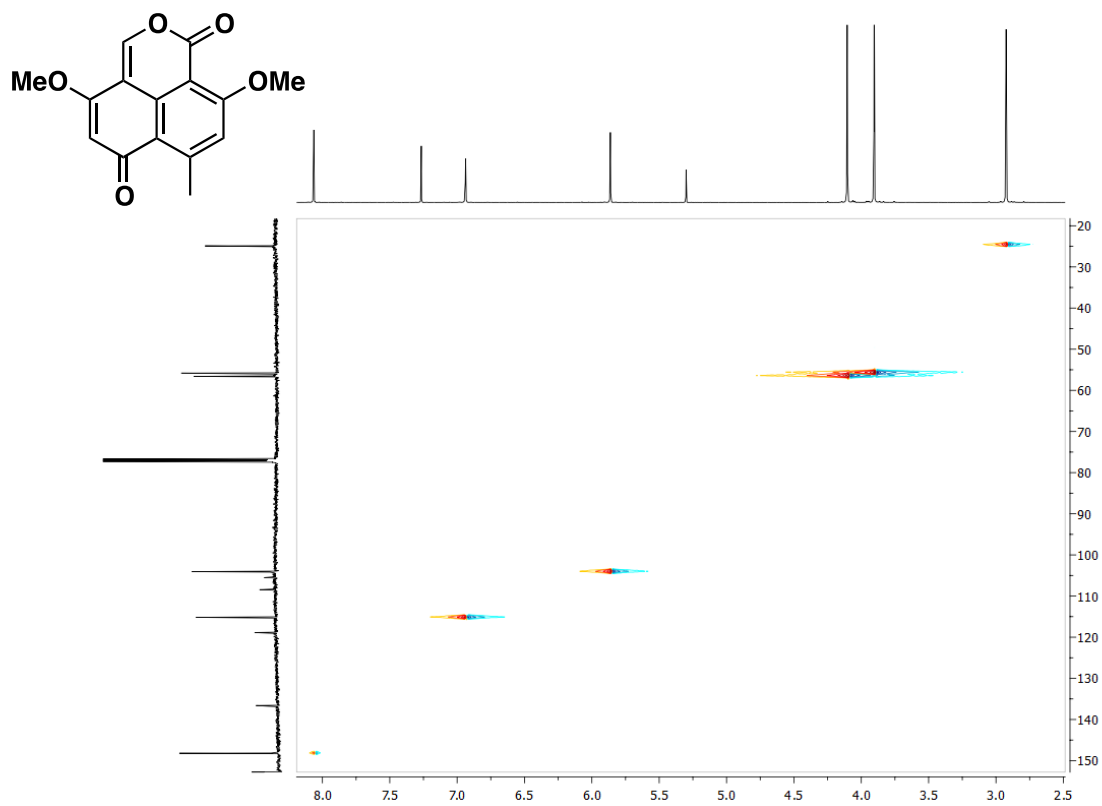


**Espectro A36.** Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del brocaenol B (**87**) en  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

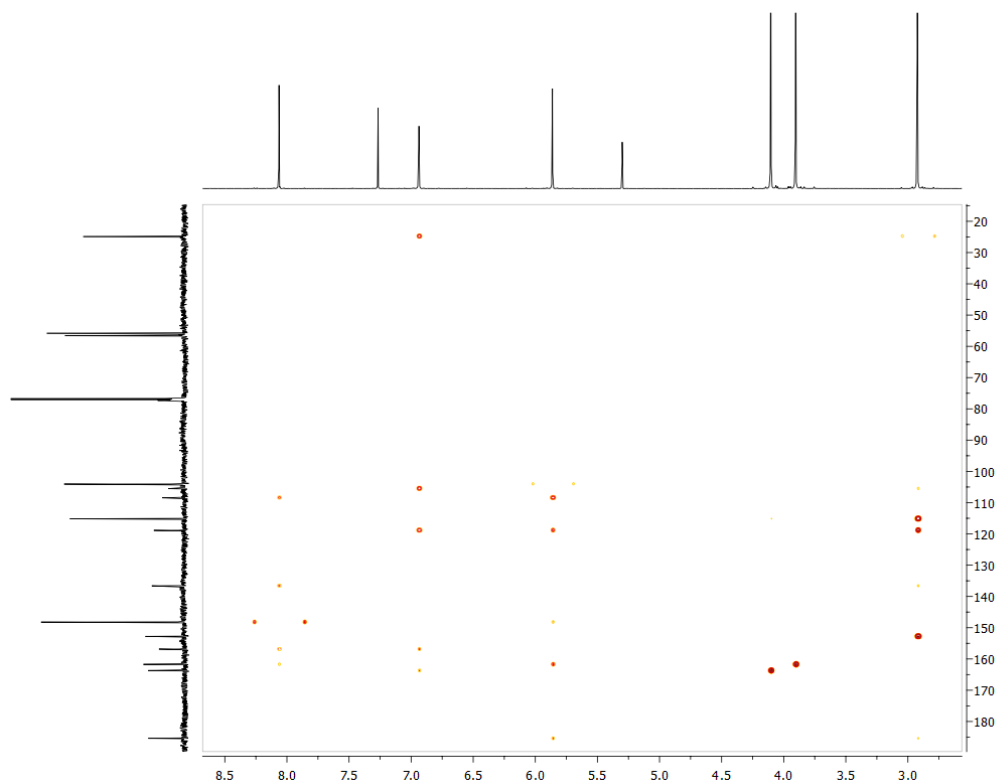


**Espectro A37.** Espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  del brocaenol B (**87**) en  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).

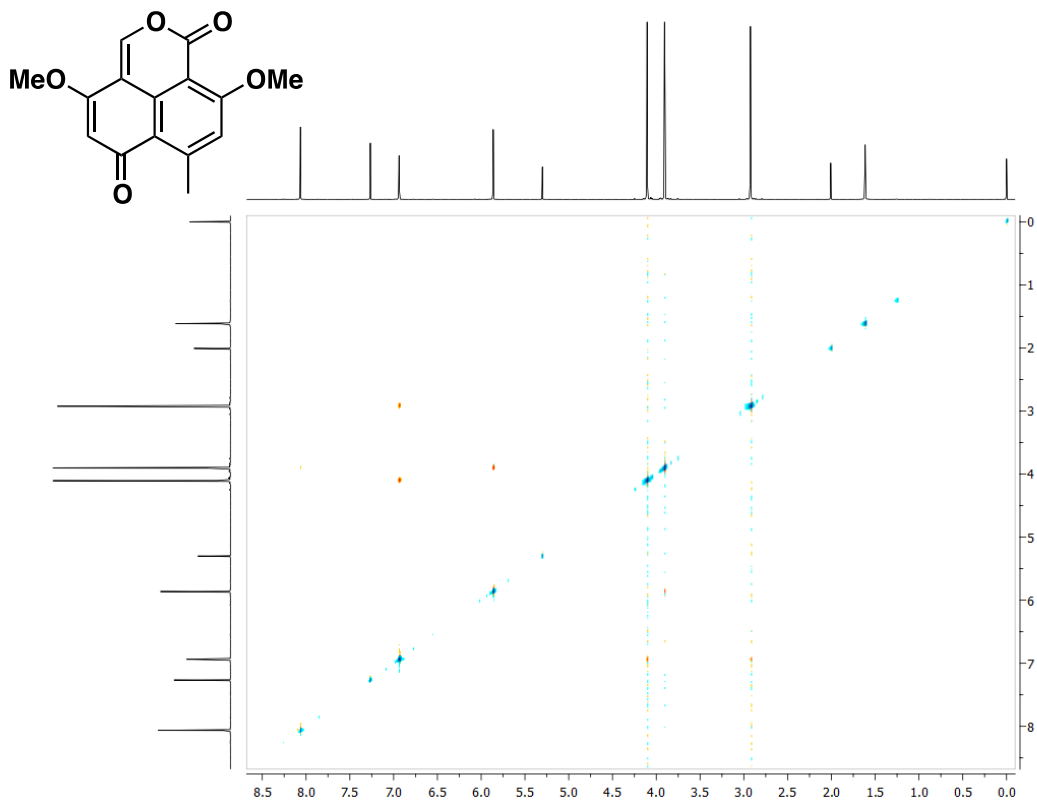




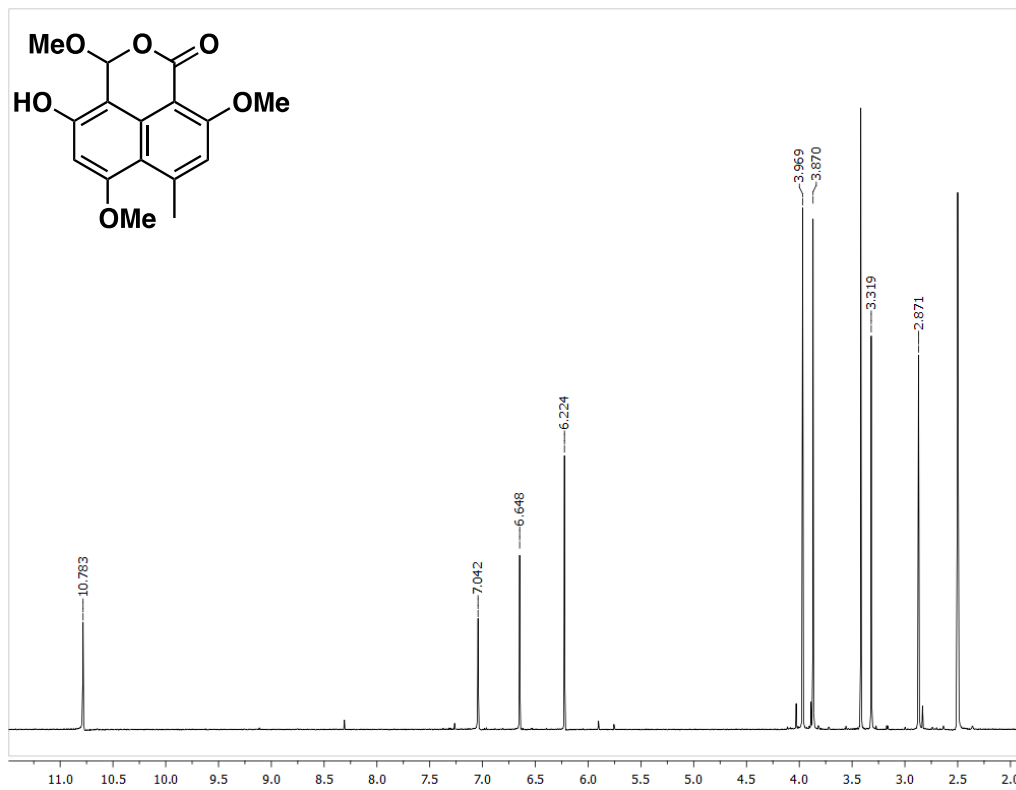
**Espectro A38.** Espectro de HSQC de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (88) en CDCl<sub>3</sub>.



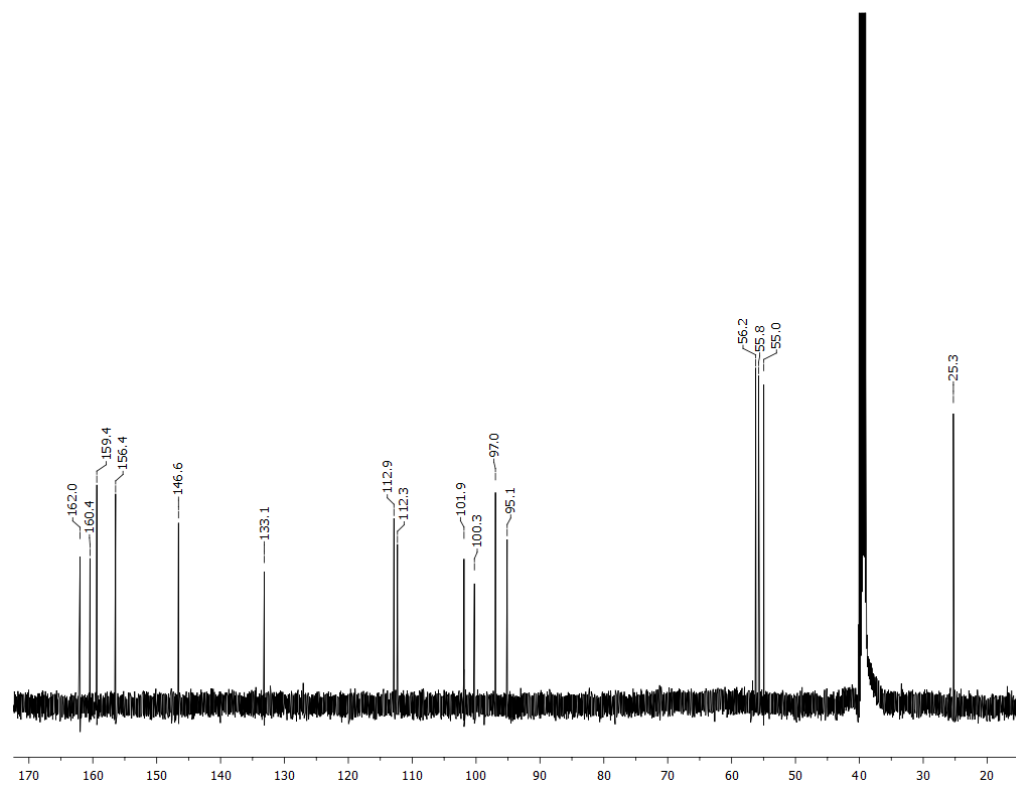
**Espectro A39.** Espectro de HMBC de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocromen-1,9-diona (88) en CDCl<sub>3</sub>.



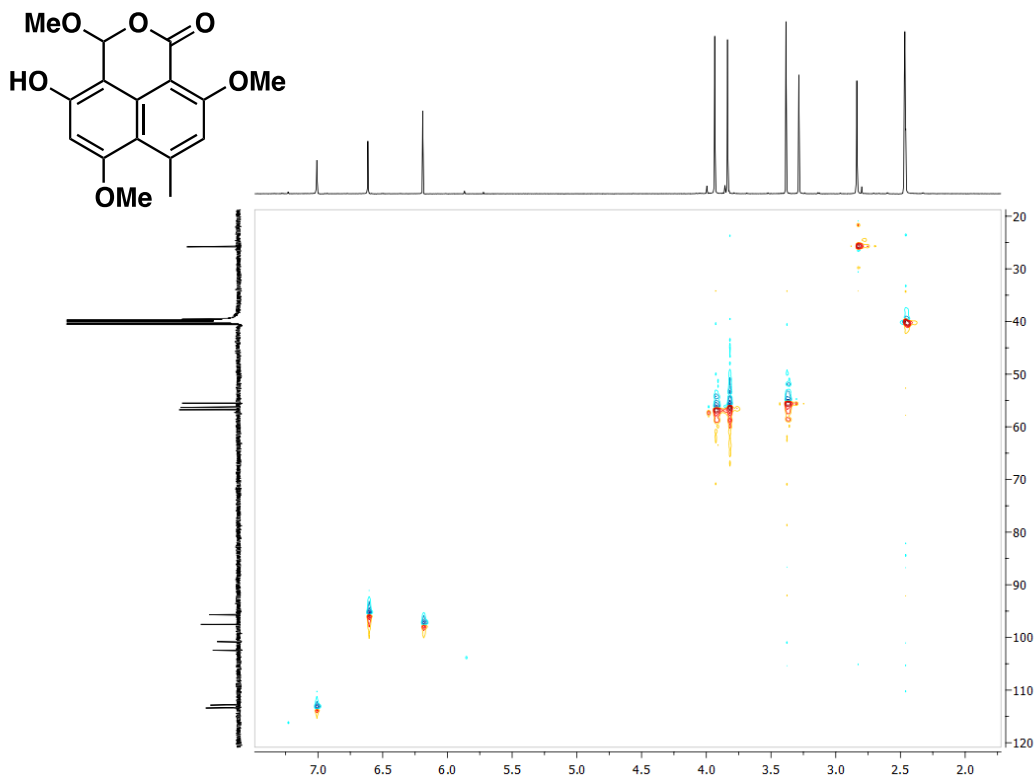
**Espectro A40.** Espectro de NOESY de la 3,6-dimetoxi-8-metil-1*H*,6*H*-benzo[*de*]isocroten-1,9-diona (**88**) en CDCl<sub>3</sub>.



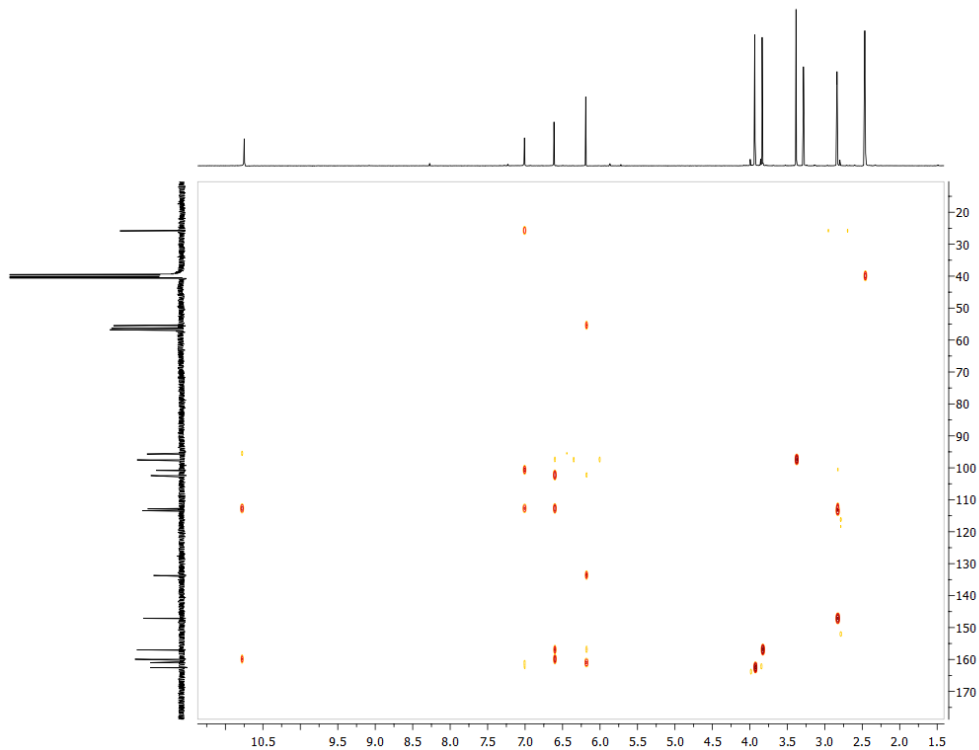
**Espectro A41.** Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1H,3H-benzo[de]isocromen-9-ona (**89**) en  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz).



**Espectro A42.** Espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1H,3H-benzo[de]isocromen-9-ona (**89**) en  $\text{DMSO-}d_6$  (125 MHz).



**Espectro A43.** Espectro de HSQC de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**) en DMSO-*d*<sub>6</sub>.



**Espectro A44.** Espectro de HMBC de la 3-hidroxi-1,6,10-trimetoxi-8-metil-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isocromen-9-ona (**89**) en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

## (+)-Ascosalitoxin and Vermelhotin, a Calmodulin Inhibitor, from an Endophytic Fungus Isolated from *Hintonia latiflora*<sup>1</sup>

Martha Leyte-Lugo,<sup>†</sup> Martín González-Andrade,<sup>†</sup> María del Carmen González,<sup>‡</sup> Anthony E. Glenn,<sup>§</sup> Carlos M. Cerda-García-Rojas,<sup>\*,⊥</sup> and Rachel Mata<sup>\*,†</sup>

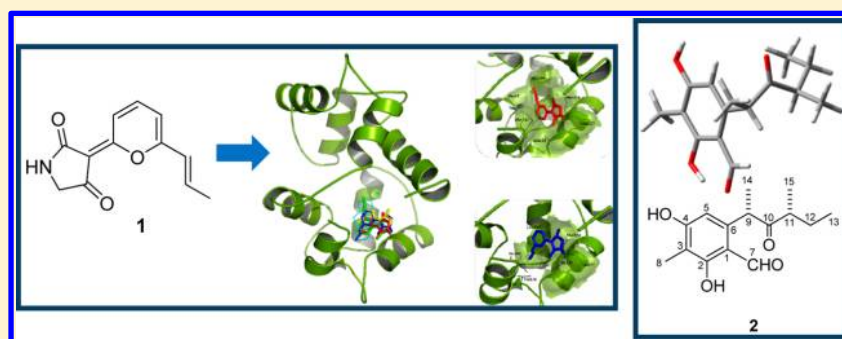
<sup>†</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

<sup>‡</sup>Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

<sup>§</sup>Toxicology & Mycotoxin Research Unit, 950 College Station Road, USDA-ARS, Russell Research Center, Athens, Georgia 30605, United States

<sup>⊥</sup>Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, México DF, 07000, Mexico

### S Supporting Information



**ABSTRACT:** Chemical investigation of the endophytic MEXU 26343, isolated from the medicinal plant *Hintonia latiflora*, yielded the known polyketide vermelhotin (**1**) and a new salicylic aldehyde derivative, namely, 9S,11R-(+)-ascosalitoxin (**2**). The structure and absolute configuration of the new compound were established through extensive NMR spectroscopy and molecular modeling calculations at the DFT B3LYP/DGDZVP level, which included the comparison between theoretical and experimental optical rotation values. In addition, chemical transformations of **2** yielded suitable derivatives for NOESY and <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NMR coupling constant analyses, which reinforce the stereochemical assignment. The potential affinity of **1** and **2** with (Ca<sup>2+</sup>)<sub>4</sub>-hCaM in solution was measured using the fluorescent biosensor hCaM M124C-mBBR. The results showed that **1** bound to the protein with a dissociation constant (*K*<sub>d</sub>) of 0.25 ± 0.04 μM, close to that of chlorpromazine (*K*<sub>d</sub> = 0.64 ± 0.03 μM), a classical CaM inhibitor. The stoichiometry ratio of **1** to (Ca<sup>2+</sup>)<sub>4</sub>-hCaM was 1:4, similar to other well-known CaM ligands.

Calmodulin (CaM) is the major ubiquitous Ca<sup>2+</sup>-binding protein of all eukaryotes, fundamental to the regulation of several cellular events.<sup>2</sup> From the structural point of view, CaM is an acidic small protein (~17 kD) composed of ~148 amino acids organized in two distinct N- and C-terminal globular domains.<sup>2</sup> The crystal structure of Ca<sup>2+</sup>-CaM (pdb code 1CLL) disclosed a protein with a dumbbell structure with a flexible α-helical central linker region. The flexibility of this linker allows CaM to adopt a variety of conformations and interact with, and activate, a surprisingly diverse set of target enzymes. These include nitric oxide synthases, adenylate cyclases, phosphodiesterases, several kinases, calcium-ATPase pumps, ion channels, phosphatases, and cytoskeletal structural proteins. Consequently, CaM is implicated in a variety of cellular functions, including cell growth and proliferation, inflammation, short- and long-term memory, muscle contraction and relaxation, learning, osteoclastogenesis, mood and anxiety, viral penetration, cell growth and differentiation, the immune response,

and the cell cycle, associating it with AIDS, Alzheimer's, some cancers, and other diseases.<sup>2–7</sup> Thus CaM is an important target for drugs useful for the treatment of such diseases.

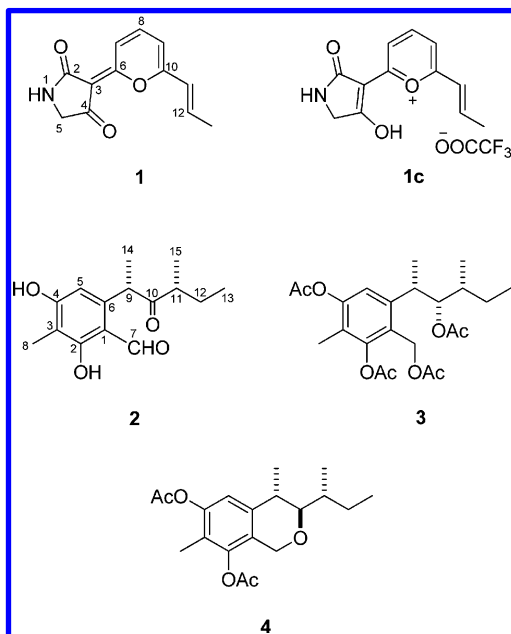
In plants CaM has also been implicated in several processes including growth and protection,<sup>2</sup> making CaM a potential herbicide target. Some enzymes exclusive to plants, for example, are regulated by CaM. Other proteins, although not exclusive to plants, are regulated by CaM only in plants. Unlike animals, higher plants express multiple CaM isoforms, two of which (SCaM-4 and SCaM-5) share 78% structural identity with vertebrate CaM. These isoforms might differentially regulate CaM-binding enzymes, and they could be specific targets for plant-growth inhibitors.

According to a recent review,<sup>2</sup> marine,<sup>8</sup> phytopathogenic, coprophilous, and a few terrestrial fungi represent an important

Received: May 7, 2012

Published: August 27, 2012

source of potent CaM inhibitors useful for the development of drugs, pesticides, or research tools, but the potential of endophytic fungi as a source of CaM inhibitors remains unexplored.<sup>2</sup> Therefore, considering their relevance as a source of novel biologically active natural products,<sup>9</sup> the present investigation was undertaken to discover novel CaM-inhibiting agents from a new endophytic fungus isolated from *Hintonia latiflora* (Sessé et Moc. ex DC.) Bull. (Rubiaceae), an antidiabetic and anti-inflammatory Mexican plant widely studied from the phytochemical and pharmacological points of view.<sup>10</sup>



## RESULTS AND DISCUSSION

In an attempt to analyze the pharmacological potential of *H. latiflora*'s endophytic fungi, strain MEXU 26343 was isolated from the plant and tested for its CaM inhibitor properties. An organic extract prepared from a culture of MEXU 26343 quenched the fluorescence of the CaM biosensor<sup>3</sup> *hCaM* M124-*mBBR* by 56%. Gel permeation chromatography of the active extract yielded four fractions (I–IV), and fraction III quenched the biosensor fluorescence by 63%. HPLC purification of the active fraction yielded compound **1** as an orange, amorphous solid, which was a mixture of *E*- and *Z*-vermelhotin. In 2006, Hosoe et al. isolated for the first time *E*-vermelhotin (**1a**) from an unidentified fungus; the compound was characterized by an X-ray analysis.<sup>11</sup> Kasetrathat et al. obtained the same compound and demonstrated that it underwent interconversion between the *E* (**1a**) and *Z* (**1b**) isomers, forming an equilibrium *E/Z* mixture with a ratio of 1:1 (Figure 1).<sup>12</sup> As in our case, such a mixture was not separable by HPLC. Our NMR data (see Supporting Information) were identical to that reported by Kasetrathat et al.<sup>12</sup> When the NMR (<sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H) spectra were recorded in CDCl<sub>3</sub>, a diastereoisomeric mixture (6.4:3.6, *E/Z* ratio) was obtained. In the presence of TFA-*d*, a single set of signals was observed, probably due to the generation of a pyrylium trifluoroacetate such as **1c**, where the double bonds are fixed at specific positions and the C3–C6 bond remained single, eliminating the possibility of geometric isomerism. The presence of

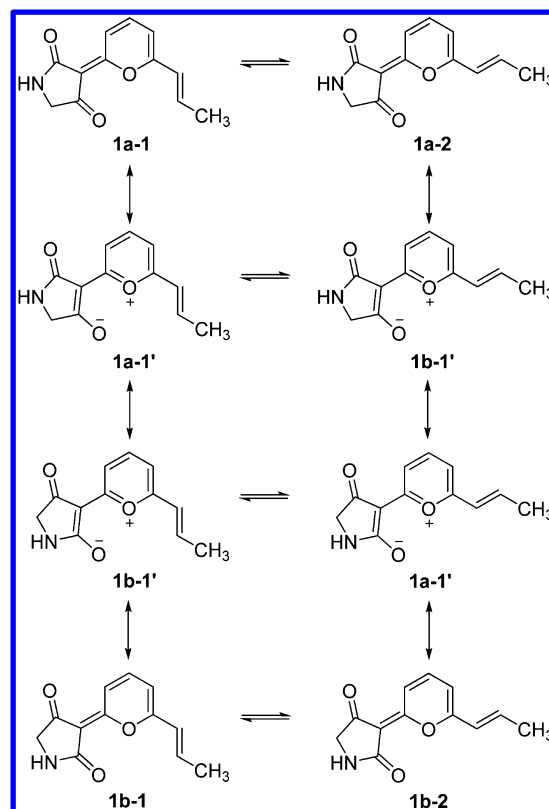


Figure 1. Isomeric and conformational equilibrium of vermelhotin (**1**).

zwitterionic species **1a** and **1b** or salts such as **1c** could explain the water solubility of vermelhotin (**1**). Density functional theory (DFT) calculations for both isomers at the B3LYP/DGDZVP level<sup>13,14</sup> revealed that **1a** was the most stable. In each case, a Monte Carlo conformational search was performed, and the results revealed that both **1a** and **1b**, contributing 64.2% and 35.8%, respectively, to the overall equilibrium, possessed two conformers with **1a-1** and **1b-1** being the most stable.

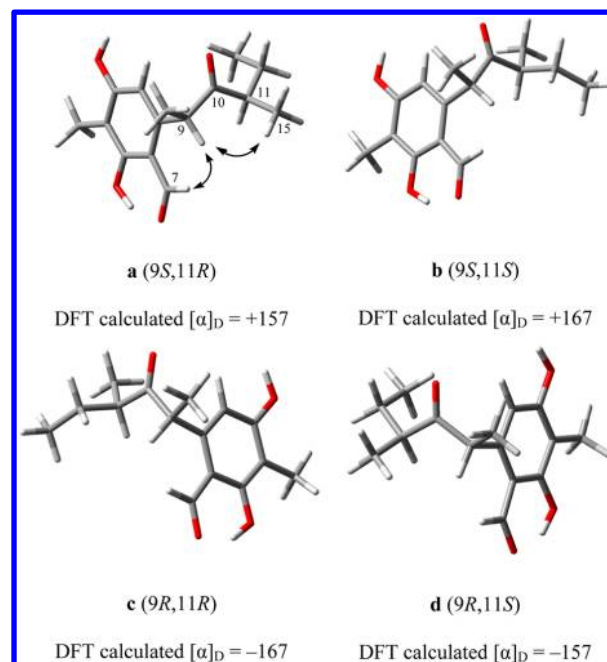
Inactive fraction F<sub>II</sub> contained a major component, which was purified by TLC to yield compound **2**, obtained as a dextrorotatory yellowish oil. Although inactive in the binding assay, the compound was characterized to contribute to the knowledge of the chemistry of the new fungus. Thus, the HREI mass spectrum revealed a molecular ion [M]<sup>+</sup> consistent with a molecular formula of C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>. The UV spectrum indicated the presence of a conjugated aromatic compound [ $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) at 221 (4.92) and 296 (4.51) nm]; the IR (KBr) showed absorption bands for a hydroxyl (3387 cm<sup>-1</sup>), a branched ketone, and an aromatic aldehyde with intramolecular hydrogen bond (1698 cm<sup>-1</sup>) groups. The NMR data of **2** (Table 1) supported a methyl salicylic aldehyde ( $\delta_{\text{C}}$  191) derivative possessing a pentasubstituted benzene ring [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  6.27 (s)/107.5, 110.8, 111.6, 142.8, 162.2 and 164.9], a dimethylated ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1.09, d, *J* = 7.2 Hz/17.5 and 1.43, d, *J* = 6.8 Hz/18.8) side chain with a ketone ( $\delta_{\text{C}}$  215) functionality, and two hydroxyl groups. The <sup>1</sup>H NMR signal at  $\delta_{\text{H}}$  12.84 was consistent with the presence of a chelated hydroxyl group *ortho* to the aldehyde group. The HMBC correlation of C-2 and C-4 confirmed the position of the methyl and hydroxyl groups at C-3 and C-4, respectively. Finally the HMBC correlations (Table 1) observed for the ketone group provided the planar structure of the side chain. The spectral data were identical to those

**Table 1.** NMR Data for 9*S*,11*R*-(+)-Ascosalitoxin (**2**) in CDCl<sub>3</sub> (400 and 100 MHz)

position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	HMBC <sup>a</sup>	NOESY
1	111.6		5, 7, 9	
2	164.9		OH-2, 7, 8	
3	110.8		8	
4	162.2		5,8	
5	107.5	6.27, s	8, 9	14
6	142.8		9, 14	
7	191.5	10.24, s		9
8	7.1	2.11, s		
9	44.2	4.53, q (6.8)	5, 14	7, 14, 15
10	215.5		9, 14, 15	
11	46.9	2.50, tq (6.8, 7.2)	13, 15	12, 15
12	25.4	1.57, ddq (14.0, 7.5, 6.8) 1.31, dq (14.0, 7.2)	13, 15	13
13	11.6	0.67, t (7.2, 7.5)	11, 12	12
14	18.8	1.43, d (6.8)	9	5, 9
15	17.5	1.09, d (7.2)	11, 12	9, 11
OH-2		12.84, s		
OH-4		7.63, s		

<sup>a</sup>HMBC correlations are from the carbon stated to the indicated hydrogen.

reported for the levorotatory fungal toxin ascosalitoxin isolated from *Ascochyta pisi* var. *pisii*,<sup>15</sup> suggesting their enantiomeric relationship. The NOESY and HMBC correlations (Table 1) confirmed the position of the substituents along the aromatic core and at the side chain. In that report the configuration of the stereogenic centers was not assigned. Therefore, molecular modeling and optical rotation calculations together with chemical transformations were carried out to assign the absolute configuration of **2** and ascosalitoxin. Theoretical optical rotations at the D-sodium line<sup>16</sup> calculated for the four possible diastereoisomers a–d (Figure 2) were compared with the experimental value of (+)-**2**. A detailed conformational search was initially performed for each diastereoisomer using molecular mechanics followed by geometry optimization with DFT at the B3LYP/DGDZVP level for the most stable conformers.<sup>14</sup> The relative free energies and the Boltzmann distribution for the 20 most relevant conformers of diastereoisomers a–d, with a  $\Delta G^0$  range of between 0.0 and at least 3.5 kcal mol<sup>-1</sup>, were taken into account to obtain population-weighted averaged calculated  $[\alpha]_D$ . The results are listed in Tables S4–S7. Diastereoisomers c (9*R*,11*R*) and d (9*R*,11*S*) were readily ruled out as possible structures for compound **2** since their theoretical  $[\alpha]_D$  values were negative (Figure 2). On the other hand, the experimentally observed rotation of **2** was in agreement with the calculated  $[\alpha]_D$  value for both a (9*S*,11*R*) and b (9*S*,11*S*) diastereoisomers (Tables S4–S7). A NOESY correlation between H-9 and Me-15 observed in the spectrum of **2** supported diastereoisomer a being the correct stereochemical arrangement for this new compound. An inspection of the minimum energy structures of a and b (Figure 2) indicated a marked preference for a specific conformation in the C6–C9–C10–C11–C12 molecular fragment having for model a C6–C9–C10–C11 and C9–C10–C11–C12 dihedral angles close to  $-75^\circ$  and  $+145^\circ$ , respectively. This feature can be seen for the first seven conformers listed in Table S4. In this arrangement H-9 is close to Me-15 in diastereoisomer a (average distance 2.4 Å, Figure 2). In contrast, the distance between H-9 and Me-15 in



**Figure 2.** Global minimum energy structures of the four possible diastereoisomers of natural product **2** showing the DFT-calculated optical rotation values at the D-sodium line. The H-5/H-9 and H-9/Me-15 NOESY interactions observed in the spectrum of **2** are marked in diastereoisomer a.

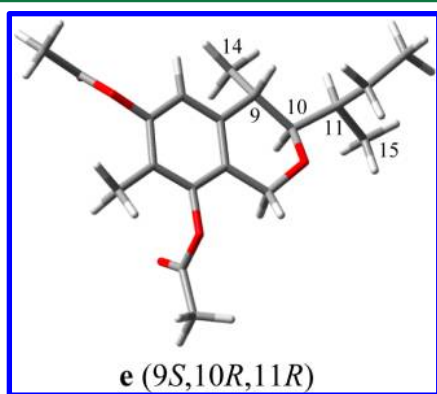
diastereoisomer b was approximately 4.7 Å, ruling out this structural possibility.

Additional evidence in favor of structure a was obtained by preparation of two C-10-reduced derivatives of **2**, followed by analysis of their NOESY spectral data in combination with molecular modeling. Comparison of theoretical and experimental <sup>1</sup>H NMR coupling constants was also included in this protocol. Thus, treatment of compound **2** with NaBH<sub>4</sub> followed by acetylation with acetic anhydride and pyridine yielded two main compounds (**3** and **4**), which were purified by HPLC as described in the Experimental Section and characterized by spectral means. Compound **3** exhibited signals for an acetylated benzyl alcohol ( $\delta_H/\delta_C$  5.10/57.4), one secondary acetylated carbinol ( $\delta_H/\delta_C$  5.00, dd,  $J = 9.3$  and 3.9 Hz/81.4), and four acetyl groups ( $\delta_H/\delta_C$  2.33, 2.31, 2.04, and 1.78, 4s, 3H each/20.9, 20.8, 20.5, 20.5, 170.7, 170.3, 168.7, and 168.7). The unusual diamagnetic shift of the acetylated benzyl alcohol could be attributed to a van der Waals shift due to the steric compression exerted by the acetyl group at C-10 or C-7, which in turn originates from the lack of free rotation around the C9–C10 bond.<sup>17</sup> The second product obtained was the cyclic ether **4**, formed during the acetylation step by the nucleophilic attack to C-7 by an appropriately oriented secondary alkoxy group at C-10, with the concomitant displacement of the primary acetoxy group.<sup>18</sup> In this cyclic product the signals for H-7eq and H-7ax appeared as an AB system at  $\delta_H$  4.65 and 4.42 (d each,  $J = 15.5$  Hz), respectively; H-10 at  $\delta_H$  3.21 (dd,  $J = 7.3$ ; 4.7 Hz) and H-9 at 2.93 (dq,  $J = 7.2$  and 6.9 Hz). A NOESY correlation between H-7ax and H-10ax confirmed the cyclic product formation. The NMR assignments were based on the analysis of the HSQC and HMBC experiments (Supporting Information).

Cyclic ether **4** was selected for further theoretical analysis because its geometrical restraints would lead to conformation-



ally distinctive information. Thus, the series of the four possible diastereoisomers of compound **4**, possessing the 9*S* configuration, namely, **e–h** (9*S*,10*R*,11*R*; 9*S*,10*R*,11*S*; 9*S*,10*S*,11*R*; and 9*S*,10*S*,11*S*, respectively), were subjected to a molecular mechanics systematic search protocol followed by optimization with DFT calculations at the B3LYP/DGDZVP level. For each conformer, magnetic shielding tensors were estimated with the gauge-including atomic orbital method, followed by theoretical calculation of the total NMR spin–spin coupling constants, using the same level of calculation.<sup>14</sup> Structure **e**, which corresponds to the 9*S*,10*R*,11*R* stereoisomer, showed the smallest root-mean-square deviation between the experimental ( $J_{9-10} = 7.4$  Hz and  $J_{10-11} = 4.8$  Hz) and calculated ( $J_{9-10} = 7.47$  Hz and  $J_{10-11} = 2.51$  Hz)  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  vicinal coupling constants (Table S8), supporting the 9*S*,11*R* configurational arrangement for the natural product **2**. Furthermore, the strong NOESY cross-peaks observed between the signals of H-10 and Me-14 and between H-10 and Me-15 in the cyclic derivative **4** were in agreement with the minimum energy molecular model **e** (Figure 3). Accordingly, the absolute configuration for the



**Figure 3.** Global minimum energy structure of **e**, representing the structure of **4**.

stereogenic centers of (–)-ascosalitoxin must be 9*R*,11*S*, even though the predicted  $[\alpha]_D$  value for **d** did not correlate well with the value previously reported.<sup>15</sup>

The affinity of **1** with  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -*h*CaM in solution was measured using the fluorescent biosensor *h*CaM M124C-*mBBR* (Figure S20).<sup>7</sup> This fluorescent-engineered *h*CaM, *h*CaM M124C-*mBBR*, was recently designed by our group by a combination of site-directed mutagenesis and covalent attachment of a fluorophore probe. The biological device allows the detection of CaM inhibitors in a reliable, quick, and sensitive manner. The fluorophore-labeled protein detects classic CaM inhibitors such as chlorpromazine (CPZ) and trifluoperazine (TFP). Its efficacy was demonstrated by means of a functional enzymatic assay and by fluorescence spectroscopy. The results of the analysis showed that **1** binds to the protein with a dissociation constant ( $K_d$ ) of  $0.25 \pm 0.04 \mu\text{M}$ , close to that of CPZ ( $K_d = 0.64 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ). The stoichiometry ratio for **1**:CaM was 1:4, as with other well-known CaM ligands.

In order to predict if conformers **1a** (**1a1** and **1a2**), and **1b** (**1b1** and **1b2**) interact with CaM (Figure 4), and if there are differences in the energetic and binding parameters, docking studies were performed using AutoDock4.2 software.<sup>19,20</sup> The 3D structure of CaM in complex with TFP (PDB code 1A29.pdb) was used in the docking calculations following an all-atom refinement of the protein using the Rosetta 3.1

software idealization protocol.<sup>21</sup> The analysis predicted that the four conformers **1a1**, **1a2**, **1b1**, and **1b2** ( $K_i = 168$ , 154.8, 159.8, and 170.6  $\mu\text{M}$ ) bound to CaM at site I, as does TFP (Figure 4), with affinities consistent with results from the fluorescence quenching experiments using the *h*CaM M124C-*mBBR* biosensor.<sup>7</sup> Refined docking studies using reduced search space and model flexibility in the target macromolecule revealed subtle differences between the interaction of the two sets of conformers. **1a1** and **1a2** display mainly hydrophobic interactions with Phe92, Met109, Met124, Glu127, Ala128, and Met144, while **1b1** and **1b2** form one hydrogen bond between H1 and Glu127, in addition to hydrophobic interactions with the residues shown in Figure 4. Both types of interactions (hydrophobic and hydrogen bond) play an important role in the stabilization of the protein–ligand complexes.

Altogether, the above findings suggested that compound **1** might be useful as a tool for studying the role of CaM in several physiological and pathophysiological processes. It is possible that the cytotoxic effect against several cancer cell lines previously demonstrated for this compound<sup>12</sup> might be related with its binding to CaM, and it would be of interest to further analyze its potential as an antitumor agent.

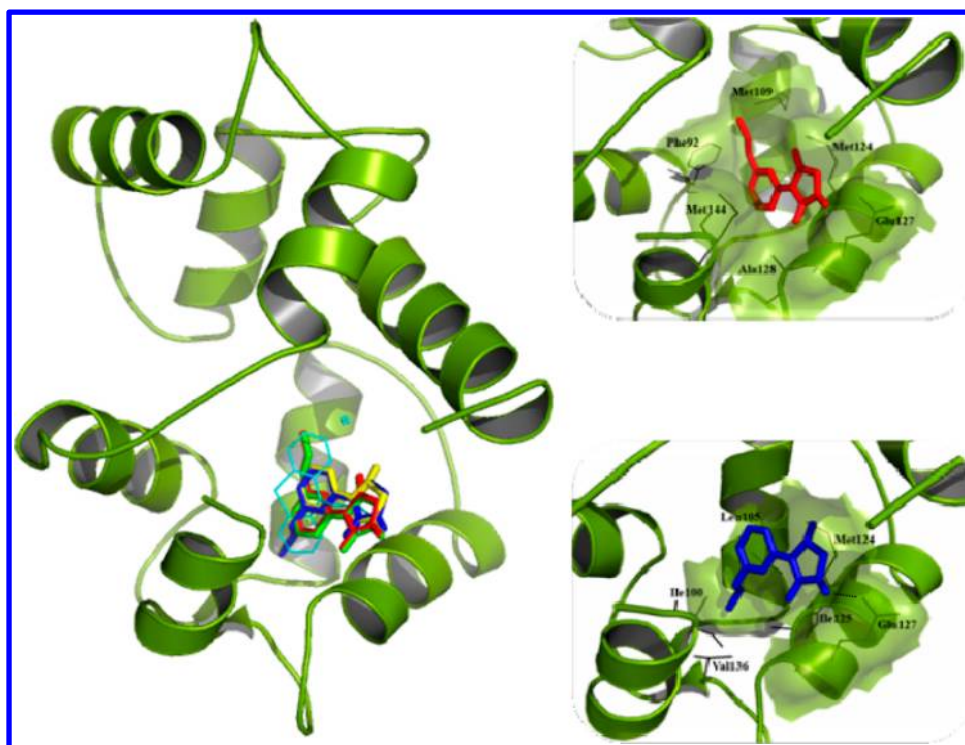
## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** The UV spectra were recorded on a Shimadzu 160 UV spectrometer in MeOH solution; the IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer 59913 spectrophotometer with KBr pellets or in a  $\text{CHCl}_3$  solution; the experimental optical rotations at the sodium D-line wavelength of pure compounds were recorded in  $\text{CHCl}_3$  solution on a Jasco model P-1030 polarimeter at 25 °C. NMR spectra were recorded on a Varian Unity Plus 500 spectrometer at 500 ( $^1\text{H}$ ) and 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), or a Bruker Avance III spectrometer at 400 ( $^1\text{H}$ ) and 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), or a Varian Mercury 300 spectrometer at 300 ( $^1\text{H}$ ) and 75.4 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) using TMS (tetramethylsilane) as the internal standard; chemical shifts were recorded as  $\delta$  values. Electrospray ionization mass spectra (ESI-TOF-MS) and electron-impact mass spectra (EIMS) were obtained on a Waters 2695 LC and on a JEOL SX 102 mass spectrometers, respectively. Preparative HPLC was performed using a Nova-Pak silica column (silica gel,  $3.9 \times 300$  mm, 6  $\mu\text{m}$ , and 0.6 mL/min) and  $\text{CHCl}_3$ –MeOH, 9:1, as the mobile phase. Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatography was performed by the Empower 2 software program (Waters). Column chromatography (CC) was carried out on Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich-Fluka, St Louis, MO, USA). Thin layer chromatography (TLC) analyses were carried out on silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck S.A. de C.V., Naucalpan de Juárez, Edo. de México) using ceric sulfate (10%) solution in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  as color reagent.

**Plant Material.** *Hintonia latiflora* leaves were collected by Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM) and Sol Cristians (Facultad de Química, UNAM) in Urique ( $29^\circ 13.143' \text{ N}$ ,  $107^\circ 54.832' \text{ W}$ ; 579 masl), State of Chihuahua, México, on July 15, 2007. Identification of the plant was secured by both collectors; a voucher specimen (Bye and Linares 39140) was deposited at the Herbario Nacional de México (MEXU).

**Fungus Isolation and Identification.** The endophytic fungus MEXU 26343 was isolated from selected adult and healthy leaves of *H. latiflora*. A strong surface sterilization protocol was applied to the leaves.<sup>22</sup> Complete intact leaves were immersed in 75% EtOH (1 min), 3.4% aqueous sodium hypochlorite solution (10 min), and 75% EtOH (1 min). The sterilized leaves were then rinsed with sterilized distilled  $\text{H}_2\text{O}$  and dried with sterile absorbent paper. Sterilized leaves were cut into  $5 \times 5$  mm pieces and deposited on a Petri dish (3 to 5 pieces by plate) containing PDA (potato-dextrose agar; Difco), streptomycin sulfate (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and ampicillin (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to inhibit the bacterial growth. The pure fungal strain was obtained after serial transfers on PDA and was deposited in the Herbario Nacional MEXU





**Figure 4.** Structural model of CaM-TFP complex represented in green cartoon. The left panel shows the binding model of TFP (purple sticks), **1a1** (red sticks), **1a2** (green sticks), **1b1** (blue sticks), and **1b2** (yellow sticks) using the crystallographic structure of the CaM-TFP complex (PDB code 1A29). The right panel shows the structure of the docking, showing the amino acids that interact with ligands. This figure was prepared using PyMOL.<sup>23</sup>

26343. Sequence data for this isolate were deposited in GenBank as accession numbers JN870279 (28S rRNA) and JN870280 [internal transcribed spacer (ITS) rRNA region]. The fungal strain lacked the reproductive structures necessary for taxonomic identification. Sequence data for MEXU 26343 were aligned with data available in GenBank, revealing that this unidentified fungus showed a close relationship with taxa from the order Pleosporales.

**Fungal Fermentation, Extraction, and Isolation.** The endophytic fungus 39140-2 was cultured at room temperature for 30 days in a Fernbach flask containing 200 g of moist rice. The cultivated rice was extracted exhaustively with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and the organic layer was evaporated *in vacuo*, yielding 1.49 g of an orange, solid extract. The crude extract was subjected to CC eluting with MeOH to yield four major primary fractions ( $F_{\text{I}}-F_{\text{IV}}$ ). Fraction  $F_{\text{III}}$  (372 mg) was the only one that significantly quenched the fluorescence of the CaM biosensor *hCaM M124C-mBBR*. HPLC analysis (see above) of the active fraction yielded 347 mg of vermehotin (**1**). TLC separation ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH, 99:1) of inactive fraction  $F_{\text{II}}$  (357.3 mg) afforded 84.9 mg of 9S,11R-(+)-ascosalitoxin (**2**).

**9S,11R-(+)-Ascosalitoxin (2):** yellow oil;  $[\alpha]_{\text{D}} +153$  (*c* 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 221 (4.92) and 296 (4.51) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3387, 2969, 1698, 1622, 1306, 1245  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 1; EIMS  $m/z$  264  $[\text{M}]^+$  (10), 246 (6), 208 (46), 180 (100), 162 (40), 85 (76); HREIMS  $m/z$  264.1344 (calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ , 264.1361).

**Preparation of Compounds 3 and 4.** A solution (20  $\mu\text{L}$ ) of  $\text{NaBH}_4$  (100 mg/mL) was slowly added to a cooled solution of compound **2** (16 mg) in MeOH. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h; thereafter, the solvent was eliminated under a  $\text{N}_2$  flow. The crude mixture was next extracted with EtOAc ( $3 \times 10$  mL), and the resulting extract dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated *in vacuo*. The resulting crude mixture, without any separation, was dissolved in 400  $\mu\text{L}$  of  $\text{Ac}_2\text{O}$ -pyridine (1:1) and maintained at room temperature for 24 h. The reaction mixture was diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) and extracted with EtOAc ( $3 \times 10$  mL); the organic phase was successively washed with saturated aqueous HCl ( $3 \times 10$  mL),

$\text{NaHCO}_3$  ( $3 \times 10$  mL), and  $\text{H}_2\text{O}$  ( $3 \times 10$  mL) and dried with anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The crude product was resolved by semi-preparative HPLC (*n*-hexane-EtOAc, 70:30; flow rate = 1.0 mL/min) to yield 4.5 mg of compound **3** and 1.4 mg of **4**.

**Compound 3:** yellow oil;  $[\alpha]_{\text{D}} +5.4$  (*c* 0.34,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.02 (1H, s, H-5), 5.11 (2H, br s, H-7), 4.99 (1H, dd,  $J = 9.2$ , 3.9 Hz, H-10), 3.47 (1H, dq,  $J = 9.2$ , 7.1 Hz, H-9), 2.34 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.31 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.04 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 1.92 (3H, s, H-8), 1.78 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 1.23 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz, H-14), 0.92 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-13), 0.87 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-15);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  170.7, 170.3, 168.7, 168.7 (4C,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 150.1 (C, C-4), 149.3 (C, C-2), 143.4 (C, C-6), 124.3 (C, C-3), 122.0 (C, C-1), 118.9 (CH, C-5), 81.4 (CH, C-10), 57.4 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 35.8 (CH, C-11\*), 35.7 (CH, C-9\*), 22.5 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 20.9, 20.8, 20.5, 20.5 (4 $\text{CH}_3$ ,  $\text{COCH}_3$ ), 18.6 ( $\text{CH}_3$ , C-14), 16.1 ( $\text{CH}_3$ , C-15), 11.7 ( $\text{CH}_3$ , C-13), 10.2 ( $\text{CH}_3$ , C-8); EIMS  $m/z$  435  $[\text{M} - 1]^+$  (1), 317 (10), 233 (65), 206 (65), 164 (100).

**Compound 4:** yellow oil;  $[\alpha]_{\text{D}} -3.6$  (*c* 0.1,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.87 (1H, s, H-5), 5.55 (2H, d,  $J = 15.5$  Hz, H-7), 3.21 (1H, dd,  $J = 7.4$ , 4.8 Hz, H-10), 2.93 (1H, dq,  $J = 7.2$ , 6.9 Hz, H-9), 2.32 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.31 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 1.92 (3H, s, H-8), 1.23 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-14), 0.98 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-15), 0.91 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-13);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  169.2, 168.9 (2C,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 148.3 (C, C-4), 145.0 (C, C-2), 138.4 (C, C-6), 125.0 (C, C-1), 120.6 (C, C-3), 118.8 (CH, C-5), 84.1 (CH, C-10), 62.5 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 35.2 (CH, C-9), 32.6 (CH, C-11), 22.7 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 20.8, 20.3 (2 $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 18.9 ( $\text{CH}_3$ , C-14), 16.6 ( $\text{CH}_3$ , C-15), 12.0 ( $\text{CH}_3$ , C-13), 9.7 ( $\text{CH}_3$ , C-8); EIMS  $m/z$  333  $[\text{M} - 1]^+$  (1), 275 (36), 236 (35), 208 (39), 194 (45), 165 (100).

**Steady-State Fluorescence Using the *hCaM M124-mBBR* Biosensor (ref 7).** All measurements were conducted with an ISS-PC1 spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL, USA) with sample stirring at 37  $^\circ\text{C}$ . The protein *hCaM M124-mBBR* (1  $\mu\text{M}$ ), obtained as previously described,<sup>7</sup> was incubated in buffer (10 mM potassium acetate [pH 5.1] and 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ), and the ligand was dissolved in DMSO (2 and 9.21 mM). Fluorescence emission spectra were

acquired with excitation and emission slit widths of 4 and 8 nm, respectively. The excitation wavelength was 381 nm, and emission wavelengths of 415 to 550 nm were measured. The fractional degree of saturated *hCaM M124-mBBR* with ligand (*y*) was calculated by changes in fluorescence on ligand binding according to  $y = (F - F_0)/(F_\infty - F_0)$ , where  $F_\infty$  represents the fluorescence intensity at saturation of the ligand, *y* is plotted as a function of the protein/ligand relation (*L*), and the apparent dissociation constants ( $K_d$ ) and stoichiometric (*S*) were obtained by fitting to the equation

$$y = \frac{(1 + K_d/S + L/S) - \sqrt{(1 + K_d/S + L/S)^2 - 4L/S}}{2}$$

where *y* represents the fractional degree of fluorescence intensity at 470 nm,  $K_d$  is the apparent dissociation constant for the ligands, *L* is the protein/ligand relation, and *S* is the stoichiometric. The data were analyzed using the Origin version 8.0 program (OriginLab, Northampton, MA, USA).

**Docking Studies.** Docking was carried out using the PDB X-ray structure of CaM (PDB code 1A29.pdb) with TFP (PDB code 1LIN.pdb). The crystal structure was rebuilt and refined after several iterations, and the final all-atom refinement of CaM was carried out with Rosetta 3.1.1.<sup>21</sup> The compound was built using the program HyperChem 8 and optimized geometrically using the program Gaussian 09, revision A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA) at DFT B3LYP/3-21G level of theory. Electrostatic grid maps were generated for each atom type in the ligands using the auxiliary program AutoGrid4, part of the software AutoDock4. The initial grid box size was 60 Å × 60 Å × 60 Å in the *x*, *y*, and *z* dimensions. Refined docking analysis was performed in a smaller grid box, with 30 Å × 30 Å × 30 Å dimensions. All calculations were made using a supercomputer KanBalam cluster from a Hewlett-Packard HP CP 4000, which includes 1368 AMD Opteron processors at 2.6 GHz and a RAM memory of 3 terabytes (Kanbalam, Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación, UNAM) (<http://www.super.unam.mx/>). The analysis of the docking was made with AutoDockTools (<http://mgltools.scripps.edu/>) using cluster analysis and the program PyMOL.<sup>23</sup>

**Molecular Modeling Calculations.** Molecular building and conformational search were carried out in the Spartan'04 program<sup>24</sup> (Wavefunction Inc. Irvine, CA, USA). Monte Carlo conformational searching<sup>25</sup> for structures **1** and **2** was carried out by molecular mechanics using the MMFF94 force field. In each case the minimum energy structures were filtered and checked for duplicity. The energy cutoff of 10 kcal/mol was selected in order to have a wide window of conformers in the Boltzmann distribution. Each conformer was geometrically optimized using hybrid DFT method B3LYP and basis set DGDZVP (B3LYP/DGDZVP). The fully optimized structures were used to calculate the thermochemical parameters and the frequencies at 298 K and 1 atm. Magnetic shielding tensors were calculated with the gauge invariant atomic orbital method (GIAO), and <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H vicinal coupling constants were obtained from the B3LYP/DGDZVP-optimized structures using the SpinSpin option during the NMR calculations. The coupling constants were also calculated from DFT dihedral angles through an empirically parametrized equation. All quantum mechanical and NMR calculations were carried out using Gaussian W03 (Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, USA) on a Linux operating system in the KanBalam cluster from a Hewlett-Packard HP CP 4000, which includes 1368 AMD Opteron processors at 2.6 GHz and a RAM memory of 3 terabytes.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ● Supporting Information

Experimental and calculated DFT B3LYP/DGDZVP free energies, population and theoretical averaged optical rotations for **a–d**. Experimental and calculated DFT B3LYP/DGDZVP free energies, population and theoretical averaged coupling constants for **e** and **f**. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of compound **1**. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC, COSY, and NOESY spectra of

compound **2**. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of **3** and **4**. Phylogenetic tree for 39140-2. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel: 525-556225289. Fax: 525-556225329. E-mail: rachel@servidor.unam.mx. Tel: 525-557474035. E-mail: ccerda@cinvestav.mx.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CONACyT (99395). We thank G. Duarte, M. Guzmán, N. Esturau, M. Gutierrez, I. Rivero, and A. Pérez for their valuable technical assistance. M.L.-L. acknowledges a fellowship from CONACyT. We are indebted to Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGSCA), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the KanBalam System.

## ■ REFERENCES

- (1) Taken in part from the Ph.D. thesis of M. Leyte-Lugo.
- (2) Bouche, N.; Yellin, A.; Snedden, W. A.; Fromm, H. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, *56*, 435–466.
- (3) Martínez-Luis, S.; Pérez-Vásquez, A.; Mata, R. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1182–1903, and references therein.
- (4) Zhang, L.; Ma, S. *Med. Chem.* **2010**, *5*, 811–822.
- (5) Racioppi, L.; Means; Anthony, R. *Trends Immunol.* **2008**, *29*, 600–607.
- (6) Kim, H. R.; Appel, S.; Vetterkind, S.; Gangopadhyay, S. S.; Morgan, K. G. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 2165–2180.
- (7) Reyes-Ramírez, A.; Leyte-Lugo, M.; Figueroa, M.; Serrano-Alba, T.; González-Andrade, M.; Mata, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2699–2708, and references therein.
- (8) González-Andrade, M.; Rivera-Chávez, J.; Sosa-Peinado, A.; Figueroa, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3875–3884, and references therein.
- (9) Strobel, G.; Bryn, D.; Castillo, U.; Harper, J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 257–268.
- (10) Cristians, S.; Guerrero-Analco, J. A.; Pérez-Vásquez, A.; Palacios-Espinosa, F.; Ciangherotti, C.; Bye, R.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 408–413.
- (11) Hosoe, T.; Fukushima, K.; Takizawa, K.; Itabashi, T.; Yoza, K.; Kawai, K. *Heterocycles* **2006**, *68*, 1949–1953.
- (12) Kasettrathat, C.; Ngamrojanavanich, N.; Wiyakrutta, S.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2621–2626.
- (13) Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. V. R.; Pople, J. A. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*; Wiley: New York, 1986.
- (14) López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; Suárez-Ortiz, G. A.; Hernández-Rojas, A. C.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6057–6066.
- (15) Evidente, A.; Capasso, R.; Vurro, M.; Bottalico, A. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 995–998.
- (16) Polavarapu, P. L. *Chirality* **2002**, *14*, 768–781.
- (17) Sato, T.; Takemura, T.; Kainosho, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, *1974*, 97–98.
- (18) Iwadare, T.; Nagano, H.; Shiota, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 705–706.
- (19) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (20) Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 1145–52.

- (21) Wedemeyer, W. J.; Baker, D. *Proteins* **2003**, *53*, 262–272.
- (22) Rodriguez, R.; Redman, R. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 1109–1114 , and references therein.
- (23) DeLano, W. L. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2004**, *228*, U313–U314.
- (24) Kong, J.; White, C. A.; Krylov, A. I.; Sherrill, C. D.; Adamson, R. D.; Furlani, T. R.; Lee, M. S.; Lee, A. M.; Gwaltney, S. R.; Adams, T. R.; Ochsenfeld, C.; Gilbert, A. T. B.; Kedziora, G. S.; Rassolov, V. A.; Maurice, D. R.; Nair, N.; Shao, Y.; Besley, N. A.; Maslen, P. E.; Dombroski, J. P.; Daschel, H.; Zhang, W.; Korambath, P. P.; Baker, J.; Byrd, E. F. C.; Van Voorhis, T.; Oumi, M.; Hirata, S.; Hsu, C.-P.; Ishikawa, N.; Florian, J.; Warshel, A.; Johnson, B. G.; Gill, P. M. W.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1532–1548.
- (25) Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379–4386.