

00550
14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUIMICAS

“Efecto de Fitotoxinas selectas de Origen
Fúngico y Vegetal Sobre la Fosfodiesterasa
del AMPc Dependiente de Calmodulina.
Metabolitos Adicionales del Hongo Coprófilo
Guanomyces polythrix.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
P R E S E N T A :
Q.F.B. SANDRA ALICIA SANTILLAN HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

MEXICO, D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

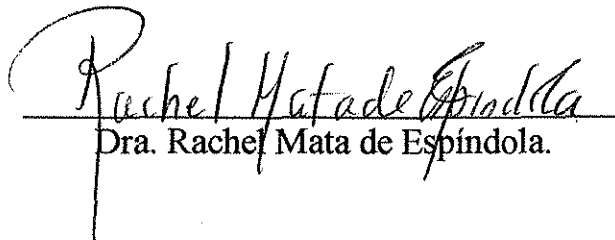
JURADO ASIGNADO

- Presidente:** Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa.
- Vocal:** Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra.
- Secretario:** Dra. Amelia Farrés González.
- Primer Suplente:** Dr. Ricardo Reyes Chilpa.
- Segundo Suplente:** Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

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

TUTOR:


Dra. Rachel Mata de Espíndola.

ASESOR TÉCNICO:


Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA) a través de los proyectos IN 200902 e IN 207300.

Agradezco al CONACyT la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A los M. en C. Isabel Chávez, Luis Velasco y Javier Pérez (Instituto de Química, UNAM), al Q.F.B. Oscar Yáñez, la Q. Marisela Gutiérrez y la Q. Georgina Duarte (Facultad de Química, UNAM) y al M. en C. Atilano Gutiérrez (UAM-Iztapalapa) por el registro de los espectros de RMN, masas e IR.

Al I. Q. Abel Blancas de la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas por llevar a cabo la fermentación del hongo.

A los miembros del Jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

A las M. en C. Isabel Rivero Cruz y Laura Acevedo por su asistencia en algunos aspectos técnicos a lo largo del desarrollo de la presente Tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis compañeros del Laboratorio 124, en especial a las M. en C. Blanca e Isabel Rivero Cruz por sus consejos, ayuda desinteresada y amistad.

En especial agradezco a la Dra. Martha Macías Ruvalcaba por su importante colaboración, valiosas sugerencias y asesoría durante la realización del presente proyecto de Tesis.

Finalmente con admiración quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Rachel Mata por asesorarme durante el desarrollo de mi trabajo de investigación y compartir conmigo sus conocimientos e invaluable consejos. Así mismo, le agradezco el haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y el apoyo que me otorgo durante mi estancia en este.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ESPECTROS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	14
2.1. Generalidades del hongo coprófilo <i>Guanomyces polythrix</i> M. C. González, Hanlin y Ulloa.	14
2.2. Fitotoxinas del hongo <i>Phoma herbarum</i> Westend.	21

2.3. Fitotoxinas de la especie vegetal <i>Prionosciadium watsoni</i> Coulter & Rose ex S. Watson.	24
2.4. Fitotoxinas de la especie vegetal <i>Leucophyllum ambiguum</i> Humb.& Bonpl.	28
2.5. Metabolitos secundarios con un efecto sobre la proteína calmodulina.	31
III. OBJETIVOS	45
3.1. Objetivos generales.	45
3.2. Objetivos particulares.	45
IV. PARTE EXPERIMENTAL	48
4.1. Material biológico.	48
4.2. Ensayos biológicos.	48
4.2.1. Método bioautográfico directo.	48
4.2.2. Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico.	49

4.2.3. Determinación de la interacción de los compuestos por electroforesis desnaturalizante.	50
4.2.4. Determinación del efecto de las fitotoxinas sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en presencia de calmodulina.	52
4.2.4.1. Determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina.	53
4.2.4.2. Obtención de la curva estándar de fosfato inorgánico.	54
4.2.4.3. Determinación del efecto de las fitotoxinas 31-38 , 50-52 , 56-57 , 68-71 y 73 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina.	54
4.2.4.4. Determinación del efecto de las fitotoxinas 31-38 , 50-52 , 56-57 , 68-71 y 73 sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa.	55
4.3. Obtención de los cultivos a mediana escala.	55

4.3.1. Cultivo a mediana escala en medio de papa-dextrosa DIFCO (20 L).	55
4.4. Estudio químico del extracto fitotóxico obtenido a partir del micelio y medio de cultivo de <i>G. polythrix</i> .	56
4.4.1. Métodos generales de análisis.	56
4.4.1.1. Métodos cromatográficos.	56
4.4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	57
4.4.2. Fraccionamiento primario del extracto activo.	57
4.4.3. Separación y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones primarias activas.	58
4.4.3.1. Obtención de la dihidroubiquinona-10 (80).	58
4.4.3.2. Obtención del ergosta-6, 8(14), 22- trien-3-ol (81) y del ergosterol (82).	60
4.4.3.3. Obtención de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidro-naftopirona (33) y de la ergosta- 4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona (43).	60

4.4.3.4.Obtención de cantidades adicionales de la ergosta-4, 6, 8 (14), 22- tetraen-3-ona (43).	60
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
5.1. Fermentación de <i>Guanomyces polythrix</i> y evaluación del potencial fitotóxico del extracto combinado obtenido a partir del medio de cultivo y del micelio.	65
5.2. Fraccionamiento biodirigido del extracto activo del hongo coprófilo <i>Guanomyces polythrix</i> .	66
5.3. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios presentes en el extracto fitotóxico de <i>G. polythrix</i> .	68
5.3.1. Caracterización de la dihidroubiquinona-10 (80).	69
5.3.2.Caracterización de la ergosta-4 , 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona (43), del ergosta-6, 8(14), 22- trien-3-ol (81) y del ergosterol (82).	79
5.4. Determinación del potencial fitotóxico de los compuestos de <i>Guanomyces polythrix</i> aislados en el presente estudio.	79

5.5. Interacción de los compuestos fitotóxicos 68-71 y 80-82 con la proteína calmodulina de cerebro de bovino.	81
5.6. Determinación del efecto de los metabolitos fitotóxicos 31-38, 43, 50-51, 56-57, 68-71 y 80-82 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina.	83
5.6.1. Determinación de la concentración óptima de calmodulina necesaria para la activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc.	86
5.6.2. Efecto de las fitotoxinas 31-38, 43, 50-51, 56-57, 68-71 y 81 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina.	87
5.6.3. Efecto de las fitotoxinas 31-38, 43, 50-51, 56-57, 68-71 y 81 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de la proteína calmodulina.	91
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES	104
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
VIII. APÉNDICE I	121

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Metabolitos fitotóxicos de origen microbiano.	7
Cuadro 2. Metabolitos aislados previamente a partir del hongo <i>G. polythrix</i> (Macías <i>et al.</i> , 2000; 2001).	18
Cuadro 3. Métodos de ensayo utilizados para determinar la actividad de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (Thompson <i>et al.</i> , 1979).	43
Cuadro 4. Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones empleadas en la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 12%).	51
Cuadro 5. Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto total de <i>G. Polythrix</i> .	58
Cuadro 6. Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción primaria activa GP- XIII*.	61
Cuadro 7. Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción primaria activa GP-X*.	63

Cuadro 8. Rendimientos de biomasa y cantidad de los extractos obtenidos a partir del hongo <i>Guanomyces polythrix</i> .	65
Cuadro 9. Efecto del extracto total del hongo <i>Guanomyces polythrix</i> sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	66
Cuadro 10. Metabolitos secundarios aislados a partir de <i>Guanomyces polythrix</i> en el presente estudio.	67
Cuadro 11. Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H de la dihidrobiquinona-10 [Q-10(H ₂)].	74
Cuadro 12. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C de la dihidrobiquinona-10 [Q-10 (H ₂)].	75
Cuadro 13. Efecto de los metabolitos secundarios aislados a partir de <i>G. polythrix</i> sobre el crecimiento radicular de la arvense <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	79
Cuadro 14. Porcentajes de máxima activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina sobre la actividad basal de la fosfodiesterasa del AMPc en presencia de las fitotoxinas 56, 57, y 68-70.	90
Cuadro 15. Concentraciones inhibitorias medias de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes fitotoxinas.	99

Cuadro 16. Constantes físicas y espectroscópicas de la Ergosta- 4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-ona (43).	121
Cuadro 17. Constantes físicas y espectroscópicas del Ergosta- 6, 8 (14), 22- trien-3-ol (81).	122
Cuadro 18. Constantes físicas y espectroscópicas del Ergosterol (82).	123
Cuadro 19. Constantes físicas y espectroscópicas de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (33).	124
Cuadro 20. Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H de la ergosta- 4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona (43), del ergosta -6, 8(14), 22- trien-3-ol (81) y del ergosterol (82).	125
Cuadro 21. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C de la ergosta- 4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-ona (43), del ergosta -6, 8 (14), 22- trien-3-ol (81) y del ergosterol (82).	126
Cuadro 22. Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C de la (+) - (2S) -5-hidroxi- 6, 8-dimetoxi-2-metil- 2, 3-dihidronaftopirona (33).	127

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Hongo <i>G. polythrix</i> M. C. González, Hanlin y Ulloa en agar papa-dextrosa. Condiciones de incubación: 15 días de crecimiento y temperatura de 28 °C.	14
Figura 2. Hongo <i>G. polythrix</i> . A) Ascoma de cuatro días de crecimiento, B) Ascoma maduro de siete días de crecimiento, C) Pelo lateral glandular septado.	15
Figura 3. Hongo <i>G. polythrix</i> . A) Asca clavada delicuescente, con ocho ascosporas, B) Ascosporas hialinas, unicelulares, elipsoides y sin un poro geminal.	16
Figura 4. Hongo <i>G. polythrix</i> . Gotas claras y brillantes de líquido en los ápices de los pelos laterales.	17
Figura 5. Hongo <i>Phoma herbarum</i> Westend.	21
Figura 6. <i>Prionosciadium watsoni</i> Coulter & Rose ex S. Watson.	24
Figura 7. <i>Leucophyllum ambiguum</i> Humb. & Bonpl.	29

Figura 8. Estructura de la calmodulina dependiente de calcio. El extremo amino terminal se encuentra constituido por los dominios I y II; el extremo carboxilo terminal por los dominios III y IV.	33
Figura 9. Reacción de hidrólisis del AMPc en 5'-monofosfato de adenosina, catalizada por la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina.	41
Figura 10. Cromatograma obtenido a nivel analítico de la fracción primaria activa GP-V*. Condiciones de análisis: Detector UV/visible, fase normal, $\lambda = 276$ nm. Sistema de elución: CH_2Cl_2 -MeOH (98:2). Flujo de 0.6 mL/min. Pico: a $T_R = 12.3$ minutos.	59
Figura 11. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -COSY de la dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H_2)].	71
Figura 12. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -NOESY de la dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H_2)].	72
Figura 13. Diagrama de fragmentación de la dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H_2)].	73
Figura 14. Estructura de la dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H_2)].	74

- Figura 15.** Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de cerebro de bovino: 2 µg de calmodulina y 2 µL de CaCl₂ 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (Calmodulina), C (Clorpromazina), compuestos 81-82, CaM+D (Calmodulina + DMSO). En todos los casos se aplicaron 8.33 x 10⁻⁸ moles/L de los compuestos en DMSO. 82
- Figura 16.** Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de cerebro de bovino: 2 µg de calmodulina y 2 µL de CaCl₂ 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (Calmodulina), C (Clorpromazina), compuestos 68-71. Los compuestos se evaluaron en un rango de concentración entre 8.25 x 10⁻⁸ y 8.91x10⁻⁸ M. 82
- Figura 17.** Curva patrón de fosfatos inorgánicos. 85
- Figura 18.** Reacciones bioquímicas involucradas en la determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc. 86
- Figura 19.** Actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de varias concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino. 87
- Figura 20.** Efecto de la clorpromazina sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa y del complejo Ca²⁺-Calmodulina-Fosfodiesterasa. 88

Figura 21. Efecto de los lignanos 2,2'-dimetoxisesamina (**68**), 2-metoxicobusina (**69**), cobusina (**70**) y la 2-metoxi-4'-hidroxidesmetoxicobusina (**71**) sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa. 89

Figura 22. Efecto de los ésteres del ácido isobutírico (3R)-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo [1,2-b:5,4-b']dipiran-3-il (**56**) y del ácido 2-metilbut-(2Z)-enoico (3R)-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo [1,2-b:5,4-b'] dipiran-3-il (**57**) sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa. 89

Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **31-38** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino. 93

Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **50-51** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino. 94

Figura 25. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **43** y **81** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino. 95

Figura 26. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **68-71** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino. 97

Figura 27. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **56** y **57** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia calmodulina de cerebro de bovino.

98

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1. Espectro de RMN- ¹ H de la dihidroubiquinona-10 (80).	77
Espectro 2. Espectro de RMN- ¹³ C de la dihidroubiquinona-10 (80).	78
Espectro 3. Espectro de RMN- ¹ H de la Ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-ona (43).	128
Espectro 4. Espectro de RMN- ¹³ C de la Ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona (43).	129
Espectro 5. Espectro de RMN- ¹ H del Ergosta -6, 8 (14), 22- trien-3-ol (81).	130
Espectro 6. Espectro de RMN- ¹³ C del Ergosta -6, 8 (14), 22- trien-3-ol (81).	131
Espectro 7. Espectro de RMN- ¹ H del Ergosterol (82).	132
Espectro 8. Espectro de RMN- ¹³ C del Ergosterol (82).	133

Espectro 9. Espectro de RMN-¹H de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (**33**). 134

Espectro 10. Espectro de RMN-¹³C de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (**33**). 135

RESUMEN

La investigación de un extracto fitotóxico obtenido a partir de la resiembra del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* permitió la obtención de tres metabolitos secundarios no descritos previamente en el hongo: la dihidroubiquinona-10 (**80**), el ergosta-6,8(14),22-trien-3-ol (**81**) y el ergosterol (**82**). De manera adicional se obtuvieron los compuestos (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (**33**) y la ergosta- 4,6,8(14),22- tetraen-3-ona (**43**) aislados en un estudio anterior de este hongo (Macías *et al.*, 2000; 2001).

La caracterización de los metabolitos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. Las fitotoxinas ergosta-6, 8 (14), 22-trien-3-ol (**81**) y ergosterol (**82**) se caracterizaron mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas previamente en la literatura; mientras que los compuestos (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (**33**) y ergosta- 4, 6, 8 (14), 22- tetraen-3-ona (**43**) se caracterizaron por comparación con muestras auténticas.

La evaluación del efecto de los compuestos **80-82** sobre la germinación y el crecimiento radicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus* permitió establecer que estos metabolitos presentan propiedades fitotóxicas significativas.

La interacción de las fitotoxinas **80-82** con la proteína calmodulina de cerebro de bovino se determinó inicialmente por medio de una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE al 12%) en presencia del calcio. También se evaluaron

los metabolitos aislados a partir de la especie vegetal *Leucophyllum ambiguum* [2, 2'-dimetoxisesamina (68), 2-metoxicobusina (69), cobusina (70) y 2-metoxi-4'-hidroxidesmetoxicobusina (71)]. Este experimento permitió establecer que los compuestos 80-82 y 68-71 poseen la capacidad de retardar la movilidad electroforética de la calmodulina. Por lo tanto, estos metabolitos interaccionan con la proteína calmodulina de cerebro de bovino.

El efecto de varias fitotoxinas de origen fúngico y vegetal sobre las propiedades activadoras enzimáticas de la calmodulina se determinó utilizando como enzima blanco a la fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina. Entre las fitotoxinas seleccionadas se encuentran las aisladas previamente a partir del hongo *G. polythrix* [(+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (31), (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (32), (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (33), (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (34), (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (35), (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (36), rubrofusarina B (37), 2,3-dimetil-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (38) y la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (43)]; las obtenidas a partir del hongo *Phoma herbarum* [herbaruminas I (50) y II (51)] y las de las plantas *Prionosciadium watsoni* [los ésteres del ácido isobutírico (3R)-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipiran-3-il (56) y del ácido 2-metilbut-(2Z)-enoico (3R)-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipiran-3-il (57)] y *Leucophyllum ambiguum* [2,2'-dimetoxisesamina (68), 2-metoxicobusina (69), cobusina (70) y la 2-metoxi-4'-hidroxidesmetoxicobusina (71)].

Los resultados generados indican que los compuestos 31-38, 43, 50-51, 68-71 y 81 inhiben la capacidad de la calmodulina de cerebro de bovino para activar a la fosfodiesterasa del AMPc, sin afectar significativamente la actividad basal de la

fosfodiesterasa. Por lo tanto, se considera que estos productos actúan como inhibidores de la proteína calmodulina. Asimismo, se encontró que las piranocromonas **56** y **57** estimulan evidentemente la actividad basal de la fosfodiesterasa y a pesar de que estos productos disminuyen la actividad del complejo fosfodiesterasa-calmodulina- Ca^{2+} no se les puede considerar inhibidores específicos de la calmodulina.

ABSTRACT

Investigation of a phytotoxic extract prepared from the culture broth of the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix* led to the isolation of three secondary metabolites previously not described in the fungus, namely dihydroubiquinone-10 (**80**), ergosta-6,8(14),22-trien-3-ol (**81**) and ergosterol (**82**). In addition (+)-(2S)-5-hydroxy-6, 8-dimethoxy-2-methyl-2, 3-dihydro-naphtopyran-4-one (**33**) and ergosta- 4, 6, 8 (14), 22- tetraen-3-one (**43**), were isolated. The structures of the isolated metabolites were established by spectrometric and spectroscopic methods.

Compounds **80-82** inhibited seedling growth of *Amaranthus hypochondriacus*. These compounds and those previously isolated from *Leucophyllum ambiguum* [2, 2'-dimethoxy-sesamine (**68**), 2-methoxycobusine (**69**), cobusine (**70**) and 2-methoxy-4'-hidroxy-desmethoxycobusine (**71**)] were also calmodulin inhibitors since they retarded the mobility of the protein as detected in a SDS-PAGE electrophoresis in denaturing conditions.

Finally the effect of several phytotoxins on the enzyme activation proprieties of calmodulin was assesed by using calmodulin sensitive cAMP phosphodiesterase as the target enzyme. The selected phytotoxins include those isolated previously from the fungus *G. polythrix* [(+)-(2S,3S)- 5- hidroxy- 6, 8-dimethoxy- 2, 3-dimethyl- 2, 3- dihydronaphtopyra-4-one (**31**), (+)- (2S,3S)- 5- hidroxy -6, 8, 10- trimethoxy-2,3- dimethyl-2,3- dihydronaphtopyra-4-one (**32**), (+)-(2S)-5- hidroxy -6,8-dimethoxy-2-methyl-2,3- dihydronaphtopyra-4-one (**33**), (+)- (2S)-5- hidroxy -6, 8, 10-trimethoxy-2-methyl-2, 3- dihydronaphtopyra-4-one

(34), (+)-(2S, 3R)-5- hidroxy -6, 8-dimethoxy-2, 3-dimethyl-2, 3- dihydronaphtopyra-4-one (35), (+)-(2S,3R)-5- hidroxy-6, 8, 10-trimethoxy-2,3-dimethyl-2,3- dihydronaphtopyra-4-one (36), rubrofusarine B (37), 2,3-dimethyl-5- hidroxy-6,8-dimethoxy-2,3- naphtopyra-4-one (38) and the ergosta-4,6,8(14),22- tetraen-3-one (43)]; those obtained from the fungus *Phoma herbarum* [herbarumines I (50) and II (51)] and from the plants *Prionosciadium watsoni* [isobutyric acid (3R)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipyran-3-yl ester (56) and 2-methylbut-(2Z)-enoic acid (3R)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2H, 6H-benzo [1,2-b:5,4-b']dipyran-3-yl ester (57)] and *L. ambiguum* [2,2'-dimethoxysesamine (68), 2-methoxycobusine (69), cobusine (70) and the 2-methoxy-4'-hidroxy-desmethoxycobusine (71)].

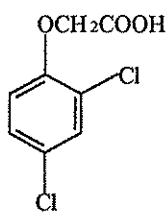
The results pointed out that compounds 31-38, 43, 50, 51, 68-71 and 81 inhibited ability of calmodulin to activate cAMP phosphodiesterase, without affecting the basal activity of the phosphodiesterase. For that reason this products are considered as calmodulin inhibitors.

Also it was found that the naphtopyrones 56 and 57 stimulated the phosphodiesterase activity. Although these compounds inhibit the phosphodiesterase-calmodulin-calcium complex activity, they aren't specific calmodulin inhibitors.

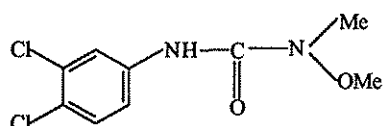
I. INTRODUCCIÓN

Las malezas invaden los cultivos de importancia económica ocasionando grandes pérdidas en la industria agrícola debido a que compiten con las plantas útiles por el espacio, los nutrientes, el agua y la luz. Además, ciertas malezas pueden provocar severos daños en la salud de humanos y animales. Por ejemplo, algunos tipos de polen que producen las malezas generan problemas respiratorios, dermatitis y fiebres en los individuos sensibles. Por otra parte, las malezas también afectan a la industria ganadera debido a que los lácteos y otros productos que se obtienen a partir de los animales que las consumen adquieren un sabor desagradable (Hoagland, 1990; Cremlyn, 1991; Cramer, 2000).

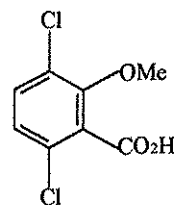
Actualmente los agentes herbicidas de origen sintético son los más utilizados para proteger los cultivos de importancia económica. Cuando estos agroquímicos se emplean de manera adecuada evitan hasta 40% de pérdidas en las cosechas. Sin embargo, su uso indiscriminado, manejo incorrecto y almacenamiento inadecuado, así como la poca efectividad que presentan varios de estos productos para combatir algunas malezas han producido efectos indeseables en el medio ambiente y en la salud de animales y humanos. Lo anterior ha ocasionado que se dejen de utilizar algunos de estos herbicidas comerciales provocando un incremento en el daño de las cosechas por plagas y enfermedades. Entre los herbicidas sintéticos que causan daños agudos o crónicos tanto a los animales como al hombre, se encuentran el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 1) el linuron (2), el dicamba (3) y la atrazina (4), algunos de los cuales inclusive presentan propiedades carcinogénicas importantes (Barnard *et al.*, 1997).



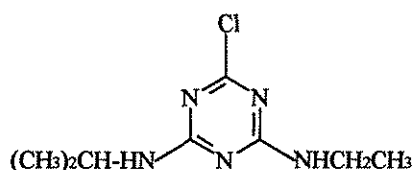
(1)



(2)



(3)



(4)

Otros inconvenientes del uso de herbicidas sintéticos son el incremento de malezas resistentes a algunos de estos productos y la aparición de los fenómenos de resistencia cruzada y múltiple. Por ejemplo, la especie *Echinochloa crus-galli*, que daña los cultivos de arroz, ha desarrollado resistencia al diclofob y al propanil. Asimismo, varias especies de *Amaranthus* que provocan daños a los cultivos de trigo, maíz, sorgo y caña de azúcar han desarrollado resistencia a las triazinas atrazina y azimacina. Otros herbicidas que han inducido resistencia son el clorosulfuron, el paraquat, el metildiclofop, el 2,4-D, el amitrol, el metaloclor, el trialato, el bromoxinil, el glifosato, el etofumesato y el clorotoluron (Heap, 1997).

El fenómeno de resistencia múltiple aparece cuando las plantas adquieren la capacidad de resistir la actividad herbicida de numerosos agentes químicos como resultado de un incremento en su metabolismo. Algunas de las especies que han desarrollado resistencia múltiple a este tipo de compuestos son: *Poa annua*, que es

resistente a la atrazina, el diuron, el terbacil y el etofumesato; *Avena fatua*, con resistencia al metil-diclofop y la pronamida; *Kochia scoparia* y *Amaranthus blitoides*, las cuales son resistentes a la triazina y a los inhibidores de la ALS (Heap, 1997). Cabe mencionar que el desarrollo de la resistencia provocado por los herbicidas sintéticos se debe a que los mismos inducen mutaciones que ocasionan alteraciones en sus blancos de acción a nivel molecular. Estas alteraciones se deben a una modificación de la conformación estructural de una enzima blanco o a la activación de sistemas enzimáticos o a una sobreproducción del sitio de acción, entre otras (Cremlyn, 1991; Holt, 1993; Dayan *et al.*, 2000; Warrior, 2000).

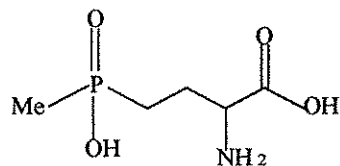
Todos los problemas arriba indicados han conducido a un incremento en los esfuerzos para desarrollar métodos alternos de protección de las cosechas que no dependan sólo de los herbicidas sintéticos. Estas estrategias incluyen la síntesis bioquímica dirigida (estrategias basadas en el conocimiento de bioquímica y biotecnología), el uso de cultivos de cobertura, la eliminación manual o mecánica de las especies dañinas, la rotación de cultivos, el desarrollo de especies resistentes mediante el uso de técnicas genéticas, el mejoramiento de los métodos de predicción que permitan la detección temprana de ataques inminentes de plagas o enfermedades, el incremento de depredadores naturales (catarinas, arañas y escarabajos) y la búsqueda de nuevos agentes herbicidas a partir de fuentes naturales (Evans, 1998).

Los agentes herbicidas de origen natural presentan grandes ventajas entre las que se encuentran una menor toxicidad para el hombre y los animales, bajos índices de bioacumulación y un menor impacto ambiental. Estos productos también disminuyen la aparición de fenómenos de resistencia debido a que poseen una mayor selectividad y sus mecanismos de acción suelen ser novedosos y más específicos (Hoagland, 1990; Duke & Abbas, 1995; Evans, 1998; Cramer, 2000).

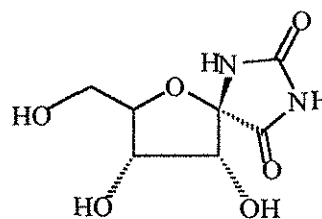
Las plantas constituyen fuentes potenciales de nuevos agentes plaguicidas debido a que sintetizan compuestos aleloquímicos de defensa que actúan como herbicidas naturales. En este sentido algunos investigadores han sugerido el empleo de técnicas que involucren las interacciones alelopáticas para inhibir el crecimiento de las plantas arvenses. Estas técnicas implican el uso de aleloquímicos (algunos sin modificar) y de plantas con compuestos alelopáticos en la rotación de cultivos. De esta forma, las fitotoxinas se pueden utilizar directamente como herbicidas (Macías, 1995; Luszniak & Pickett, 1998).

Los microorganismos constituyen también un reservorio importante de productos naturales bioactivos, ya que crecen en ambientes competitivos y su metabolismo secundario está influenciado por la presión ejercida por otros organismos. Una de las principales ventajas de los microorganismos sobre las plantas como fuentes potenciales de productos biodinámicos radica en que los microorganismos pueden cultivarse y preservarse en un estado estable y viable (Porter & Fox, 1997). Los microorganismos, además biosintetizan una gran cantidad de compuestos químicamente muy diversos y con estructuras novedosas. De manera adicional, el hallazgo de fitotoxinas naturales con estructuras novedosas puede conducir al descubrimiento de nuevos blancos de acción más específicos a nivel molecular, proporcionando así las herramientas necesarias para el diseño bioracional de nuevos agentes herbicidas más potentes, eficaces y con una mayor compatibilidad con el medio ambiente (Hoagland, 1990; Duke & Abbas, 1995; Macías, 1995; Cramer, 2000).

Entre los metabolitos fitotóxicos de origen microbiano más importantes se encuentran la fosfotricina (5) [Duke & Lydon, 1993; Duke & Abbas, 1995], la hidantocidina (6) y la cornexistina (7) [Siehl, 1996; Dayan *et al.*, 2000], los cuales se obtienen a partir de varias especies de actinobacterias.

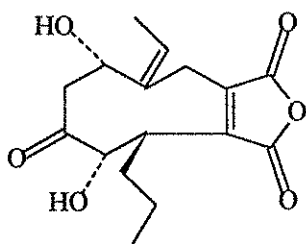


(5)

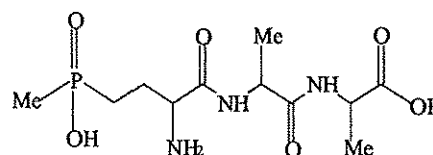


(6)

La fosfinitricina (5), producida por *Streptomyces viridochromnes* y *Streptomyces hygroscopicus*, es el primer producto de origen microbiano desarrollado como herbicida comercial no selectivo y de amplio espectro que se utiliza para la protección de los cultivos de maíz y frijol de soya. A partir de esta fitotoxina se sintetizó el bialafos (8), un tripéptido que al aplicarse a las plantas se metaboliza para generar fosfinitricina (5). Ambos productos inhiben a la enzima glutamino sintasa y bloquean la síntesis de aminoácidos cruciales para la vida de las plantas (Crowley *et al.*, 1998; Luszniak, 1998; Lydon & Duke, 1999). La fosfinitricina se produce también por síntesis y se comercializa con el nombre de glufosinato.



(7)



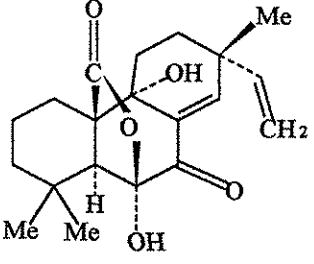
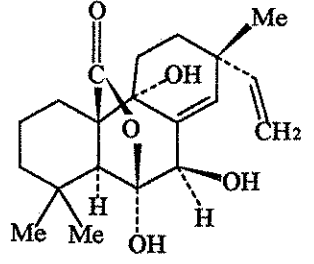
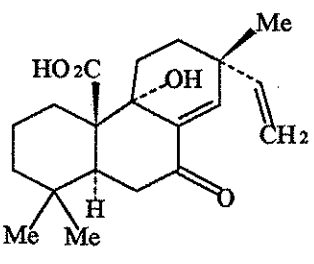
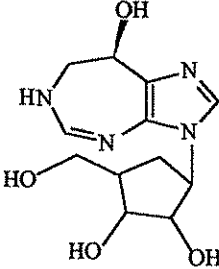
(8)

La hidantocidina (6) mimetiza al monofosfato de inosina (IMP) cuando se fosforila e inhibe a la enzima adenilo-succinato sintasa, la cual participa en la síntesis del AMP; por otra parte, la cornexistina (7), sintetizada por la especie

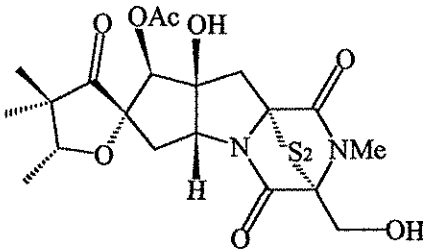
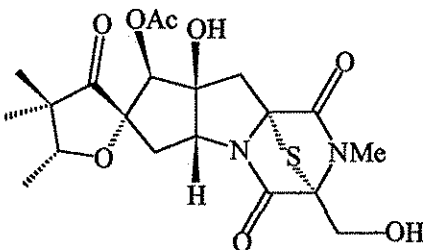
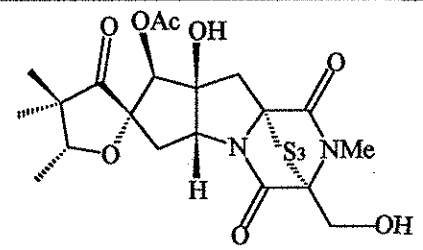
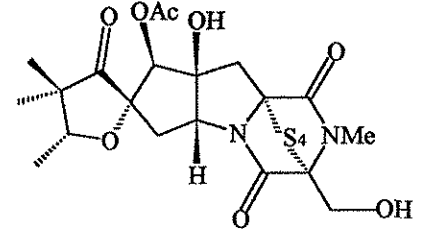
Paecilomyces variotii (Duke & Lydon, 1993; Duke & Abbas, 1995), también debe ser bioactivada para inhibir a la enzima aspartato aminotransferasa (AspATP), la cual cataliza la transaminación reversible del oxaloacetato en presencia de glutamina para generar α -cetoglutarato y aspartato. En las plantas, la enzima aspartato aminotransferasa participa en los procesos de asimilación del nitrógeno (Buchanan *et al.*, 2000; Dayan *et al.*, 2000).

Recientemente, los hongos se han estudiado como fuentes potenciales de metabolitos secundarios con una gran diversidad estructural y mecanismos de acción novedosos y específicos. Se estima que existen aproximadamente 1.5 millones de especies de hongos en el mundo, de las cuales sólo 65,000 (el 5%) han sido caracterizadas taxonómicamente. Por lo tanto, la amplia reserva de especies fúngicas representa un inmenso recurso no explorado de nuevos metabolitos de importancia agrícola y biomédica. Las fitotoxinas derivadas de una gran variedad de hongos, incluyendo los fitopatógenos, han demostrado una elevada eficacia en el control de las plantas nocivas, aunque todavía ningún producto derivado de hongos se ha desarrollado comercialmente como herbicida (Charudattan, 1990; Hoagland, 1990; Duke & Abbas, 1995; Macías, 1995). En el Cuadro 1 se presentan algunos ejemplos de fitotoxinas sintetizadas por microorganismos.

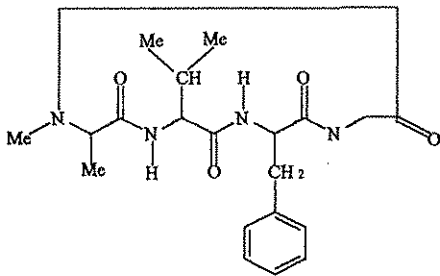
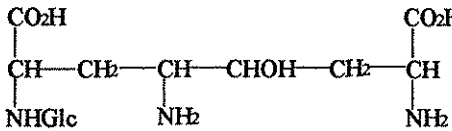
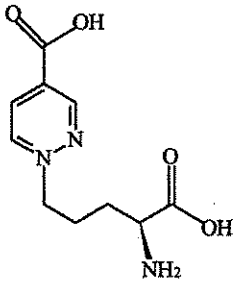
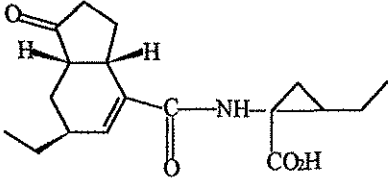
Cuadro 1. Metabolitos fitotóxicos de origen microbiano.

Metabolito Secundario	Microorganismo	Referencias Bibliográficas
 <p data-bbox="294 679 534 747">Esfaeropsidina A (9)</p>	<p data-bbox="680 555 962 592"><i>Sphaeropsis sapinea</i></p>	<p data-bbox="1005 555 1292 629">Evidente <i>et al.</i>, 1996 Evidente <i>et al.</i>, 1997</p>
 <p data-bbox="294 1031 534 1100">Esfaeropsidina B (10)</p>	<p data-bbox="680 907 962 944"><i>Sphaeropsis sapinea</i></p>	<p data-bbox="1005 907 1292 982">Evidente <i>et al.</i>, 1996 Evidente <i>et al.</i>, 1997</p>
 <p data-bbox="294 1384 534 1452">Esfaeropsidina C (11)</p>	<p data-bbox="680 1224 962 1261"><i>Sphaeropsis sapinea</i></p>	<p data-bbox="1005 1224 1292 1299">Evidente <i>et al.</i>, 1996 Evidente <i>et al.</i>, 1997</p>
 <p data-bbox="243 1804 581 1877">Coformicina carbicélica (12)</p>	<p data-bbox="707 1659 931 1696"><i>Streptomyces sp.</i></p>	<p data-bbox="1005 1659 1292 1734">Bush <i>et al.</i>, 1993 Pillmoor <i>et al.</i>, 1993</p>

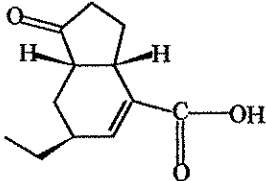
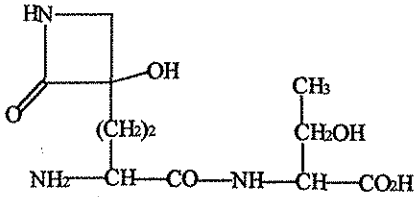
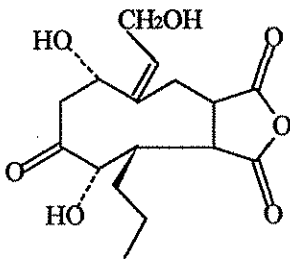
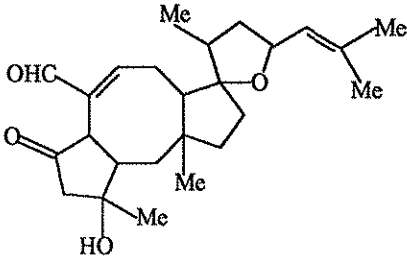
Cuadro 1. Metabolitos fitotóxicos de origen microbiano (continuación).

Metabolito Secundario	Microorganismo	Referencias Bibliográficas
 <p data-bbox="294 706 523 779">Sidoresmina PL (13)</p>	<p data-bbox="722 555 926 588"><i>Phoma lingam</i></p>	<p data-bbox="1009 555 1263 588">Pedras <i>et al.</i>, 1990</p>
 <p data-bbox="307 1089 511 1162">Sidoresmina H (14)</p>	<p data-bbox="722 938 926 971"><i>Phoma lingam</i></p>	<p data-bbox="1009 938 1271 971">Pedras <i>et al.</i>, 1990</p>
 <p data-bbox="310 1466 508 1539">Sidoresmina J (15)</p>	<p data-bbox="722 1321 926 1355"><i>Phoma lingam</i></p>	<p data-bbox="1009 1321 1263 1355">Pedras <i>et al.</i>, 1990</p>
 <p data-bbox="307 1835 511 1908">Sidoresmina K (16)</p>	<p data-bbox="722 1705 926 1738"><i>Phoma lingam</i></p>	<p data-bbox="1009 1705 1263 1738">Pedras <i>et al.</i>, 1990</p>

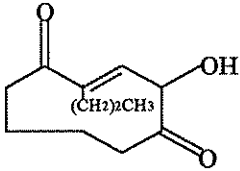
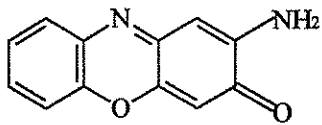
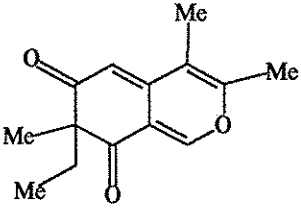
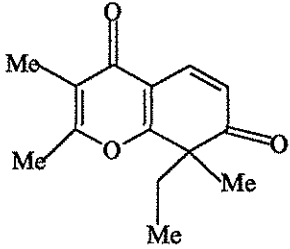
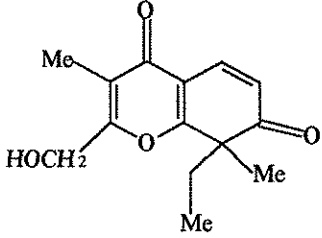
Cuadro 1. Metabolitos fitotóxicos de origen microbiano (continuación).

Metabolito Secundario	Microorganismo	Referencias Bibliográficas
 <p style="text-align: center;">Tentoxina (17)</p>	<i>Alternaria alternata</i>	Duke & Lydon, 1993 Boyette & Abbas, 1995
 <p style="text-align: center;">Ácido bis-amino N-glucósido (18)</p>	<i>Ascochyta caulina</i>	Evidente <i>et al.</i> , 1998
 <p style="text-align: center;">Piridazocidina (19)</p>	<i>Streptomyces sp.</i>	Gerwick <i>et al.</i> , 1997
 <p style="text-align: center;">Coronatina (20)</p>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bender <i>et al.</i> , 1999

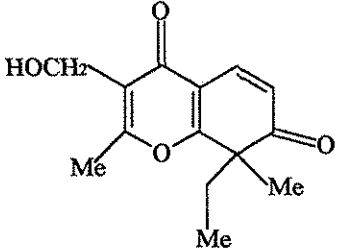
Cuadro 1. Metabolitos fitotóxicos de origen microbiano (continuación).

Metabolito Secundario	Microorganismo	Referencias Bibliográficas
 <p>Ácido coronafácico (21)</p>	<p><i>Pseudomonas syringae</i></p>	<p>Bender <i>et al.</i>, 1999</p>
 <p>Tabtoxina (22)</p>	<p><i>Pseudomonas syringae</i></p>	<p>Bender <i>et al.</i>, 1999</p>
 <p>Hidrocornexistina (23)</p>	<p><i>Paecilomyces variotii</i></p>	<p>Harborne, 1999</p>
 <p>Ofiobolina A (24)</p>	<p><i>Helminthosporium maydis</i></p>	<p>Leung <i>et al.</i>, 1984</p>

Cuadro 1. Metabolitos fitotóxicos de origen microbiano (continuación).

Metabolito Secundario	Microorganismo	Referencias Bibliográficas
 <p>Putaminoxina C (25)</p>	<p><i>Phoma putaminum</i></p>	<p>Harborne, 1999</p>
 <p>AV Toxina C (26)</p>	<p><i>AcrospERMUM viticola</i></p>	<p>Strobel <i>et al.</i>, 1991</p>
 <p>Espiciferinona (27)</p>	<p><i>Cochliobolus spicifer</i></p>	<p>Nakajima <i>et al.</i>, 1992</p>
 <p>Espiciferona A (28)</p>	<p><i>Cochliobolus spicifer</i></p>	<p>Nakajima <i>et al.</i>, 1992</p>
 <p>Espiciferona B (29)</p>	<p><i>Cochliobolus spicifer</i></p>	<p>Nakajima <i>et al.</i>, 1992</p>

Cuadro 1. Metabolitos fitotóxicos de origen microbiano (continuación).

Metabolito Secundario	Microorganismo	Referencias Bibliográficas
 <p data-bbox="310 679 514 754">Espiciferona C (30)</p>	<p data-bbox="675 555 973 592"><i>Cochliobolus spicifer</i></p>	<p data-bbox="1011 555 1303 592">Nakajima <i>et al.</i>, 1992</p>

Aunque existen fitotoxinas de origen microbiano que han sido consideradas por varias industrias agroquímicas como agentes herbicidas potenciales, sus rendimientos en el medio de fermentación son muy bajos; además la complejidad de sus estructuras ha impedido el desarrollo de un método eficiente de síntesis. Por ejemplo, la tentoxina (17) es un tetrapéptido cíclico producido por diferentes hongos fitopatógenos del género *Alternaria*. Este producto induce clorosis en las hojas de las especies sensibles y es eficiente para el control del crecimiento de plantas nocivas que crecen en los cultivos de maíz y frijol de soya (Duke & Lydon, 1993; Boyette & Abbas, 1995; Porter & Fox, 1997); sin embargo, no se ha podido lograr una síntesis eficiente del producto y su rendimiento a partir del medio de cultivo de los hongos productores es muy bajo.

La estrategia metodológica utilizada para el descubrimiento de fitotoxinas novedosas a partir de organismos fúngicos inicia con la preselección de las especies de acuerdo a un criterio ecológico que se fundamenta principalmente en las interacciones planta-microorganismo o microorganismo-microorganismo (Boyette & Abbas, 1995). Después de que las especies fúngicas han sido preseleccionadas, se

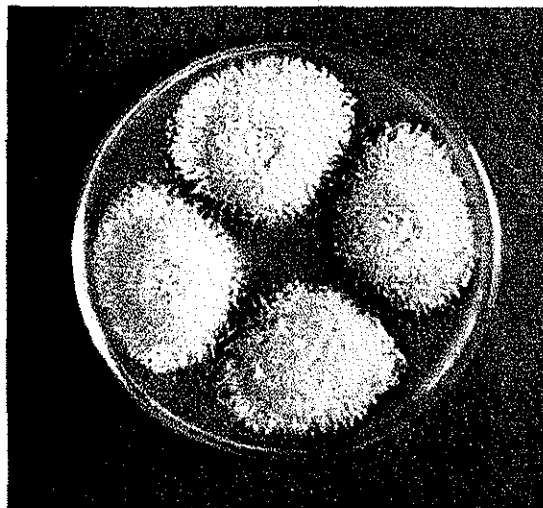
realizan pruebas conducentes a la determinación de las condiciones óptimas de cultivo, para lo cual las especies son cultivadas en pequeña escala, utilizando diferentes condiciones de cultivo. A continuación, se lleva a cabo la obtención de los extractos orgánicos del micelio y del medio de cultivo a partir de cada una de las especies cultivadas. Posteriormente, se efectúa la determinación del efecto fitotóxico de los extractos obtenidos por medio de la evaluación de sus efectos sobre la germinación y el crecimiento de diversas especies vegetales de prueba. Los extractos que presentan una actividad fitotóxica significativa son considerados como candidatos para su estudio biodirigido (Duke & Lydon, 1987; Duke & Abbas, 1995; Boyette & Abbas, 1995; Evidente, 2001).

Una vez seleccionada la especie fúngica apropiada se procede a su cultivo en gran escala. Al cabo de la fermentación se preparan los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio, los cuales se someten a estudios químicos biodirigidos que tienen como objetivo la obtención de las fitotoxinas. Durante todo el proceso se efectúan las mismas pruebas biológicas utilizadas durante el proceso de selección. Finalmente, los compuestos bioactivos aislados se caracterizan y se someten a pruebas de invernadero en especies vegetales nocivas y de interés agrícola, así como a ensayos específicos conducentes a la determinación de los mecanismos de acción de las fitotoxinas (Duke & Lydon, 1987; Duke & Abbas, 1995; Boyette & Abbas, 1995; Evidente, 2001).

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* M. C. González, Hanlin y Ulloa.

El hongo *Guanomyces polythrix* (Figura 1) se aisló en el año de 1978 a partir del guano del murciélago *Leptonycteris nivalis* en la Cueva del Diablo, localizada en Tepoztlán, Estado de Morelos, México. La clasificación taxonómica del hongo estuvo a cargo de los doctores María del Carmen González y Miguel Ulloa del Departamento de Botánica del Instituto de Biología, UNAM, y del doctor Richard Hanlin, de la Universidad de Georgia, E.U.A. La identificación se realizó con base en estudios morfológicos, filogenéticos y el análisis de la secuencia del ADN ribosomal 18S. El hongo pertenece a un género nuevo de ascomicetes que se relaciona con los géneros *Chaetomium* y *Farrowia*.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Hongo *G. polythrix* M. C. González, Hanlin y Ulloa en agar papa-dextrosa. Condiciones de incubación: 7 días de crecimiento y temperatura de 28 °C.

El crecimiento de *G. polythrix* es rápido, ya que aparece un ascoma joven en cuatro días (Figura 2A) y uno maduro en siete días (Figura 2B). Entre las principales características morfológicas de *G. polythrix* se encuentran la presencia de un ascoma membranoso, con un cuello largo adornado con pelos laterales glandulares septados, que surgen de las células externas, y pelos aglandulares terminales (Figuras 2B y 2C). Las ascas son clavadas, delicuescentes y contienen ocho ascosporas hialinas, unicelulares, elipsoides, sin un poro geminal (Figuras 3A y 3B). Estas características permitieron clasificar al hongo dentro de la familia Chaetomiaceae del orden Sordariales.

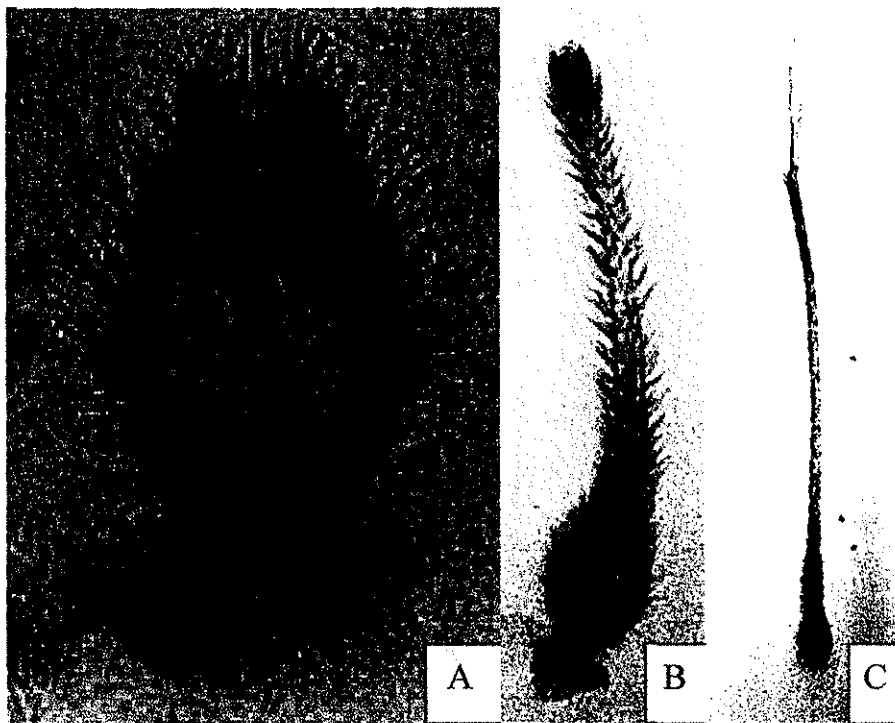


Figura 2. Hongo *G. polythrix*. A) Ascoma de cuatro días de crecimiento, B) Ascoma maduro de siete días de crecimiento, C) Pelo lateral glandular septado.

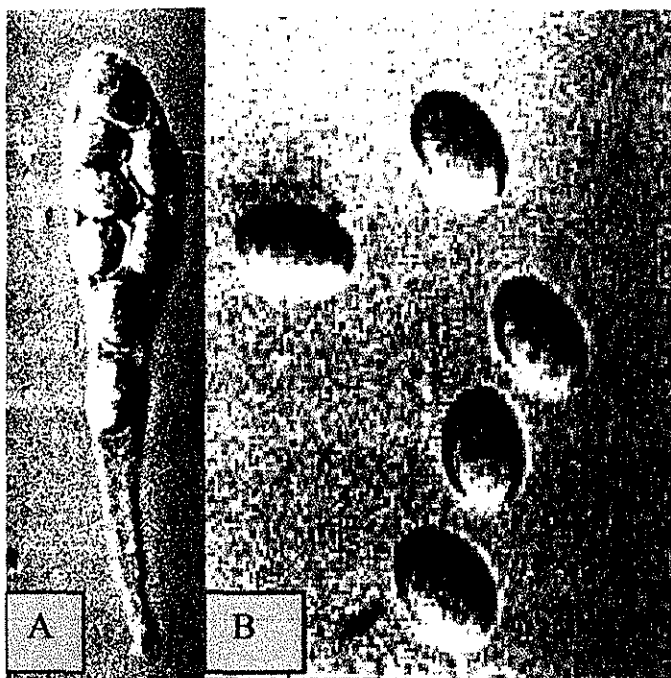


Figura 3. Hongo *G. polythrix*. A) Asca clavada delicuescente, con ocho ascosporas, B) Ascosporas hialinas, unicelulares, elipsoides y sin un poro germinal.

Una característica relevante de *G. polythrix* es su capacidad para formar pequeñas gotas de líquido en los ápices de los pelos laterales. Estas gotas adquieren una apariencia clara y brillante cuando el ascoma alcanza el estado maduro (Figura 4). Aunque no se conoce el papel biológico de estas secreciones se cree que tal vez actúan como atractores de insectos que contribuyen a la diseminación del hongo (González *et al.*, 2000).

En un estudio previo de este hongo se determinó que las condiciones óptimas para la fermentación son: medio de cultivo papa-dextrosa, casero; temperatura de

incubación de 28°C; agitación a 200 rpm y 15 días de fermentación (Macías *et al.*, 2000).

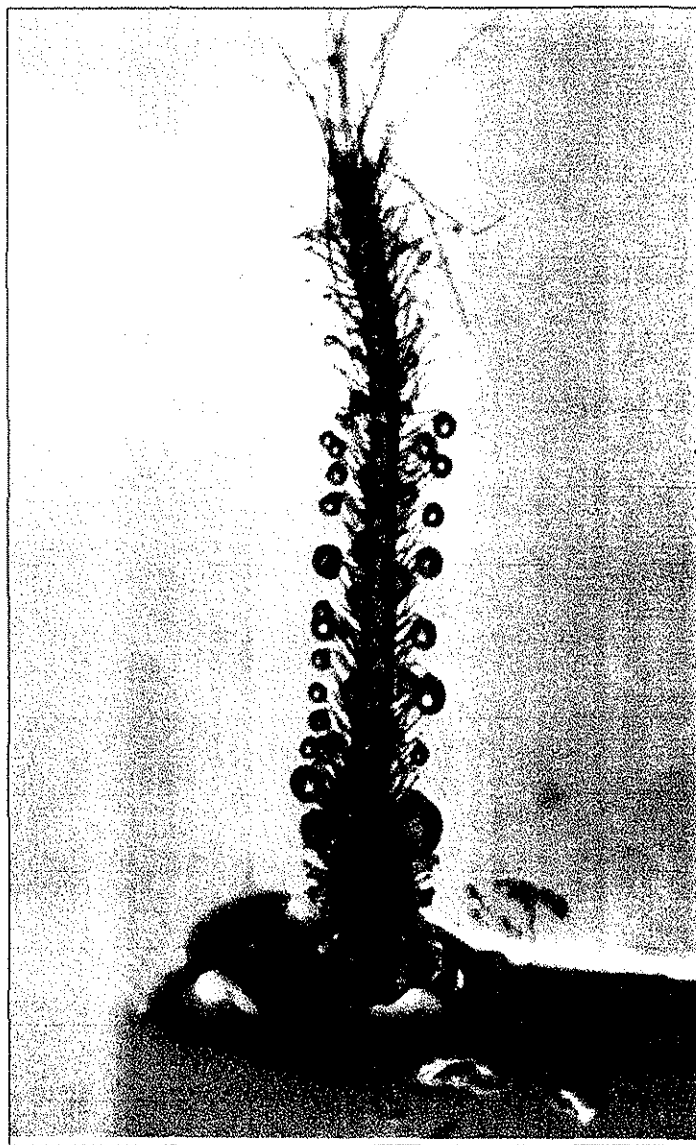
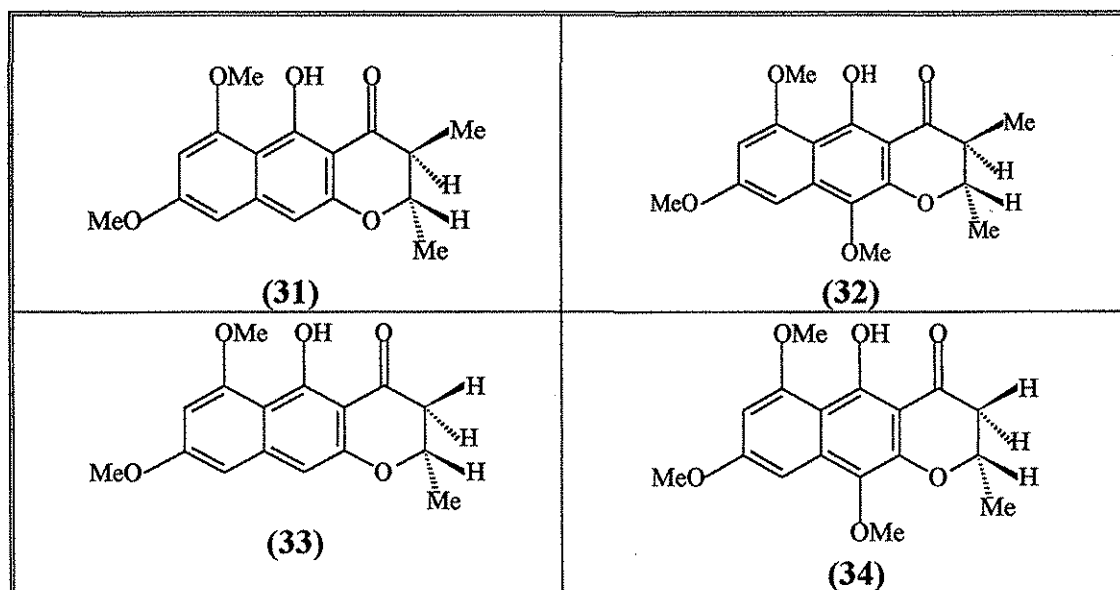


Figura 4. Hongo *G. polythrix*. Gotas claras y brillantes de líquido en los ápices de los pelos laterales.

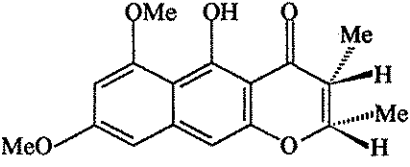
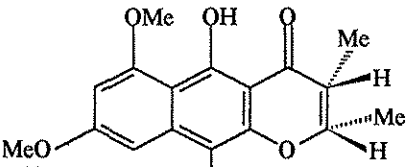
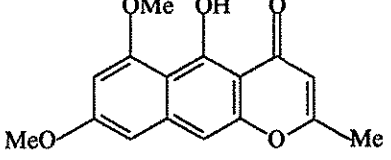
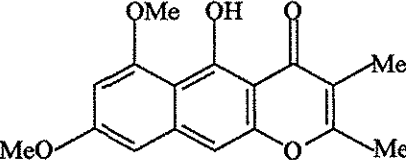
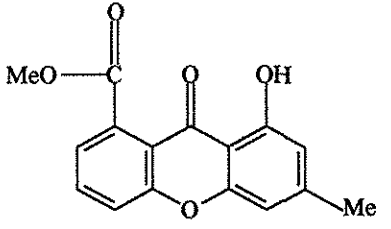
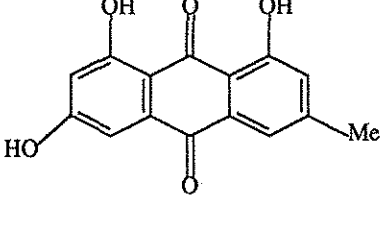
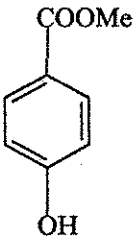
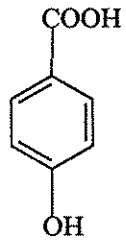
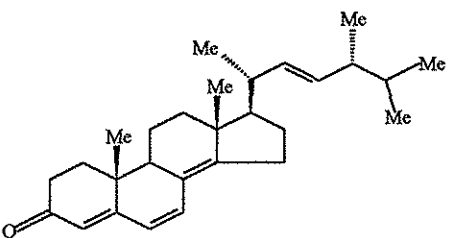
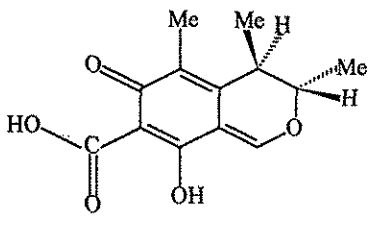
El estudio químico biodirigido de los extractos fitotóxicos, preparados a partir del medio de cultivo y del micelio del hongo, permitió el aislamiento y la

purificación de catorce metabolitos secundarios, entre los que se encuentran ocho metabolitos novedosos (Macías *et al.*, 2000; 2001). Los metabolitos novedosos se caracterizaron como la (+)-(2S,3S)- 5- hidroxí- 6,8-dimetoxi- 2,3-dimetil- 2,3- dihidronaftopirona (**31**), la (+)- (2S,3S)- 5-hidroxí- 6, 8, 10- trimetoxi-2,3- dimetil-2, 3- dihidronaftopirona (**32**), la (+)- (2S)- 5- hidroxí- -6, 8-dimetoxi-2- metil-2,3-dihidronaftopirona (**33**), la (+)-(2S)-5- hidroxí- 6,8,10- trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (**34**), la (+)- (2S, 3R)-5- hidroxí-6, 8- dimetoxi-2, 3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**35**), la (+)- (2S, 3R)-5-hidroxí-6, 8,10-trimetoxi -2, 3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**36**), la 2,3-dimetil-5-hidroxí-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (**38**) y la 8-hidroxí-1-metoxícarbonil-6-metil-xantona (**39**). De manera adicional se obtuvieron seis compuestos conocidos: la rubrofusarina B (**37**), la emodina (**40**), el metilparabeno (**41**), el ácido 4-hidroxí-benzoico (**42**), la ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona (**43**), y la citrinina (**44**). Las estructuras de los metabolitos se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Metabolitos aislados previamente a partir del hongo *G. polythrix* (Macías *et al.*, 2000; 2001).



Cuadro 2. Metabolitos aislados previamente a partir del hongo *G. polythrix* (Macías *et al.*, 2000; 2001) [continuación].

 <p style="text-align: center;">(35)</p>	 <p style="text-align: center;">(36)</p>
 <p style="text-align: center;">(37)</p>	 <p style="text-align: center;">(38)</p>
 <p style="text-align: center;">(39)</p>	 <p style="text-align: center;">(40)</p>
 <p style="text-align: center;">(41)</p>	 <p style="text-align: center;">(42)</p>
 <p style="text-align: center;">(43)</p>	 <p style="text-align: center;">(44)</p>

La elucidación estructural de los metabolitos aislados se realizó mediante el uso de métodos espectroscópicos, espectrométricos, quiroópticos y de difracción de rayos X.

La determinación del efecto de los compuestos aislados sobre la germinación y el crecimiento radicular de las malezas *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* utilizando el método de la caja de Petri permitió establecer sus propiedades fitotóxicas significativas. Todos los metabolitos inhibieron el crecimiento radicular de las arvenses con valores de CI_{50} comprendidos entre 1.3×10^{-5} y 6.5×10^{-4} M. Cabe destacar que la xantona **39** presentó un marcado efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de *E. crus-galli* (CI_{50} de 1.5×10^{-4} M).

También se demostró por medio de una electroforesis vertical descendente en condiciones desnaturalizantes (SDS -PAGE al 12%) que las fitotoxinas de *G. polythrix* interaccionan con la proteína calmodulina, ya que retardaron la movilidad electroforética de la proteína. El retardo en la movilidad electroforética de la calmodulina provocado por las fitotoxinas fue más notable en presencia del calcio (Macías *et al.*, 2000 y 2001). Posteriormente, se comprobó que los metabolitos **31**, **32**, **35**, **36**, **39**, **40** y **43** afectaron las propiedades moduladoras enzimáticas de la calmodulina. Para estos experimentos se utilizó como enzima blanco a la NAD cinasa dependiente de calmodulina aislada a partir de plántulas de chícharo. Los resultados de esta última evaluación permitieron establecer que el efecto inhibitorio fue mayor con los compuestos **31**, **32**, **35** y **36** cuando se empleó calmodulina de espinaca como activador. Sin embargo, al utilizar calmodulina de cerebro de bovino el efecto inhibitorio de los compuestos fue menor (Macías, 2002).

Por último, para descartar un efecto directo de las fitotoxinas sobre la enzima NAD cinasa, se procedió a evaluar su efecto sobre la actividad de la cinasa en ausencia de calmodulina. Los resultados indicaron que con excepción de los

metabolitos 33 y 34, las fitotoxinas restantes no interfieren significativamente con la actividad basal de la enzima NADcinasa (Macías, 2002).

2.2. Fitotoxinas del hongo *Phoma herbarum* Westend.

El hongo *Phoma herbarum* (Figura 5) se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial. Crece principalmente en la madera de los árboles, suelo y agua de las zonas templadas; así como en los bosques, la composta de los jardines, las dunas de los desiertos, los pastizales, los sedimentos de los ríos y los suelos con vegetación de tundra. Por otra parte, este hongo se ha logrado aislar a partir de los cultivos de maíz, papa, pistache y trigo (Domsch, 1982).



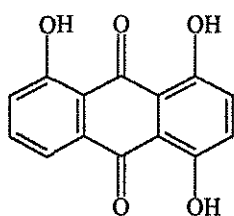
Figura 5. Hongo *Phoma herbarum* Westend.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

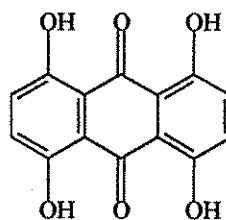
Investigaciones previas permitieron establecer que *P. herbarum* es fitopatógeno para *Acacia mearnsii*, *Taraxacum officinale* (diente de león) y *Avena*

fatua, cuando se inocula artificialmente (Olembo, 1972; Domsch, 1982; Brebaum & Boland, 1999).

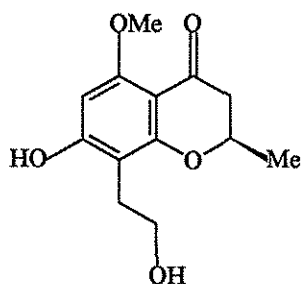
En estudios químicos realizados durante las décadas de los 80 y 90's sobre esta especie se logró el aislamiento y la caracterización de varias antraquinonas [la helmintosporina (45), la cinodontina (46)] y benzo- γ -pironas [la LL-D253 α (47), la LL-D253 β (48) y la LL-D253 γ (49)] (Domsch, 1982; Chandler, 1992a y 1992b).



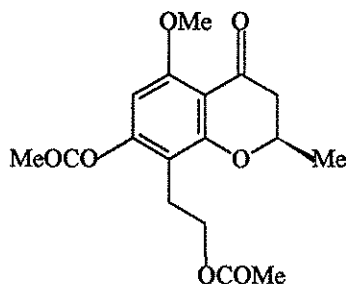
(45)



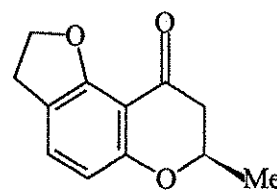
(46)



(47)



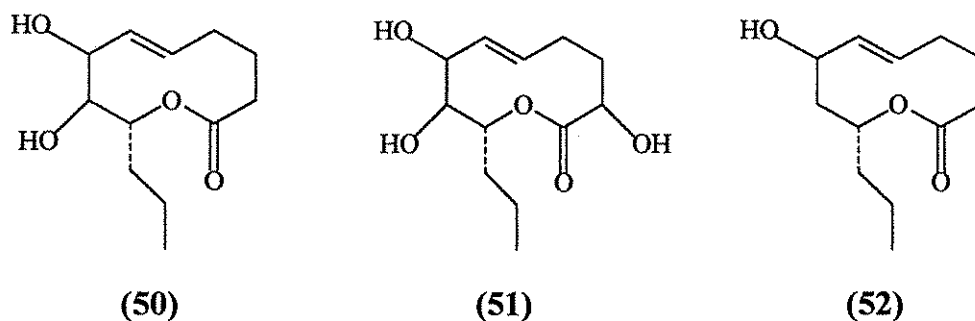
(48)



(49)

Recientemente se investigó un aislamiento de *P. herbarum* obtenido a partir de las semillas del maíz cacahuacintle recolectadas en el Bajío mexicano y proporcionadas por la Compañía Nacional de Subsistencias Populares

(CONASUPO). El estudio condujo al aislamiento de tres nonenólidas novedosas denominadas con los nombres triviales de herbaruminas I (50), II (51) y III (52).



La elucidación estructural de estos productos se llevó a cabo mediante métodos químicos, espectroscópicos, quiroópticos y cálculos de mecánica molecular (Rivero-Cruz *et al.*, 2000; Rivero-Cruz, 2001).

La evaluación de la actividad fitotóxica en semillas de *A. hypochondriacus* permitió establecer que los compuestos 50-52 inhiben el crecimiento vegetal a nivel preemergente. Para determinar los posibles mecanismos de acción se evaluó el efecto de las fitotoxinas sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca, y sobre la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) de maíz y glutamino sintetasa (GS) de amaranto, encontrándose que ninguna de las fitotoxinas afectaban los blancos de acción estudiados. De manera adicional, se investigó si estos compuestos interaccionaban con las calmodulinas de cerebro de bovino y de espinaca mediante el empleo de una electroforesis desnaturalizante, observándose que las fitotoxinas alteran la movilidad de ambas calmodulinas. Sin embargo, en esa ocasión no se determinó si la interacción con la calmodulina modificaba su capacidad para activar sus enzimas blanco, y por lo tanto su papel fisiológico (Rivero-Cruz *et al.*, 2000; Rivero-Cruz, 2001).

2.3. Fitotoxinas de la especie vegetal *Prionosciadium watsoni* Coulter &

Rose ex S. Watson.

Prionosciadium watsoni Coulter & Rose ex S. Watson (Umbelliferae), conocida como "flor de ocotillo", "ococote" o "hierba del oso" es una planta medicinal que se distribuye en los bosques de pino y roble, desde Hidalgo hasta Chihuahua, en México (Figura 6). En las prácticas médicas tradicionales de México, la infusión de las raíces de esta especie se emplea para aliviar los dolores gastrointestinales, y los frutos para el tratamiento de la diabetes y fiebre (Aguilar *et al.*, 1994).

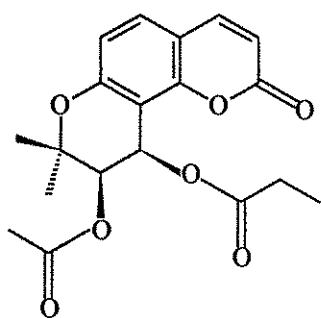


Figura 6. *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose ex S. Watson.

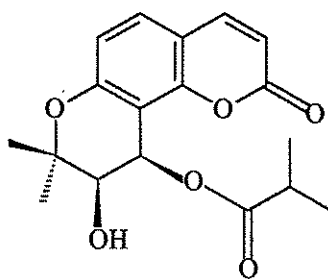
Los individuos de esta especie son arbustos erectos que pueden alcanzar más de 2 m de altura, con tallos huecos, hojas grandes y lobuladas. Sus flores son generalmente de un color verde-amarillo y los frutos poseen un sabor acre (Figura 6).

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

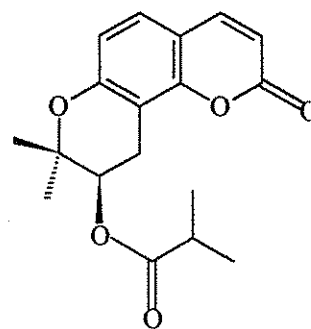
En un estudio previo, *P. watsoni* se seleccionó como una fuente potencial de agentes herbicidas debido a que el extracto CH₂Cl₂- MeOH (1:1) preparado a partir de las partes aéreas de la planta presentó actividad fitotóxica significativa en contra de *A. hypochondriacus*, *E. crus-galli* y *Lemna pausicostata*. Posteriormente, el estudio químico biodirigido del extracto bioactivo permitió el aislamiento de tres piranocumarinas y dos piranocromonas novedosas. Estos compuestos se caracterizaron con base en métodos espectroscópicos, químicos y de difracción de rayos X, como el éster del ácido propiónico (9R, 10R)-9-acetoxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo [1,2-b:3,4-b'] dipiran-2-ona-10-il (**53**), éster del ácido isobutírico (9R, 10R)-9-hidroxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona-10-il (**54**), éster del ácido isobutírico (9R) -8,8-dimetil-9, 10-dihidro-2H, 8H-benzo [1,2-b:3,4-b'] dipiran-2-ona-9-il (**55**), éster del ácido isobutírico (3R)-5-metoxi-3, 4-dihidro-2, 2, 8-trimetil-6-oxo-2H, 6H-benzo [1,2-b:5,4-b']dipiran-3-il (**56**) y el ester del ácido 2-metilbut-(2Z)-enoico (3R) -5- metoxi-3, 4-dihidro-2, 2, 8- trimetil-6-oxo-2H, 6H-benzo [1,2-b:5,4-b']dipiran-3-il (**57**). La estereoquímica de los carbonos quirales se estableció por medio de la metodología de los ésteres de Mosher (Valencia-Islas *et al.*, 2002).



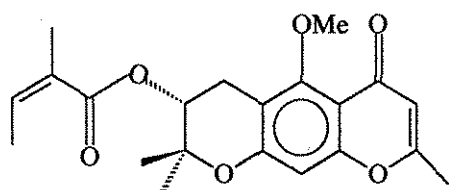
(53)



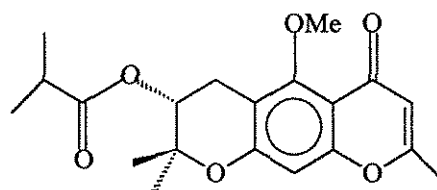
(54)



(55)

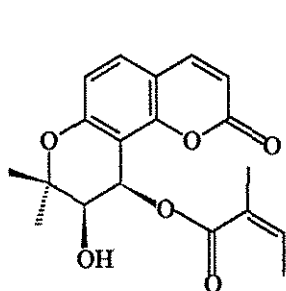


(56)

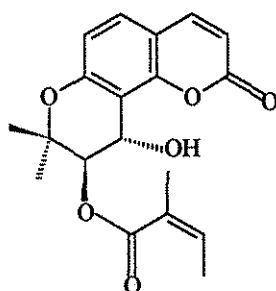


(57)

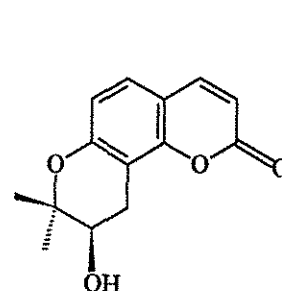
De manera adicional, se obtuvieron la quianhucumarina A (**58**), el éster del ácido 2-metilbut-(2Z)-enoico (9R, 10R)-10-hidroxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo [1,2-b:3,4b']-dipiran-2-ona-9-il (**59**), el éster del ácido 2-metilbut-(2E)-enoico (9R,10R)-10-hidroxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo [1,2-b:3,4b']-dipiran-2-ona-9-il (**60**), la seravshanina (**61**), la quianhucumarina D (**62**), la (+)-*cis*-quelactona (**63**) y la jatamansina (**64**), los cuales se identificaron mediante la comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados previamente en la literatura (Valencia-Islas *et al.*, 2002).



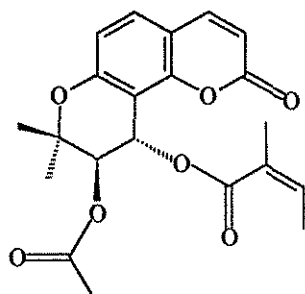
(58)



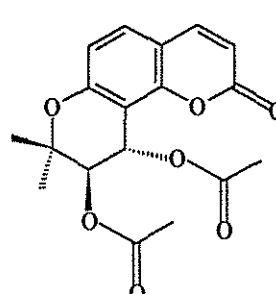
(59)



(60)



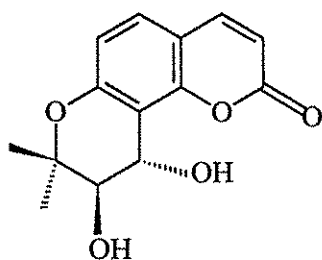
(61)



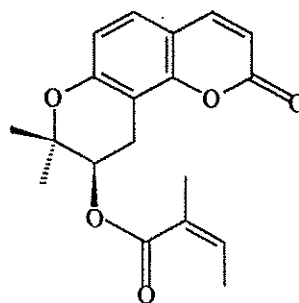
(62)

La actividad fitotóxica de los compuestos aislados y sus derivados químicos se determinó sobre la germinación y elongación de las radículas de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*, permitiendo establecer que todos los metabolitos secundarios poseen propiedades fitotóxicas significativas, en especial los compuestos **56** y **57**. Asimismo, se evaluó el potencial fitotóxico de los compuestos sobre *Lemna pausicostata*, observándose que sólo los metabolitos **55** y **64** poseen actividad fitotóxica sobre esta especie. De igual forma, estos compuestos ocasionaron una reducción en el contenido de clorofila y la pérdida de electrolitos de esta especie.

Para determinar el mecanismo de acción de los metabolitos secundarios **55-57** y **64** se procedió a evaluar su efecto sobre el proceso de respiración en mitocondrias aisladas de los hipocotilos de frijol mungo (*Vigna radiata*) y sobre la fotosíntesis en hojas de frijol mungo y frijol común (*Phaseolus vulgaris*). De manera adicional, se evaluó la interacción de los compuestos con la proteína calmodulina de cerebro de bovino y de espinaca. Los compuestos **56** y **57** inhibieron el transporte de electrones en el complejo II de la cadena de respiración mitocondrial, mientras que los compuestos **55** y **57** inhibieron el proceso de la fotosíntesis en hojas aisladas de *Vigna radiata* y *Phaseolus vulgaris*, debido a que afectan los centros de reacción activos y la absorción de la luz por el complejo antena.



(63)



(64)

La interacción de los compuestos **53-64** con las calmodulinas de espinaca y cerebro de bovino (Sigma) se determinó de manera preliminar mediante una electroforesis desnaturizante. Todos los compuestos ocasionan un retardo en la movilidad electroforética de la proteína tanto de origen animal (cerebro de bovino) como vegetal (espinaca). Este efecto fue más notable con las piranocromonas **56** y **57**. De nueva cuenta, en este estudio no se determinó si la interacción de estos compuestos con la proteína modifica sus propiedades reguladoras enzimáticas.

Con la finalidad de verificar la inocuidad *in vitro* de los compuestos aislados, se realizaron pruebas de citotoxicidad animal sobre cuatro líneas celulares de mamífero (H4TG, MDCK, NIH3T3 y KA31T¹). Los resultados derivados de este experimento revelaron que de manera general ninguna de las fitotoxinas de *P. watsoni* son citotóxicas debido a que los valores de CI₅₀ obtenidos son mayores a 50 µM (Valencia-Islas *et al.*, 2002).

2.4. Fitotoxinas de la especie vegetal *Leucophyllum ambiguum* Humb.& Bonpl.

Leucophyllum ambiguum (Scrophulariaceae) es un arbusto perennifolio con hojas cubiertas de pubescencia lanosa blanca, que se encuentra generalmente formando parte de matorrales xerófilos localizados a lo largo de la Sierra Madre Oriental, desde Nuevo León hasta Hidalgo, extendiéndose un poco hacia la Planicie Costera Nororiental y el Altiplano (Figura 7). Esta especie se conoce con los nombres populares de “cenizo de Monterrey”, “chamizo” y “raguno” (Díaz, 1976; Rzedowski, 1978; Argueta, 1994). En la medicina tradicional de Michoacán y San Luis Potosí, *L. ambiguum* se utiliza para el tratamiento de las enfermedades hepáticas y vesiculares (Paredes, 1984).

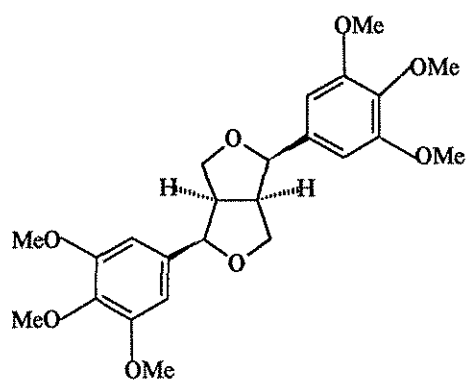
¹H4TG= Células de hepatoma de rata resistentes a la tioguanina; MDCK= Células de riñón de perro Mandin-Darby; NIH3T3= Línea celular permanente de fibroblastos embrionarios de ratón suizo 3T3; KA31T= Cepa Kirsten de células 3T3 transformadas por el virus del sarcoma Moloney.



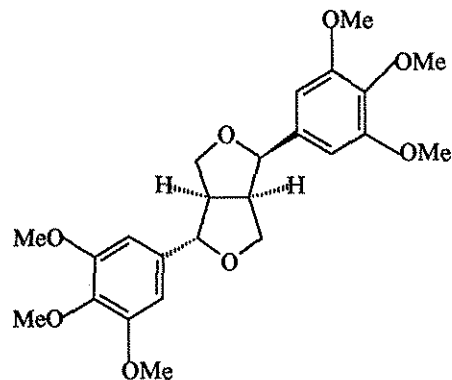
Figura 7. *Leucophyllum ambiguum* Humb.& Bonpl.

La única especie del género previamente estudiada es *L. frutescens* a partir de la cual se aislaron los lignanos diayangambina (65), epiyangambina (66) y diasesartemina (67). Estos productos demostraron una actividad fitotóxica significativa, constituyendo un antecedente importante para considerar a *L. ambiguum* como una fuente potencial de metabolitos fitotóxicos (Rimando, 1999). Por lo tanto, la preselección de *Leucophyllum ambiguum* se llevó a cabo con base en un criterio quimiotaxonómico. Posteriormente, se procedió a realizar la preparación del extracto orgánico de *L. ambiguum* y la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*. El extracto activo de *L. ambiguum* se fraccionó de manera biodirigida

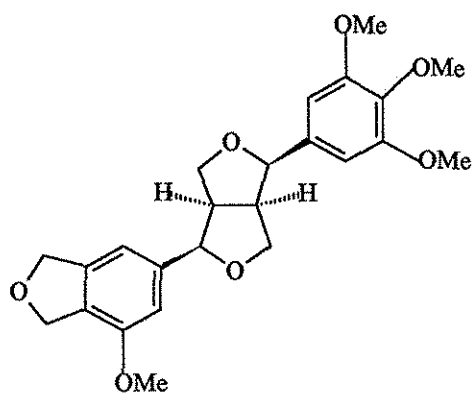
para así obtener los lignanos fitotóxicos 2,2'-dimetoxisesamina (68), la 2-metoxicobusina (69), la cobusina (70), y la 2-metoxi-4'-hidroxidesmetoxicobusina (71). En esta ocasión se determinó que la fotosíntesis no constituye el blanco de acción de estas fitotoxinas (Rojas, 2002).



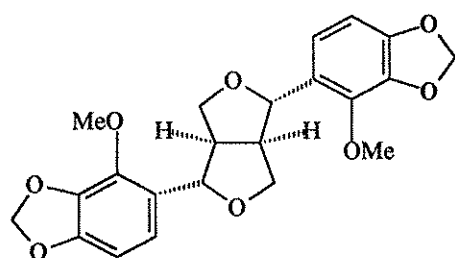
(65)



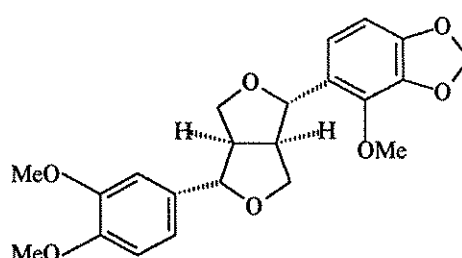
(66)



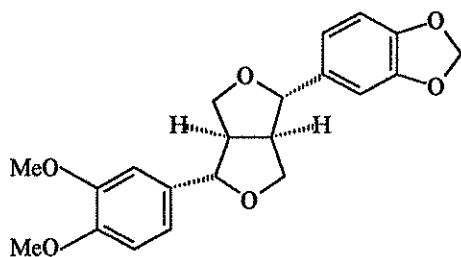
(67)



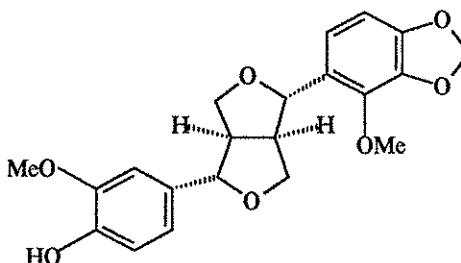
(68)



(69)



(70)



(71)

2.5. Metabolitos secundarios con un efecto sobre la proteína calmodulina.

La calmodulina (CaM) es una proteína de bajo peso molecular (16.7 KDa), de naturaleza ácida, que se ha aislado y caracterizado a partir de una gran variedad de tejidos animales y vegetales, constituida en promedio por 148 aminoácidos (Persechini *et al.*, 1996; Buchanan *et al.*, 2000). Su ubicuidad sugiere una función fundamental en los procesos celulares. Estudios recientes también han permitido determinar que las propiedades bioquímicas, físicas y biológicas de las calmodulinas de origen vegetal son muy similares a las de origen animal, lo cual demuestra su alta

conservación a través de la escala filogenética. La principal diferencia entre ambas proteínas consiste en la presencia de un residuo de cisteína en la posición 27 y del dipéptido metionina-metionina en las posiciones 145 y 146 en la calmodulina vegetal. La proteína animal presenta este dipéptido desplazado en un residuo y carece de la cisteína en la posición 27.

La calmodulina consta de dos lóbulos globulares conectados por una región central flexible constituida por 26 aminoácidos y que forma una α -hélice cuando se encuentra en estado cristalino (Figura 8). Cada lóbulo contiene dos sitios de unión al calcio o dominios funcionales, que se designan con los números romanos I-IV. Los dominios I y II constituyen el extremo amino terminal de la proteína y poseen baja afinidad por el calcio, mientras que los dominios III y IV forman el extremo carboxilo terminal y presentan una elevada afinidad por el calcio. Cada dominio se encuentra constituido por 12 aminoácidos y son ricos en ácido aspártico y glutámico (Ohki *et al.*, 1997; Cobb *et al.*, 1999).

La calmodulina es el miembro más estudiado de un grupo de proteínas que son utilizadas por las células eucariotas en los procesos de transducción de las señales intracelulares mediadas por el calcio. La calmodulina carece de actividad enzimática, sin embargo, regula la actividad de más de 40 proteínas blanco incluyendo la fosfodiesterasa de los nucleótidos cíclicos, la sintasa de óxido nítrico, la glutamato descarboxilasa, la fosfatasa, la NADcinasa, la Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPasa, la superóxido dismutasa y varias cinasas, por tan solo mencionar algunas. La calmodulina también regula a muchas proteínas estructurales y transportadoras de membrana (Marmé & Dieter, 1983; Mirzoeva *et al.*, 1999; Ohki *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1999). La activación de sus proteínas blanco ocurre sólo en presencia del calcio, cuando su concentración intracelular se eleva de su nivel de reposo de 10^{-7} M hasta 10^{-6} M (Manalan & Klee, 1984; Persechini *et al.*, 1996).

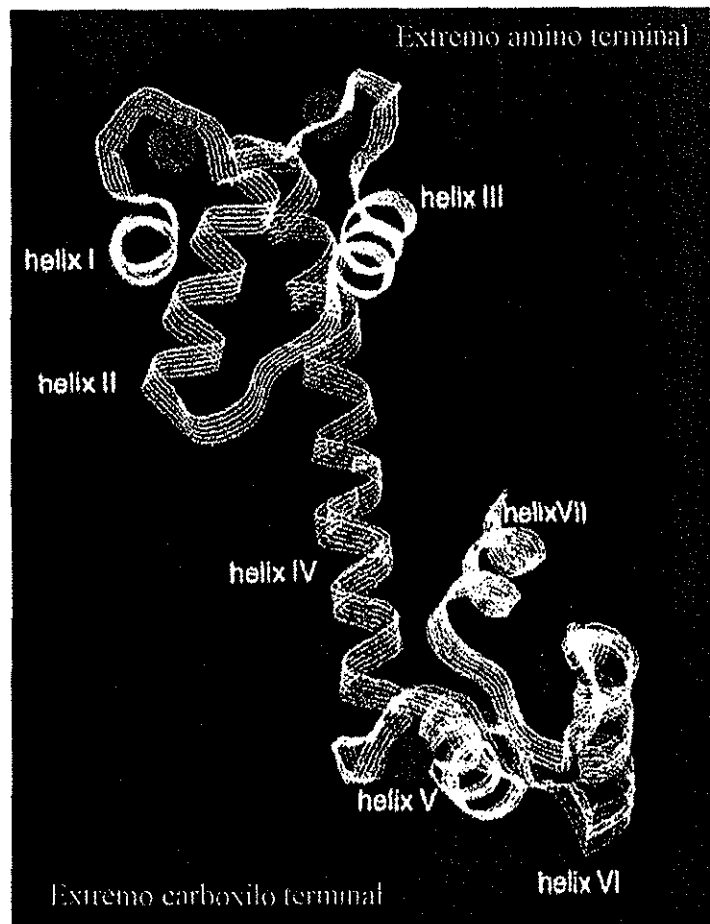


Figura 8. Estructura de la calmodulina dependiente de calcio. El extremo amino terminal se encuentra constituido por los dominios I y II; el extremo carboxilo terminal por los dominios III y IV.

La activación de las proteínas blanco reguladas por la calmodulina se realiza a través de un mecanismo que consta de dos etapas. Primero ocurre la interacción entre el calcio y los dominios de la calmodulina en el siguiente orden: III, IV, I y II. Posteriormente la unión al calcio provoca grandes cambios conformacionales dentro de la α -hélice que deja expuestas a las superficies hidrofóbicas (ricas en metionina, leucina y fenilalanina). Por otra parte, durante la interacción los lóbulos amino y carboxilo terminales de la calmodulina convergen formando un canal hidrofóbico que rodea a la proteína blanco (Cobb *et al.*, 1999; Mirzoeva *et al.*, 1999; Yuan *et al.*,

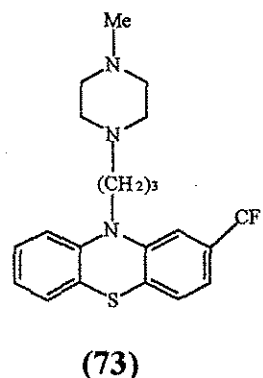
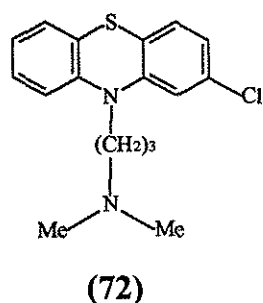
1999). Las proteínas blanco poseen dominios de unión a la calmodulina que consisten usualmente de una región de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos y con la capacidad de formar una α -hélice básica con carga positiva. Por otra parte, el sitio de unión de la calmodulina se encuentra constituido por ocho residuos de metionina que proporcionan una superficie hidrofóbica altamente ajustable para la unión debido a la flexibilidad intrínseca de la cadena lateral de los residuos de metionina y a la alta polarizabilidad de sus átomos de azufre que generan sitios de unión adecuados para las fuertes interacciones con superficies no polares, y que también se pueden adaptar a los sitios de unión de las proteínas blanco, aun cuando presenten diferentes secuencias de residuos (Gellman, 1991; Zhang *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 1999).

La calmodulina participa en los procesos de regulación y transducción de las señales que tienen lugar durante la germinación y el crecimiento vegetal. Esta proteína también participa en los mecanismos de defensa contra patógenos, la estimulación del crecimiento gravitrópico, las señales mediadas por el ácido giberélico, los procesos fisiológicos mediados por la luz, la formación de los filamentos de actina y el ciclo de división celular (Marmé & Dieter, 1984; Lee *et al.*, 1999). Por ejemplo, en estudios *in vitro* realizados en cultivos embriogénicos de zanahoria doméstica se estableció que durante el proceso de germinación se duplican los niveles de calmodulina y se incrementa la concentración de una proteína dependiente de calmodulina (Oh *et al.*, 1992).

Por otra parte, el sistema Ca^{2+} - calmodulina se encuentra involucrado en la germinación de semillas a través del control que ejerce sobre las proteínas dependientes de calmodulina. Por ejemplo, la NAD cinasa incrementa el nivel de NADP^+ , promoviendo la reactivación de la ruta de las pentosas, lo cual ocurre en las primeras etapas de la germinación. También se cree que participa en el control de la síntesis del ADN y la mitosis celular (Cocucci & Negrini, 1988).

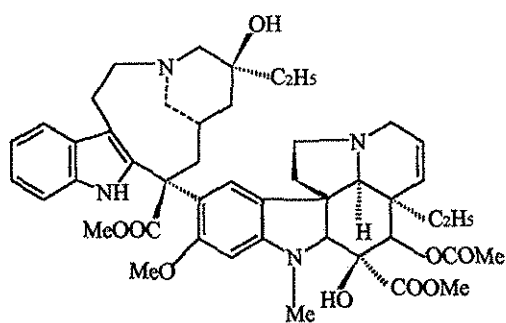
En los vegetales se han descubierto varias isoformas de calmodulina con diferentes grados de divergencia en la secuencia de aminoácidos. Estas isoformas poseen la capacidad de activar de manera diferencial algunas de las enzimas dependientes de calmodulina. En consecuencia estas isoformas podrían constituir blancos de acción específicos de agentes herbicidas (Lee *et al.*, 1999; 2000).

La actividad reguladora de la calmodulina se inhibe en presencia de ciertos fármacos y numerosos metabolitos secundarios distintos a los aislados de *G. polythrix*. Entre los fármacos más importantes se encuentran antipsicóticos como la clorpromazina (72) y la trifluoperazina (73), los cuales actúan como poderosos antagonistas interfiriendo con la activación de las enzimas dependientes de calmodulina (Marmé & Dieter, 1984; Leung *et al.*, 1988). Estudios de cristalografía de rayos X y de dicroísmo circular demostraron que de una a cuatro moléculas de trifluoperazina (73) pueden unirse a una de calmodulina, encontrándose su sitio de unión en la región hidrofóbica del carboxilo terminal de los dominios III y IV, así como en la región central de unión o interdominio.

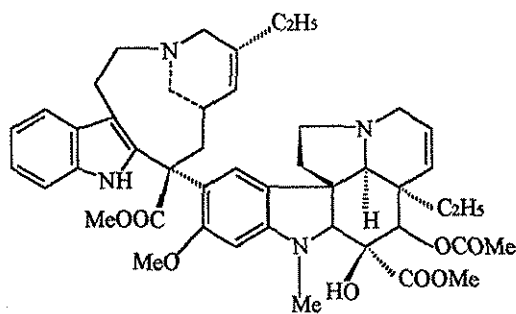


Otro fármaco que interacciona con la calmodulina es el compuesto R24571, derivado del antimicótico miconazol. Este producto afecta la actividad de las enzimas dependientes de calmodulina a una concentración menor que la clorpromazina (72) y trifluoperazina (73) [Marmé & Dieter, 1983].

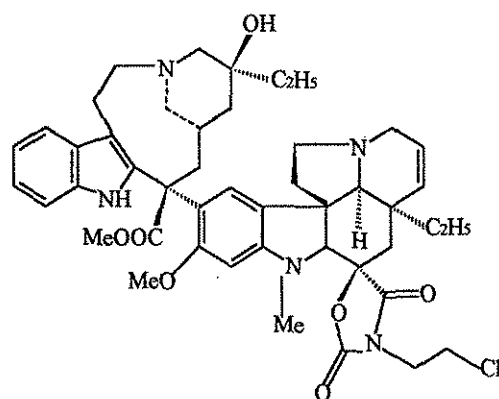
Por último, con relación al grupo de los fármacos, recientemente se demostró que la vinblastina (74), la navelbina (75) y su análogo, la 3''-(β-cloroetil)-2'',4''-dioxo-3,5''-espirooxazolidino-4-deacetoxivinblastina (KAR-2) [76], interaccionan con la calmodulina. Estos compuestos actúan como antagonistas competitivos. De hecho, la KAR-2 se une a la calmodulina aún en ausencia del calcio (Vertessy *et al.*, 1998).



(74)



(75)

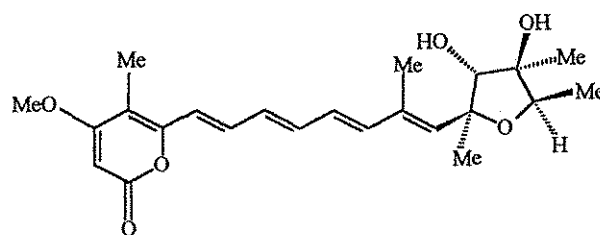


(76)

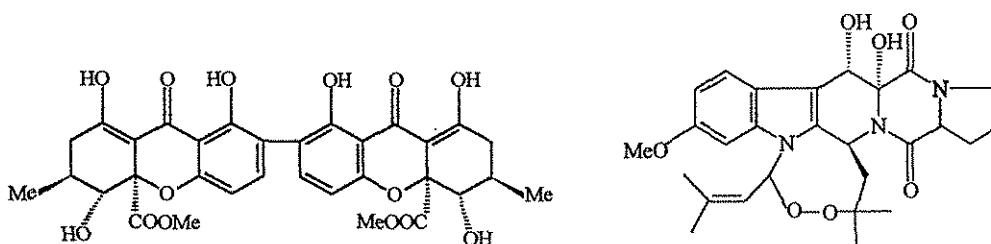
La melitina, un péptido presente en el veneno de abejas, se une al extremo amino terminal de los dominios I y II y al extremo carboxilo terminal de los

dominios III y IV de la calmodulina. Este producto natural de origen animal se ha utilizado ampliamente para estudiar el comportamiento funcional de la calmodulina (Pala *et al.*, 1998; Vertessy *et al.*, 1998).

La citreoviridina (77), el ácido secalónico (78) y la verruculogena (79) son metabolitos neurotóxicos producidos por hongos del género *Penicillium*, que también interaccionan con la calmodulina afectando sus propiedades reguladoras, debido a que inducen cambios conformacionales que exponen las regiones hidrofóbicas de la proteína y que alteran la actividad de varias enzimas dependientes de la proteína calmodulina (Pala *et al.*, 1999).



(77)



(78)

(79)

El efecto neurotóxico de las tres micotoxinas se atribuye a que modifican la activación de enzimas clave como las acetilcolinesterasas, las ATPasas, las proteínas

cinasa C (PKC), y las adenilato ciclasas, que participan en la regulación de procesos fisiológicos del sistema nervioso central. Así, existen varios estudios en los cuales se ha logrado demostrar que la disminución en la actividad de la proteína cinasa C interfiere con el transporte de calcio a través de las membranas neuronales ocasionando una alteración en la actividad neuronal (Pala *et al.*, 1999).

Por otra parte, mediante los estudios de fluorescencia y de la verificación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina se logró demostrar que algunos flavonoides como la quercetina y compuestos del tipo fenil propanoide interaccionan con el complejo calcio-calmodulina actuando como antagonistas (Nishino *et al.*, 1984; Paliyath & Poovaiah, 1985).

Otro grupo de compuestos estudiados son las naftalensulfonamidas. Estas amidas interaccionan con las regiones hidrofóbicas de la calmodulina y afectan su actividad moduladora (Marmé & Dieter, 1983; Vertessy *et al.*, 1998).

La ofiobolina A (24) es uno de los antagonistas de la calmodulina más conocidos y estudiados. La ofiobolina A (24) es una fitotoxina de naturaleza sesterpenoide producida por hongos fitopatógenos del género *Bipolaris*, que usualmente infectan los cultivos de arroz, maíz y sorgo. Estos hongos producen en las plantas las enfermedades conocidas como “hambruna del arroz de Bengala” en India y “tizón sureño de la hoja de maíz” en E.U.A. (Leung *et al.*, 1984; Leung *et al.*, 1985; Au & Leung, 1998; Au *et al.*, 2000a; Au *et al.*, 2000b).

Tanto la ofiobolina A (24) como las especies productoras de esta fitotoxina generan lesiones de color café, inducen cambios en la permeabilidad de la membrana, disminuyen la fijación fotosintética del CO₂, estimulan la liberación de β- cianina, electrolitos y glucosa de las raíces, producen cambios en la respiración,

estimulan la apertura de los estomas e inhiben el crecimiento de las raíces, así como la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos.

La interacción de la ofiobolina A (**24**) con la calmodulina se demostró inicialmente a través de la inhibición de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina. Cabe señalar que la ofiobolina A (**24**) no modifica la actividad basal de la fosfodiesterasa. La interacción directa de la calmodulina de cerebro de bovino con esta fitotoxina se demostró por medio de experimentos de fluorescencia. De tal forma que en presencia de ofiobolina A (**24**) la fluorescencia intrínseca a la tirosina del complejo Ca^{2+} -calmodulina se reducía drásticamente (Leung *et al.*, 1984; 1985; Au & Leung, 1998; Au *et al.*, 2000a; 2000b).

Estudios de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) permitieron determinar que la ofiobolina A (**24**) retarda la movilidad electroforética de la proteína calmodulina, la cual es dependiente del calcio. Los resultados de este experimento indicaron también que la unión *in vitro* entre la ofiobolina A (**24**) y la calmodulina es de naturaleza covalente (Leung *et al.*, 1984; 1985).

Por medio de la técnica de espectroscopía de UV se demostró que la ofiobolina A (**24**) reaccionaba con la calmodulina para producir un cromóforo con un máximo de absorción a 272 nm. Se propone que el cromóforo se genera por la reacción del grupo aldehído de la fitotoxina con los residuos de lisina presentes en la calmodulina.

Los sitios de unión para la ofiobolina A (**24**) en la calmodulina de cerebro de bovino se determinaron por medio de un estudio de mutagénesis dirigida sobre los residuos de lisina, utilizando el método de intercambio de los residuos de lisina por

glutamina o arginina. Estos experimentos permitieron establecer que los residuos de las posiciones 75, 77 y 148 son los sitios de unión para esta fitotoxina.

Finalmente, su efecto *in vivo* se evaluó por medio del tratamiento de las raíces de maíz con la ofiobolina A (24). Este procedimiento ocasiona una disminución en la concentración de calmodulina activa en los extractos obtenidos a partir de las raíces (Leung *et al.*, 1985).

Como se desprende de la información antes presentada, los métodos más utilizados para detectar inhibidores de la calmodulina incluyen: (i) análisis de fluorescencia, (ii) electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), (iii) estudios de mutagénesis, y (iv) métodos enzimáticos empleando algunas de las enzimas moduladas por la calmodulina. Estos últimos consisten en evaluar si los productos de prueba inhiben la actividad de la enzima blanco en presencia de calmodulina.

La enzima fosfodiesterasa del AMPc de cerebro de bovino es la proteína dependiente de calmodulina más frecuentemente utilizada para evaluar los efectos de las mutaciones de CaM en la activación de las proteínas blanco y para detectar inhibidores de la calmodulina (Yuan *et al.*, 1999). A continuación se incluyen algunas generalidades acerca de esta enzima.

En general, las fosfodiesterasas (PDEs) son las enzimas que catalizan la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) a sus correspondientes nucleósidos de monofosfato (Figura 9). Las fosfodiesterasas dependientes de calmodulina (CaM-PDEs) son proteínas homodiméricas, N^o-acetiladas, con cadenas polipeptídicas de 529 residuos y con un peso que va de 58 a 69 KDa. En presencia del calcio se unen a dos moléculas de calmodulina y actúan como mediadores entre el calcio y los nucleótidos cíclicos, permitiendo que los procesos dependientes de los

nucleótidos cíclicos sean regulados por un incremento en la concentración intracelular de calcio. Para que las fosfodiesterasas presenten actividad requieren de la presencia de un catión divalente o cofactor, entre los que se encuentran Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , o Co^{2+} y un cofactor endógeno (Mg^{2+}).

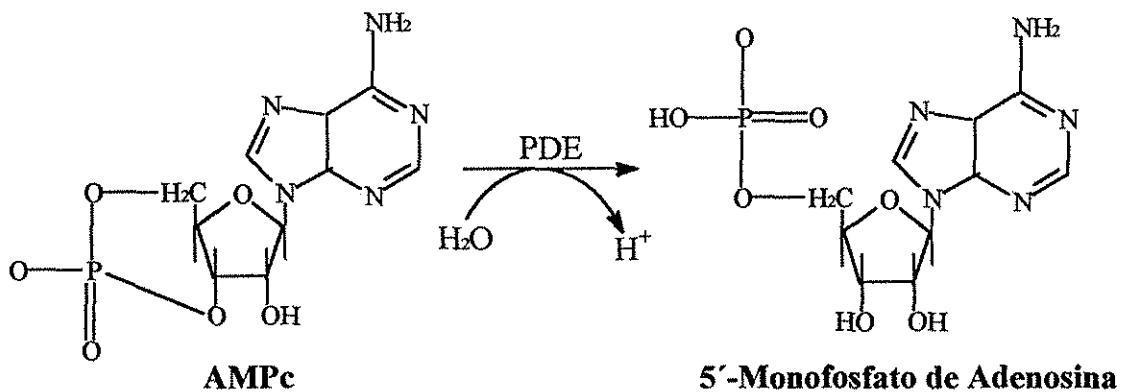


Figura 9. Reacción de hidrólisis del AMPc en 5'-monofosfato de adenosina, catalizada por la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina.

Se conocen al menos 11 familias de fosfodiesterasas y cada una posee secuencias únicas en sus dominios catalíticos y frecuentemente se expresan de manera selectiva en ciertas células permitiendo la regulación del nivel de nucleótidos cíclicos en cada célula. Es decir, las isoformas se expresan de manera diferencial y se regulan en diferentes tipos de células, modulando la localización, la

selectividad del sustrato, la cinética y su respuesta a los compuestos que activan o inhiben a la enzima. Aunque se conocen varios miembros de esta familia, sólo se han descrito y caracterizado algunas isoformas como las de 61 KDa y 69 KDa, las cuales se han aislado a partir del cerebro de bovino, así como las de 59 KDa y de 58 KDa, obtenidas a partir del corazón y del pulmón de bovino, respectivamente. Estas isoformas se diferencian por su tamaño aparente, la inmunoreactividad que presentan, su habilidad para ser fosforiladas por las cinasas en los estudios *in vitro*, su afinidad por la calmodulina y, en algunos casos, por sus parámetros cinéticos (Yuan *et al.*, 1999).

La estructura de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina se ha investigado por medio de experimentos de proteólisis y de la síntesis de análogos peptídicos, identificándose el sitio de interacción con la calmodulina, así como su posición. El dominio catalítico es un fragmento de 36 KDa con una secuencia de aproximadamente 250 residuos que se conserva entre todas las isoformas de las fosfodiesterasas, sin importar su tamaño, filogenia o función, debido a que comprenden una sola familia de proteínas con un dominio catalítico que proviene de un progenitor común. Asimismo, la búsqueda de las secuencias de los sitios potenciales de unión a la calmodulina revelan sólo un segmento de 15 residuos, con una carga neta positiva y que presenta la capacidad de formar una α -hélice. Al comparar los residuos del dominio catalítico de diferentes isoformas, se logró determinar que comparten más del 90% y que las secuencias que presentan son idénticas, lo cual demuestra que los dominios de las diferentes isoformas estudiadas son iguales (Xu *et al.*, 2000).

En la literatura se describen varios métodos para determinar la actividad de esta enzima y los más importantes resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Métodos de ensayo utilizados para determinar la actividad de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (Thompson *et al.*, 1979).

Ensayo	Ventajas	Desventajas
Cromatografía (resina de intercambio aniónico).	Rápido, conveniente.	La etapa de la nucleotidasa; cada muestra se cromatografía en una columna.
Cromatografía en papel	Reacción en un paso.	Cada muestra se cromatografía en una columna. Sustrato marcado con ^{32}P .
Extracción $^{32}\text{P}_i$ /molibdato	Rápido, conveniente	Cada muestra se cromatografía en papel Sustrato marcado con ^{32}P .
Liberación de fosfato	Sin radioisótopos Rápido, conveniente	Interferencia por fosfato inorgánico en la etapa de la nucleotidasa.
Luciferina-luciferasa	Sin radioisótopos	Susceptible a la interferencia de sustancias (nucleótidos); se requiere equipo especial de mezclado y detección.
Método de titulación	Sin radioisótopos; monitoreo continuo de la velocidad enzimática	Se requiere equipo de titulación enzimática.
Precipitación Zinc-bario	Rápido, conveniente	La etapa de la nucleotidasa. Sustrato marcado con ^{32}P .

De los métodos anteriormente mencionados, uno de los más utilizados es el de liberación de fosfato, el cual se empleó en la tesis. Este método se basa en medir la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina mediante el uso de un ensayo que cuantifica la cantidad de fosfato que se genera a partir de la hidrólisis del AMPc formado por acción de la fosfodiesterasa. Esta última reacción es catalizada por la enzima nucleotidasa.

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GENERALES.

- ◆ Continuar con la búsqueda de fitotoxinas de organismos fúngicos mediante la reinvestigación del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix*.
- ◆ Determinar la habilidad de fitotoxinas selectas de origen fúngico y vegetal para afectar las propiedades moduladoras de la proteína calmodulina, utilizando como enzima blanco a la fosfodiesterasa del AMPc.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Realizar los cultivos en mediana escala del hongo *G. polythrix* utilizando medio de cultivo de agar papa-dextrosa (DIFCO).
2. Obtener los extractos orgánicos del micelio y del medio de cultivo de *G. polythrix*.
3. Evaluar cuantitativamente el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos sobre la germinación y el crecimiento radicular en semillas de *Amaranthus hypochondriacus* por el método de la caja de Petri.

4. Aislar los productos naturales responsables de la actividad fitotóxica a partir de los extractos obtenidos de los cultivos a mediana escala, a través de un estudio químico biodirigido.
5. Determinar cuantitativamente el efecto fitotóxico de los metabolitos aislados de las fracciones activas sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.
6. Establecer la estructura molecular de los compuestos fitotóxicos mediante el uso de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
7. Determinar la posible interacción de los metabolitos aislados a partir de *G. polythrix* en el presente estudio [la dihidroubiquinona10 (72), el ergosta-6,8 (14), 22- trien-3-ol (73) y el ergosterol (74), y de *Leucophyllum ambiguum* [2,2'-dimetoxisesamina (68), la 2-metoxicobusina (69), la cobusina (70), y la 2-metoxi-4'-hidroxidesmetoxicobusina (71)] con la proteína calmodulina de cerebro de bovino utilizando una electroforesis en condiciones desnaturalizantes.
8. Evaluar si la interacción de la calmodulina con las fitotoxinas de *Phoma herbarum* [herbaruminas I (50) y II (51)], *Prionosciadium watsoni* [los ésteres del ácido isobutírico (3R) - 5 - metoxi-3, 4- dihidro- 2, 2, 8- trimetil- 6-oxo- 2H, 6H-benzo [1,2-b:5,4-b']dipiran-3-il (56) y del ácido 2-metilbut-(2Z)-enoico (3R)-5-metoxi-3,4-dihidro-2, 2, 8- trimetil- 6 -oxo- 2H, 6H- benzo [1,2-b: 5,4-b'] dipiran-3-il (57)] , *L. ambiguum* [2,2'-dimetoxisesamina (68), la 2-metoxicobusina (69), la cobusina (70), y la 2-metoxi-4'-hidroxidesmetoxicobusina (71)] y de *G. polythrix* [la (+)- (2S,3S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (31), la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6, 8, 10-trimetoxi-2, 3-dimetil-2, 3- dihidronaftopirona (32), la (+)-(2S)-5-hidro-

xi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (**33**), la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (**34**), la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**35**), la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**36**), la rubrofusarina B (**37**) la 2,3-dimetil-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (**38**), la ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona (**39**), la dihidroubiquinona-10 (**80**), el ergosta-6,8 (14), 22-trien-3-ol (**81**), y el ergosterol (**82**)] afectan las propiedades reguladoras enzimáticas de la calmodulina utilizando como enzima blanco a la fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina. De manera adicional, se verificará mediante el empleo de la enzima fosfodiesterasa si los metabolitos interaccionan *in vitro* con la proteína calmodulina.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

El hongo *Guanomyces polythrix* fue proporcionado por el Dr. Miguel Ulloa del Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM, en diciembre de 2001. El aislamiento del hongo utilizado en el presente estudio fue obtenido a partir de una muestra sembrada de la referencia depositada en el Herbario Nacional, Instituto de Biología, UNAM (MEXU, 24486).

4.2. ENSAYOS BIOLÓGICOS.

4.2.1. Método bioautográfico directo.

Para monitorear la actividad fitoinhibidora del extracto total y de las fracciones primarias se utilizó un método bioautográfico (Rahalison *et al.*, 1991; 1994; Inoue *et al.*, 1992). Los ensayos se efectuaron en placas de vidrio de 5 x 10 cm, recubiertas con gel de sílice (gránulos de 0.2-0.63 mm, 230 malla ASTM, MERCK), las cuales se sembraron con 5 mg de la muestra y eluyeron con una mezcla apropiada de disolventes empleando los métodos convencionales para cromatografía en capa fina. De manera simultánea se eluyó una placa sin muestra (control negativo). Concluido el proceso de elución, se permitió la evaporación completa del disolvente y las cromatoplasas se cubrieron con 15 mL de una suspensión de agar bacteriológico (DIFCO) al 1%. Una vez solidificada la

suspensión las superficies de las placas se cubrieron completa y homogéneamente con semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y se incubaron en una atmósfera húmeda a 28 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la zona de inhibición y se determinó su factor de retención (Rf) mediante su comparación con una placa con la muestra de prueba, eluida en las mismas condiciones y revelada con un agente cromógeno adecuado (sulfato cérico) [Rahalison *et al.*, 1991; 1994; Inoue *et al.*, 1992]. Como control positivo se empleó el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, Sigma), y todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

4.2.2. Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico.

La determinación del potencial fitotóxico de los extractos y de los compuestos puros se realizó por medio de la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de amaranto utilizando el método de la caja de Petri (Anaya *et al.*, 1990; 1995). En el caso del extracto el bioensayo se realizó en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. La muestra se disolvió en diclorometano y se prepararon las diluciones necesarias para obtener las concentraciones finales de 10, 100 y 1000 µg/mL. Tres mL de cada una de las disoluciones con las concentraciones apropiadas se adicionaron a las cajas de Petri, sobre un disco de papel filtro (Whatman No. 1); el disolvente se evaporó por medio de una corriente de aire. Una vez evaporado el disolvente, se adicionaron 3 mL de agua destilada sobre el papel filtro y se colocaron 10 semillas *A. hypochondriacus* en cada caja.

En el caso de los compuestos puros, el bioensayo se realizó en cajas de Petri de 6 cm de diámetro. Las muestras se disolvieron en los disolventes apropiados y se prepararon disoluciones con una concentración de 1, 10 y 100 µg/mL. Se adicionaron 1.5 mL de cada una de las disoluciones a las cajas de Petri sobre discos

de papel filtro (Whatman No.1) y se dejó evaporar el disolvente por medio de una corriente de aire. Posteriormente, se agregaron 1.5 mL de agua destilada sobre el papel filtro y se colocaron 10 semillas de *A. hypochondriacus* en cada una de las cajas. Las cajas de Petri se incubaron durante 24 horas a 30°C y la actividad fitotóxica se registró calculando el porcentaje de germinación y midiendo la longitud de las radículas. De manera simultánea, se evaluaron controles positivos (2,4-D) y negativos (disolvente y agua destilada). Las determinaciones se realizaron por triplicado y se evaluaron mediante la prueba estadística de ANOVA. Las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) se determinaron mediante el análisis de probabilidad de Finney a partir de los porcentajes de inhibición calculados.

4.2.3. Determinación de la interacción de los compuestos por electroforesis desnaturalizante.

La posible interacción entre los compuestos puros y la calmodulina de cerebro de bovino se determinó por medio de una electroforesis desnaturalizante, para lo cual se prepararon mezclas constituidas por 10 µg del compuesto de prueba en 10 µL de una disolución en DMSO (1 µg /mL), 2 µg de calmodulina de cerebro de bovino (SIGMA) y 3 µL de CaCl₂ 1 mM. La disolución se llevó a un volumen final de 30µL con agua desionizada, incubándose durante 90 minutos a 30°C para facilitar la interacción de las fitotoxinas con la proteína calmodulina. Al término del periodo de incubación las muestras se sometieron a ebullición por cinco minutos. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les adicionaron 10 µL de buffer de carga (Liao *et al.*, 1996). Finalmente, se realizó una electroforesis vertical descendente en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 12%), a partir de la cual se determinó de manera preliminar si la calmodulina tratada experimentaba algún cambio en su movilidad electroforética. Cabe mencionar que en todos los casos se utilizó como control positivo a la clorpromazina. Cada

determinación se realizó por triplicado (Nishino *et al.*,1984). La composición de los geles y las disoluciones empleadas se indican en el Cuadro 4 (Laemmli, 1970; Bradford, 1976).

Cuadro 4. Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones empleadas en la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE al 12%).

Geles y disoluciones	Reactivos
Gel sellador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08 (1 mL) TEMED 100% (2 µL) APS 10% (10 µL)
Gel separador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08 (3.7 mL) TRIS 3M pH 8.8 (1.17 mL) Agua (4.26 mL) TEMED 100% (10 µL) APS 10% (70 µL) SDS 10% (92 µL)
Gel apilador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08 (625 µL) TRIS 1M pH 6.8 (625 µL) SDS 10 % (50 µL) Agua (3.67 µL) TEMED 100% (3.5 µL) APS 10% (35 µL)

Cuadro 4. Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones empleadas en la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 12%) [continuación].

Geles y disoluciones	Reactivos
Disolución de corrida	Trizma (6.0 g) Glicina (28.5 g) SDS (2.0 g) Agua (2.0 L) pH 8.3
Buffer de carga	TRIS-HCL 1M pH 6.8 (0.6 mL) Glicerol 50% (5.0 mL) SDS 10% (2.0 mL) 2-mercaptoetanol (0.5 mL) Azul de bromofenol 1% (10.0 mL) Agua (0.9 mL)
Disolución de tinción	Metanol 20% (100.0 mL) Ácido acético 0.5% (25.0 mL) Azul de Coomassie R250 (0.2 g)

4.2.4. Determinación del efecto de las fitotoxinas sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en presencia de calmodulina.

La actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc se determinó utilizando el método experimental descrito por Sharma y Wang (1979; 1986). De acuerdo a

este método la actividad de la enzima correlaciona con la cantidad del fosfato inorgánico producido durante la reacción de hidrólisis del AMPc en presencia de la enzima 5'-nucleotidasa. A continuación, se describe la parte experimental en detalle.

4.2.4.1. Determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina.

Los ensayos se realizaron adicionando a una disolución de 0.015 unidades de fosfodiesterasa dependiente de calmodulina aislada de cerebro de bovino (Sigma), diferentes concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino (Sigma) [2.5×10^{-3} a $0.5 \mu\text{g}$], $15 \mu\text{L}$ de una disolución de 5'- nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* de 0.3 unidades (Sigma), preparada en un buffer constituido por Tris-HCl 10 mM y acetato de magnesio 0.5 mM, a pH 7, y $800 \mu\text{L}$ de un buffer de reacción constituido por Tris-HCl 45 mM, acetato de magnesio 5.6 mM, imidazol 45 mM y CaCl_2 2.5 mM, a pH 7. La mezcla anterior se incubó durante 30 minutos a 30°C . Transcurrido este tiempo se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de AMPc 10.8 mM a cada una de las muestras y la mezcla resultante se incubó nuevamente a 30°C durante 30 minutos. Al término de este segundo período de incubación se adicionaron a cada muestra $100 \mu\text{L}$ de ácido tricloroacético al 55% para detener la reacción.

La cuantificación del fosfato generado en la reacción recién descrita se llevó a cabo utilizando un método espectrofotocolorimétrico (Sumner, 1944), de acuerdo al procedimiento siguiente: A una alícuota de $500 \mu\text{L}$ de la mezcla de reacción anterior se le adicionaron $800 \mu\text{L}$ de heptamolibdato de amonio al 6.6 % en H_2SO_4 3.75 N y $200 \mu\text{L}$ de FeSO_4 al 10%. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se determinó la densidad óptica de cada una de ellas a 660 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una

curva estándar de fosfato monobásico de potasio para determinar la concentración de fosfato obtenido en cada tratamiento (Figura 16).

4.2.4.2. Obtención de la curva estándar de fosfato inorgánico.

La curva estándar se construyó a partir de una disolución 50 mM de fosfato monobásico de potasio (Sigma), tomando las alícuotas necesarias para obtener catorce concentraciones diferentes en un intervalo de 50 a 700 nM. A cada alícuota se añadieron 800 μL de FeSO_4 al 10 % y agua desionizada hasta obtener un volumen final de 1500 μL . La densidad óptica de las muestras se determinó a 660 nm utilizando un espectrofotómetro Cintra 5.

4.2.4.3. Determinación del efecto de las fitotoxinas 31-38, 50-52, 56-57, 68-71 y 73 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina.

Para evaluar el efecto de los compuestos fitotóxicos sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en presencia de la proteína calmodulina se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones de los compuestos de prueba (0 a 100 μM) y se incubaron con una concentración saturante de calmodulina de cerebro de bovino (0.2 μg), de acuerdo con el procedimiento antes descrito. Los compuestos a evaluar se adicionaron después de incubar durante tres minutos la mezcla de reacción que contenía 0.015 unidades de fosfodiesterasa de cerebro de bovino, 0.2 μg de calmodulina de cerebro de bovino, 0.3 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* y 800 μL del buffer de reacción. Cada ensayo se realizó por triplicado y como control positivo se utilizó la clorpromazina.

4.2.4.4. Determinación del efecto de las fitotoxinas 31-38, 50-52, 56-57, 68-71 y 73 sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa.

La evaluación del efecto de los compuestos aislados sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 4.2.4.3., con la excepción de que no se adicionó calmodulina a la mezcla de reacción.

4.3. OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS A MEDIANA ESCALA.

4.3.1. Cultivo a mediana escala en medio de papa-dextrosa DIFCO (20 L).

La fermentación se realizó en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en dos fermentadores de 15 L de capacidad (Brunswick FS-314). A cada uno se adicionó 240 g de agar papa-dextrosa (DIFCO) y 10 L de agua; posteriormente el medio de cultivo se inoculó con el hongo desarrollado por 15 días en agar papa-dextrosa en una caja de Petri. La incubación se realizó a una temperatura de 28°C durante 20 días, con agitación continua a 200 rpm y un flujo de aire de 8 a 10 L/min.

Al cabo de la fermentación se separó el micelio del medio de cultivo por centrifugación y se procedió a la preparación de los extractos correspondientes, utilizando como disolventes de extracción primero CH_2Cl_2 , luego AcOEt y por último una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH 1:1. El extracto del micelio se preparó por maceración (1.5341 g) y en el caso del medio de cultivo por partición (3.9459 g). Los extractos resultantes se combinaron para generar un residuo de color café (5.48 g).

4.4. ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO FITOTÓXICO OBTENIDO A PARTIR DEL MICELIO Y DEL MEDIO DE CULTIVO DE *G. POLYTHRIX*.

4.4.1. MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS.

4.4.1.1. Métodos cromatográficos.

El fraccionamiento primario de los extractos de *Guanomyces polythrix* se realizó mediante una cromatografía de adsorción en columna abierta sobre gel de sílice (sílica gel G60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, 70-230 malla ASTM). Los análisis cromatográficos en capa fina (ccf) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales (Marcel, 1992), utilizando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck, de 0.25 mm de espesor) y varios sistemas de elución. Las cromatoplasmas se visualizaron primero con luz UV (onda corta de 254 nm y onda larga de 365 nm) y se revelaron con una disolución de sulfato cérico en H₂SO₄ (Stahl, 1969). Para el desarrollo del color fue necesario calentar a 110 °C por aproximadamente dos minutos (Ghisalberti, 1993).

Para los análisis cromatográficos preparativos en capa delgada se emplearon placas de vidrio de 20 x 20 cm recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck, de 0.25 mm de espesor). La cromatografía de líquidos de alta resolución se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore corp., Waters Chromatography División Milford, MA, USA), equipado con un detector UV dual (2487 Dual Absorbance Detector) o un detector con arreglo de diodos (996 Photodiode Array Detector). El control del equipo, la adquisición de datos y el procesamiento de la información, se llevó a cabo utilizando el programa de Millennium 32 (Waters). La separación y purificación del compuesto 75 se realizó en una columna de gel de sílice (Waters, μ porasil 125 Å; tamaño de partícula 10 μ m) de 300 mm de longitud y con un diámetro interno de 19 mm.

4.4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin Elmer, modelo 599-B, utilizando la técnica de pastilla de KBr. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM-IE) se determinaron en los espectrómetros de masas HP 5890, serie II y JEOL JMS-AX505 HA, mediante la introducción directa a 70 eV. Los espectros de masas modalidad FAB⁺ se registraron en un aparato JEOL DX300. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹H) y de carbono-13 (RMN ¹³C) se generaron en los aparatos Varian UNITY PLUS 500 o Bruker DM X500, los cuales se operaron a las frecuencias de 500 MHz y de 125 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se asignaron en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) que se utilizó como referencia interna. Los espectros se registraron en CDCl₃ o benceno deuterado.

Todos los análisis descritos se realizaron en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, en el Instituto de Química de la UNAM, o en el Departamento de Química de la UAM-Iztapalapa.

4.4.2. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DEL EXTRACTO ACTIVO.

El extracto activo combinado del medio de cultivo y del micelio (5.48 g de un sólido de color café rojizo) se fraccionó por medio de una cromatografía de adsorción en columna abierta utilizando 275 g de gel de sílice. Se obtuvieron 263 fracciones de 110 mL cada una y se reunieron las que presentaron características cromatográficas similares, para generar 12 fracciones primarias. Los sistemas de elución y la reunión de las fracciones se resumen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto total de *G. polythrix*.

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas	Clave
Hexano/CH ₂ Cl ₂	90:10	1-10	GP-I
Hexano/CH ₂ Cl ₂	70:30	11-24	GP-II*
Hexano/CH ₂ Cl ₂	60:40	25-34	GP-III*
Hexano/CH ₂ Cl ₂	1:1	35-44	GP-IV*
Hexano/CH ₂ Cl ₂	40:60	45-64	GP-V*
Hexano/CH ₂ Cl ₂	30:70	65-70	GP-VI*
CH ₂ Cl ₂	100%	71-88	GP-VII*
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	99:1	89-151	GP-VIII*
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	97:3	152-166	GP-IX*
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	95:5	167-182	GP-X*
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	90:10	183-205	GP-XI*
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	1:1	206-263	GP-XII

*Fracciones con actividad fitotóxica.

4.4.3. Separación y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones primarias activas.

4.4.3.1. Obtención de la dihidroubiquinona-10 (80).

El análisis cromatográfico de la fracción primaria activa GP-V* (72.0 mg) y la bioautografía indicaron que la fracción contenía un producto fitotóxico. Para separar el compuesto se empleó una cromatografía preparativa en capa fina sobre gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂. Las cromatoplacas se eluyeron dos veces

consecutivas y se procesaron de la manera habitual, obteniéndose 12.1 mg de un sólido amorfo de color amarillo oscuro. Para purificar este sólido se aplicó la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). El cromatograma resultante se observa en la Figura 10. El procedimiento anterior permitió la obtención de 6.6 mg del producto **80** como un sólido amorfo de color amarillo claro, soluble en CH_2Cl_2 .

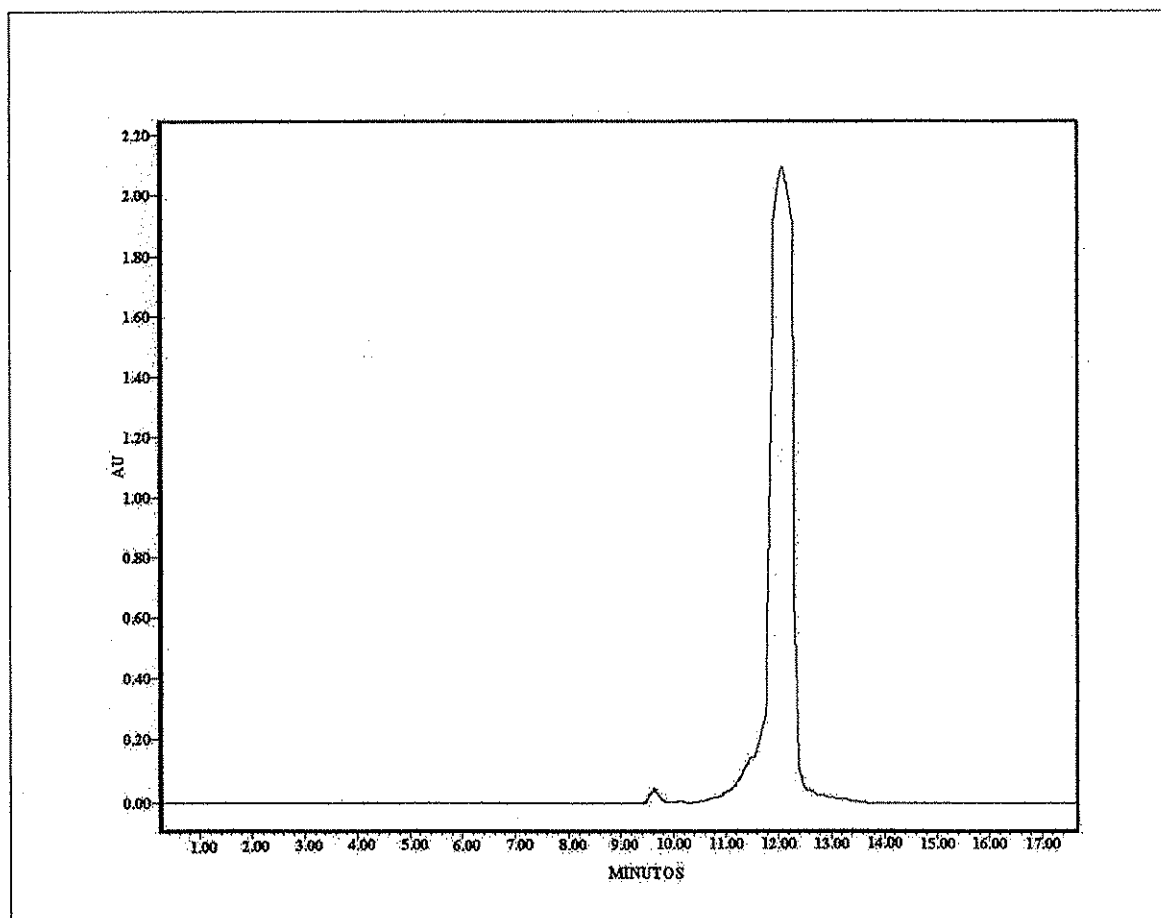


Figura 10. Cromatograma obtenido a nivel analítico de la fracción primaria activa GP-V*. Condiciones de análisis: Detector UV/visible, fase normal, $\lambda = 276$ nm. Sistema de elución: CH_2Cl_2 -MeOH (98:2). Flujo de 0.6 mL/min. Pico: a $T_R = 12.3$ minutos.

4.4.3.2. Obtención del ergosta-6,8 (14), 22- trien-3-ol (81) y del ergosterol (82).

A partir de la fracción primaria activa GP-VIII* (182.8 mg), precipitaron de manera espontánea 6.0 mg de un polvo amarillo con un p.f. de 134-136 °C, el cual se identificó como el ergosta-6,8 (14), 22- trien-3-ol (81) (Nes, 1985).

De las aguas madres precipitó un sólido amorfo de color amarillo, el cual después de varios lavados con una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (diversas proporciones) y posterior recristalización de CH₂Cl₂-MeOH 1:1 generó 67.6 mg de un sólido cristalino blanco, con un p.f de 140 °C, caracterizado como el ergosterol (82).

4.4.3.3. Obtención de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (33) y de la ergosta- 4, 6, 8 (14), 22- tetraen-3-ona (43).

De la fracción primaria GP-IX* (107.6 mg) se obtuvieron 7.1 mg de un sólido cristalino de color amarillo, con un punto de fusión de 196-198 °C y soluble en CH₂Cl₂. Este compuesto se identificó como la ergosta- 4, 6, 8 (14), 22- tetraen-3-ona (43).

A partir de las aguas madres de esta fracción, se obtuvieron 2.3 mg de un sólido cristalino de color rojizo, soluble en CH₂Cl₂ y con un punto de fusión de 176-177 °C. El producto se identificó como la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (33). La identidad de los compuestos se determinó mediante su comparación con muestras auténticas aisladas previamente (Macías *et al.*, 2000; 2001).

4.4.3.4. Obtención de cantidades adicionales de la ergosta- 4, 6, 8 (14), 22- tetraen-3-ona (43).

El análisis en cromatografía en capa fina de las fracciones primarias activas GP-VIII* (174.8 mg) y GP-IX* (99.4 mg) demostró que ambas fracciones estaban

constituidas por un compuesto mayoritario, por lo cual se decidió unir las para generar la fracción activa GP-XIII*.

De esta forma, la fracción activa GP-XIII* (274.2 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 20 g de gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de 186 fracciones de 8.0 mL cada una. El análisis por cromatografía en capa fina permitió reunir las fracciones que presentaban similitud cromatográfica en trece grupos. El monitoreo de la actividad fitotóxica mediante el método bioautográfico permitió observar que la actividad se concentraba en la fracción secundaria GP-XIII₅*. De esta fracción cristalizaron 23.2 mg adicionales de la ergosta- 4, 6, 8(14), 22- tetraen-3-ona (43). En el Cuadro 6 se presentan los sistemas de elución utilizados y las fracciones combinadas generadas a partir de la fracción GP-XIII*.

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción primaria activa GP- XIII*.

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas	Clave
Hexano/CH ₂ Cl ₂	40:60	1-54	GP-XIII ₁
Hexano/CH ₂ Cl ₂	10:90	55-73	GP-XIII ₂
Hexano/CH ₂ Cl ₂	10:90	74	GP-XIII ₃
ACOEt	100%	75-93	GP-XIII ₄
ACOEt	100%	94-96	GP-XIII ₅ *
ACOEt/MeOH	99:1	97-143	GP-XIII ₆
ACOEt/MeOH	99:1	144-150	GP-XIII ₇

*Fracciones con actividad fitotóxica.

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción primaria activa GP- XIII* (continuación).

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas	Clave
ACOEt/MeOH	99:1	151-157	GP-XIII ₈
ACOEt/MeOH	99:1	158-174	GP-XIII ₉
ACOEt/MeOH	98:2	175-179	GP-XIII ₁₀
ACOEt/MeOH	98:2	180	GP-XIII ₁₁
ACOEt/MeOH	95:5	181-182	GP-XIII ₁₂
ACOEt/MeOH	95:5	183-186	GP-XIII ₁₃

*Fracciones con actividad fitotóxica.

Por otra parte, la fracción primaria activa GP-X* (2.33 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta sobre 60 g de gel de sílice, obteniéndose fracciones de 25 mL cada una. Posteriormente, se reunieron las fracciones que presentaron similitud cromatográfica para así generar 15 fracciones secundarias. Este proceso se resume en el Cuadro 7. Después de monitorear la actividad fitotóxica por medio de un método bioautográfico directo en semillas de *A. hypochondriacus*, se determinó que la actividad se encontraba en la fracción secundaria GP-X₅*. A partir de esta fracción se obtuvieron 190.7 mg adicionales de la ergosta- 4, 6, 8 (14), 22- tetraen-3-ona [43] (Macías *et al.*, 2000; 2001).

Cuadro 7. Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción primaria activa GP-X*.

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas	Clave
Hexano/ACOEt	98:2	1-57	GP-X ₁
Hexano/ACOEt	95:5	58-62	GP-X ₂
Hexano/ACOEt	90:10	63-68	GP-X ₃
Hexano/ACOEt	90:10	69	GP-X ₄
Hexano/ACOEt	90:10	70-80	GP-X ₅ *
Hexano/ACOEt	90:10	81-112	GP-X ₆
Hexano/ACOEt	80:20	113-148	GP-X ₇
Hexano/ACOEt	70:30	149-167	GP-X ₈
Hexano/ACOEt	50:50	168-192	GP-X ₉
Hexano/ACOEt	50:50	193-200	GP-X ₁₀
Hexano/ACOEt	30:70	201-219	GP-X ₁₁
ACOEt	100%	220-229	GP-X ₁₂
ACOEt/MeOH	99:1	230-241	GP-X ₁₃
ACOEt/MeOH	95:5	242-249	GP-X ₁₄
ACOEt/MeOH	1:1	250-263	GP-X ₁₅

*Fracciones con actividad fitotóxica.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo del presente estudio se utilizó la estrategia convencional para el descubrimiento de fitotoxinas de origen fúngico (Charudattan, 1990; Hoagland, 1990; Duke, 1995; Cramer, 2000; Evidente *et al.*, 2001) y los resultados obtenidos se describen en tres partes: la primera comprende los resultados derivados de la fermentación del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* y de la evaluación del potencial fitotóxico de los extractos generados a partir del medio de cultivo y del micelio. En la segunda parte se describe el aislamiento y la caracterización de los principios fitotóxicos. Asimismo, se presenta la actividad fitotóxica de los metabolitos aislados sobre la arvense *Amaranthus hypochondriacus*. La última parte se refiere a la determinación de la interacción de las fitotoxinas de *G. polythrix* aisladas en este estudio, y las de *L.ambiguum* con la proteína calmodulina de cerebro de bovino mediante una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 12%). Asimismo en esta parte se describe el efecto de estos metabolitos y otras fitotoxinas selectas de origen fúngico y vegetal sobre las propiedades activadoras enzimáticas de la calmodulina, utilizando como enzima blanco a la fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina. Las fitotoxinas seleccionadas incluyen las aisladas previamente a partir de los hongos *G. polythrix* (Macías *et al.*, 2000; 2001) y *Phoma herbarum* (Rivero-Cruz, 2000; 2001), así como aquellas de las especies vegetales *Prionosciadium watsoni* (Valencia-Islas *et al.*, 2002) y *Leucophyllum ambiguum*. (Rojas *et al.*, 2002).

5.1. Fermentación de *Guanomyces polythrix* y evaluación del potencial fitotóxico del extracto combinado obtenido a partir del medio de cultivo y del micelio.

La fermentación del microorganismo se efectuó a mediana escala (20L) en un medio de cultivo de agar papa-dextrosa de la marca DIFCO. Las condiciones de incubación se indican en el inciso 4.3.1. de la sección experimental. Al término de la fermentación se separó el micelio del medio de cultivo y se prepararon los extractos correspondientes. Los rendimientos de biomasa y la cantidad de los extractos obtenidos a partir del hongo *G. polythrix* se indican en el Cuadro 8. Los extractos resultantes se analizaron por cromatografía en capa fina y con base en su similitud cromatográfica se combinaron para generar un residuo de color café (5.48 g).

Cuadro 8. Rendimientos de biomasa y cantidad de los extractos obtenidos a partir del hongo *Guanomyces polythrix* .

Cultivo a mediana escala (20 L).	
Extracto del micelio	1.5341 g
Extracto del medio de cultivo	3.9459 g
Extracto total	5.48 g
Biomasa	93.98 g

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico del extracto se llevó a cabo mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento

vegetal de las semillas de *A. hypochondriacus* mediante el método de la caja de Petri. En el Cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos.

Cuadro 9. Efecto del extracto total del hongo *Guanomyces polythrix* sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*.

Germinación CI₅₀ (µg/mL)	Crecimiento vegetal CI₅₀ (µg/mL)
141.25	11.59

Estos resultados, en congruencia con los obtenidos en estudios anteriores (Macías *et al.*, 2000; 2001), indican que el extracto total derivado de la fermentación del hongo *Guanomyces polythrix* posee propiedades fitotóxicas notables sobre la germinación y el crecimiento vegetal de las semillas de *A. hypochondriacus*.

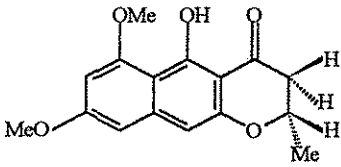
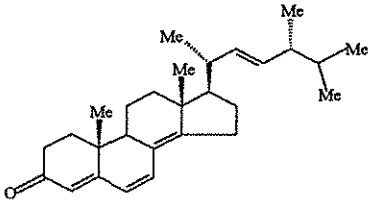
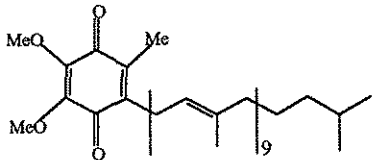
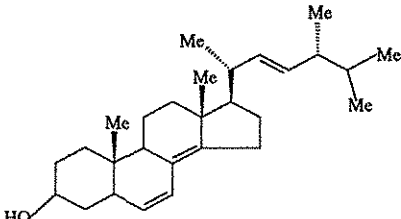
5.2. Fraccionamiento biodirigido del extracto activo del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix*.

El aislamiento de los metabolitos secundarios fitotóxicos a partir del extracto activo obtenido del cultivo en mediana escala del hongo se realizó por medio de un procedimiento biodirigido. Para monitorear la actividad fitotóxica se utilizó el método bioautográfico descrito por Inoue y colaboradores (1992).

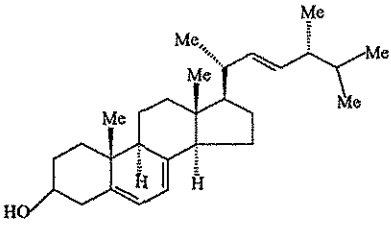
El fraccionamiento biodirigido del extracto activo se llevó a cabo por medio de diversos procedimientos cromatográficos, a partir de los cuales se logró el

aislamiento y purificación de cinco compuestos: la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (**33**), la ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-ona (**43**), la dihidroubiquinona-10 (**80**), el ergosta-6, 8(14), 22- trien-3-ol (**81**), y el ergosterol (**82**). En el Cuadro 10 se muestran las estructuras de los metabolitos secundarios aislados, así como su rendimiento.

Cuadro 10. Metabolitos secundarios aislados a partir de *Guanomyces polythrix* en el presente estudio.

Metabolitos secundarios	Rendimiento
 <p style="text-align: center;">(33)</p>	2.1×10^{-3} mg/L
 <p style="text-align: center;">(43)</p>	0.18 mg/L
 <p style="text-align: center;">(80)</p>	6.0×10^{-3} mg/L
 <p style="text-align: center;">(81)</p>	5.5×10^{-3} mg/L

Cuadro 10. Metabolitos secundarios aislados a partir de *Guanomyces polythrix* (continuación).

Metabolitos secundarios	Rendimiento
 <p style="text-align: center;">(82)</p>	0.062 mg/L

Cabe mencionar que los metabolitos **80-82** no se habían descrito con anterioridad en este hongo, en tanto que los compuestos **33** y **43** se aislaron en estudios anteriores (Macías *et al.*, 2000; 2001).

5.3. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios presentes en el extracto fitotóxico de *G. polythrix*.

La caracterización de los compuestos se realizó a través de la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales. Las fitotoxinas **81** y **82** se caracterizaron mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas previamente en la literatura (Porter, 1975; Seitz & Paukstelis, 1977; Nes *et al.*, 1985; Zhou & Nes, 2000; Macías *et al.*, 2000; 2001). Los compuestos **33** y **43** se caracterizaron por comparación con muestras auténticas. A continuación, se presentan los aspectos más relevantes de la elucidación estructural del compuesto **80** caracterizado como la dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H₂)], metabolito poco común en la naturaleza. Su homóloga, la ubiquinona-10 (coenzima Q₁₀) se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en especial en los animales (Terao *et al.*, 1978; Lipshutz *et al.*, 1999).

5.3.1. Caracterización de la dihidroubiquinona-10 (80).

La dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H₂)] se obtuvo como un sólido amorfo de color amarillo y soluble en CH₂Cl₂. Su espectro en el IR presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de una benzoquinona en 1645 cm⁻¹. Su fórmula molecular se estableció como C₅₉H₉₂O₄ por medio de espectrometría de masas de alta resolución. Esta fórmula permite un índice de insaturación de catorce.

El análisis del conjunto de los espectros de RMN y masas permitió establecer que el producto natural es una ubiquinona con diez unidades isopreno (Gale *et al.*, 1963; Lavate *et al.*, 1963; Yamada *et al.*, 1973; Takizawa *et al.*, 1992). En los Cuadros 11 y 12 se resumen los desplazamientos de los protones y átomos de carbono presentes, así como su multiplicidad. A continuación se discuten detalladamente las características principales de los espectros de resonancia magnética unidimensionales (RMN-¹H y RMN-¹³C) y bidimensionales (HMQC y COSY).

1. En la región vinílica del espectro de RMN-¹H (Espectro 1) se observa un multiplete en δ_H 5.11 (H-6', H-10', H-14', H-18', H-22', H-26', H-30' y H-34') que integra para ocho protones, y un triplete ($J= 7.05$ Hz) en δ_H 4.94 (H-2') que corresponde al protón vinílico de la unidad isopreno adyacente al núcleo quinoide. Estas señales correlacionan en los espectros de HMQC con nueve metinos vinílicos en la zona entre δ_C 123.84 y 124.25, y la señal en δ_C 118.83, respectivamente.
2. En δ_H 3.99 y 3.98 (2-OCH₃) se observan dos singuletes que corresponden a los dos metoxilos ubicados en C-2 y C-3 de la función quinoide. Estas señales correlacionan en el espectro de HMQC con la señal presente en δ_C 61.11.

3. En δ_H 3.18 (H-1') aparece un doblete [$J= 6.98$ Hz] que correlaciona en el espectro HMQC con la señal en δ_C 25.29. Esta señal es diagnóstica del metileno alílico (C-1') unido al núcleo quinoide.
4. En la zona comprendida entre δ_H 2.16 y 1.90 (H-4', H-5', H-8', H-9', H-12', H-13', H-16', H-17', H-20', H-21', H-24', H-25', H-28', H-29', H-32', H-33' y H-36') se observa una señal múltiple asignable a los metilenos restantes de la molécula.
5. En δ_H 2.01 (Me-5) se observa una señal simple que presenta correlación con una señal de carbono en δ_C 11.94 en el espectro HMQC y es atribuible al metilo en C-5.
6. En δ_H 1.74 (H-41') se aprecia una señal simple que correlaciona en el espectro HMQC con la señal en δ_C 16.33. Esta señal es típica para el metilo de la unidad isopreno adyacente al núcleo quinona, en C-3'.
7. En el intervalo comprendido en δ_H 1.60 y 1.55 (H-42', H-43', H-44', H-45', H-46', H-47', H-48' y H-49') se aprecian las señales asignables a los metilos sobre dobles ligaduras restantes de la cadena isoprenoide. Sus carbonos correspondientes aparecen en el rango δ_C 16.0-15.87 en el espectro de RMN- ^{13}C .

De manera adicional, el espectro de RMN- 1H presenta un doblete en δ_H 0.86 ($J=6.6$ Hz, H-40') que integra para seis protones. Esta señal es asignable a los dos metilos terminales de un residuo isoprenoide. Esta señal muestra correlación en el espectro 1H - 1H COSY con un multiplete en δ_H 1.53 (H-39'). Esta última absorción, a su vez, correlaciona con un cuarteto ubicado en δ_H 1.12 ($J= 15.8$ Hz, H-38') y que se asigna a un grupo metileno. Por último, el cuarteto muestra un cuadro de

conectividad en el espectro ^1H - ^1H COSY con la señal múltiple en δ_{H} 1.37 ($J= 11.67$ Hz, H-37'). Este último grupo de señales es congruente con la presencia en la molécula de una unidad de isopreno terminal reducida. Por lo tanto, la doble ligadura entre C-37' y C-38' de la coenzima Q₁₀ (ubiquinona-10) se encuentra reducida en el producto **80**. En la Figura 11 se ilustran las correlaciones observadas en el espectro ^1H - ^1H COSY.

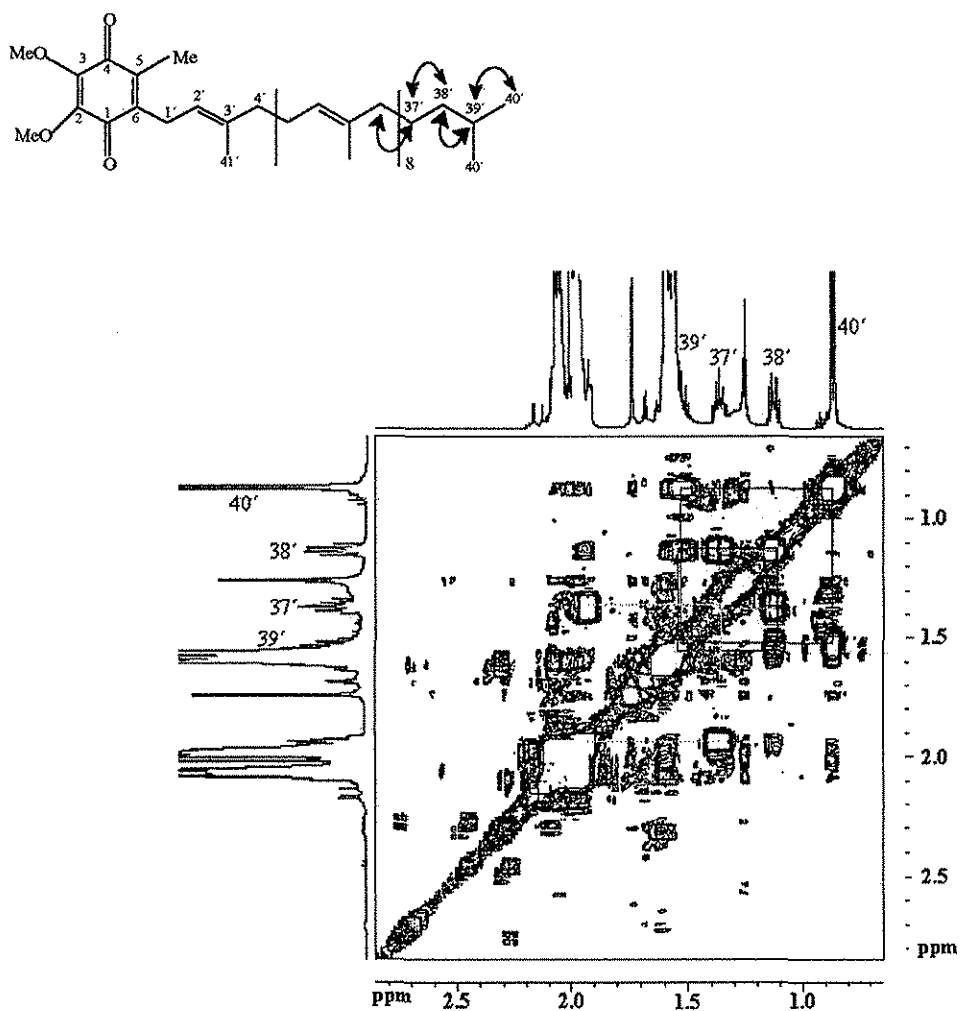


Figura 11. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -COSY de la dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H_2)].

Las señales restantes observadas en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 2) se asignaron por medio del análisis de los espectros HMQC, HMBC y DEPT se resumen en el Cuadro 12.

Para corroborar la ubicación de los grupos funcionales en el núcleo quinoide la correlación observada en el espectro NOESY entre los hidrógenos del metileno en δ_H 3.18 adyacente al núcleo quinoide y los hidrógenos del metilo en δ_H 2.01(C-5) indicaron que este metilo y la cadena isoprenoide se encuentran en una disposición orto. Las correlaciones entre C-5 y el singulete en δ_H 2.01y entre C-5/H-1' corroboran esta propuesta. Por lo tanto los metoxilos debían encontrarse en C-2 y C-3 (Figura 12).

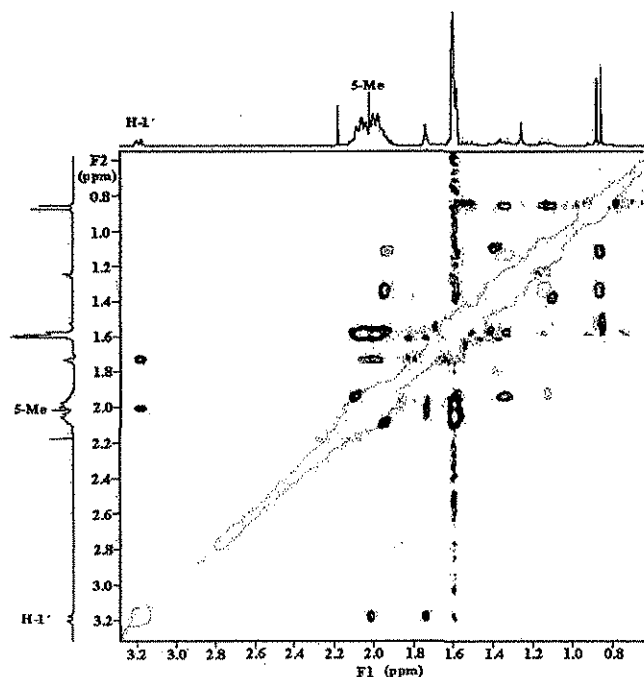
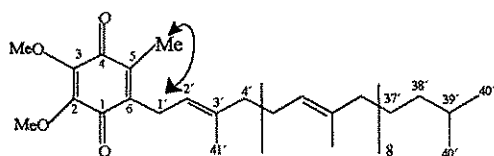


Figura 12. Espectro bidimensional ¹H-¹H-NOESY de la dihidrobiquinona-10 [Q-10 (H₂)].

El patrón de fragmentación (Figura 13) observado en el espectro de masas es congruente con la estructura propuesta (Friis *et al.*, 1966; Muraca *et al.*, 1967).

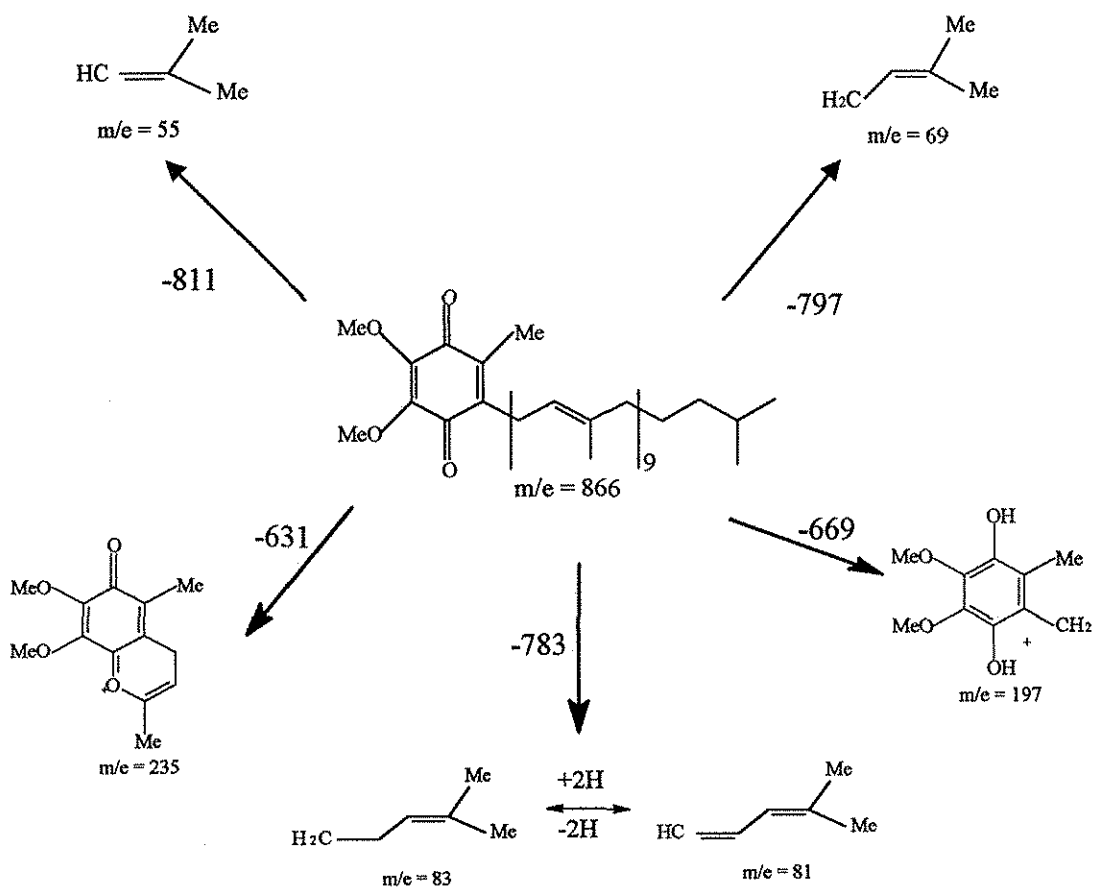


Figura 13. Diagrama de fragmentación de la dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H₂)].

Con base en el análisis presentado anteriormente se determinó que el compuesto aislado es la dihidroubiquinona-10[Q-10 (H₂)] y su estructura se muestra en la Figura 14.

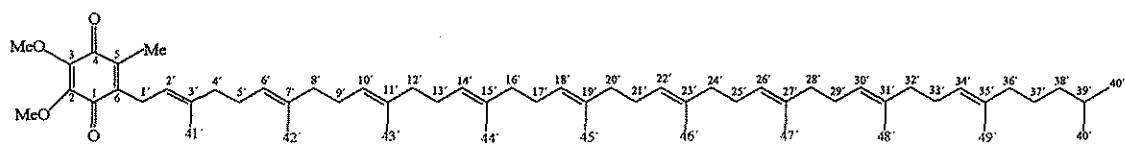


Figura 14. Estructura de la dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H₂)].

Cuadro 11. Desplazamientos químicos de RMN-¹H de la dihidroubiquinona-10 [Q-10(H₂)].

Posición	δ_H (ppm) y multiplicidad	No. de protones
1'	3.18 (<i>d</i> , 6.98)	2 H
2'	4.938 (<i>t</i> , 7.05)	1 H
6', 10', 14', 18', 22', 26', 30', 34'	5.11 (<i>m</i>)	8 H
4', 5', 8', 9', 12', 13', 16', 17', 20', 21', 24', 25', 28', 29' 32', 33', 36'	2.16-1.90 (<i>m</i>)	36 H
2-MeO	3.99 (<i>s</i>)	3 H
3-MeO	3.98 (<i>s</i>)	3 H
5-Me	2.01 (<i>s</i>)	3 H
41'	1.74 (<i>s</i>)	3 H
42', 43', 44', 45', 46', 47', 48', 49'	1.60-1.55 (<i>m</i>)	24 H

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 11. Desplazamientos químicos de RMN-¹H de la dihidroubiquinona-10 [Q-10(H₂)] (continuación).

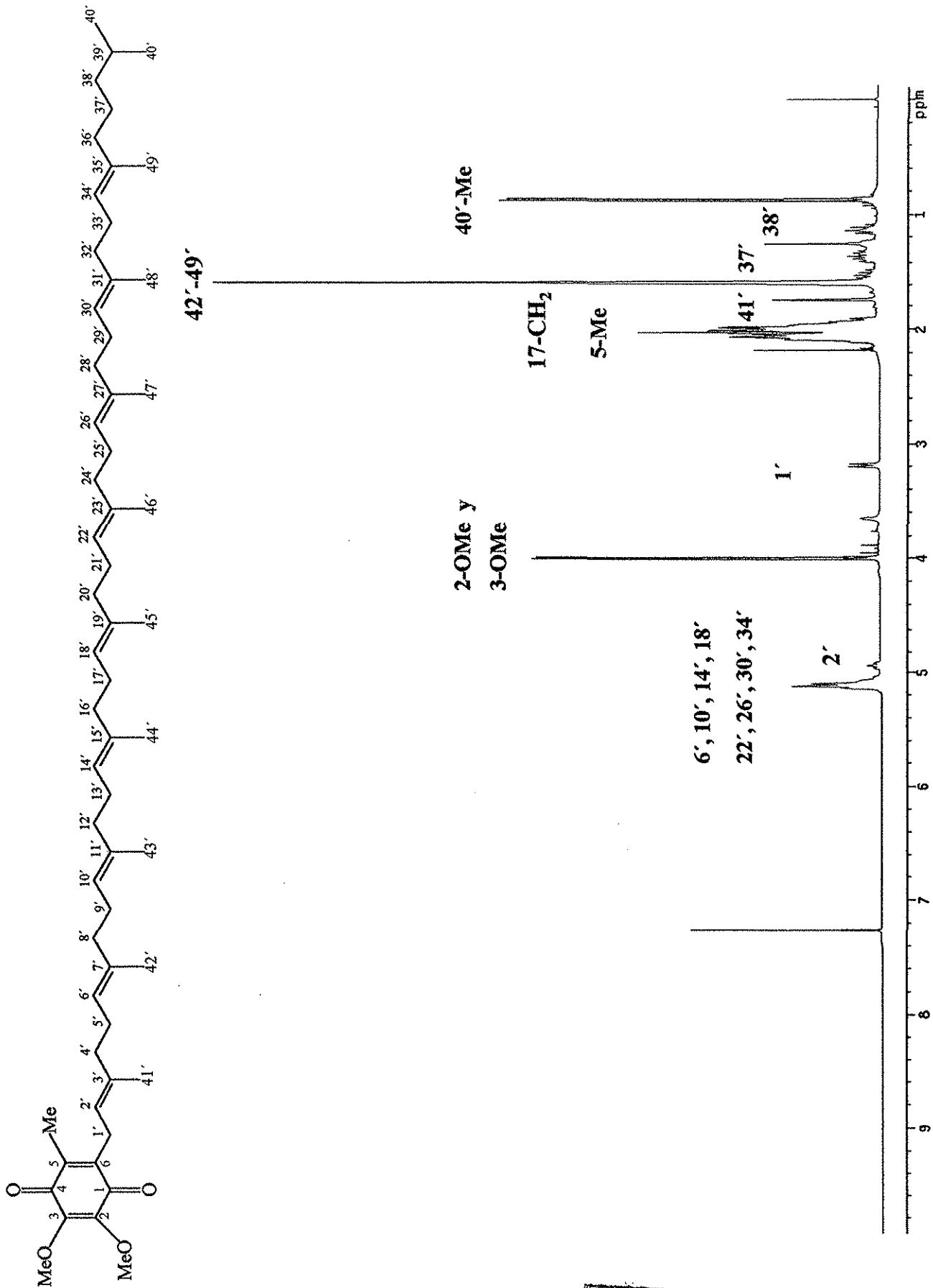
Posición	δ_H (ppm) y multiplicidad	No. de protones
37'	1.37 (<i>m</i>)	2 H
38'	1.12 (<i>m</i>)	2 H
39'	1.53 (<i>m</i>)	1 H
40'-Me	0.86 (<i>d</i> , 6.6)	6 H

Cuadro 12. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de la dihidroubiquinona-10 [Q-10 (H₂)].

Posición	δ_C (ppm)	No. de carbonos
1	184.76	1 C
2	144.3	1 C
3	144.2	1 C
4	183.90	1 C
5	141.67	1 C
6	138.85	1 C
2-OMe	61.11	1 C
3-OMe	61.11	1 C
5-Me	11.94	1 C
1'	25.29	1 C
2'	118.83	1 C
3'	137.63	1 C

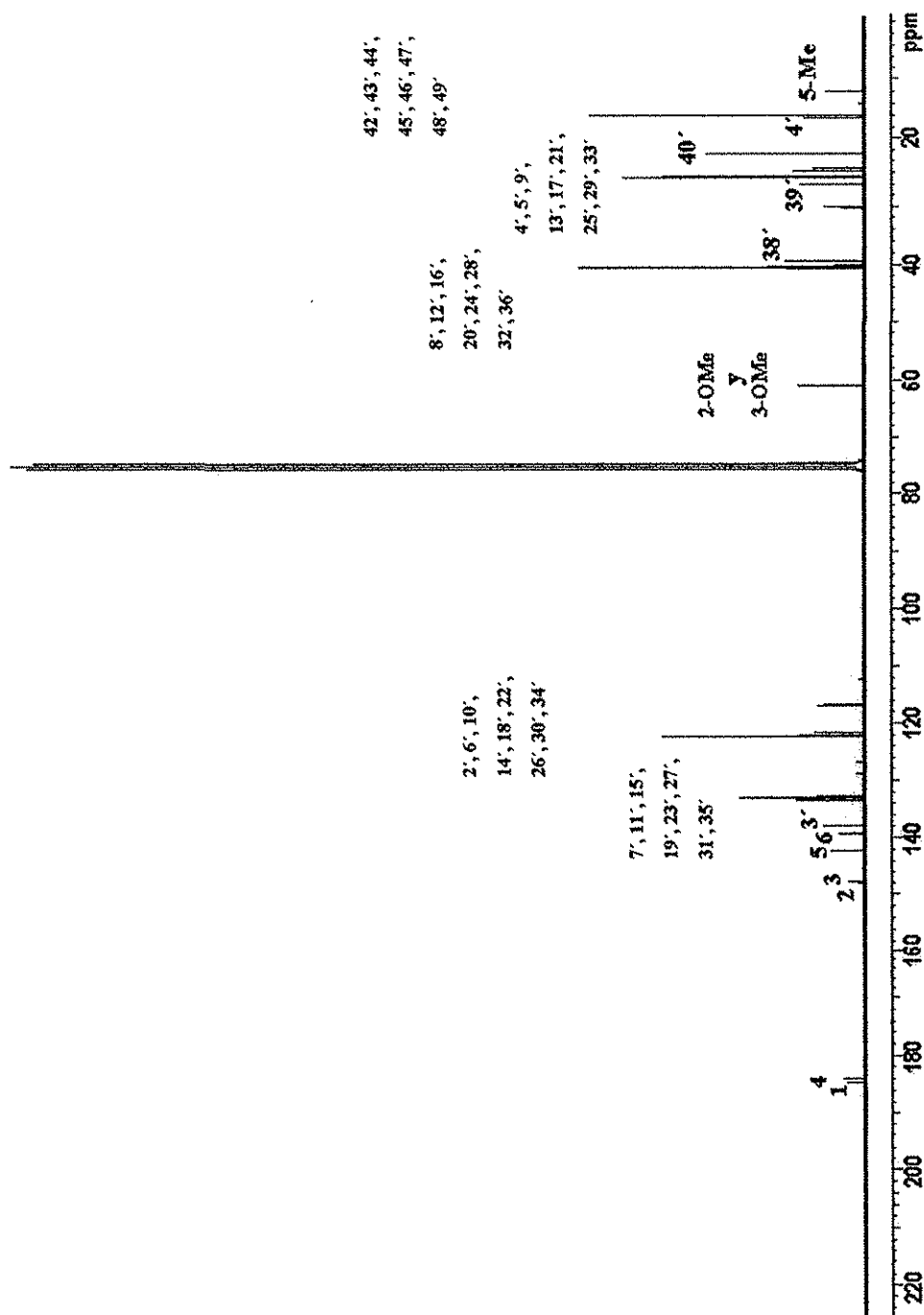
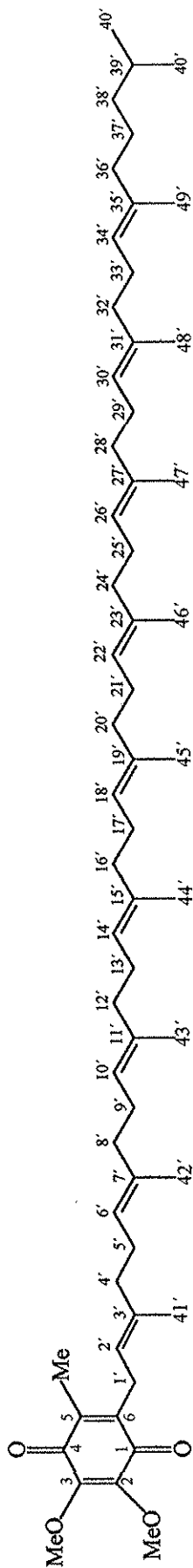
Cuadro 12. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de la dihidrobiquinona-10 [Q-10 (H₂)] (continuación).

Posición	δ _c (ppm)	No. de carbonos
4', 5', 9', 13', 17', 21', 25', 29', 33',	26.52-26.70	9 C
6', 10', 14', 18', 22', 26', 30', 34'	123.84-124.25	8 C
7', 11', 15', 19', 23', 27', 31', 35'	135.26-134.93	8 C
8', 12', 16', 20', 24', 28', 32', 36'	39.74-39.91	8 C
41'	16.33	8 C
42', 43', 44', 45', 46', 47', 48', 49'	16.0-15.87	1 C
37'	25.74	1 C
38'	38.61	1 C
39'	27.89	1 C
40'-Me	22.63	2 C



Espectro 1. Espectro de RMN-¹H de la dihidroquinona-10 (80).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 2. Espectro de RMN-¹³C de la dihidroquinona-10 (80).

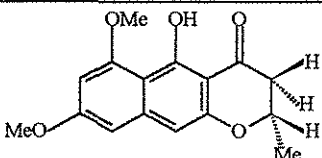
5.3.2. Caracterización de la ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona (43), del ergosta -6, 8(14), 22- trien-3-ol (81) y del ergosterol (82).

La caracterización de las fitotoxinas ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-ona (43), del ergosta-6, 8(14), 22- trien-3-ol (81) y del ergosterol (82) se llevó a cabo mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas previamente en la literatura (Seitz & Paukstelis, 1977; Nes *et al.*, 1985; Zhou & Nes, 2000). En el Apéndice I se incluyen los espectros de estos productos (Espectros 3-8) y los Cuadros (16-18, 20 y 21) donde se indican sus constantes físicas y espectroscópicas.

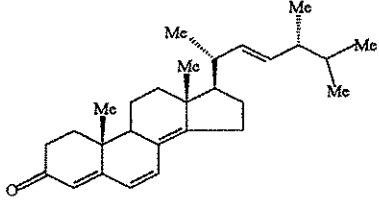
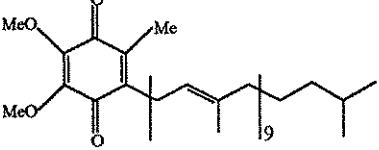
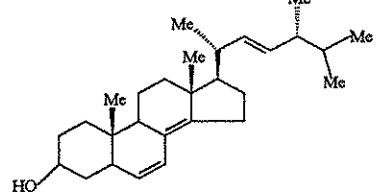
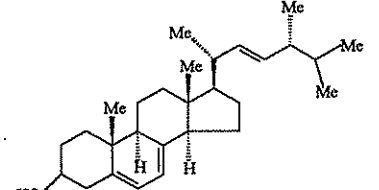
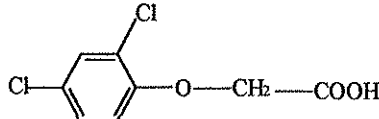
5.4. Determinación del potencial fitotóxico de los compuestos de *Guanomyces polythrix* aislados en el presente estudio.

La actividad fitotóxica de los metabolitos secundarios aislados en el presente estudio se determinó mediante su evaluación sobre la germinación y el crecimiento vegetal utilizando como especie de prueba a la arvense *A. hypochondriacus* (dicotiledónea). Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando las concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL de los compuestos de acuerdo con la metodología descrita en la sección experimental. Como control positivo se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los resultados se resumen en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Efecto de los metabolitos secundarios aislados a partir de *G. polythrix* sobre el crecimiento radicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus*.

Metabolitos secundarios	CI ₅₀ (M)
 (33)	2.1X10 ⁻⁵

Cuadro 13. Efecto de los metabolitos secundarios aislados a partir de *G. polythrix* sobre el crecimiento radicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus* (continuación).

Metabolitos secundarios	CI ₅₀ (M)
 <p style="text-align: center;">(43)</p>	8.2X10 ⁻⁵
 <p style="text-align: center;">(80)</p>	9.76X10 ⁻⁵
 <p style="text-align: center;">(81)</p>	1.18X10 ⁻⁴
 <p style="text-align: center;">(82)</p>	2.0X10 ⁻⁴
 <p style="text-align: center;">2,4-D</p>	1.83X10 ⁻⁴

De manera general los compuestos evaluados poseen actividad fitotóxica significativa sobre la especie arvensis de prueba, presentando concentraciones inhibitorias medias menores a la del control positivo. El efecto fue mayor sobre el crecimiento radicular. Por otra parte, ninguno de los metabolitos puros presentan un efecto significativo sobre el proceso de germinación a la máxima concentración evaluada (100 µg/mL).

5.5. Interacción de los compuestos fitotóxicos 68-71 y 80-82 con la proteína calmodulina de cerebro de bovino.

Para determinar un posible blanco de acción a nivel molecular para los compuestos fitotóxicos dihidroubiquinona-10 (**80**), ergosta -6, 8 (14), 22- trien-3-ol (**81**) y ergosterol (**82**) se analizó de manera preliminar su efecto sobre la proteína reguladora calmodulina de cerebro de bovino empleando una electroforesis descendente en condiciones desnaturizantes. De manera adicional se evaluaron los metabolitos aislados a partir de *L. ambiguum* [2, 2'-dimetoxisesamina (**68**), 2-metoxicobusina (**69**), cobusina (**70**) y 2-metoxi-4'-hidroxidesmetoxicobusina (**71**)]. En la Figura 15 se observa el electroforetograma de los metabolitos fúngicos (**80-82**) y en la Figura 16 el de las fitotoxinas vegetales (**68-71**).

De manera general se observa en ambos electroforetogramas que todas las fitotoxinas modifican la movilidad electroforética de la calmodulina en presencia del calcio. El efecto fue más notable en el caso de los metabolitos **70** y **81**. Es importante mencionar que la interacción de la proteína con los metabolitos modifica su conformación y por lo tanto su movilidad electroforética.

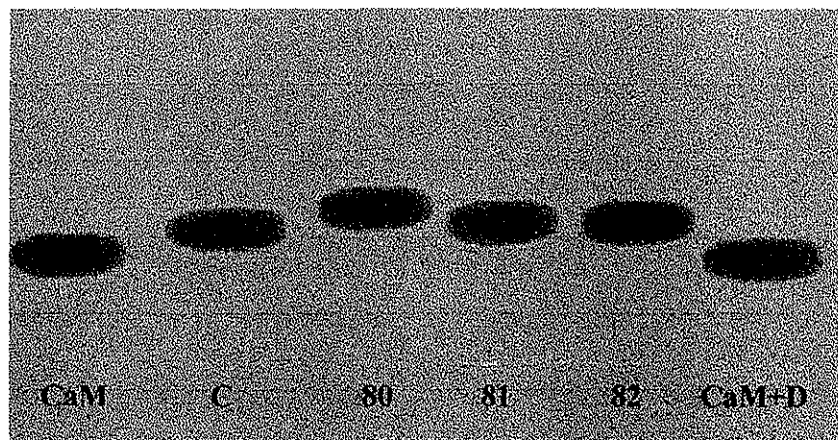


Figura 15. Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de cerebro de bovino: 2 μg de calmodulina y 2 μL de CaCl_2 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 C. CaM (Calmodulina), C (Clorpromazina), compuestos **80-82**, CaM+D (Calmodulina + DMSO). En todos los casos se aplicaron 8.33×10^{-8} moles/L de los compuestos en DMSO.

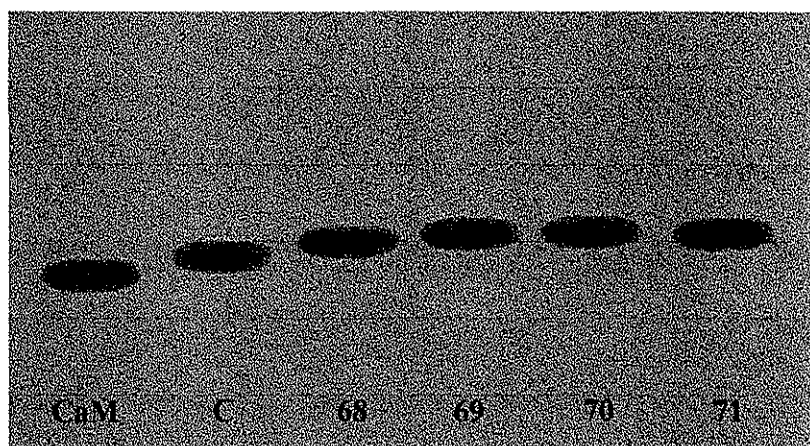


Figura 16. Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de cerebro de bovino: 2 μg de calmodulina y 2 μL de CaCl_2 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 C. CaM (Calmodulina), C (Clorpromazina), compuestos **68-71**. Los compuestos se evaluaron en un rango de concentración entre 8.25×10^{-8} y 8.91×10^{-8} M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.6. Determinación del efecto de los metabolitos fitotóxicos 31-38, 43, 50-51, 56-57, 68-71 y 80-82 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMP cíclico dependiente de calmodulina.

El experimento de electroforesis permitió determinar que las fitotoxinas interaccionan con la proteína calmodulina, sin embargo, este procedimiento no establece si la interacción de las fitotoxinas con la calmodulina afecta sus propiedades reguladoras enzimáticas. Por lo tanto, para comprobar *in vitro* si los metabolitos fitotóxicos afectan la capacidad de la calmodulina para interaccionar con sus proteínas blanco se procedió a evaluar su efecto sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPcíclico dependiente de calmodulina obtenida a partir de cerebro de bovino. Además de los compuestos aislados en el presente estudio [la (+)- (2S)- 5- hidroxí- 6, 8- dimetoxi- 2 - metil-2, 3-dihidronaftopirona (**33**), la ergosta- 4, 6, 8 (14), 22- tetraen-3-ona (**43**), la dihidroubiquinona-10 (**80**), el ergosta-6, 8 (14), 22 -trien-3-ol (**81**) y el ergosterol (**82**)], los metabolitos analizados incluyeron a las fitotoxinas obtenidas previamente a partir de *Guanomyces polythrix* [(+)- (2S,3S)- 5- hidroxí- 6, 8-dimetoxi- 2, 3-dimetil- 2, 3- dihidronaftopirona (**31**), (+)- (2S,3S)- 5-hidroxí-6, 8, 10-trimetoxi-2, 3-dimetil-2, 3-dihidronaftopirona (**32**), (+)- (2S)-5-hidroxí-6, 8, 10- trimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (**34**), (+)-(2S, 3R)- 5-hidroxí-6, 8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**35**), (+)-(2S, 3R)-5-hidroxí-6, 8, 10-trimetoxi -2, 3-dimetil-2, 3-dihidronaftopirona (**36**), rubrofusarina B (**37**), 2,3-dimetil-5-hidroxí-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (**38**) y la ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-ona (**43**)], *Phoma herbarum* [herbaruminas I (**50**) y II (**51**)], *Prionosciadium watsoni* [ésteres del ácido isobutírico (3R)-5-metoxi-3, 4-dihidro-2, 2, 8-trimetil-6-oxo-2H, 6H-benzo [1,2-b:5,4-b']dipiran-3-il (**56**) y del ácido 2-metilbut- (2Z)-enoico (3R)-5-metoxi-3, 4-dihidro-2, 2, 8-trimetil-6-oxo-2H, 6H-benzo [1,2-b:5,4-b']dipiran-3-il (**57**)] y *Leucophyllum ambiguum* [2,2'-dimetoxisesamina (**68**), 2-metoxicobusina (**69**), la cobusina (**70**) y la 2-metoxi-4'-hidroxí-desmetoxicobusina (**71**)].

La estrategia experimental utilizada para evaluar el efecto de los metabolitos sobre la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina se realizó en tres etapas:

(i) En primer lugar se determinó la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino. Este experimento permitió determinar la concentración óptima de calmodulina requerida para la máxima activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc.

(ii) A continuación se determinó el efecto de los metabolitos secundarios fitotóxicos sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina.

(iii) Por último se evaluó el efecto de los metabolitos fitotóxicos sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en presencia de calmodulina.

La actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc se determinó utilizando un método espectrofotocolorimétrico de acuerdo al procedimiento experimental descrito por Sharma y Wang (1979; 1986), en el cual se mide la actividad de la enzima mediante la cuantificación del fosfato inorgánico generado de la hidrólisis del AMPc en presencia de la enzima 5'-nucleotidasa de *Crotalus atrox* (Sigma). El AMPc, claro está, se genera por la actividad enzimática de la fosfodiesterasa utilizada como enzima monitora.

El fosfato liberado se determinó por un método colorimétrico bajo la forma de fosfomolibdato de amonio (Sumner *et al.*, 1944). Para cuantificar la cantidad de fosfato inorgánico (HPO_4^{2-}) generado se construyó la curva patrón que se observa en

la Figura 17 a partir de una disolución 50 mM de fosfato monobásico de potasio (Sigma).

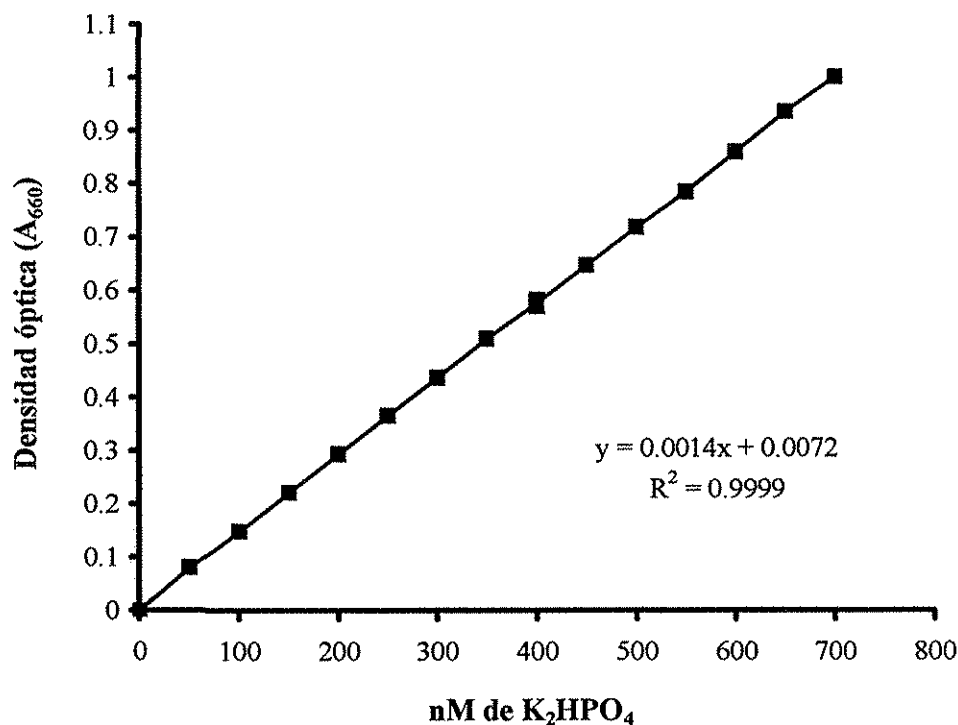
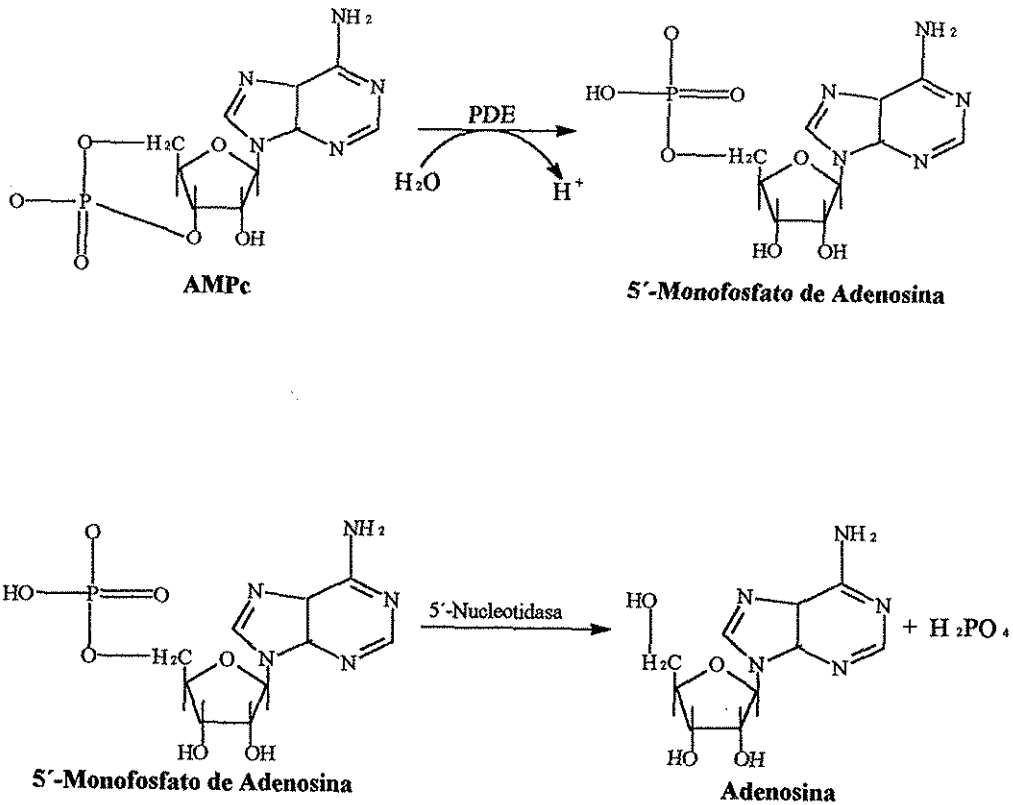


Figura 17. Curva patrón de fosfatos inorgánicos.

La interpolación de los valores de absorbancia obtenidos en cada caso en la recta de la Figura 17 permitió determinar cuantitativamente la concentración de fosfatos inorgánicos liberados durante la reacción de hidrólisis del AMPc a 5'-monofosfato de adenosina y por ende la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina en cada tratamiento (nM de fosfato inorgánico).

En la Figura 18 se ilustran las reacciones enzimáticas involucradas en la determinación de la actividad de la fosfodiesterasa del AMPc.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 18. Reacciones bioquímicas involucradas en la determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc.

5.6.1. Determinación de la concentración óptima de calmodulina necesaria para la activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc.

En la Figura 19 se ilustra la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino.

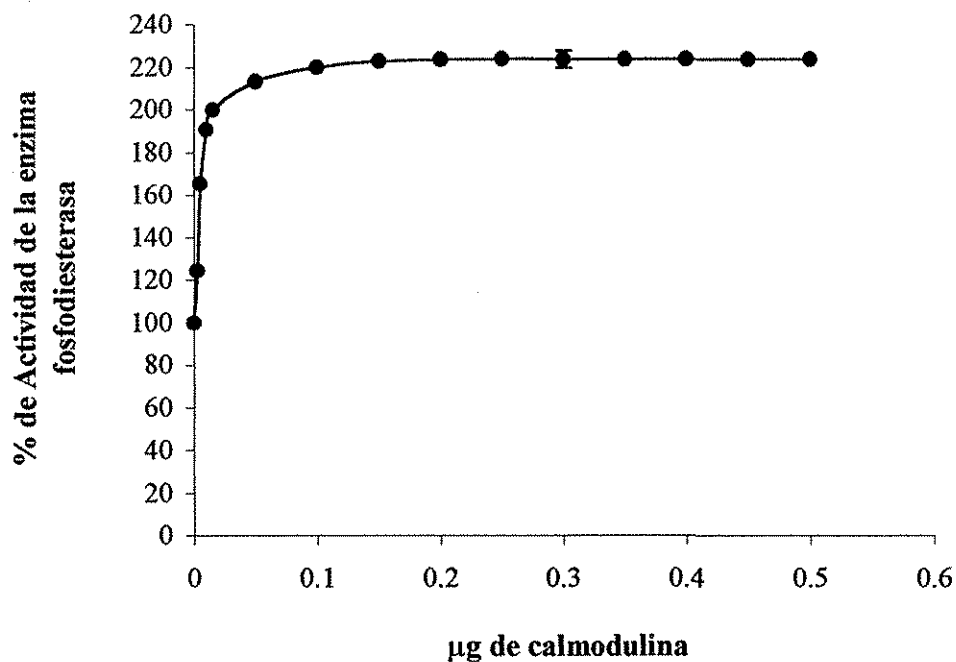


Figura 19. Actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de varias concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino.

La máxima activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc (123%) se obtuvo en presencia de 0.2 µg de la proteína calmodulina.

5.6.2. Efecto de las fitotoxinas 31-38, 43, 50-51, 56-57, 68-71 y 81 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina.

Antes de proceder a determinar el efecto de las fitotoxinas sobre la actividad de la fosfodiesterasa en presencia de calmodulina era necesario determinar si los compuestos modifican la actividad de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina con la finalidad de descartar un efecto directo de las fitotoxinas sobre la enzima. En consecuencia se analizó el efecto de diferentes concentraciones de cada una de las fitotoxinas objeto de estudio y de la clorpromazina sobre la enzima blanco.

Los resultados de estas evaluaciones revelaron que con excepción de los compuestos **56**, **57**, **68** y **69**, ninguna de las fitotoxinas modificó significativamente la actividad de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina de cerebro de bovino. El control positivo tampoco afectó la actividad de la fosfodiesterasa. En las Figuras 20-22 se muestran los resultados derivados de estas evaluaciones. En la Figura 21 se observa que los lignanos **68** y **70** incrementan la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en ausencia de calmodulina en aproximadamente 64% y 57%, respectivamente, a la máxima concentración observada. Los compuestos **69** y **71** sólo provocan un incremento moderado en la actividad de la fosfodiesterasa. Por último, en la Figura 22 se ilustran los resultados para los compuestos **56** y **57**. Ambas pironas aumentan drásticamente la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa del AMPc. De hecho, la pirona **56** activó en más de un 500% a la enzima fosfodiesterasa; en tanto que la pirona **57** sólo incrementó la actividad de esta enzima en aproximadamente un 200% (Cuadro 14).

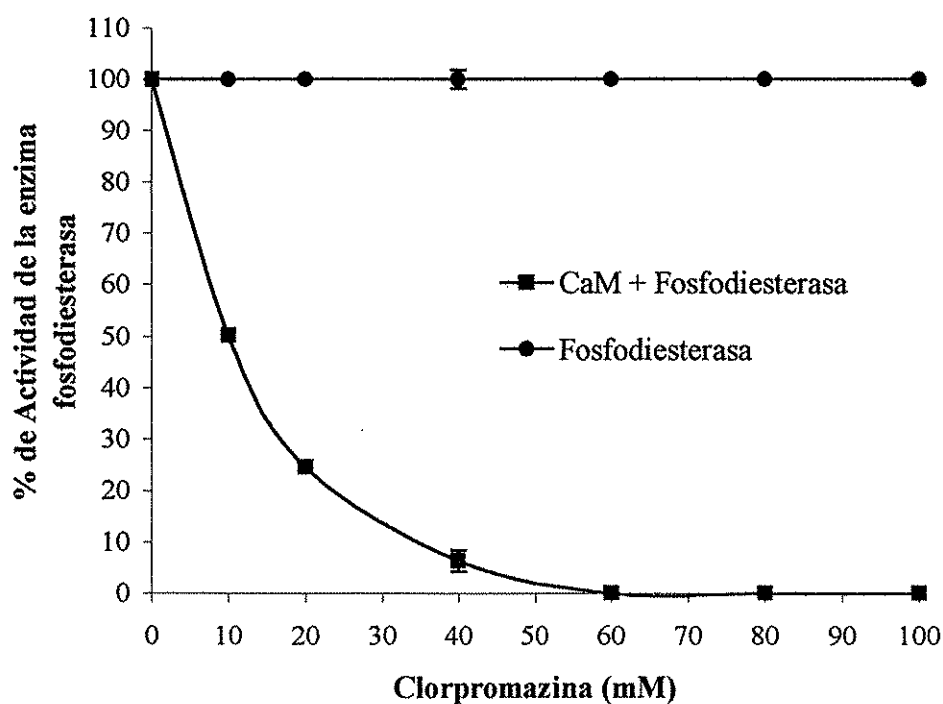


Figura 20. Efecto de la clorpromazina sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa y del complejo Ca^{2+} -Calmodulina-Fosfodiesterasa.

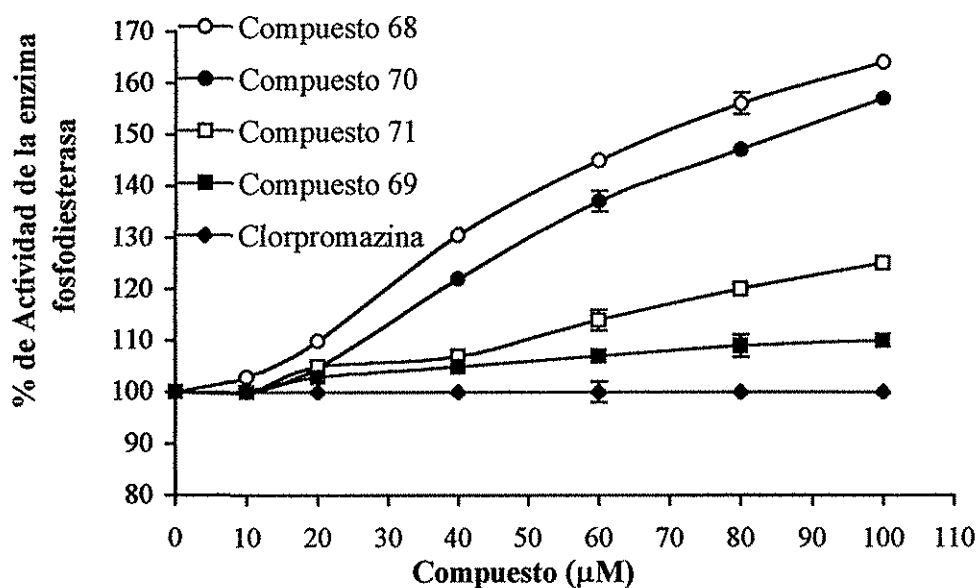


Figura 21. Efecto de los lignanos 2,2'-dimetoxisesamina (68), 2-metoxicobusina (69), cobusina (70) y la 2-metoxi-4'-hidroxidesmetoxicobusina (71) sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa.

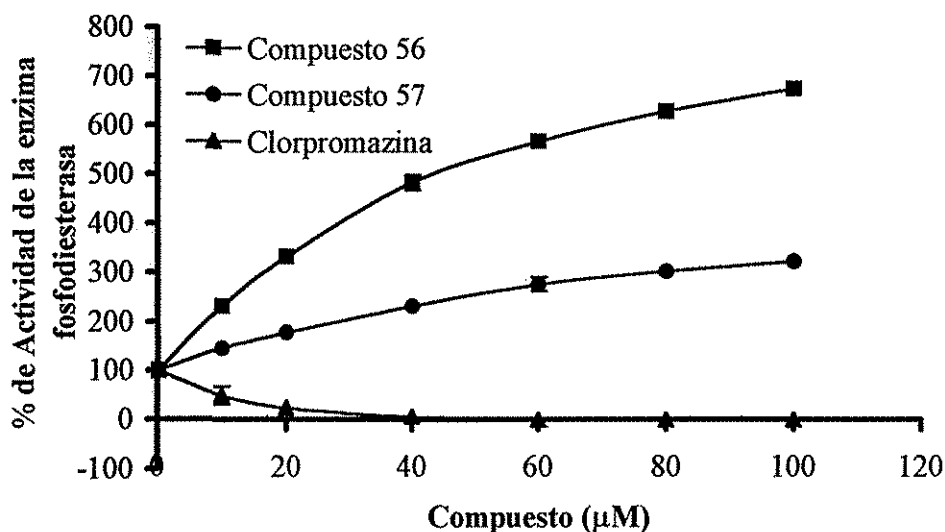
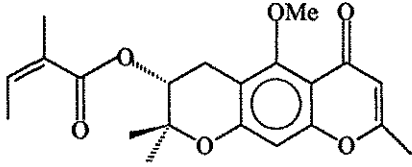
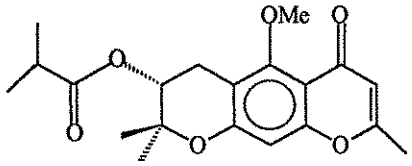
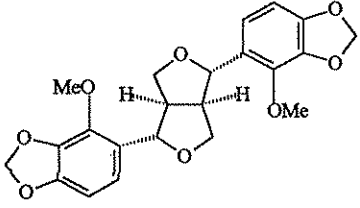
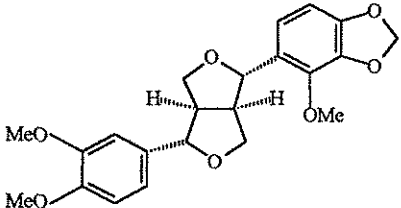
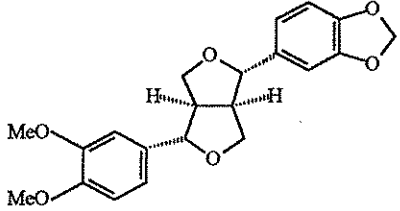
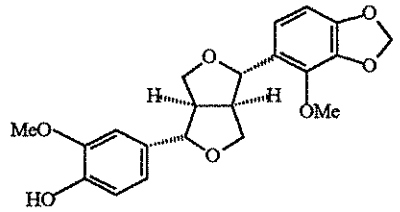


Figura 22. Efecto de los ésteres del ácido isobutírico (3R)-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipiran-3-il (56) y del ácido 2-metilbut-(2Z)-enoico (3R)-5-metoxi-3, 4-dihidro-2, 2, 8-trimetil-6-oxo-2H, 6H-benzo [1,2-b:5,4-b'] dipiran-3-il (57) sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa.

Cuadro 14. Porcentajes de máxima activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina sobre la actividad basal de la fosfodiesterasa del AMPc en presencia de las fitotoxinas **56**, **57**, y **68-70**.

Fitotoxina	% de máxima activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc	Cantidad de fosfato inorgánico liberado durante la hidrólisis del AMPc (nM)
 <p style="text-align: center;">(56)</p>	580	1843.0
 <p style="text-align: center;">(57)</p>	220	879.0
 <p style="text-align: center;">(68)</p>	64	445.2
 <p style="text-align: center;">(69)</p>	10	298.5

Cuadro 14. Porcentajes de máxima activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina sobre la actividad basal de la fosfodiesterasa del AMPc en presencia de las fitotoxinas 56, 57, y 68-70 (continuación).

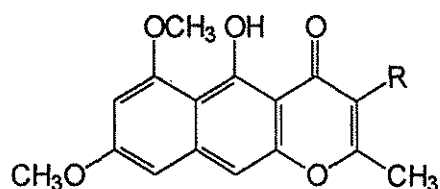
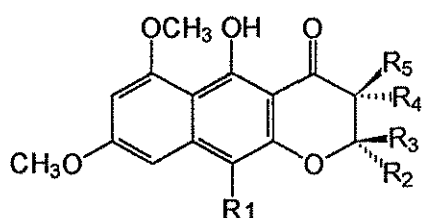
Fitotoxina	% de máxima activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc	Cantidad de fosfato inorgánico liberado durante la hidrólisis del AMPc (nM)
 <p style="text-align: center;">(70)</p>	57	425.2
 <p style="text-align: center;">(71)</p>	25	336.9

5.6.3. Efecto de las fitotoxinas 31-38, 43, 50-51, 56-57, 68-71 y 81 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de la proteína calmodulina.

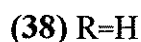
El análisis del efecto de las fitotoxinas sobre la actividad del complejo fosfodiesterasa-calmodulina de cerebro de bovino- Ca^{2+} permitió clasificar a las fitotoxinas en dos grupos. El primer grupo incluye a los compuestos que demostraron un efecto inhibitorio específico sobre el complejo (31-38, 43, 50-51 y 68-71), mientras que el segundo grupo se encuentra constituido por las fitotoxinas

que ocasionaron un efecto inhibitor in específico sobre éste (56 y 57). A continuación se discuten los resultados observados.

En la Figura 23 se indica el efecto de los compuestos fitotóxicos 31-38 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino. De manera general todos los compuestos inhibieron la actividad del complejo enzimático fosfodiesterasa-calmodulina de cerebro de bovino- Ca^{2+} en forma creciente en el intervalo de concentraciones de 10 μM a 40 μM . Es decir, la mayoría de las fitotoxinas a la concentración de 40 μM provocaron el 100% de inhibición de la actividad del complejo enzimático. Con base en los resultados presentados se considera que los compuestos 31-38 son potentes inhibidores de la proteína calmodulina de cerebro de bovino. Anteriormente se descubrió que los metabolitos 31-38 también inhiben la actividad del complejo NADcinas – calmodulina de espinaca (Macías, 2002). Por lo tanto mediante el empleo de dos enzimas reguladas por la calmodulina se comprobó que estos productos naturales son inhibidores generales de la calmodulina.



- (31) $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$, $\text{R}_3=\text{H}$, $\text{R}_4=\text{H}$, $\text{R}_5=\text{CH}_3$
 (32) $\text{R}_1=\text{CH}_3\text{O}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$, $\text{R}_3=\text{H}$, $\text{R}_4=\text{H}$, $\text{R}_5=\text{CH}_3$
 (33) $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$, $\text{R}_3=\text{H}$, $\text{R}_4=\text{H}$, $\text{R}_5=\text{H}$
 (34) $\text{R}_1=\text{CH}_3\text{O}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$, $\text{R}_3=\text{H}$, $\text{R}_4=\text{H}$, $\text{R}_5=\text{H}$
 (35) $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$, $\text{R}_3=\text{H}$, $\text{R}_4=\text{CH}_3$, $\text{R}_5=\text{H}$
 (36) $\text{R}_1=\text{CH}_3\text{O}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$, $\text{R}_3=\text{H}$, $\text{R}_4=\text{CH}_3$, $\text{R}_5=\text{CH}_3$



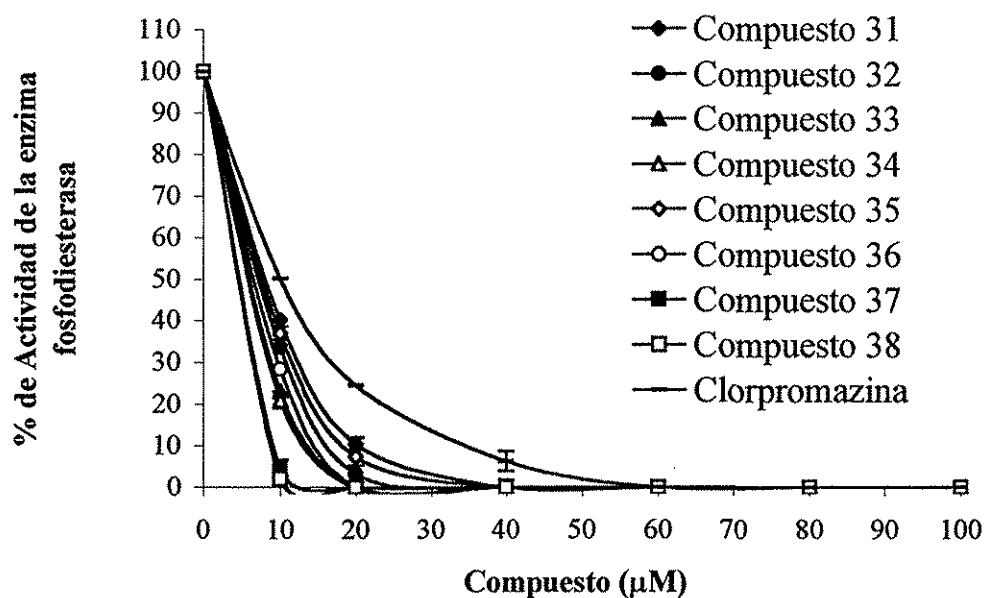
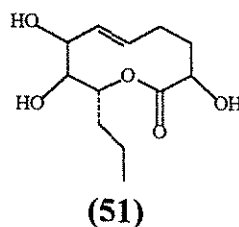
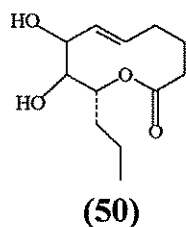


Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **31-38** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino.

Las herbaruminas I (**50**) y II (**51**) también presentan un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino. En la Figura 24 se observa el efecto inhibitor de los compuestos fitotóxicos **50** y **51** sobre la actividad del complejo enzimático fosfodiesterasa-calmodulina de cerebro de bovino- Ca^{2+} en forma creciente en el intervalo de concentraciones de $10 \mu\text{M}$ a $50 \mu\text{M}$. Por lo tanto, las herbaruminas I (**50**) y II (**51**) alcanzan el 100% de inhibición a las concentraciones aproximadas de 45 y $20 \mu\text{M}$, respectivamente.



La herbarumina II (51) que posee un grupo hidroxilo adicional en C-2 presenta una actividad inhibitoria mayor sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina de cerebro de bovino que la observada para la herbarumina I (50). En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos.

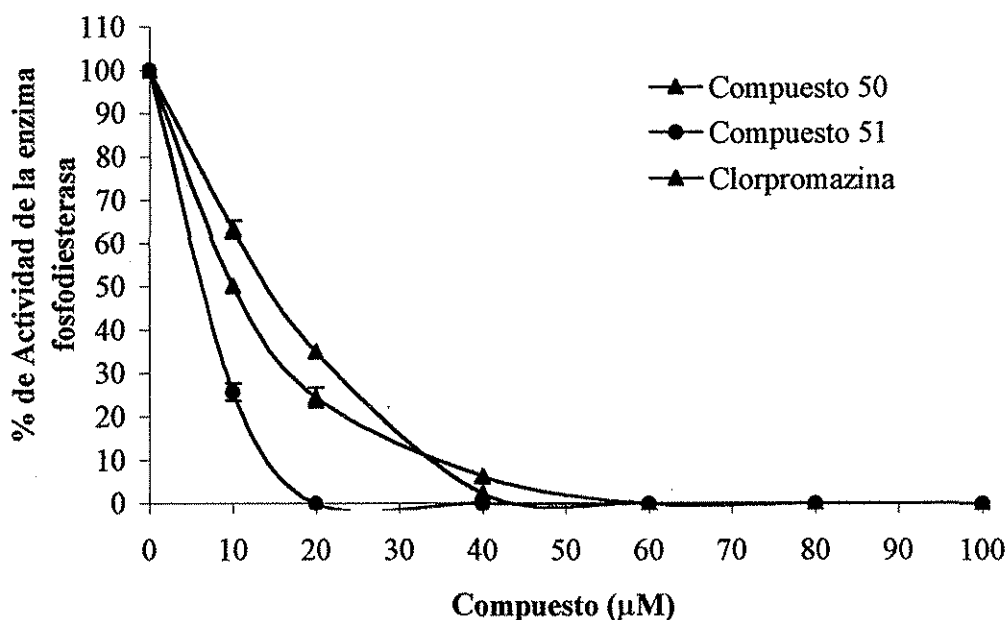


Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 50-51 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la Figura 25 se muestra el efecto de los esteroides 43 y 81 sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de la calmodulina de cerebro de bovino. Las fitotoxinas 81 y 43 provocan el 100% de inhibición de la actividad del complejo enzimático fosfodiesterasa-calmodulina de cerebro de bovino- Ca^{2+} a las concentraciones de 40 y 20 µM, respectivamente. Por lo tanto, aunque ambas fitotoxinas afectan las propiedades reguladoras de la proteína, el compuesto 43, con una cetona en C-3 y una doble ligadura entre C-4 y C-5, presenta un efecto inhibitor sobre el complejo enzimático mayor al del compuesto 81. De

manera adicional este efecto inhibitorio presenta correlación con el efecto fitotóxico sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. De esta forma, uno de los posibles mecanismos de acción herbicida de los compuestos **43** y **81** podría involucrar una alteración de la actividad moduladora de la calmodulina sobre las proteínas blanco.

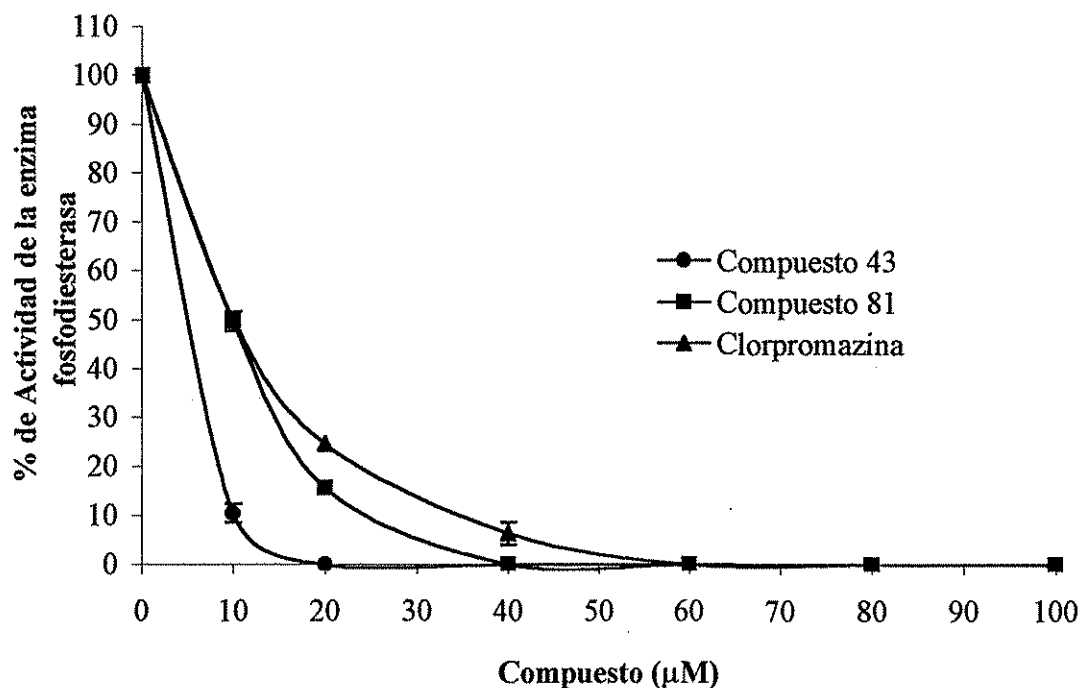
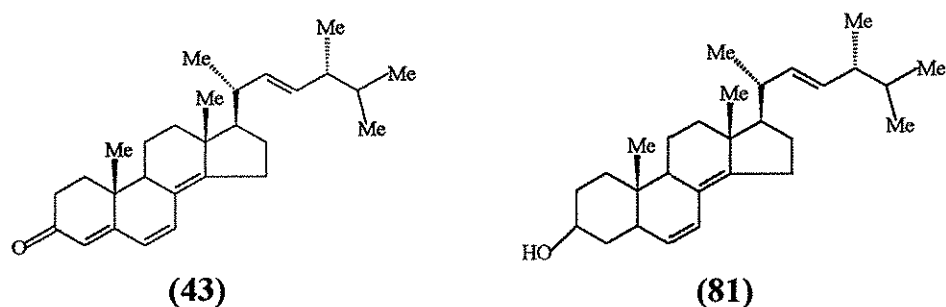
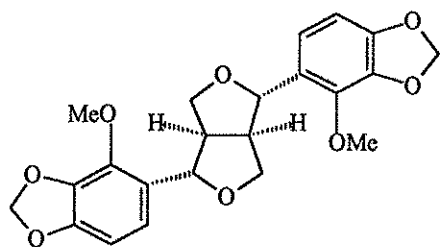
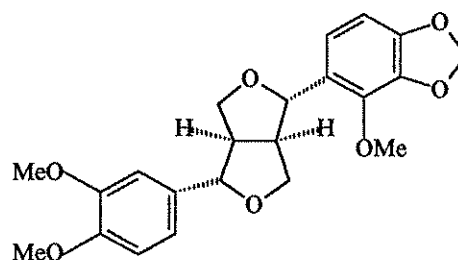


Figura 25. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **43** y **81** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino.

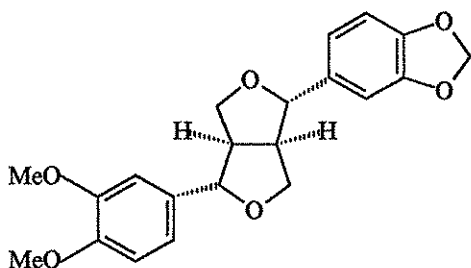
En la Figura 26 se observa que los lignanos **68-71** inhiben la actividad del complejo enzimático fosfodiesterasa-calmodulina de cerebro de bovino- Ca^{2+} . Las fitotoxinas **69**, **70** y **71** afectan las propiedades reguladoras de la proteína a una concentración menor que la presentada por la clorpromazina ($60 \mu\text{M}$).



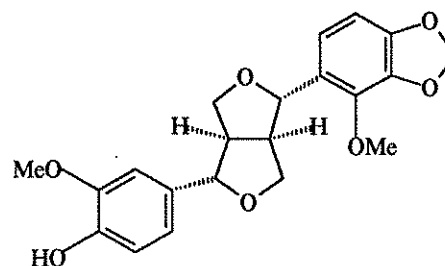
(68)



(69)



(70)



(71)

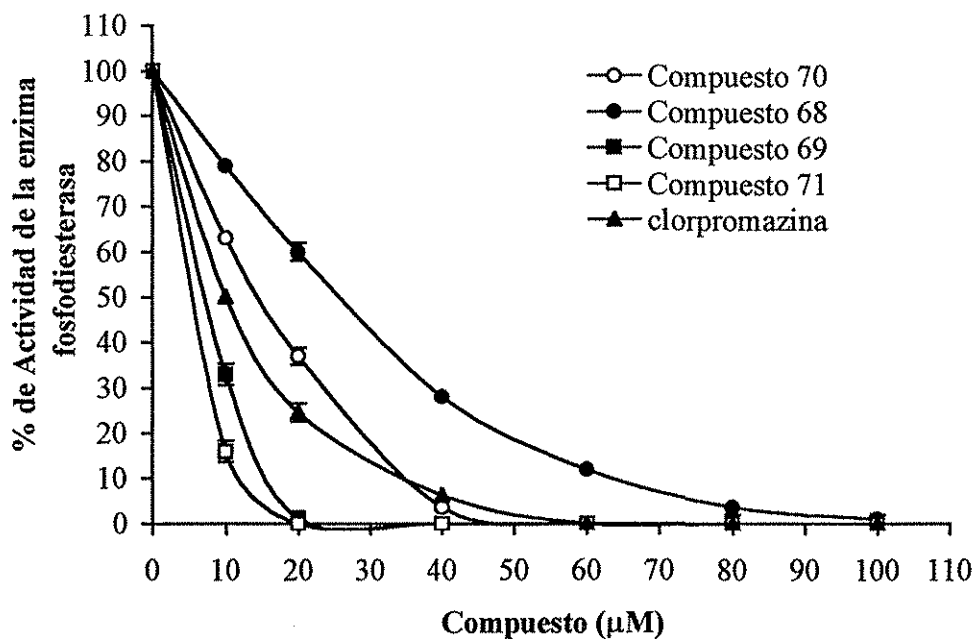


Figura 26. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **68-71** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina de cerebro de bovino.

En general todos los productos discutidos a este punto resultaron más potentes que la clorpromazina. En el caso de los compuestos (+)-(2S,3S)- 5- hidroxí-6,8-dimetoxi- 2,3-dimetil- 2,3- dihidronaftopirona (**31**), (+)- (2S,3S)-5-hidroxí-6, 8, 10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**32**), (+)- (2S)-5-hidroxí-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (**33**), (+)- (2S)-5- hidroxí- 6, 8,10- trimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (**34**), (+)- (2S, 3R)-5-hidroxí-6, 8-dimetoxi-2, 3-dimetil-2, 3-dihidronaftopirona (**35**), (+)- (2S, 3R)-5-hidroxí-6, 8,10-trimetoxi-2, 3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**36**), rubrofusarina B (**37**), 2,3-dimetil-5-hidroxí-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (**38**) y la ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-ona (**43**), el efecto inhibitorio sobre la calmodulina es inespecífico ya que afectan a la calmodulina vegetal y animal. Como ninguno de estos productos interaccionan con las enzimas blanco se pueden utilizar como herramientas de investigación para estudiar los procesos en los que participa la calmodulina animal y vegetal.

Con respecto al segundo grupo, éste incluye a aquellos compuestos que estimulan la actividad del complejo enzimático fosfodiesterasa-calmodulina de cerebro de bovino- Ca^{2+} . En la figura 27 se observa que las pironas **56** y **57** estimulan en un 200% y en un 40% respectivamente, la actividad de la fosfodiesterasa en presencia de calmodulina.

De hecho, el incremento en la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa del AMPc provocada por estos compuestos es mayor que su efecto sobre el complejo enzimático. Por lo tanto, se puede considerar que estos productos son inhibidores inespecíficos de la calmodulina. La fitotoxina **56** con una doble ligadura entre C-13 y C-14 es más activa que su análogo **57**.

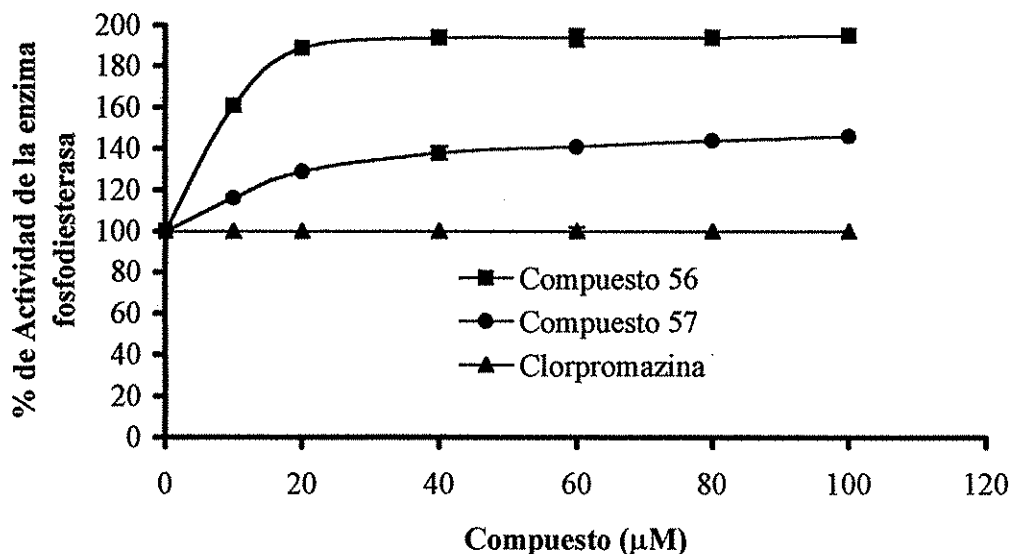
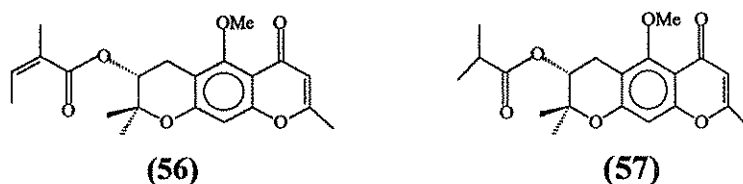
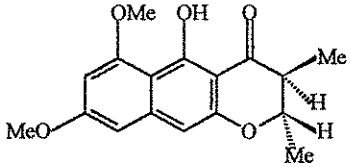
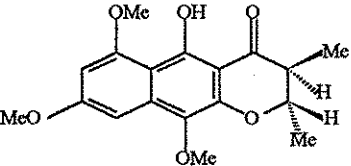
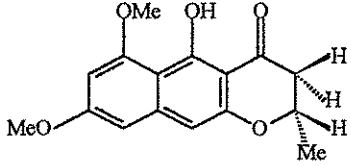
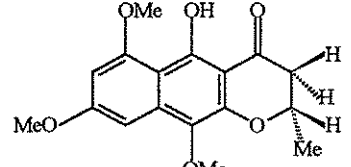


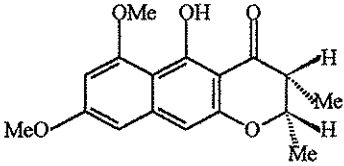
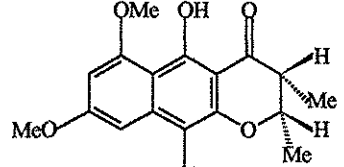
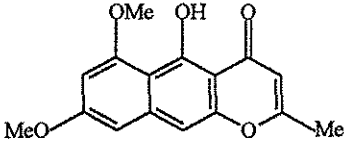
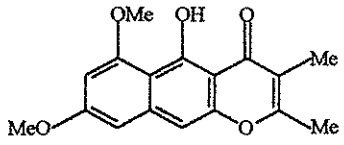
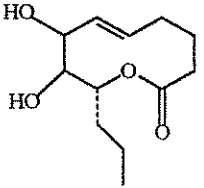
Figura 27. Efecto de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **56** y **57** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia calmodulina de cerebro de bovino.

En el Cuadro 15 se presentan los valores de CI_{50} calculados y expresados en μM , así como la cantidad de fosfato inorgánico producido durante la reacción de hidrólisis del AMPc en presencia de las fitotoxinas a la máxima concentración utilizada.

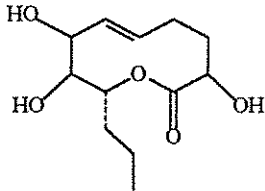
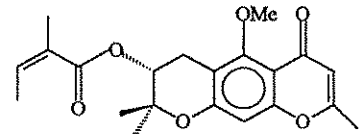
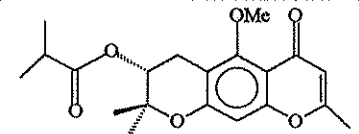
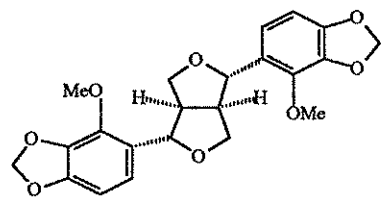
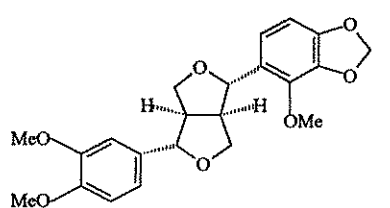
Cuadro 15. Concentraciones inhibitorias medias de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes fitotoxinas.

Fitotoxinas	Concentración inhibitoria media (CI_{50})
 <p style="text-align: center;">(31)</p>	8.1 μM
 <p style="text-align: center;">(32)</p>	7.2 μM
 <p style="text-align: center;">(33)</p>	6.1 μM
 <p style="text-align: center;">(34)</p>	5.8 μM

Cuadro 15. Concentraciones inhibitorias medias de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes fitotoxinas (continuación).

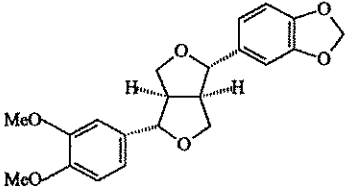
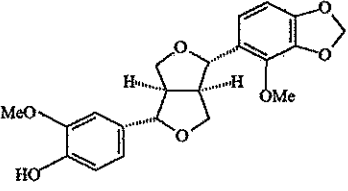
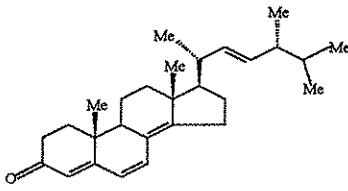
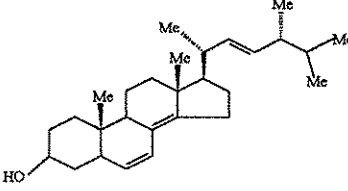
Fitotoxinas	Concentración inhibitoria media (CI ₅₀)
 <p>(35)</p>	7.6 μM
 <p>(36)</p>	6.6 μM
 <p>(37)</p>	4.8 μM
 <p>(38)</p>	4.7 μM
 <p>(50)</p>	6.6 μM

Cuadro 15. Concentraciones inhibitorias medias de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes fitotoxinas (continuación).

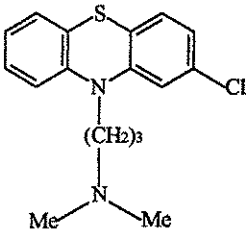
Fitotoxinas	Concentración inhibitoria media (CI ₅₀)
 <p style="text-align: center;">(51)</p>	14.2 μM
 <p style="text-align: center;">(56)</p>	N.D.*
 <p style="text-align: center;">(57)</p>	N.D.*
 <p style="text-align: center;">(68)</p>	26.4 μM
 <p style="text-align: center;">(69)</p>	7.4 μM

N.D.* No se puede determinar.

Cuadro 15. Concentraciones inhibitorias medias de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes fitotoxinas (continuación).

Fitotoxinas	Concentración inhibitoria media (CI ₅₀)
 <p style="text-align: center;">(70)</p>	14.4 μ M
 <p style="text-align: center;">(71)</p>	5.6 μ M
 <p style="text-align: center;">(43)</p>	5.15 μ M
 <p style="text-align: center;">(81)</p>	10.0 μ M

Cuadro 15. Concentraciones inhibitorias medias de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes fitotoxinas (continuación).

Control positivo	Concentración inhibitoria media (CI₅₀)
 <p>The chemical structure of Clorpromazina is shown. It consists of a central nitrogen atom bonded to two phenyl rings and a propyl chain. One phenyl ring has a chlorine atom at the para position. The propyl chain is attached to a secondary amine with two methyl groups.</p> <chem>CN(C)CCCC1=NC2=CC=CC=C2S1C3=CC=C(Cl)C=C3</chem> <p>Clorpromazina</p>	<p>10.2 μM</p>

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

◆ La investigación de un extracto activo obtenido a partir de un nuevo aislamiento del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* permitió la obtención de tres metabolitos secundarios no descritos previamente en el hongo: la dihidroubiquinona-10 (**80**), el ergosta-6,8 (14), 22- trien-3-ol (**81**) y el ergosterol (**82**). Adicionalmente se obtuvieron los compuestos (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (**33**) y la ergosta- 4, 6, 8 (14), 22- tetraen-3-ona (**43**), aislados en un estudio anterior de este hongo. La diferencia en el contenido metabólico del hongo encontrada en el presente estudio con relación al anterior posiblemente radica en el uso de un medio de cultivo artificial, el cual promovió primordialmente la biosíntesis de esteroides (Macías *et al.*, 2000; 2001).

◆ A diferencia de la ubiquinona Q-10, la dihidroubiquinona es un metabolito de escasa distribución en el reino fúngico, por lo tanto su presencia en *G. polythrix* podría ser de interés quimiotaxonómico.

◆ Las fitotoxinas **31-38** y **43** inhiben las propiedades moduladoras tanto de la calmodulina vegetal (espinaca) como animal (cerebro de bovino). En el primer caso se utilizó como enzima blanco a la NAD cinasa aislada de chícharo y en el segundo se empleó la fosfodiesterasa del AMPcíclico. En ninguno de los dos estudios las fitotoxinas interaccionaron con la enzima blanco, por lo tanto estos productos constituyen herramientas útiles para el estudio de los procesos

fisiológicos en los que participa la calmodulina en organismos animales y vegetales.

♦ Los compuestos **50** y **51** poseen un efecto inhibitor sobre la actividad de la fosfodiesterasa de cerebro de bovino en presencia de la calmodulina animal. Considerando que la magnitud de los efectos fitotóxico e inhibitorio de la calmodulina presentado por las herbaruminas I (**50**) y II (**51**) no son proporcionales, es posible que el mecanismo de acción de estas fitotoxinas no involucre únicamente a esta proteína (la herbarumina I [CI_{50} de 5.43×10^{-5} M] es más potente como fitotoxina que la herbarumina II [CI_{50} de 1.25×10^{-4} M]; sin embargo, esta última es un inhibidor más potente de la calmodulina que la herbarumina I).

♦ Las fitotoxinas **69-71** y **81** afectan las propiedades reguladoras de la proteína a una concentración menor que la presentada por la clorpromazina ($60 \mu\text{M}$). Por lo tanto, estos compuestos podrían ser de interés medicinal y/o agroquímico. Como agentes medicinales estos productos podrían constituir agentes tranquilizantes, antihipertensivos y relajantes de la musculatura lisa. También estos productos podrían convertirse en herbicidas potenciales si se demostrase un efecto selectivo sobre alguna isoforma de la calmodulina de origen vegetal. De cualquier forma el efecto fitotóxico de estos compuestos sí puede deberse a su interacción con la calmodulina.

♦ Los compuestos **56** y **57** provocan un incremento en la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc, tanto en presencia de la proteína calmodulina de cerebro de bovino como en ausencia de ésta. De hecho, como el incremento es considerablemente mayor cuando no se adiciona calmodulina, se considera que estos productos son también antagonistas de la calmodulina. Aunque estos compuestos presentan valores de CI_{50} de 7.4×10^{-5} M y 1.43×10^{-4} M sobre el

crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*, el efecto fitotóxico de las pironas **56** y **57** posiblemente no se debe exclusivamente a su interacción con la calmodulina.

◆ Finalmente, las fitotoxinas **31-38**, **43**, **50-51**, **68-71** y **81** se pueden utilizar como instrumentos para el estudio de los procesos bioquímicos y fisiológicos que son regulados por las proteínas calmodulina vegetal y animal.

◆ Este trabajo contribuye adicionalmente al conocimiento del metabolismo del hongo *G. polythrix* y de la biodiversidad de México.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, A. J., Camacho, S., Chino, P., Jáquez, P. & López, M. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F. p. 253.

Anaya, A. L., Calera, M., Mata, R. & Pereda-Miranda, R. (1991). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology* **16**, 2145-2152.

Anaya, A. L., Hernández-Bautista, B. E., Calera, M. R., Torres, A., Pelayo, H. & Fernández, E. (1995). A methodological model used in the search for allelopathic potential in some Mexican plants. En: *Methodology for Allelopathy Research*. Waller, G.R. & S. Narwal (Eds.).

Argueta, A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Vol. III. Instituto Nacional Indigenista, México. p. 521.

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.

Au, T. K., Chick, W. S. H. & Leung, P. C. (2000a). Initial kinetics of the inactivation of calmodulin by the fungal toxin ophiobolin A. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **32**, 1173-1182.

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

Barnard, C., Daberkow, S., Padgitt, M., Smith, M. & Uri, N. (1997). Alternative measures of pesticide use. *The Science of the Total Environment* **203**, 229-244.

Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F. & Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63** (2), 266-324.

Boyette, C. D., & Abbas, H. K., (1995). Weed control with mycoherbicides and phytotoxins. A non traditional application of allelopathy. *American Chemical Society. Symposium Series* **582**, 280-299.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Brebaum, S. N. & Boland, G. J. (1999). First report of *Phoma herbarum* and *Phoma exigua* as pathogens of dandelion in Southern Notario, *Plant Disease* **83**, p. 200.

Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2000). Biochemistry & molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists*. Rockville, 962-973.

Bush, B. D., Fitchet, G. V., Gates, D. A. & Langley, D. (1993). Carbocyclic nucleosides from a species of *Saccharothrix*. *Phytochemistry* **32** (3), 737-739.

Chandler, I. M., McIntyre, R. C. & Simpson, T. J. (1992a). Biosynthesis of LL-D253 α , poliketide chromanone metabolite of *Phoma pigmentivora*: Incorporation of

^{13}C , ^2H and ^{18}O labelled precursors. *Journal of Chemistry Society. Perkin Transactions I*, 2285-2293.

Chandler, I. M., McIntyre, R. C. & Simpson, T. J. (1992b). Structural revision and synthesis of LL-D253 α and related chromanone fungal metabolites. *Journal of Chemistry Society. Perkin Transactions I*, 2271-2284.

Charudattan, R. (1990). Pathogens with potential for weed control. En: *Microbes and Microbial Products as Herbicides*. R. E. Hoagland (Ed.). *American Chemical Society. Symposium Series 439*, 132-154.

Cobb, J. A., Han, C. H., Wills, D. M. & Roberts, D. M. (1999). Structural elements within the methylation loop (residues 112-117) and EF hands III and IV of calmodulin are required for Lys 115 trimethylation. *Biochemistry Journal* **340**, 417-424.

Cocucci, M. & Negrini, N. (1988). Changes in the levels of calmodulin and of a calmodulin inhibitor in the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Physiology* **88**, 910-914.

Cramer, H. M. (2000). Crop protection. En: *Agrochemicals. Composition, Production, Toxicology and Applications*. F. Müller (Editor), Wiley-VCH, Federal Republic of Germany, 288-317.

Cremllyn, R. J. (1991). Agrochemicals. Preparation and mode of action. John Wiley and Sons. Nueva York, Cap. 8, 217-170.

Crowley, P., Fischer, H. & Devonshire, A. (1998). Feed the world. *Chemistry in Britain* **34**(1), 25-28.

Dayan, F. E., Romagni, J. G. & Duke, S. O. (2000). Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology* **26** (9), 2079-2094.

Díaz, J. (1976). Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas I. IMEPLAN, México, p. 61.

Domsch, K. H., Gams, W. & Anderson, T. H. (1982). *Compendium of Soil Fungi* vol.2 Academic Press, Nueva York, 630-643.

Duke, O. S. & Abbas, H. K. (1995). Natural products with potential use as herbicides. En: *Allelopathy: Organism, Processes and Applications*. Inderjit, M. Dakshini & Frank A. Einhellig (Eds.), *American Chemical Society. Symposium Series* **582**, 348-362.

Duke, O. S. & Lydon, J. (1987). Herbicides from natural compounds, *Weed Technology* **1**, 122-128.

Duke, O. S. & Lydon, J. (1993). Natural phytotoxins as herbicides. En: Pest control with enhanced environmental safety. *American Chemical Society. Symposium Series* **524**, Cap. 9 pp.110-124.

Evans, D., (1998). Agrochemicals-benefits and Risks. *Chemistry in Britain* **34**(1), 20-23.

Evidente, A., Sparapano, L., Motta, A., Giordano, F., Fierro, O. & Frisullo, S. (1996). A phytotoxic pimarane diterpene of *Sphaeropsis sapinea* f. sp. Cupressi, the pathogen of a canker disease of cypress. *Phytochemistry* **42** (6), 1541-1546.

Evidente, A., Sparapano, L., Fierro, O., Bruno, G., Giordano, F. & Motta, A. (1997). Sphaeropsidins B and C, phytotoxic pimarene diterpenes from *Sphaeropsis sapinea* f. sp. Cupressi and *Diplodia mutila*. *Phytochemistry* **45** (4), 705-713.

Evidente, A., Capasso, R., Andolfi, A., Vurro, M. & Zonno, M. C. (1998). Putaminoxins D and E from *Phoma putaminum*. *Phytochemistry* **48**, 941-945.

Evidente, A. & Motta, A. (2001). Phytotoxins from fungi, pathogenic for agrarian, forestal and weedy plants. En: *Bioactive Compounds from Natural Sources*. C. Tringalli (Ed.), Taylor & Francis, Londres, 475-525.

Friis, P., Daves, G. D. & Folkers, K. (1966). Complete sequense of biosynthesis from p-hydroxybenzoic acid to ubiquinone. *Journal of the American Chemical Society* **88**, 4754-4756.

Gale, P. H., Arison, B. H., Trenner, N. R., Page, A. C. Jr. & Folkers, K. (1963). Coenzyme Q. XXXVI. Isolation and characterization of Coenzyme Q₁₀ (H-10). *Biochemistry* **2** (1), 6633-6636.

Gellman, S. H. (1991). On the role of methionine residues in the sequense-independent recognition of nonpolar protein surfaces. *Biochemistry* **30**, 6633-6636.

Gerwick, B. C., Fields, S. S., Graupner, P. R., Gray, J. A., Chapin, E. L., Cleveland, J. A. & Heim, D. R. (1997). Pyridazocidin, a new microbial phytotoxin with activity in the Mehler reaction. *Weed Science* **45**, 654-657.

Ghisalberti, E. (1993). Detection and isolation of bioactive natural products. En: *Bioactive Natural Detection, Isolation and Structural Determination*. Colegate, S. & Molyneux, R. (Eds.). C.R.C. Press., E.U.A. pp 10-49.

González, M. C., Hanlin, R. T., Ulloa, M. (2000). *Guanomyces*, a new genus of *Ascomycetes* from Mexico. *Mycologia* **92**, 861-864.

Harborne, J. B. (1999). Recent advances in chemical ecology. *Natural Products Reports* **16**, 509-523.

Heap, I. M. (1997). The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science* **51**, 235-243.

Hoagland, R. E. (1990). Microbes and microbial products as herbicides, an overview. En: *Microbes and Microbial Products as Herbicides*. American Chemical Society. *Symposium Series* **439**, 1-52.

Holt, J. S. (1993). Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 203-229.

Inoue, M., Nishimura, H., Li, H. H. & Mizutani, J. (1992). Allelochemicals of *Polygonum sachalinense* FR. SCHM (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology* **18**, 1833-1840.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lavate, W. V., Dyer, J. R., Springer, C. M. & Bentley, R. (1965). The isolation, characterization, and general properties of a partly reduced Coenzyme Q₁₀ from *Penicillium stipitatum*. *The Journal of Biological Chemistry* **240** (1), 524-531.

Lee, H. S., Kim, M. C., Heo, W. D., Kim, J. C., Chung, W. S., Park, C. Y., Park, H. C., Cheong, Y. H., Kim, C. Y., Lee, S. H., Lee, K. J., Bahk, J. D., Lee, S. Y. & Cho,

M. J. (1999). Competitive binding of calmodulin isoforms to calmodulin-binding proteins: implication for the function of calmodulin isoforms in plants. *Biochimica et Biophysica acta* **1433**, 56-67.

Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H. & Tripton, C. L. (1984). Ophiobolin A: A natural product inhibitor of calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry* **259** (5), 2742-2747.

Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H. & Tripton, C. L. (1985). Role of calmodulin inhibition in the mode of action of ophiobolin A. *Plant Physiology* **77**, 303-308

Leung, P. C., Graves, L. M. & Tripton, C. L. (1988). Characterization of the interaction of Ophiobolin A and calmodulin. *International Journal of Biochemistry* **20**, 1351-1359.

Liao, B., Gawienowski, M. C., Zielinski, R. E. (1996). Differential stimulation of NAD kinase and binding of peptide substrates by wild-type and mutant plant calmodulin isoforms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **327**, 53-60.

Lipshutz, B.H., Bulow, G., Fernández-Lazaro, F., Sung-Kyu, K., Lowe, R., Mollard, P. & Stevens, K. L. (1999). A convergent approach to coenzyme Q. *Journal of American Chemistry Society* **121**, 11664-11673.

Liu, A., Laliberté, F., Bobechko, B., Bartlett, A., Lario, P., Gorseth, E., Van Hamme, J., Gresser, M. J. & Huang, Z. (2001). Dissecting the cofactor-dependent and independent bindings of PDE4 inhibitors. *Biochemistry* **40**, 10179-10186.

Lusznjak, M. & Pickett, J. (1998). Self-defence for plants. *Chemistry in Britain* **34**(1), 29-32.

Macías, F. (1995). Allelopathy in the search for natural herbicide models. *American Chemical Society. Symposium Series* **582**, 310-329.

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.

Macías, M. (2002). *Metabolitos Fitotóxicos del Hongo Coprófilo Guanomyces polythrix como una Fuente Potencial de Compuestos Herbicidas con una Actividad Sobre la Proteína Calmodulina y la Enzima NAD cinasa Dependiente de Calmodulina*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM. pp. 226.

Marmé, D. & Dieter, P. (1983). *Role of Ca²⁺ and Calmodulin in Plants*. Academic Press, Inc. Nueva York, Cap. 7, 264-311.

Mirzoeva, S., Weigand, S., Lukas, T. J., Shuvalova, L., Anderson, W. F. & Watterson, D. M. (1999). Analysis of the functional coupling between calmodulin's calcium binding and peptide recognition properties. *Biochemistry* **38**, 3936- 3947.

Muraca, R F., Whittick, J. S., Daves, G. D., Friis, P. & Folkers, K. (1967). Mass spectra of ubiquinones and ubiquinols. *Journal of the American Chemical Society* **89**(6), 1505-1508.

Nakajima, H., Kimura, Y. & Hamasaki, T. (1992). Spiciferinone, an azaphilone phytotoxin produced by the fungus *Cochliobolus spicifer*. *Phytochemistry* **31**(1), 105-107.

Nes, W. D., Heupel, R.C. & Le, P. H. (1985). Biosynthesis of Ergosta-6 (7), 8 (14), 22 (23)-trien-3 β -ol by *Gibberella fujikuroi*: Its importance to ergosterol's metabolic pathway. *Journal of the Chemical Society, Chemistry Community* **963**, 1431-1433.

Nishino, H., Naitoh, E., Iwashima, A. & Umezawa, K. (1984). Quercetin interacts with calmodulin, a calcium regulatory protein. *Experientia* **40**, 184-185.

Oh, S. H., Steiner, D. K., Dougall, D. M., Roberts. (1992). Modulation of calmodulin levels, calmodulin methylation and calmodulin binding proteins during carrot cell growth and embryogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **297**, 28-34.

Ohki, S., Ikura, M., & Zhang, M. (1997). Identification of Mg²⁺-binding sites and the role of Mg²⁺ on target recognition by calmodulin. *Biochemistry* **36**, 4309-4316.

Olembo, T. W. (1972). *Phoma herbarum* Westend: Pathogen of *Acacia mearnsii* Wild. in Kenya, *East African Agricultural and Forestry Journal* **38**, 201-206.

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

Paliyath, G. & Poovaiah, B. W. (1985). Identification of naturally occurring calmodulin inhibitors in plants and their effects on calcium- and calmodulin-promoted protein phosphorylation. *Plant Cell Physiology* **26** (1), 201-209.

Paredes, D. (1984). *Etnobotánica mexicana: Plantas popularmente empleadas en el Edo. de Michoacán en el tratamiento de enfermedades hepáticas y vesiculares*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

Pedras, M. S. C., Séguin-Swartz, G. & Abrams, S. R. (1990). Minor phytotoxins from the blackleg fungus, *Phoma lingam*. *Phytochemistry* **29** (3), 777-782.

Persechini, A., Gansz, K. J. & Paresi, R. J. (1996). Activation of myosin light chain kinase and nitric oxide synthase activities by engineered calmodulins with duplicated or exchanged EF hand pairs. *Biochemistry* **35**, 224-228.

Pillmoor, J. B., Wright, K. & Terry, A. S. (1993). Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Science* **39**, 131-140.

Porter, K., Bacon, C., Robinson, J. & Higman, H. (1975). A field indicator in plants associated with ergot-type toxicities in cattle. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **23**, 271-275.

Porter, N., & Fox, F. M., (1997). Diversity of microbial products – Discovery and application. *Pesticide Science* **39**, 161-168.

Rahalison, L., Hamburger, M., Hosttetmann, K., Monod, M. & Frenk, E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis* **2**, 199-203.

Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E. & Hosttetmann, K. (1994). A antifungal test in phytochemical investigations: Comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human phatogenic fungi. *Planta Medica* **60**, 41-44.

Rimando, A., Dayan, F., Mikell, J. & Moraes, R. (1999). Phytotoxic lignans of *Leucophyllum frutescens*. *Natural Toxins* **7**, 39-43.

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

Rivero-Cruz, F. (2001). *Análisis Conformacional y Estereoquímica Absoluta de las Nonenólidas Fitotóxicas del Hongo Phoma herbarum*. Tesis de Doctorado. pp.197.

Rojas, T. I. S. (2002). *Metabolitos Fitotóxicos de Parmotrema tinctorum N. y I. (Hale) y Leucophyllum ambiguum Humb.& Bonpl. Como una Fuente Potencial de Compuestos Herbicidas con un Efecto Sobre la Fotosíntesis y la Proteína Calmodulina*. Tesis de Doctorado. pp. 116.

Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*, Ed. Limusa, México D.F., pp. 247-256.

Seitz, L. & Paukstelis, J. (1977). Metabolites of *Alternaria alternata*: Ergosterol and ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **25**, 838-841.

Sharma R. K. & Wang, J. H. (1979). Preparation and assay of the Ca²⁺ -dependent modulator protein. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Vol 10, pp. 187-198. Raven Press, Nueva York.

Sharma, R. K. & Wang, J. H. (1986). Purification and characterization of bovine lung calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *The Journal of Biological Chemistry* **261**(30), 14160-14166.

Siehl, D. L., Subramanian, M. V., Walters, E. W., Lee, S., Anderson, R. J. & Toschi, A. G.(1996). Adenylosuccinate synthetase: Site of action of hydantocidin, a microbial phytotoxin. *Plant Physiology* **110**, 753-758.

Stahl, E. (1969). *Thin Layer Cromatography*. Academic Press Inc., Nueva York. p. 478.

Strobel, G., Kenfield, D., Bunkers, G., Sugawara, F. & Clardy, J. (1991). Phytotoxins from fungi attacking weedy plants. En: *Handbook of Natural Toxins* Vol. 6, Toxicology of plant and fungal compounds. R. Keeler y A. T. Tu, Marcel Dekker, Nueva York.

Sumner, J. B. (1944). Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* **100**, 413-415.

Swager, T. M. & Cardellina II, J. H. (1985). Coumarins from *Musineon divaricatum*. *Phytochemistry* **24**(4), 805-813.

Takisawa, K., Fukushima, K., Maebayashi, Y., Okada, K., Nishimura, K. & Miyaji, M. (1992). Isolation and structural elucidation of a dihydroubiquinone-9 from the fungus *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiology Letters* **92**, 129-132.

Terao, S., Kato, K., Shiraishi, M. & Morimoto, H. (1978). Synthesis of ubiquinones. Elongation of the heptaprenyl side chain in ubiquinone-7. *Journal of Chemistry Society Perkin Transactions I* 1101-1110.

Thompson, W. J., Terasaki, W.L., Epstein, P. M. & Strada, S. J. (1979). Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme. *Advances in Cyclic Nucleotide Research* 10, Raven Press, Nueva York, 69-92.

Valencia-Islas, N., Abbas, H., Bye, R., Toscano, R. & Mata, R. (2002). Phytotoxic compounds from *Prionosciadium watsoni*. *Journal of Natural Products*.

Vertessy, B. G., Harmat, V., Böcskei, Z., Náráy-Szabó, G., Orosz, F., & Ovádi, J. (1998). Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: Crystallographic and spectroscopic studies. *Biochemistry* 37,15300-15310.

Warrior, P., (2000). Living systems as natural crop-protection agents, *Pesticide Management Science* 56, 671-687.

Xu, R. X., Hassell, A. M., Vanderwall, D., Lambert, M. H., Holmes, W. D., Luther, M. A., Rocque, W. J., Milburn, M. V., Zhao, Y., Ke, H., Nolte, R. T., (2000). Atomic structure of PDE4: Insights into phosphodiesterase mechanism and specificity, *Science* 288, 1822-1825.

Yamada, Y., Kanematsu, Y., Ohashi, M. & Kondo, K. (1973). On the partly reduced coenzyme Q isolated from "*Rhodotorula lactosa*" IFO 1058 and its relation to the taxonomic position. *Agricultural and Biological Chemistry* 37(3), 621-628.

Yuan, T., Walsh, M. P., Sutherland, C., Fabian, H., Vogel, H. J., (1999). Calcium-dependent and -independent interactions of the calmodulin-binding domain of cyclic nucleotide phosphodiesterase with calmodulin. *Biochemistry* **38**, 1446-1455.

Zhang, M., Li, M., Wang, J. H. & Vogel, H. J. (1994). The effect of Met→ Leu mutations on calmodulin's ability to activate cyclic nucleotide phosphodiesterase. *The Journal of Biological Chemistry* **269** (22), 15546-15552.

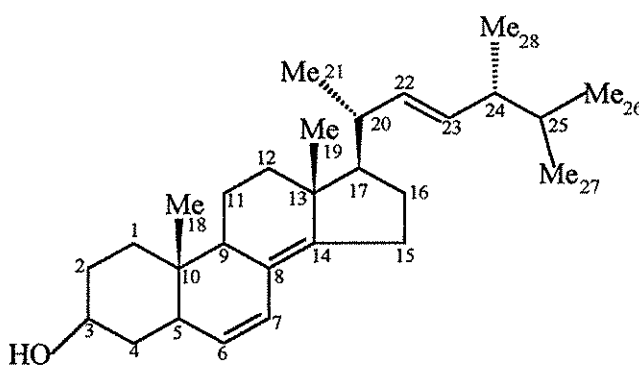
Zhou, W. & Nes, W. D. (2000). Stereochemistry of hydrogen introduction at C-25 in ergosterol synthesized by the mevalonate-independent pathway. *Tetrahedron Letters* **41**, 2791-2795.

APÉNDICE I

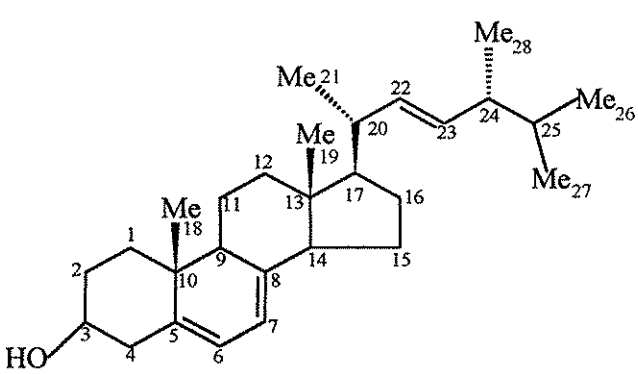
Cuadro 16. Constantes físicas y espectroscópicas de la Ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona (43).

Punto de fusión	70-73 °C
Peso molecular	392 uma
Fórmula molecular	$C_{28}H_{40}O$
EM-IE	m/z (int. rel.) 392 $[M]^+$ (68), 268(100), 267 (62), 253 (14), 214 (13), 43 (10), 41(5).
IR	2940, 2860, 1650, 1445, 1347, 1217, 1191, 946, 872 y 758 cm^{-1} .
RMN ¹ H y RMN ¹³ C	Cuadros 20 y 21.

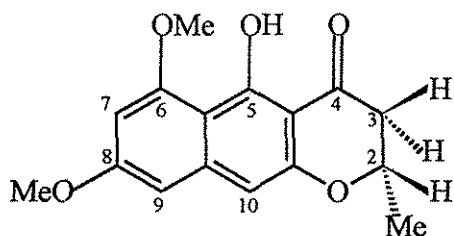
Cuadro 17. Constantes físicas y espectroscópicas del Ergosta -6, 8 (14), 22- trien-3-ol (81).

	
Punto de fusión	134-136 °C
Peso molecular	396 uma
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₄₄ O
EM-IE	<i>m/z</i> (int. rel.) 396 [M] ⁺ (67), 381 (18), 363 (60), 271 (100), 253 (100), 69 (34).
IR	Grupo hidroxilo (~3400 cm ⁻¹), metilos (~1380 cm ⁻¹), metilenos(~760 cm ⁻¹) y metinos (~3000 - 2840 cm ⁻¹).
RMN ¹ H y RMN ¹³ C	Cuadros 20 y 21.

Cuadro 18. Constantes físicas y espectroscópicas del Ergosterol (82).

	
Punto de fusión	140 °C
Peso molecular	396 uma
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₄₄ O
EM-IE	<i>m/z</i> (int. rel.) 396 [M] ⁺ (32), 376 (15), 363 (100), 271 (18), 251 (34), 69 (35).
IR	Grupo hidroxilo (~3400 cm ⁻¹), metilos (~1380 cm ⁻¹), metilenos(~760 cm ⁻¹) y metinos (~3000 - 2840 cm ⁻¹).
RMN ¹ H y RMN ¹³ C	Cuadros 20 y 21.

Cuadro 19. Constantes físicas y espectroscópicas de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (**33**).



Punto de fusión	175-177 °C
Peso molecular	288 uma
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₆ O ₅
EM-IE	<i>m/z</i> (int. rel.) 288 [M ⁺ (100)], 246 (50), 218(10), 190 (20).
IR	3500, 1639 y 1611 cm ⁻¹ .
RMN ¹ H y RMN ¹³ C	Cuadro 22.

Cuadro 20. Desplazamientos químicos de RMN-¹H de la ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona (43), del ergosta -6, 8 (14), 22- trien-3-ol (81) y del ergosterol (82).

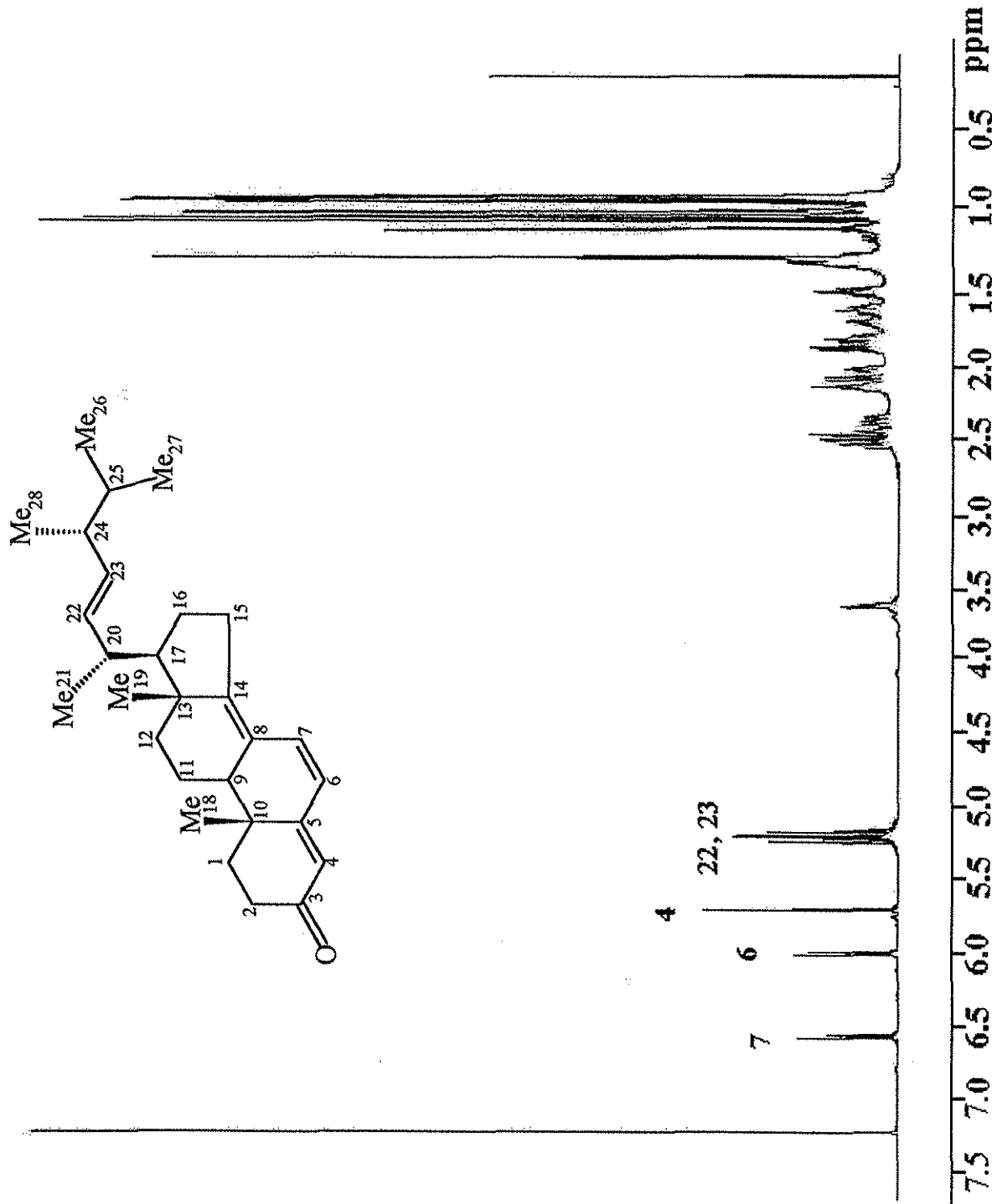
Posición	δ_H (ppm) y Multiplicidad (43)	δ_H (ppm) y Multiplicidad (81)	δ_H (ppm) y Multiplicidad (82)
1	1.29,2.01 (<i>m</i>)	1.27, 2.0 (<i>m</i>)	1.23-1.94 (<i>m</i>)
2	1.79, 1.98	1.46, 1.86 (<i>m</i>)	1.44, 1.84 (<i>m</i>)
3	----	3.68 (<i>m</i>)	3.60 (<i>m</i>)
4	5.7 (<i>s</i>)	1.37, 1.8 (<i>m</i>)	1.32, 1.8 (<i>m</i>)
5	----	1.92(<i>m</i>)	----
6	6.03 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.5 Hz)	5.23 (<i>m</i>)	5.37 (<i>m</i>)
7	6.6 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.5 Hz)	6.13 (<i>m</i>)	5.58 (<i>m</i>)
9	2.1	2.03 (<i>m</i>)	2.0 (<i>m</i>)
11	1.59, 1.70 (<i>m</i>)	1.60,1.65 (<i>m</i>)	1.5, 1.75 (<i>m</i>)
12	2.44, 2.53 (<i>m</i>)	1.14, 1.68 (<i>m</i>)	1.25, 1.62 (<i>m</i>)
15	2.38, 2.45 (<i>m</i>)	2.26, 2.35 (<i>m</i>)	2.20, 2.32 (<i>m</i>)
16	1.50, 1.80 (<i>m</i>)	1.42, 1.74 (<i>m</i>)	1.40,1.75 (<i>m</i>)
17	1.31 (<i>m</i>)	1.20 (<i>m</i>)	1.25 (<i>m</i>)
18	0.94 (<i>s</i>)	0.64 (<i>s</i>)	0.60 (<i>s</i>)
19	0.96 (<i>s</i>)	0.90 (<i>s</i>)	0.95 (<i>s</i>)
20	2.16 (<i>m</i>)	2.10 (<i>m</i>)	2.10 (<i>m</i>)
21	1.05 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.0 Hz)	1.03 (<i>d</i>)	1.04 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.6 Hz)
22	5.26 (<i>m</i>)	5.27 (<i>m</i>)	5.20 (<i>m</i>)
23	5.21(<i>m</i>)	5.21 (<i>dd</i>)	5.20 (<i>m</i>)
24	1.88 (<i>m</i>)	1.83 (<i>m</i>)	1.80 (<i>m</i>)
25	1.48 (<i>m</i>)	1.47 (<i>m</i>)	1.47(<i>m</i>)
26	0.83 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.5 Hz)	0.82 (<i>d</i> <i>J</i> =5.09 Hz)	0.82 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.7 Hz)
27	0.84 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.5 Hz)	0.87 (<i>d</i> <i>J</i> =5.09 Hz)	0.84 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.7 Hz)
28	0.93 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.0 Hz)	0.92 (<i>d</i> <i>J</i> =5.09 Hz)	0.92 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.9 Hz)

Cuadro 21. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de la ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona (43), del ergosta -6, 8 (14), 22- trien-3-ol (81) y del ergosterol (82).

Posición	δ_c (ppm) (43)	δ_c (ppm) (81)	δ_c (ppm) (82)
1	35.60	36.56	39.07
2	34.20	31.50	38.35
3	199.50	71.40	70.45
4	122.70	36.61	70.43
5	134.10	48.10	135.55
6	134.10	129.40	131.96
7	124.50	125.70	116.27
8	156.0	147.40	139.77
9	44.30	44.77	54.54
10	36.80	35.70	40.39
11	18.90	19.70	17.58
12	34.20	35.10	38.34
13	44.0	43.50	46.23
14	164.50	125.20	141.33
15	25.40	24.70	28.26
16	27.70	27.90	31.97
17	55.70	55.56	55.72
18	19.0	11.30	19.62
19	16.6	19.40	12.02
20	39.30	39.50	40.77
21	21.20	21.17	22.97
22	135.0	135.40	135.35
23	132.6	132.10	119.57
24	43.0	42.80	42.80
25	33.10	33.10	33.06
26	20.0	19.90	21.08
27	19.70	19.70	19.92
28	17.60	17.70	16.25

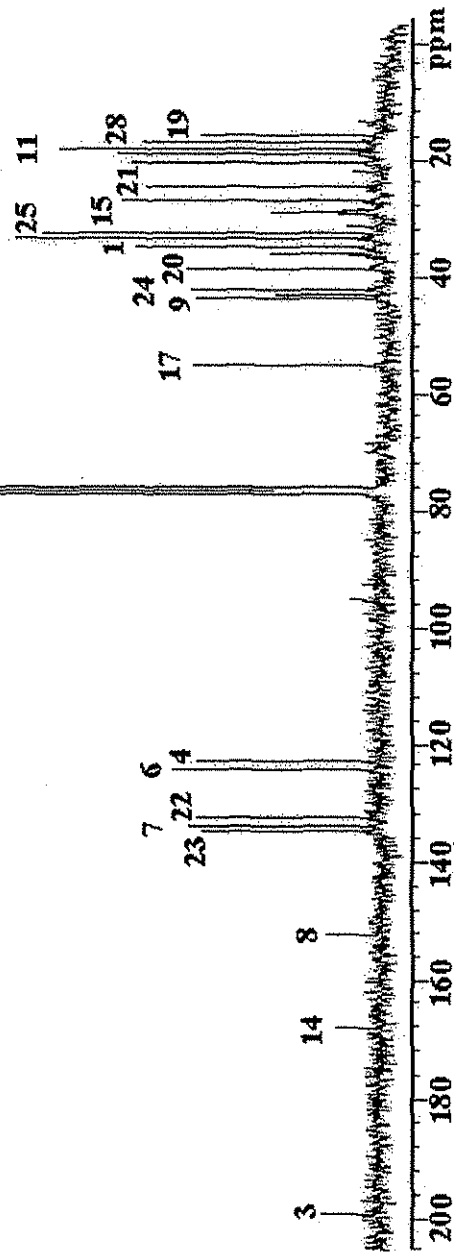
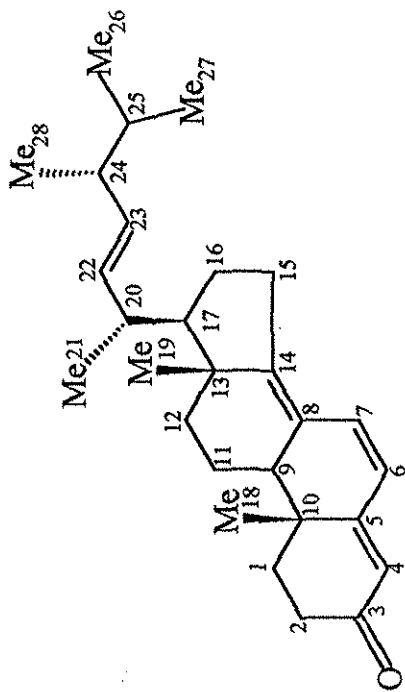
Cuadro 22. Desplazamientos químicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (**33**).

Posición	δ_H (ppm) y Multiplicidad (33)	δ_C (ppm) (33)
1	-----	-----
2	4.58 (<i>dqd</i> , $J=11.0, 6.25, 3.5$ Hz)	73.2
3	2.73a (<i>dd</i> , $J=17.0, 3.5$ Hz)	43.9
4	2.81b (<i>dd</i> , $J=17.0, 11.0$ Hz)	197.6
4a	-----	103.1
5	-----	165.3
5a	-----	107.4
6	-----	161.5
7	6.30 (<i>d</i> , $J=2.5$ Hz)	96.6
8	-----	162.5
9	6.45 (<i>d</i> , $J=2.5$ Hz)	98.5
9a	-----	143.5
10	6.52 (<i>s</i>)	101.4
10a	-----	156.2
2-Me	1.51 (<i>d</i> , $J=6.5$ Hz)	21.2
6-OMe	3.97 (<i>s</i>)	56.1
8-OMe	3.89 (<i>s</i>)	55.4
5-OH	14.46 (<i>s</i>)	-----



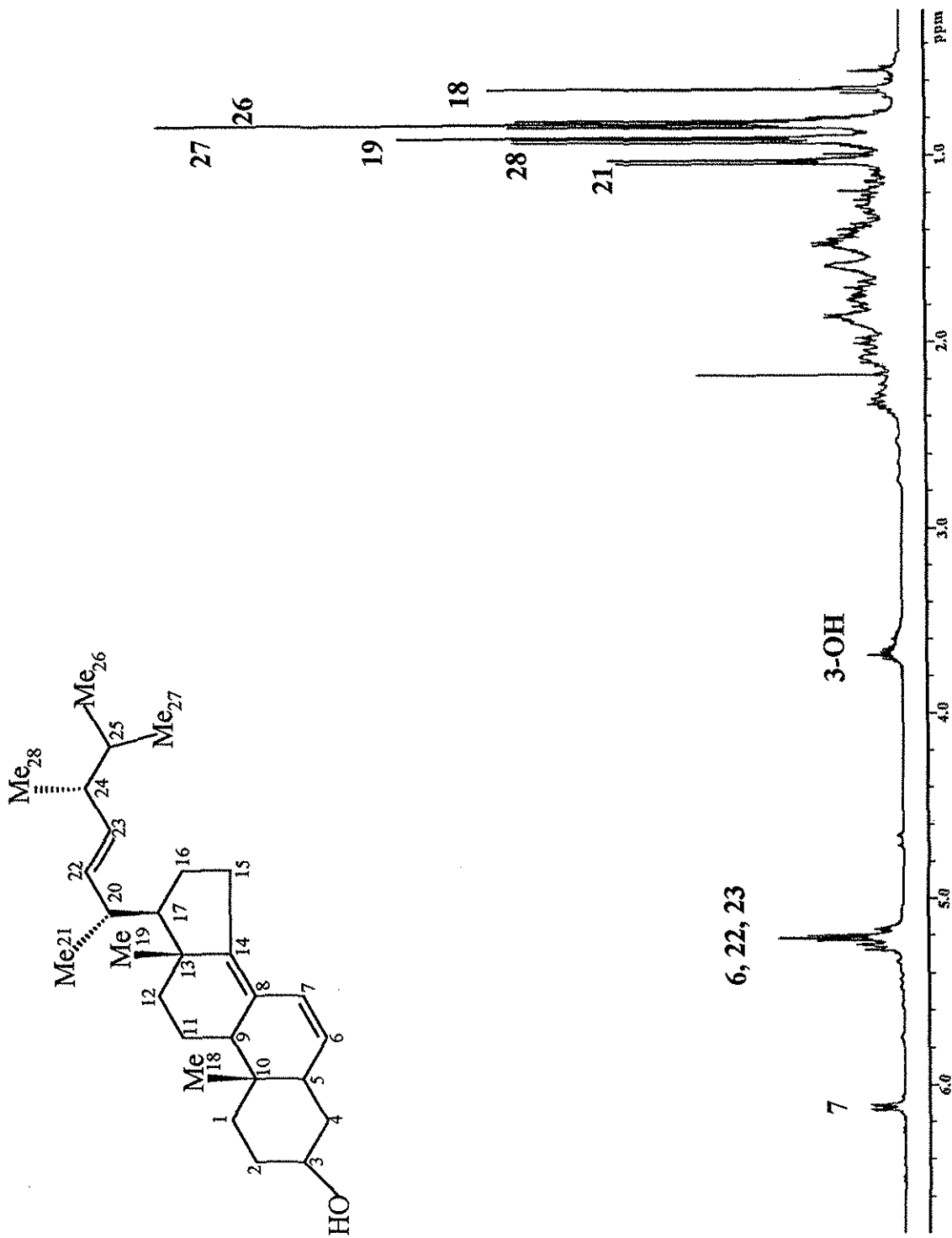
Espectro 3. Espectro de RMN-¹H de la Ergosta-4,6,8(14), 22-tetraen-3-ona (43)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



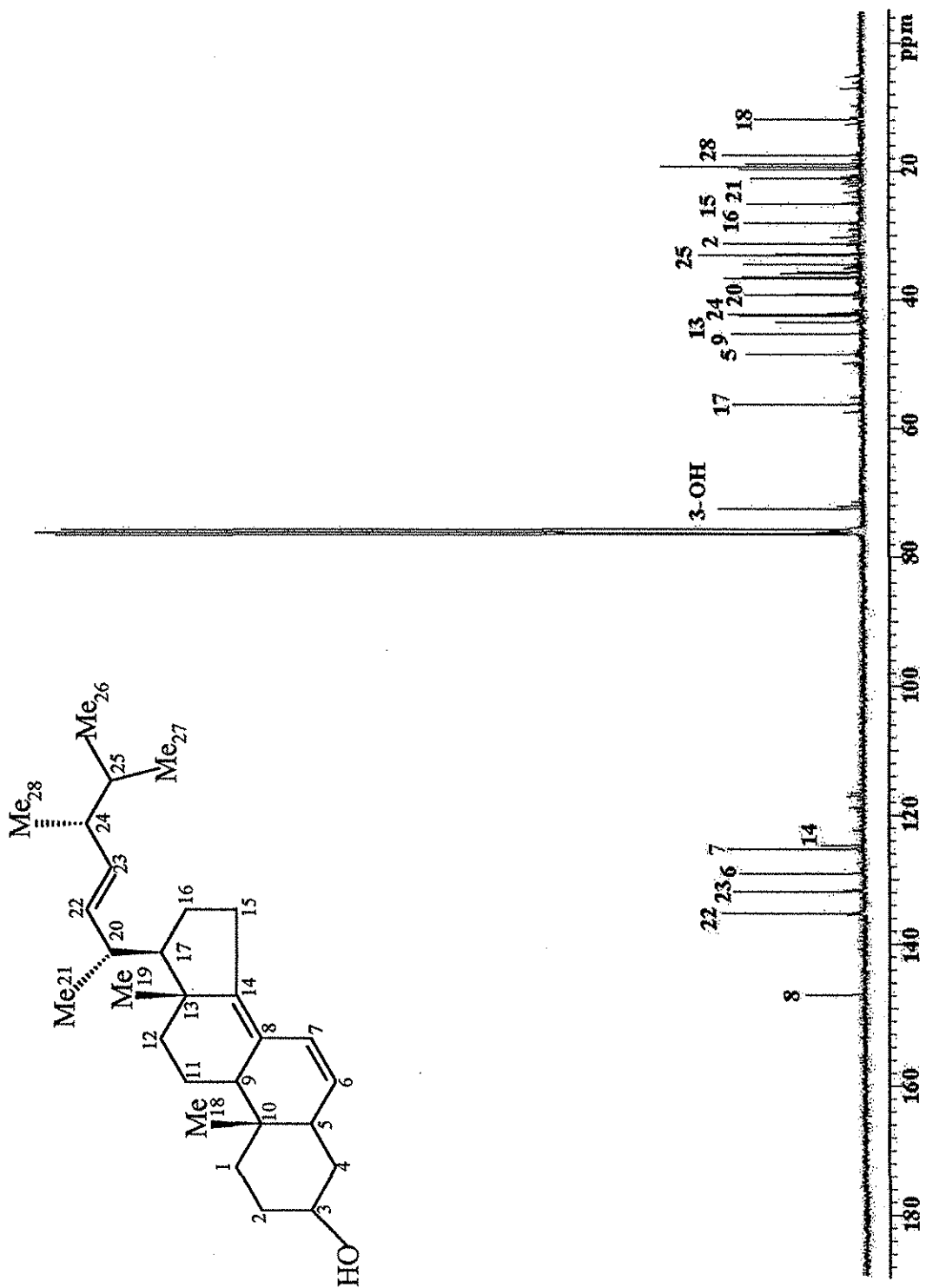
Espectro 4. Espectro de RMN-¹³C de la Ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona (43).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



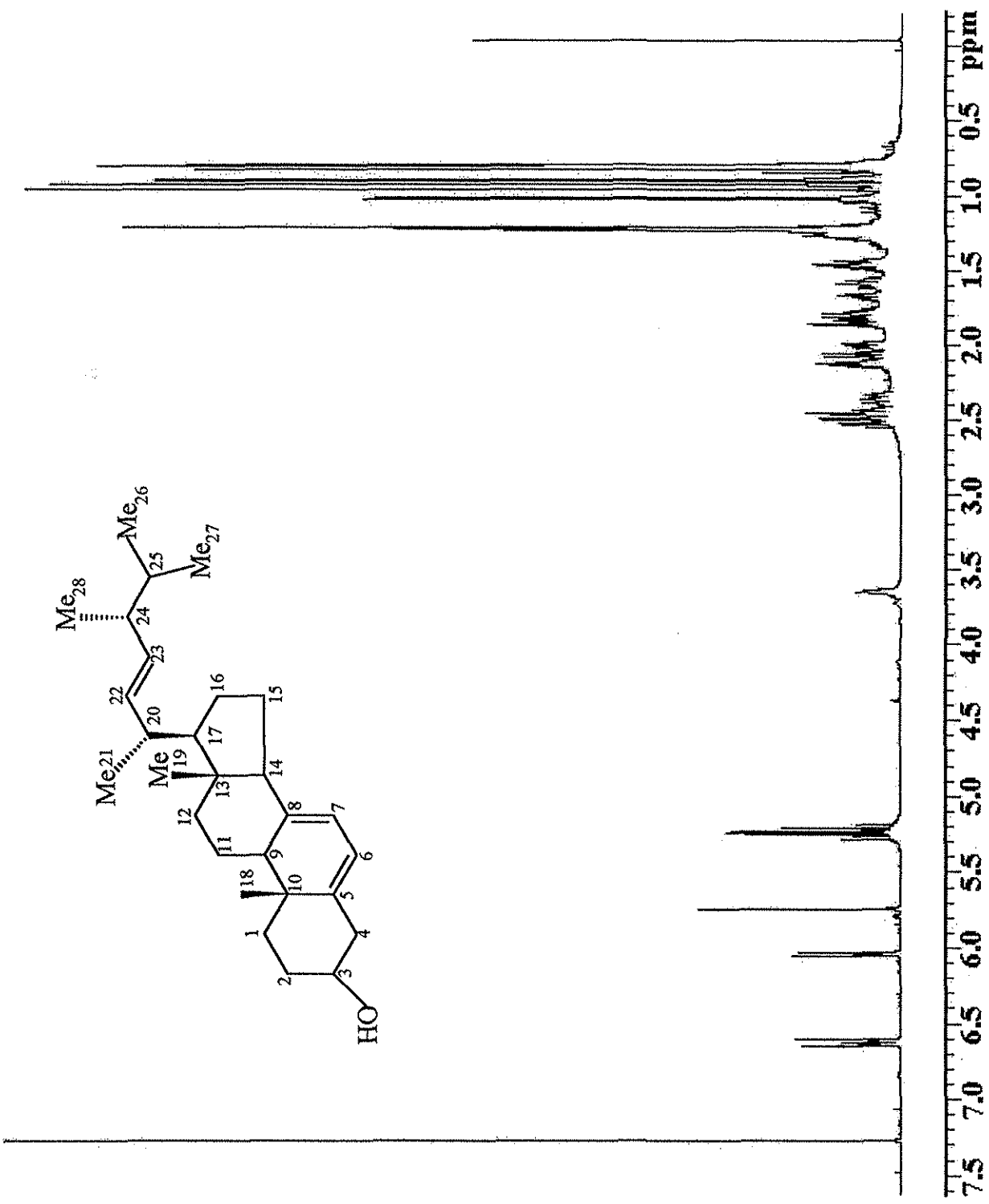
Espectro 5. Espectro de RMN-¹H del Ergosta -6, 8 (14), 22- trien-3-ol (81).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



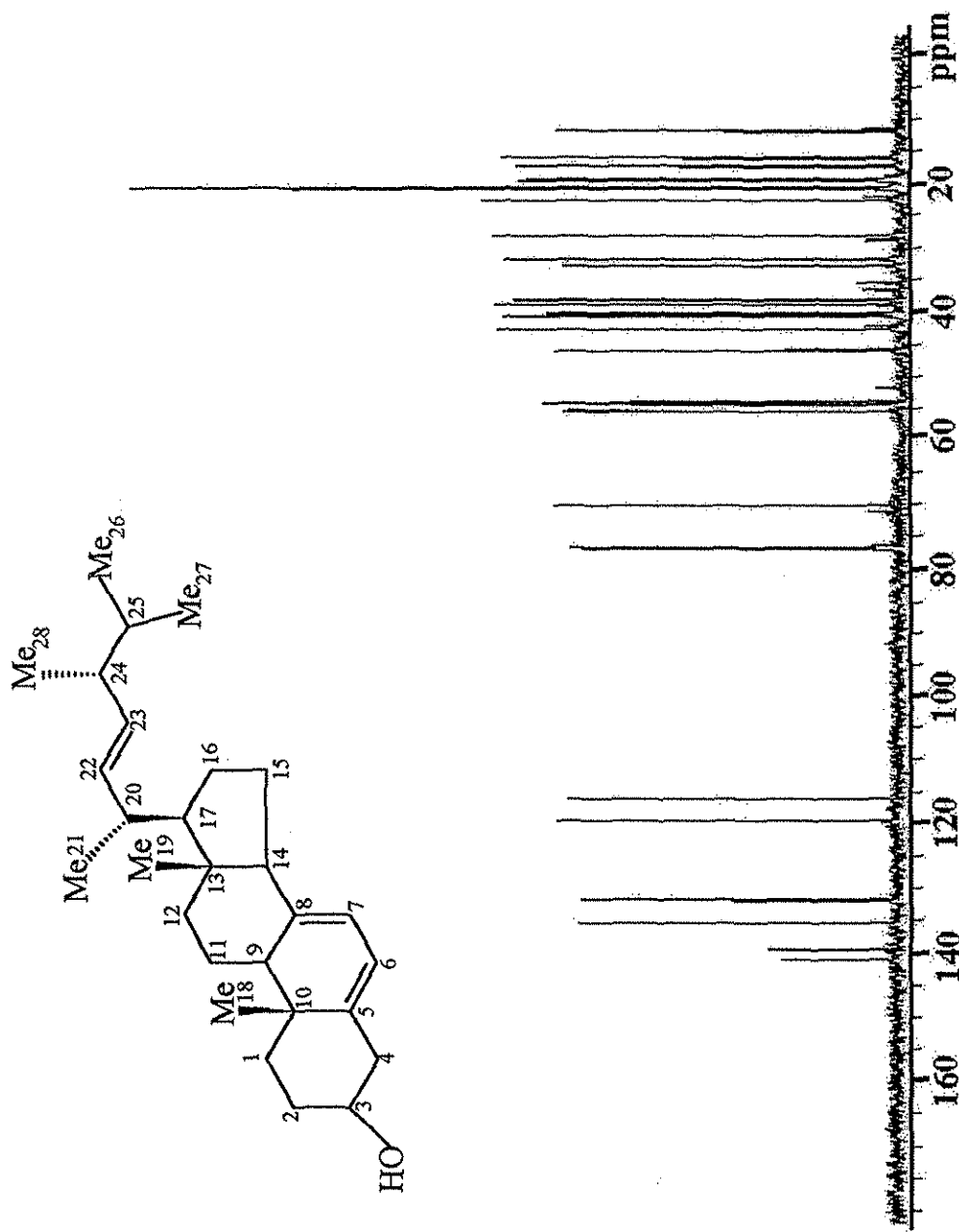
Espectro 6. Espectro de RMN-¹³C del Ergosta -6, 8 (14), 22- trien-3-ol (81).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



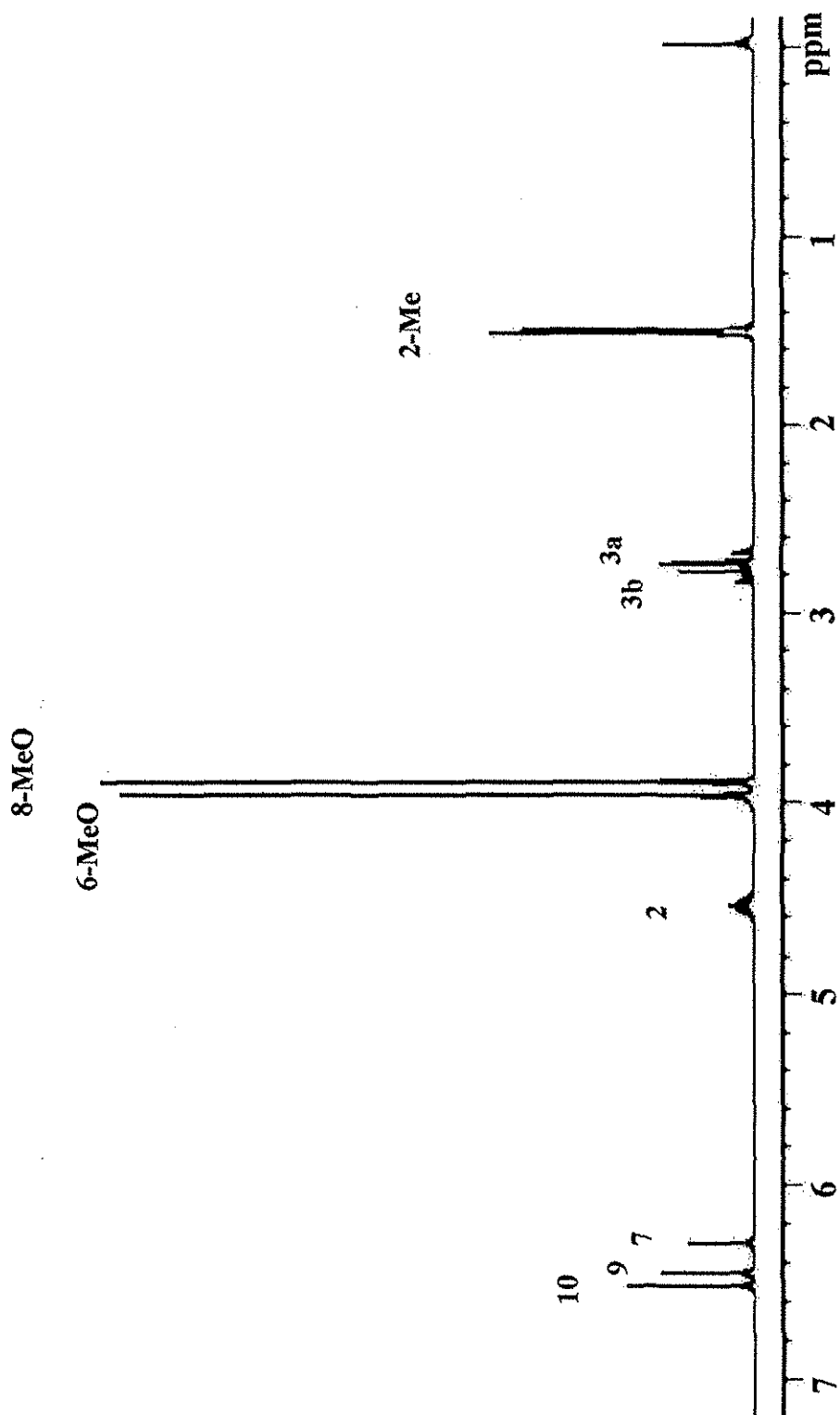
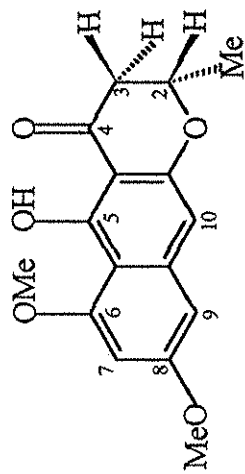
Espectro 7. Espectro de RMN-1H del Ergosterol (82).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

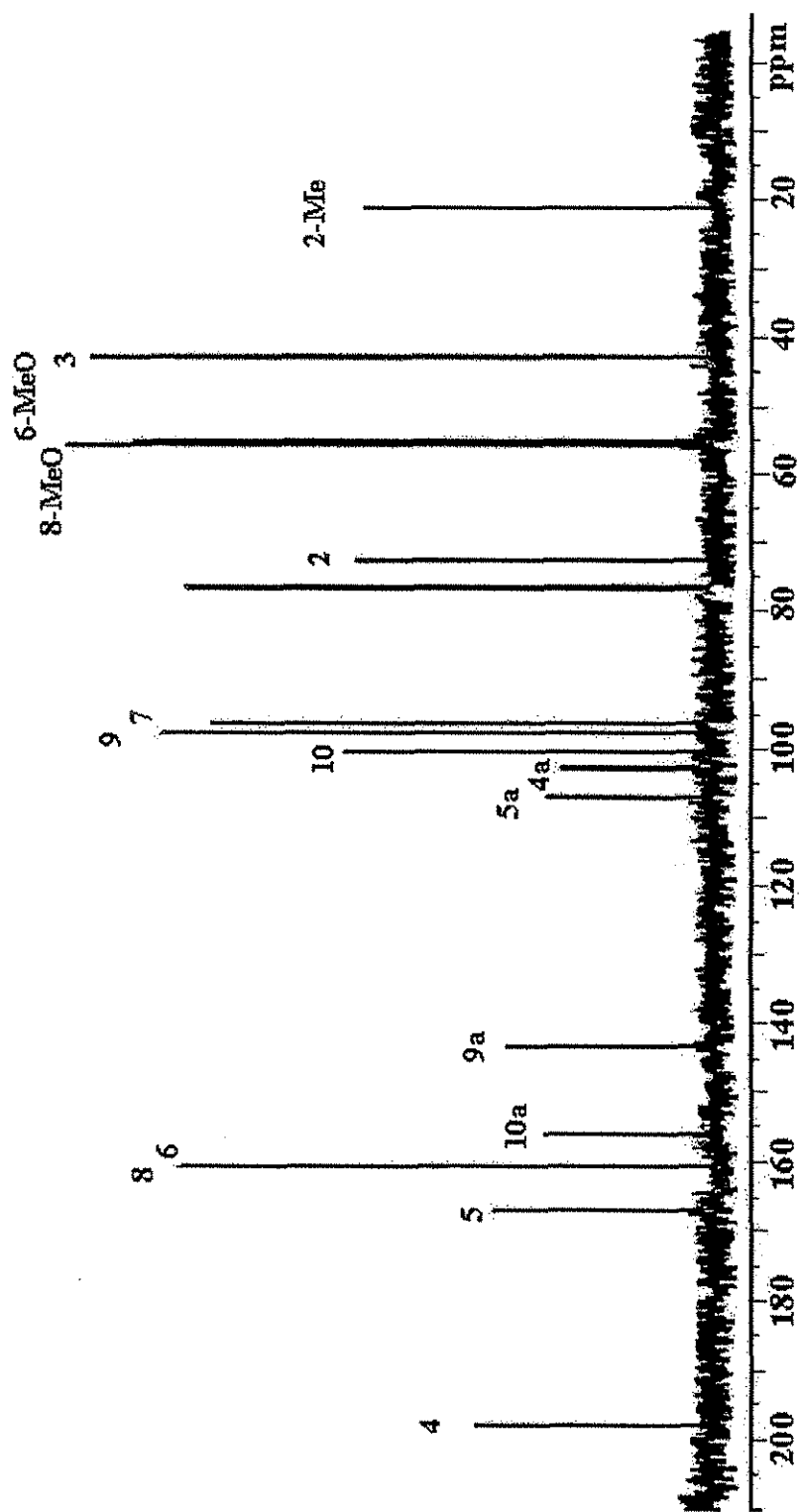
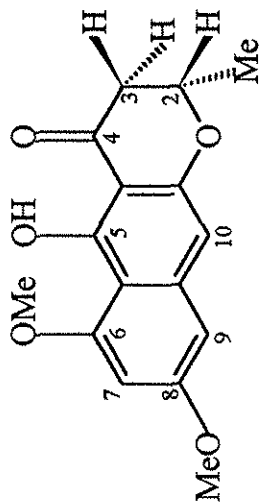


Espectro 8. Espectro de RMN-¹³C del Ergosterol (82).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 9. Espectro de RMN- ^{13}C de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (33).



Espectro 10. Espectro de RMN-¹³C de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6, 8-dimetoxi-2-metil-2, 3-dihidronaftopirona (33).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN