



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Malbranqueamida C, un nuevo alcaloide de
Malbranchea aurantiaca Sigler & Carmichel

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ABRAHAM MADARIAGA MAZÓN



MÉXICO, D.F.

2008



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: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag

Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz

1er suplente: M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

2do suplente: M. en C. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

Asesor:

Dra. Rachel Mata Essayag

Supervisor Técnico:

M. en C. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sustentante:

Abraham Madariaga Mazón

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, que a través de sus profesores y compañeros, me formaron un criterio ético y profesional.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por las valiosas enseñanzas y experiencia que recibí en todo momento y por todo el apoyo otorgado a lo largo del proyecto. Gracias.

Al CONACyT (Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología), por el financiamiento otorgado a través del proyecto CONACyT-45814-Q.

Al SNI (Sistema Nacional de Investigadores), por el apoyo económico otorgado para la realización de esta tesis de licenciatura.

Al M. en C. Mario Alberto Figueroa Saldívar, por su guía y conducción en el desarrollo del presente trabajo, por su paciencia y experiencias compartidas.

A la M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz, por su valioso apoyo en todo momento, tanto técnico como personal, y por el interés prestado en la realización del proyecto.

Al personal técnico de la USAI, por el registro de los espectros utilizados en el presente trabajo.

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

A mis compañeros del Laboratorio 124, Araceli, Paquito, Sol, Martha, Magda, Viridiana, Karina, Lupita, Fernando y Pepe, que gracias a la convivencia diaria, su amistad brindada, y todos los momentos que hemos pasado, mi estancia en el laboratorio se hizo muy agradable y placentera.

A mis compañeros de la Facultad, Ileana, Pedro, Graciela, Dulce, Dorys, gracias por todo su apoyo, consejos, pláticas, enseñanzas y convivencia. Su valiosa amistad fue parte fundamental en el vaivén de la vida académica en la facultad.

*A Dios, por darme la oportunidad de culminar una de mis más grandes metas,
por permitirme compartirla con mis seres queridos.*

*Gracias papá y mamá, por el apoyo incondicional brindado en todo momento de mi vida,
académica y personal. Gracias por siempre confiar en mí, por enseñarme a luchar por lo
que quiero, a no rendirme tan fácil y seguir adelante. Gracias por la comprensión, por
acompañarme en las desveladas y momentos difíciles, por compartir mis logros y,
sobre todo, por todo su amor.*

*A mis hermanos, Luis y Yael, que han estado conmigo en cada momento,
que no dejan de ser parte fundamental en mi vida.
Gracias.*

ÍNDICE

	Página
Lista de Figuras	III
Lista de Cuadros y Tablas	IV
Lista de Esquemas	V
Lista de Abreviaturas	V
Apéndice de espectros	VII
1. ANTECEDENTES.	1
1.1 Microorganismos fúngicos como fuentes potenciales de agentes herbicidas.	1
1.2 Antecedentes del hongo <i>Malbranchea aurantiaca</i> .	4
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	12
3. PARTE EXPERIMENTAL.	14
3.1 Material fúngico.	14
3.2 Fermentación de <i>M. aurantiaca</i> en mediana escala en condiciones estáticas.	14
3.3 Procedimientos cromatográficos generales.	14
3.4 Registro de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	16
3.5 Preparación de los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo de <i>Malbranchea aurantiaca</i> .	16
3.6 Fraccionamiento del extracto orgánico de <i>Malbranchea aurantiaca</i> .	16
3.7 Separación y purificación de las malbranqueamidas I, B (II) y C (VII) a partir de la fracción FXIV mediante CLAR.	17
3.8 Ensayos biológicos.	19

ÍNDICE (continuación)

	Página
3.8.1 Determinación del efecto fitotóxico.	19
3.8.2 Efecto de la malbranqueamida C (VIII) sobre la actividad de la enzima PDE-1.	19
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	21
4.1 Establecimiento de las condiciones adecuadas para lograr una mayor producción de los metabolitos minoritarios presentes en la especie <i>Malbranchea aurantiaca</i> .	21
4.2 Cultivo en agitación de <i>Malbranchea aurantiaca</i> en mediana escala.	22
4.3 Separación de los análogos de la malbranqueamida.	23
4.4 Caracterización de la malbranqueamida C (VIII).	27
4.5 Evaluación de la fitotoxicidad del compuesto VIII.	34
4.6 Evaluación de las propiedades inhibitorias del compuesto VIII sobre la proteína CaM.	34
5 RESUMEN Y CONCLUSIONES.	37
6 BIBLIOGRAFÍA.	38
Apéndice de Espectros.	43

Lista de Figuras.

Figura		Página
1	Compuestos fitotóxicos selectos de origen microbiano.	3
2	<i>Malbranchea aurantiaca</i> Sigler & Carmichel.	7
3	Estructura del compuesto VIII .	18
4	Cromatograma de los extractos orgánicos obtenidos del micelio y medio de fermentación de la especie <i>M. aurantiaca</i> observada bajo luz UV ^a (254nm) y revelada con el reactivo Dragendorff ^b . Sistema de elución CH ₂ Cl ₂ :MeOH (97:3). 1) Estático, 2) agitación, y 3) referencia.	22
5	Cromatograma de la fracción FXIV obtenida a partir del extracto orgánico de <i>M. aurantiaca</i> vista bajo luz UV ^a (254nm) y revelada con reactivo de Dragendorff ^b . Sistema de elución CH ₂ Cl ₂ :MeOH (97:3). R) Malbranqueamida (I).	23
6	Cromatograma de la fracción primaria FXIV. Condiciones cromatográficas: detector UV (235 nm); sistema de elución: ACN; flujo: 2.0 mL/min; concentración: 4 mg/mL; pico uno (Rt: 5.2 min); pico dos (Rt: 6.2 min).	25
7	Cromatograma de la fracción secundaria, obtenida a partir de la fracción FXIV. Condiciones cromatográficas: detector UV (235 nm); sistema de elución: MeOH; flujo: 3.5 mL/min; concentración: 5 mg/mL; compuesto II (Rt: 4.9 min); compuesto VIII (Rt: 5.3 min).	26
8	Estructura de la malbranqueamida C (VIII).	27
9	Espectro de ¹³ C-RMN del compuesto VIII .	30
10	Espectro de ¹ H-RMN del compuesto VIII .	32
11	Efecto de diferentes concentraciones del compuesto VIII sobre la actividad del complejo Ca ²⁺ -CaM-PDE1.	36

Lista de Cuadros y Tablas

Cuadro		Página
1	Compuestos aislados y caracterizados de diferentes especies de <i>Malbranchea</i> .	5
2	Estructuras de metabolitos aislados de la especie <i>Malbranchea aurantiaca</i> .	8
3	Estructuras de algunos de los compuestos que comparten similitud estructural con las malbranqueamidas	10
4	Composición del medio de cultivo líquido empleado para el crecimiento de la especie <i>M. aurantiaca</i> .	14
5	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos.	15
6	Resumen del fraccionamiento primario derivado del extracto orgánico de <i>M. aurantiaca</i> . obtenido mediante CCA.	18
Tabla		
1	Rendimientos de los diferentes extractos obtenidos de la fermentación en mediana escala de <i>Malbranchea aurantiaca</i> .	23
2	Condiciones cromatográficas analíticas en las que se obtiene la mejor resolución de los componentes de la FXIV.	24
3	Condiciones cromatográficas analíticas para la separación de la subfracción correspondiente al pico uno de la fracción FXIV.	26
4	Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto VIII .	28
5	Datos de ¹³ C-RMN (MeOD, 100 MHz) de I , II y VIII .	29
6	Datos de ¹ H-RMN (MeOD, 400 MHz) de I , II y VIII .	31
7	Efecto de los compuestos I y VIII sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> .	34
8	Efecto de los compuestos I , II , VIII y la CHL sobre la actividad del complejo Ca ²⁺ -CaM-PDE1.	35

Lista de Esquemas

Esquema		Página
1	Fraccionamiento primario del cultivo de <i>M. aurantiaca</i> .	17

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
AMPc	Adenosin Monofosfato cíclico
BSA	Albúmina Sérica de Bovino
FAB	Bombardeo Rápido de Átomos
KBr	Bromuro de potasio
PDA	Agar Papa-Dextrosa
PDB	Caldo Papa-Dextrosa
CaM	Calmodulina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHL	Clorpromazina
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>K_i</i>	Constante de inhibición
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano

Lista de Abreviaturas (continuación)

Abreviatura	Significado
dd	Doble de dobles
d	Doblete
eV	Electronvolts
PDE1	Enzima fosfodiesterasa del AMP cíclico
EE	Error Estándar
EM	Espectrometría de Masas
g	Gramos
Hz	Hertz
Hex	Hexano
IR	Infrarrojo
M ⁺	Ion Molecular
L	Litros
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
µm	Micrómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
m	Multiplete
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
ppm	Partes Por Millón
p.f.	Punto de Fusión

Lista de Abreviaturas (continuación)

Abreviatura	Significado
^{13}C -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
m/z	Relación masa-carga
^1H -RMN	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
s	singulete
T_R	Tiempo de retención
TMS	Trimetilsilano
UV	Ultravioleta
uma	Unidades de Masa Atómica

Apéndice de Espectros

Espectro		Página
1	Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto I.	44
2	Espectro de ^1H -RMN del compuesto I.	45
3	Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto II.	46
4	Espectro de ^1H -RMN del compuesto II.	47

1. ANTECEDENTES

1.1 Microorganismos fúngicos como fuentes potenciales de agentes herbicidas de origen natural.

El principal medio de control de malezas en las prácticas agrícolas del mundo moderno consiste en la aplicación de agentes herbicidas, que si bien es cierto que son eficaces, suelen ocasionar severos problemas de contaminación ambiental. De tal manera que el uso de muchos de estos productos está sujeto a ciertas restricciones o se ha prohibido del todo. Los problemas ocasionados por los herbicidas sintéticos han promovido una intensa búsqueda de herbicidas de origen natural, los cuales tienen ciertas ventajas sobre los primeros ya que pueden ser menos tóxicos para el hombre y animales, sus índices de acumulación son menores ya que son biodegradables y sus mecanismos de acción son generalmente específicos (Duke *et al.*, 2000).

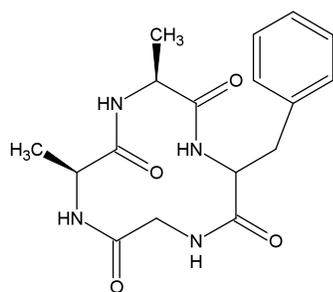
En la actualidad, la industria agroquímica ha demostrado gran interés en la exploración de materias primas de origen vegetal y microbiano para el descubrimiento de nuevos productos útiles para el desarrollo de agentes herbicidas más eficaces y potentes. Esta búsqueda se ha concentrado principalmente en compuestos fitotóxicos de origen microbiano, prestando especial atención a aquellos provenientes de microorganismos no patógenos aislados en diferentes ecosistemas (Duke *et al.*, 2001 y 2002).

Muchos compuestos derivados de hongos presentan una gran eficacia para el control de las plantas nocivas. Además, estos productos presentan una gran diversidad estructural y los mecanismos mediante los cuales ejercen su actividad biológica han resultado en ocasiones novedosos y específicos. Así, de varias especies fitopatógenas del género *Alternaria* se ha aislado **la tentoxina**, un tetrapéptido cíclico que inhibe el proceso de fotosíntesis. De la especie *Alternaria alternata* se obtuvo **la toxina AAL** que interfiere con la síntesis de nucleótidos e inhibe la enzima ceramida sintasa. Es importante destacar que tanto la tentoxina como la toxina AAL (Figura 1) han sido objeto de numerosos estudios con la finalidad de lograr su comercialización (Duke *et al.*, 2005).

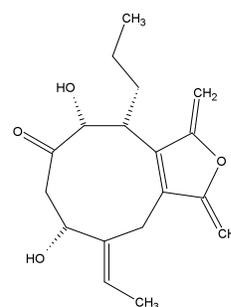
El hongo saprofito *Paecilomyces variotii* biosintetiza **la cornexistina** (Figura 1) cuyo modo de acción consiste en la inhibición de la enzima aspartato amino transferasa y es efectivo contra hierbas monocotiledóneas y dicotiledóneas que invaden los cultivos del maíz (Duke *et al.*, 2008). El sesterpeno **ofiobolina A** (Figura 1), aislado de varios hongos fitopatógenos de los géneros *Bipolares* y *Drechslera*, es un potente inhibidor de la proteína calmodulina (CaM) y, Evidente y colaboradores en 2006, demostraron que el producto tiene un gran potencial para el desarrollo de agentes herbicidas ya que provoca necrosis en distintas especies de malezas, aún a bajas concentraciones (Evidente *et al.*, 2006; Figura 1).

Finalmente, algunas investigaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo han permitido el aislamiento y caracterización de numerosos compuestos de origen fúngico (Figura 1). Los productos más notables obtenidos a través de estos estudios son las **naftopironas** de *Guanomyces polythrix* (Macías *et al.*, 2000 y 2001; Mata *et al.*, 2003), **las herbaruminas I-III**, policétidos del tipo de las nonenólidas aislados de *Phoma herbarum* (Rivero-Cruz *et al.*, 2000 y 2003); y por último, los alcaloides indólicos novedosos **malbrancheamida (I)** y **malbrancheamida B (II)** aislados de *Malbranchea aurantiaca*, un ascomiceto del guano de murciélago (Martínez-Luis *et al.*, 2006; Figueroa *et al.*, 2008). Estos compuestos tienen en común su efecto inhibitorio del complejo Ca²⁺-calmodulina-fosofodiesterasa del AMPc (PDE1), un blanco de acción a nivel molecular poco explorado en estudios afines .

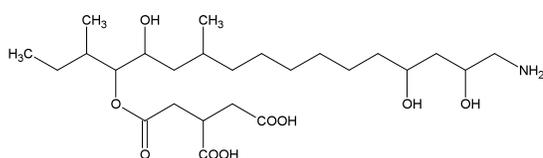
Para el descubrimiento de los compuestos fitotóxicos de microorganismos, en primer lugar, se seleccionan las materias primas, generalmente mediante un criterio ecológico con base en interacciones planta-microorganismo. Así, un gran número de microorganismos están involucrados en enfermedades de plantas o se encuentran asociados naturalmente a las mismas. Las fitototoxinas causantes de enfermedades (por ejemplo la tentoxina y la toxina AAL antes mencionadas) poseen efectos fitotóxicos no sólo sobre las plantas hospederas sino también sobre otras especies vegetales, incluyendo las plantas nocivas.



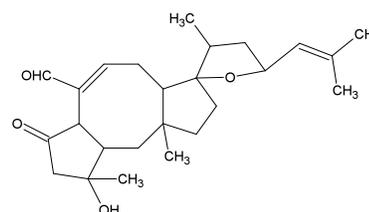
Tentoxina



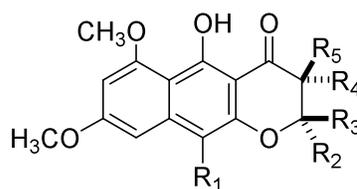
Cornexistina



Toxina AAL



Ofiobolina A

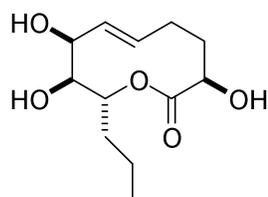


Naftopirona I $R_1=R_3=R_4=H, R_2=R_5=CH_3$

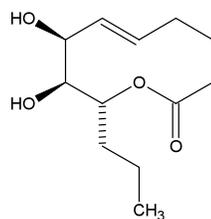
Naftopirona II $R_1=CH_3O, R_2=R_5=CH_3, R_3=R_4=H$

Naftopirona III $R_1=R_3=R_4=R_5=H, R_2=CH_3$

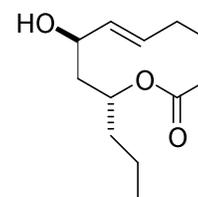
Naftopirona IV $R_1=CH_3O, R_2=CH_3, R_3=R_4=R_5=H$



Herbarumina I



Herbarumina II



Herbarumina III

Figura 1. Compuestos fitotóxicos selectos de origen microbiano.

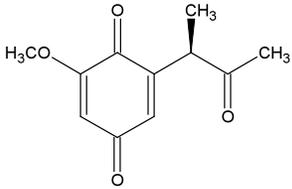
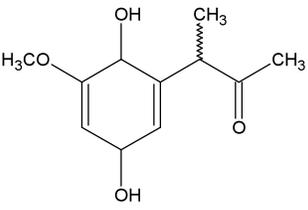
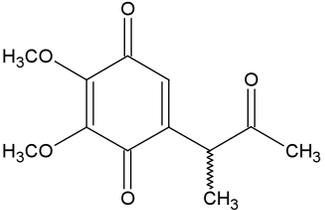
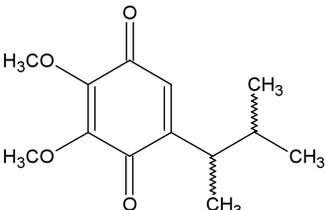
Es por esta razón que a los hongos fitopatógenos se les considera materias primas idóneas para el descubrimiento de nuevos agentes herbicidas. Los hongos endofíticos asociados a ciertas plantas con un potencial alelopático comprobado constituyen también fuentes importantes de herbicidas potenciales (Macías *et al.*, 2008).

A continuación se realizan pruebas biológicas de selección. Estas pruebas consisten en la determinación del efecto fitotóxico de los extractos derivados de las materias primas mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación, el crecimiento radicular, el crecimiento de plántulas y la producción de biomasa de diversas especies de prueba. En el caso específico de los organismos fúngicos, primero es necesario cultivarlos en pequeña escala para establecer las condiciones de fermentación más apropiadas para la producción de compuestos fitotóxicos, en seguida se preparan los extractos del medio de crecimiento y del micelio y se ensayan en las pruebas de fitoinhibición. Una vez que se detectan las especies activas, los microorganismos se fermentan en gran escala y sus extractos se estudian químicamente para aislar los principios activos, mismos que se identifican mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. Posteriormente, los productos identificados se someten a pruebas de tipo pre y post-emergente en diferentes especies vegetales, tanto cultivables como malezas. Por último, se realizan estudios conducentes a determinar su mecanismo de acción así como otros análisis que permitan la futura comercialización de los productos (Duke *et al.*, 2002).

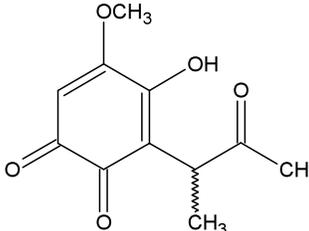
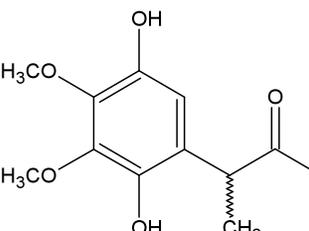
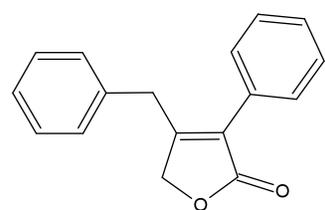
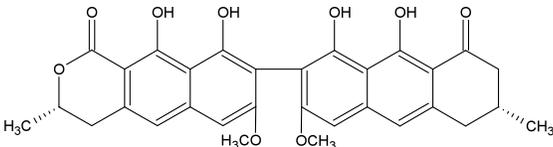
1.2 Antecedentes del hongo *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmichel.

Malbranchea aurantiaca (Gymnoascaceae; Figura 2) es un ascomiceto descrito taxonómicamente por Sigler y Carmichel en 1976. La especie se ha aislado del suelo o del excremento de animales en la India, Centro América, Australia, Estados Unidos de Norteamérica y Bélgica. Las cepas pueden ser moderadamente o marcadamente queratolíticas. A partir de otras especies del mismo género se han aislado benzoquinonas, hidroquinonas, benzofuranos y otros compuestos aromáticos. En el Cuadro 1 se presentan ejemplos de metabolitos biodinámicos aislados y caracterizados de *M. pullchella*, *M. cinnamomea* y *M. filamentosa*.

Cuadro 1. Compuestos aislados y caracterizados de diferentes especies de *Malbranchea*.

Especie	Compuesto	Actividad biológica
<i>M. cinnamomea</i>	 <p>Malbranicina (Chiung <i>et al.</i>, 1993)</p>	Antibiótico efectivo contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>
	 <p>Dihidromalbranicina (Schlegel <i>et al.</i>, 2003)</p>	Antioxidante
	 <p>7-Metoximalbranicina I (Schlegel <i>et al.</i>, 2003)</p>	Inhibe la síntesis del gen de transcripción viral HTLV-1
	 <p>7-Metoximalbranicina II (Schlegel <i>et al.</i>, 2003)</p>	Antioxidante

Cuadro 1. Compuestos aislados y caracterizados de diferentes especies de *Malbranchea* (continuación).

Especie	Compuesto	Actividad Biológica
<i>M. cinnamomea</i>	 <p>7-Metoximalbranicina III (Schlegel <i>et al.</i>, 2003)</p>	Antioxidante
	 <p>7-Metoximalbranicina IV (Schlegel <i>et al.</i>, 2003)</p>	Antioxidante
<i>M. filamentosa</i>	 <p>4-Benzil-3-fenil-5H-furan-2-ona (Hosoe <i>et al.</i>, 2005)</p>	Vasodilatador
<i>M. pulchella</i>	 <p>TF-26VX (Saito <i>et al.</i>, 1979)</p>	Antibacteriano (amplio espectro)

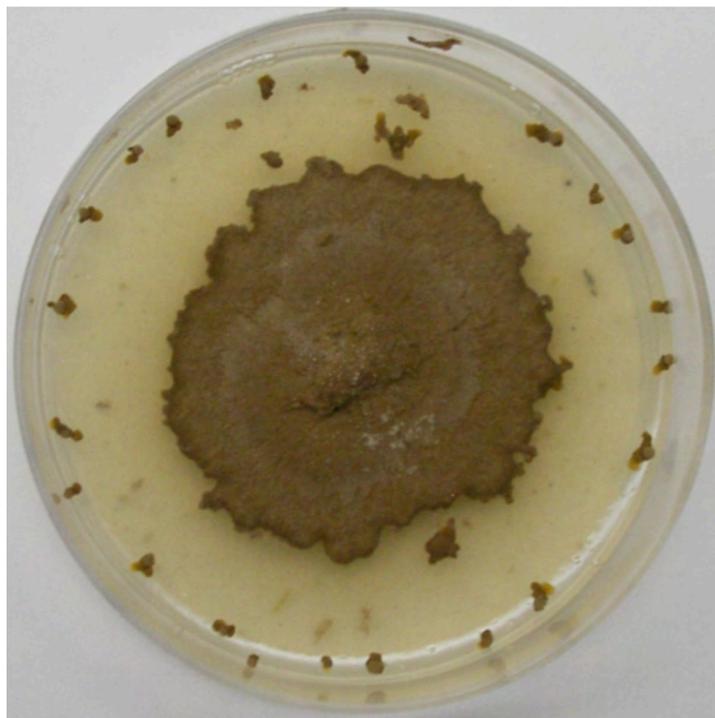
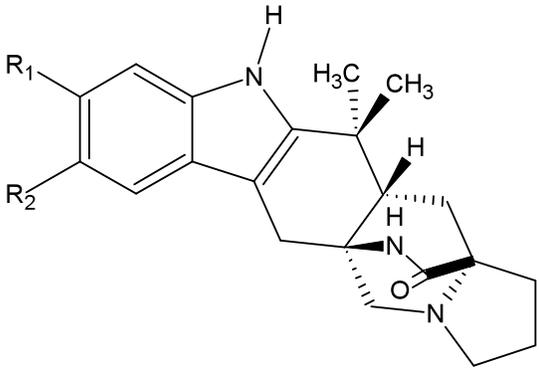
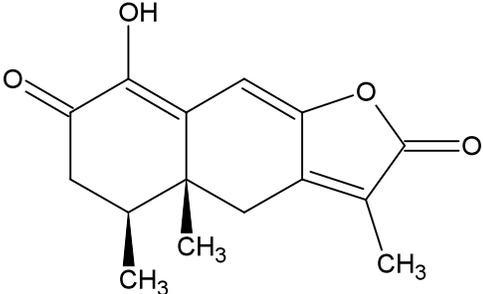
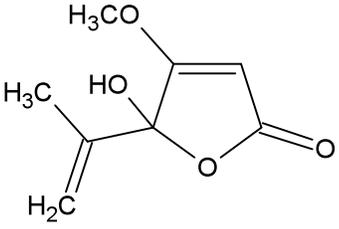
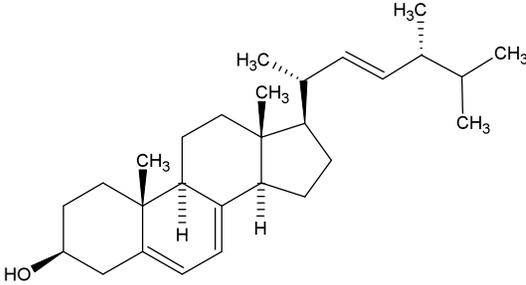
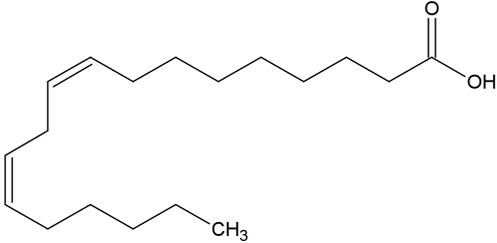
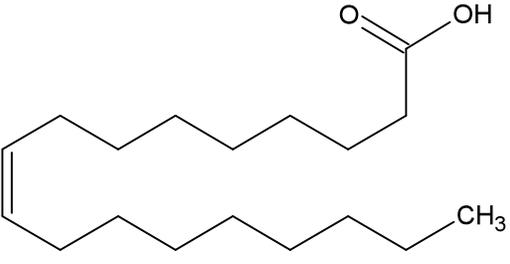


Figura 2. *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmichel.

Como parte de un programa dirigido a descubrir nuevos agentes fitotóxicos de origen fúngico, el hongo *M. aurantiaca* fue recientemente investigado por Martínez-Luis (2005 y 2006) y Figueroa *et al* (2008). En estos estudios, se aislaron siete metabolitos secundarios (Cuadro 1) caracterizados como el ácido penicílico (**IV**), el ergosterol (**V**), el ácido linoléico (**VI**), el ácido oléico (**VII**) y tres compuestos fitotóxicos novedosos caracterizados como 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olida (**III**), (5a*S*,12a*S*,13a*S*)-8,9-dicloro-12,12-dimetil-2,3,11,12,12a,13-hexahidro-1*H*,6*H*-5a,13a(epiminometano)indolizino[7,6b]carbazol-14-ona (**I**) y (5a*S*,12a*S*,13a*S*)-9-cloro-12,12-dimetil-2,3,11,12,12a,13-hexahidro-1*H*,6*H*,5a,13a(epiminometano)indolizino[7,6b]carbazol-14-ona (**II**), los dos últimos se designaron con los nombres triviales de **malbranqueamida I** y **malbranqueamida B** (**II**), respectivamente. La caracterización estructural del compuesto tipo eremofilano (**III**) se realizó por comparación con una muestra auténtica, mientras que la de los compuestos **I-IV** y **VI-VII** se realizó

mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. En el caso de los compuestos **II** y **III** las estructuras se corroboraron mediante un análisis de difracción de rayos X (Cuadro 1; Martínez-Luis *et al.*, 2005 y 2006; Figueroa *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Estructuras de metabolitos aislados de la especie *Malbranchea aurantiaca*

 <p style="text-align: center;"> <table border="0"> <tr> <td></td> <td>R₁</td> <td>R₂</td> </tr> <tr> <td>(I)</td> <td>Cl</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>(II)</td> <td>Cl</td> <td>H</td> </tr> </table> </p>		R₁	R₂	(I)	Cl	Cl	(II)	Cl	H	 <p style="text-align: center;">(III)</p>
	R₁	R₂								
(I)	Cl	Cl								
(II)	Cl	H								
 <p style="text-align: center;">Ác. penicílico (IV)</p>	 <p style="text-align: center;">Ergosterol (V)</p>									
 <p style="text-align: center;">Ác. linoléico (VI)</p>	 <p style="text-align: center;">Ác. oléico (VII)</p>									

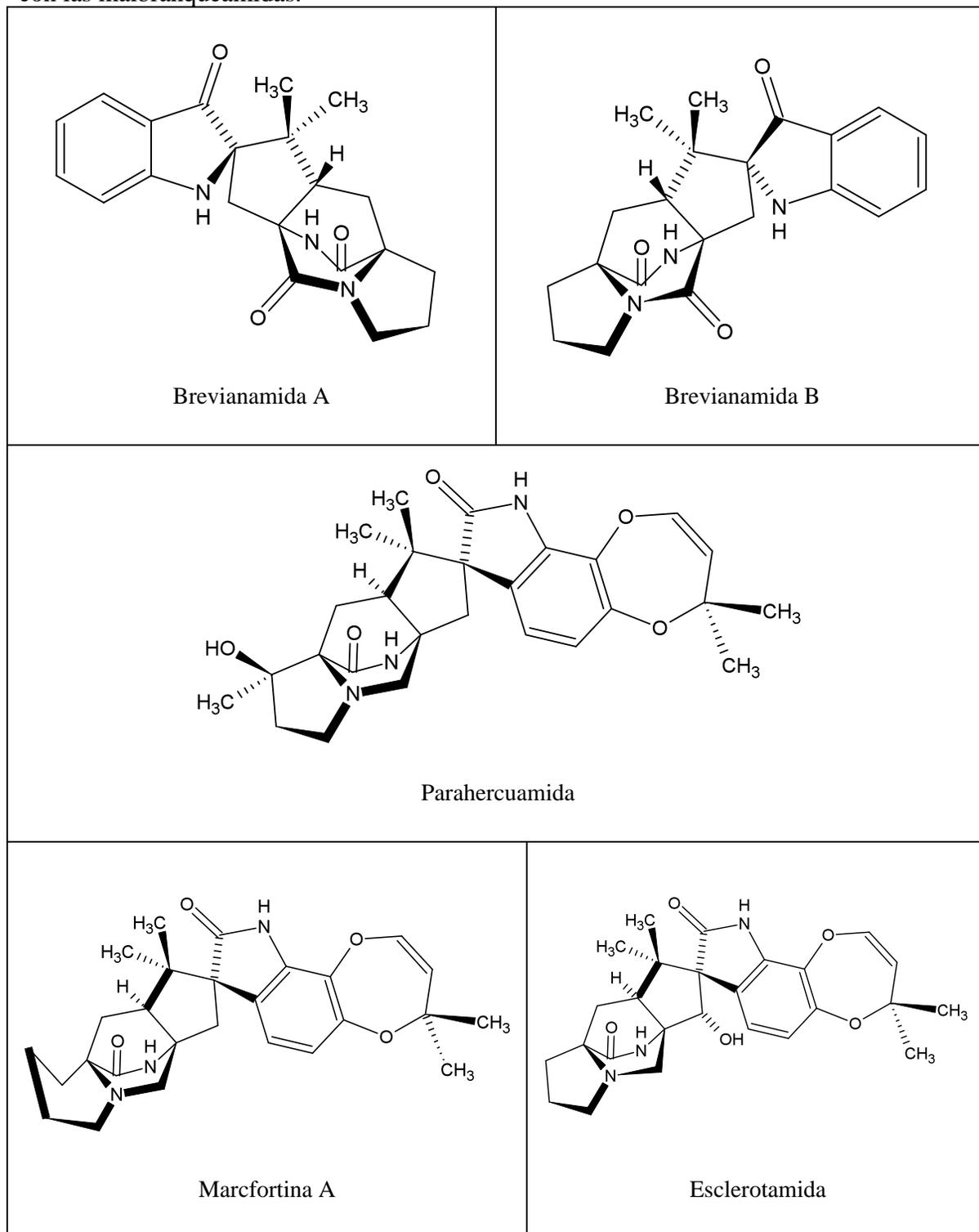
Los alcaloides **I** y **II** de *M. aurantiaca* pertenecen a un tipo raro de alcaloides indólicos que poseen una unidad estructural de tipo biciclo [2.2.2] diazaoctano al igual que las brevianamidas, aspergamidas, macfortinas, parahercuamidas, esclerotamidas y las estefacidinas (Sanz-Cervera *et al.*, 2000). En el Cuadro 3 se indican algunos ejemplos de estos alcaloides.

Estos productos naturales aislados periódicamente de diferentes cepas de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* desde su descubrimiento en 1969, se biosintetizan a partir de triptófano, prolina o lisina, y al menos una unidad isoprénica. Se ha propuesto que el biciclo [2.2.2] diazaoctano se forma por medio de una reacción intramolecular de Diels-Alder (Sanz-Cervera *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2008).

El efecto de los compuestos aislados de *M. aurantiaca* sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de la maleza *Amaranthus hypochondriacus* permitió establecer que los metabolitos **I**, **III** y **IV** presentan propiedades fitotóxicas significativas. De hecho, estos compuestos mostraron una potencia análoga a la del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Martínez-Luis *et al.*, 2005 y 2006).

Con la finalidad de obtener información acerca del posible mecanismo de acción se evaluó el efecto del compuesto **I** sobre la proteína CaM. Este efecto fue analizado mediante la utilización de un método enzimático funcional. En este ensayo la enzima monitora de la actividad de la CaM fue la PDE1. Mediante la aplicación de esta metodología se comprobó que el compuesto **I** inhibe la activación de la PDE1 en forma dependiente de la concentración. El valor de la CI_{50} calculada fue de 3.65 μ M, mostrando un efecto comparable al de la clorpromazina (CI_{50} = 2.75 μ M). Para obtener mayor información acerca del papel de la CaM en la inhibición del complejo Ca^{2+} - CaM-PDE1, se realizó un análisis cinético de la inhibición de la actividad de la PDE1 usando diferentes cantidades de CaM en la presencia de diferentes concentraciones de la fitotoxina **I**. El resultado de este experimento (K_i = 7.4 μ M) indicó que el metabolito **I** es un antagonista competitivo de la proteína, y actúa compitiendo con la formación del complejo activo Ca^{2+} -CaM-PDE1 (Martínez-Luis *et al.*, 2006).

Cuadro 3. Estructuras de algunos de los compuestos que comparten similitud estructural con las malbranqueamidas.



El efecto del compuesto **III** sobre la PDE1 fue similar al de la malbranqueamida (**I**). Este compuesto también inhibió la activación de la PDE1 ($CI_{50} = 10.2 \mu\text{M}$) y su efecto incluso fue mayor que el de la clorpromazina. (Martínez-Luis *et al.*, 2005 y 2006).

El efecto antibrasinoesteroide de la malbranqueamida (**I**) se determinó mediante la inhibición del crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* promovida por la brasinolida. Este efecto se comprobó utilizando el bioensayo del desenrollamiento de las hojas de trigo. El análisis cinético realizado en este ensayo demostró que el compuesto **I** inhibe de manera competitiva el efecto de los brasinoesteroides en las hojas de trigo (Martínez-Luis, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los problemas graves generados por el uso irracional de los herbicidas sintéticos han despertado un gran interés en la búsqueda de nuevos herbicidas de origen natural. Para ello, el reino fúngico constituye una fuente valiosa de principios fitotóxicos y por ende de moléculas modelo adecuadas para el desarrollo de nuevos herbicidas.

De manera general, los metabolitos secundarios se consideran un punto de partida valioso para el descubrimiento de nuevos agentes herbicidas potenciales, además de que han contribuido a la identificación y esclarecimiento de nuevos modos de acción, a menudo más específicos.

La gran diversidad fúngica de México constituye un escenario ideal para el descubrimiento de productos biodinámicos que podrían constituir la base de nuevos herbicidas. Por lo tanto, en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se ha desarrollado un programa multidisciplinario destinado a explorar el potencial fitotóxico de especies fúngicas selectas y así, contribuir al desarrollo de nuevos herbicidas. En el marco de este programa, se determinó que la especie *Malbranchea aurantiaca* constituye una fuente potencial de alcaloides y eremofilanos fitotóxicos. Estos productos inhibieron significativamente el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*; en particular la malbranqueamida resultó de singular interés ya que además del efecto fitotóxico mencionado, presentó un efecto antibrasinoesteroide importante similar al de 2,4-D.

Con base en lo antes expuesto, el objetivo primordial del presente trabajo consiste en la obtención de al menos un análogo minoritario de la malbranqueamida (I) y la malbranqueamida B (II) a partir del organismo fúngico *Malbranchea aurantiaca*, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos herbicidas biodegradables y con mecanismos de acción novedosos.

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Establecer cualitativamente si el cultivo en condiciones estáticas incrementa la producción de malbranqueamidas y sus análogos, en comparación a la fermentación en agitación.
- 2.- Obtener los alcaloides análogos a la malbranqueamida mediante la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución.
- 3.- Establecer la estructura molecular de los compuestos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales.
- 4.- Cuantificar el efecto fitotóxico de los productos naturales aislados mediante la determinación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* utilizando el método de la caja de Petri.
- 5.- Determinar el efecto de los metabolitos sobre la actividad de la enzima PDE1, con la finalidad de establecer si estos afectan las propiedades moduladoras de la CaM.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material fúngico.

Malbranchea aurantiaca Sigler & Carmichel se aisló de guano de murciélago recolectado en las Cuevas de Juxtlahuaca, localizadas en el Ramal del Infierno, Estado de Guerrero, en el año 2002. Una muestra de referencia (voucher: 24428) fue depositada en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

3.2 Fermentación de *M. aurantiaca* en mediana escala en condiciones estáticas.

La fermentación del hongo se realizó en un medio de cultivo caldo papa-dextrosa (PDB) comercial (18.5 L; Difco®), en condiciones estáticas y de luz-oscuridad normal durante 30 días. Cabe destacar que las condiciones se determinaron a través de un ensayo preliminar en pequeña escala (2 L). La composición del medio de cultivo se indica en el Cuadro 4. El inóculo consistió en un cubo de agar sólido conteniendo el microorganismo desarrollado con antelación por 15 días en cajas de Petri con agar papa-dextrosa (PDA).

Cuadro 4. Composición del medio de cultivo líquido empleado para el crecimiento de la especie *M. aurantiaca*.

Medio de cultivo	Composición
PDB (Difco ®)	(Fórmula indicada por el fabricante)
	Almidón de papa..... 4.0 g
	Dextrosa..... 20.0 g
	Agua destilada..... cbp 1 L

3.3 Procedimientos cromatográficos generales.

Para los análisis de cromatografía en capa delgada (CCD) se emplearon placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con gel de sílice de 0.25 mm de espesor (gel de sílice 60 F₂₅₄, Merck®). La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV a dos diferentes longitudes de onda (365 y 254 nm). Como agentes cromógenos se utilizaron una solución de sulfato cérico amoniacal en H₂SO₄ y reactivo Dragendorff (Cuadro 5).

Cuadro 5. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos.

Agente Revelador	Composición		Referencia
Sulfato cérico/H ₂ SO ₄	Sulfato cérico amoniacal	12.0 g	Stahl, 1969
	Ácido Sulfúrico	22.5 mL	
	Hielo	350 g	
Reactivo de Dragendorff	Nitrato de bismuto	8 g	Domínguez, 1979
	Ácido nítrico	20 mL	
	Yoduro de potasio	27.2 mL	
	Agua	80 mL	

Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron utilizando como fase estacionaria gel de sílice (gel de sílice 60 F₂₅₄, Merck®), y empleando diferentes sistemas de elución como eluyentes (Hex, CH₂Cl₂ y MeOH).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo marca Waters® (Millipore Corp., MA, USA), equipado con un detector de UV de dos canales (2487 Dual Absorbance Detector). El control del equipo, la adquisición de datos y el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower 2 (Waters® Software 2005). La separación y purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de gel de sílice C₁₈ Waters® Symmetry Prep (tamaño de partícula 7 µm, 7.8 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud) o una Phenomenex® Nucleosil (tamaño de partícula 5 µm, 10 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud). La detección se ajustó a 230 y 285 nm.

3.4 Registro de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

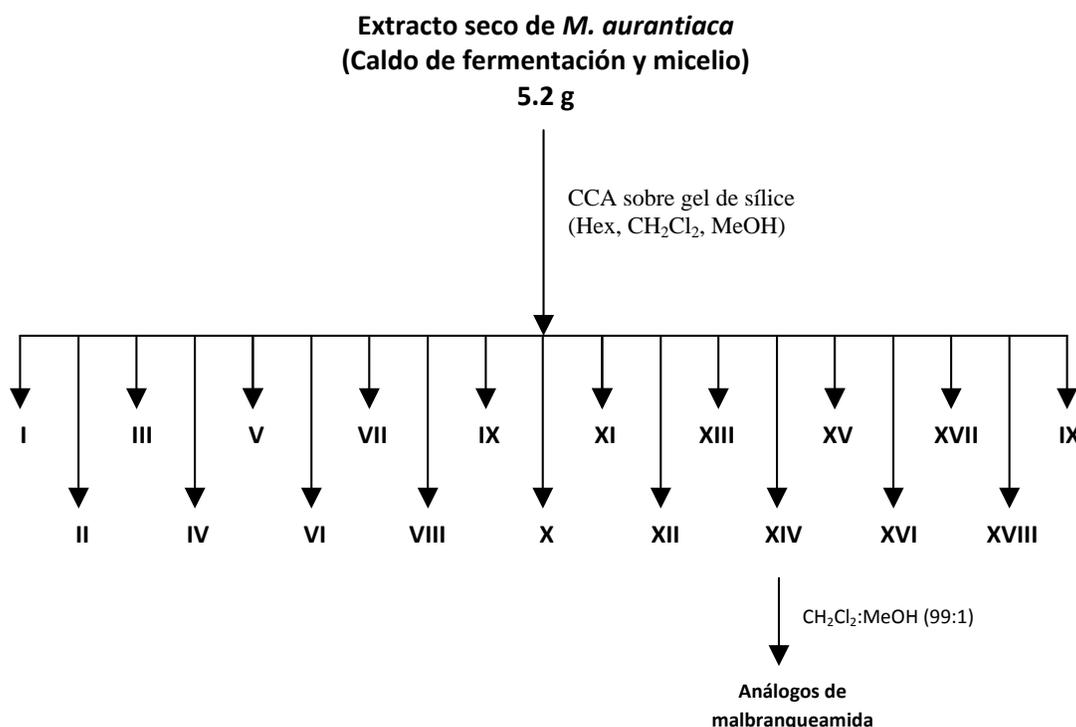
Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fischer-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros en el IR se obtuvieron en pastillas de KBr y se midieron en un espectrómetro Perkin Elmer 59913. Los espectros en el UV se registraron utilizando un espectrómetro Lambda II UV y se obtuvieron en MeOH. Los espectros de RMN se registraron en un espectrofotómetro Unity INOVA 400 a 400 MHz (^1H) o 100 MHz (^{13}C). Para el registro de los espectros de RMN se utilizó CDCl_3 o CD_3OD como disolventes y TMS como referencia interna. Los espectros de masas por FAB^+ se obtuvieron utilizando un espectrómetro JEOL SX 102 mediante inyección directa y con una energía de ionización de 70 eV.

3.5 Preparación de los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo de *Malbranchea aurantiaca*.

Al cabo de la fermentación, el micelio (biomasa) y el medio de crecimiento del hongo se separaron mediante una filtración simple a través de gasa estéril. El extracto orgánico del medio de cultivo se preparó mediante particiones sucesivas con CH_2Cl_2 . La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Por otro lado, el micelio se sometió a un proceso de maceración utilizando el mismo disolvente, por un periodo de ocho días. El extracto resultante de la maceración se filtró a través de gasa estéril y el disolvente orgánico se eliminó al vacío. Los dos extractos concentrados resultantes (micelio y caldo de fermentación) se analizaron por CCD y se combinaron con base en su similitud cromatográfica.

3.6 Fraccionamiento del extracto orgánico de *Malbranchea aurantiaca*.

El extracto seco (5.2 g) se fraccionó mediante una CCA sobre gel de sílice utilizando como eluyentes mezclas de disolventes (Hex, CH_2Cl_2 y MeOH) con un incremento gradual de polaridad. Se obtuvieron un total de 404 fracciones primarias las cuales se reunieron de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica en 19 fracciones primarias (FI-FXIX). Los detalles de este fraccionamiento se resumen en el Esquema 1 y Cuadro 6.



Esquema 1. Fraccionamiento primario del extracto del medio de cultivo y micelio de *M. aurantiaca*.

3.7 Separación y purificación de las malbranqueamidas (I), B (II) y C (VIII) a partir de la fracción FXIV mediante CLAR.

La separación de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción FXIV (402 mg; Cuadro 6), se realizó mediante CLAR en una columna de gel de sílice Waters® Symmetry Prep (fase reversa C₁₈), empleando como fase móvil ACN y un flujo de 2.0 mL/min. El proceso cromatográfico permitió la obtención de dos fracciones mayoritarias (tiempos de retención (T_R): 5.2 y 6.2 min), resultando la primera fracción colectada en un sólido amarillo con p.f. de 321-324 °C, reidentificado como la malbranqueamida (I). La segunda fracción colectada se sometió nuevamente a un proceso de separación y purificación mediante CLAR en una columna Phenomenex® Nucleosil, utilizando como fase móvil MeOH y un flujo de 3.5 mL/min. De este proceso de separación se obtuvieron

los productos **II** y **VIII** (Figura 3) sólidos color crema con p.f. de 348-352°C y 319-321°C, y T_R de 4.9 y 5.3 min, respectivamente.

Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento primario derivado del extracto orgánico de *M. aurantiaca* obtenido mediante CCA

Eluyente	Proporción	Número de Fracciones	Fracciones combinadas	Clave de la Fracción
Hex-CH ₂ Cl ₂	50:50	1-25	1-14	I
	40:60	26-147	15-23	II
	30:70	148-159	24-45	III
	20:80	160-175	46-62	IV
	10:90	174-185	63-81	V
CH ₂ Cl ₂	100	186-226	82-90	VI
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99:1	227-275	91-119	VII
	98:2	276-284	120-141	VIII
	95:5	285-324	142-165	IX
	94:6	325-346	166-200	X
	93:7	347-370	201-236	XI
	90:10	371-388	237-240	XII
	85:15	389-406	241-254	XIII
	50:50	407-413	255-261	XIV
			262-287	XV
			288-307	XVI
			308-330	XVII
			331-389	XVIII
			390-413	XIX

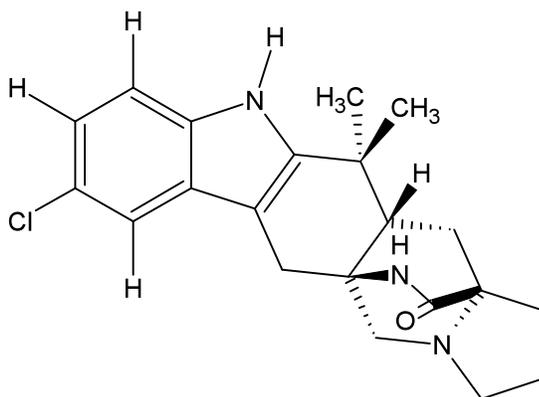


Figura 3. Estructura del compuesto **VIII**.

3.8 Ensayos Biológicos

3.8.1 Determinación del efecto fitotóxico.

La determinación del potencial fitotóxico de los extractos y compuestos puros se realizó mediante la evaluación de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* empleando el método de la caja de Petri (Anaya *et al.*, 1995). El bioensayo se realizó en cajas de Petri que contenían un disco de papel filtro de 10 cm de diámetro. Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en CH_2Cl_2 y se prepararon las disoluciones correspondientes para llegar a las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm para los extractos y 1, 10 50, 75 y 100 ppm para los compuestos puros. Posteriormente, 1 mL de cada una de estas disoluciones se vertió sobre el papel filtro contenido en las cajas de Petri y se permitió la evaporación completa del disolvente. A continuación, se agregaron 3 mL de agua y se inició la germinación de 15 semillas de la especie de prueba mediante la incubación de las mismas a 30°C durante 24 horas. La actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas y contando el número de semillas germinadas después del tiempo de crecimiento. La tricolorina A se utilizó como control positivo y se evaluó a las concentraciones finales de 500, 100 y 10 ppm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.8.2 Efecto de la malbranqueamida C (VIII) sobre la actividad de la enzima PDE1.

La actividad de la PDE1 en presencia de la proteína CaM se determinó de acuerdo con la metodología establecida por Sharma y Wang (Sharma y Wang, 1979), con algunas modificaciones, y se describe a continuación:

Preparación del medio de reacción: 0.015 unidades de PDE de cerebro de bovino, 0.8 μg de CaM de cerebro de bovino, 0.3 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalux atrox* y 30 nM de albúmina sérica de bovino (BSA) se incubaron, durante 1 hora a 30 °C, en un vial que contenía exactamente 2.5 mL de buffer de reacción.

Procedimiento: El ensayo se realizó en placas de 96 pozos de 250 μL de capacidad. Para cada muestra de prueba se prepararon 11 diluciones seriadas, para obtener concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 13, 20, 32, 50 y 65 μM . A continuación, se transfirieron a los pozos de la placa 10 μL de las diluciones de prueba conteniendo las concentraciones antes indicadas y 40 μL de la mezcla de reacción previamente preparada y mantenida a una temperatura aproximada de 30 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, la placa se incubó a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Al finalizar este tiempo, se agregó a cada pozo 10 μL de AMPc (10.8 μM) en intervalos de 10 segundos y hasta completar 15 minutos de tiempo de reacción a temperatura ambiente. Al término de este segundo periodo de incubación se adicionó a cada pozo 190 μL de verde de malaquita para detener la reacción. La cantidad de fosfato generado durante la reacción de hidrólisis del AMPc se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica de las muestras a 700 nm en un espectrofotómetro marca BioRad modelo 660. La actividad de la enzima se calculó de forma indirecta al interpolar las densidades ópticas registradas en una curva estándar preparada con fosfato monobásico de potasio en un intervalo de 0.2 a 3 nmoles. Para cada muestra se realizaron seis réplicas independientes. Todos los resultados se expresan como la media de seis valores \pm EE. Los valores de CI_{50} (concentración inhibitoria del 50% de la actividad de la enzima) se determinaron por un análisis no lineal y graficando una inhibición hiperbólica utilizando el programa Origin 7.0 (Microcal). Como control positivo se empleó clorpromazina (CHL).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento de las condiciones adecuadas para lograr una mayor producción de los metabolitos minoritarios presentes en la especie *Malbranchea aurantiaca*.

En un estudio previo (Martínez-Luis, 2007) se estipularon algunas condiciones de fermentación para el crecimiento del hongo *M. aurantiaca*, mismas que permitieron la excreción al medio de cultivo de compuestos fitotóxicos. Sin embargo, con la finalidad de explorar con mayor detalle la capacidad biosintética del hongo, en este trabajo se decidió cultivarlo variando las condiciones de agitación. Al cabo de las pruebas en pequeña escala (2L) en medio PDB comercial, al igual que en los estudios anteriores, se obtuvieron los extractos del micelio y medio de cultivo, por cada condición (estática vs agitación). La cantidad de extracto total (micelio y medio de fermentación) generado en las condiciones de agitación fue superior al obtenido en condiciones estáticas (0.62g y 0.42g, respectivamente). De manera adicional, el análisis cromatográfico en capa delgada de ambos extractos indicó, luego de revelar las placas con el reactivo de Dragendorff, que el extracto obtenido en condiciones de agitación contenía, además de la malbranqueamida (I) y la malbranqueamida B (II), alcaloides adicionales (Figura 4). Con base en estas observaciones se concluyó que la fermentación en condiciones de agitación, en medio PDB durante 30 días permite la obtención de los metabolitos adicionales de potencial interés.

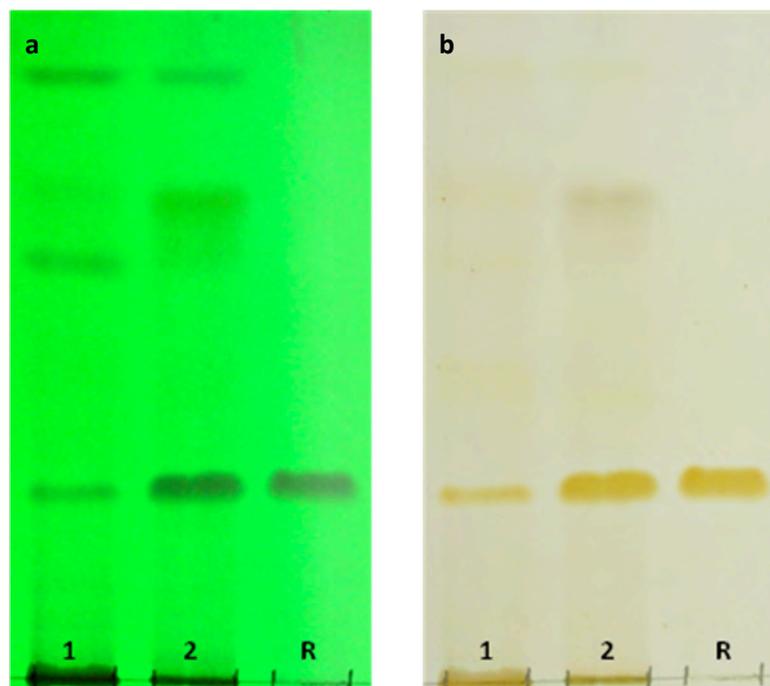


Figura 4. Cromatograma de los extractos orgánicos obtenidos del micelio y medio de fermentación de la especie *M. aurantiaca* observada bajo luz UV (a) a una longitud de 254nm y revelada con el reactivo Dragendorff (b). Sistema de elución CH_2Cl_2 :MeOH (97:3). 1) Estático, 2) agitación, y 3) referencia.

4.2 Cultivo en agitación de *M. aurantiaca* en mediana escala.

Una vez determinadas las condiciones apropiadas para la producción de los metabolitos minoritarios de interés, se realizó la fermentación del hongo *M. aurantiaca* en mediana escala. Para este propósito, se prepararon 18.5 L de medio de cultivo PDB comercial, el cuál se inoculó con la especie fúngica objeto de estudio. Una vez transcurrido el tiempo de fermentación (30 días), se realizaron las extracciones del medio de cultivo con CH_2Cl_2 (18.5 L x 6), y se obtuvieron los extractos de la biomasa y de medio de cultivo, los cuales fueron analizados en CCD. Debido a su similitud cromatográfica, se decidió reunir ambos extractos para su posterior estudio químico. Los rendimientos de los extractos obtenidos en este estudio se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimientos de los diferentes extractos obtenidos de la fermentación en mediana escala de *M. aurantiaca*.

Volumen de Medio de Cultivo	Extracto del Micelio (g)	Extracto del Medio (g)	Total (g)	Biomasa generada (g)
18.5 L	1.7	4.0	5.2	28.7

4.1 Separación de los análogos de la malbranqueamida (I).

El extracto orgánico resultante se fraccionó mediante una CCA. Las fracciones combinadas resultantes fueron analizadas en CCD y comparadas con una muestra de referencia de la malbranqueamida (I) aislada por Martínez-Luis y colaboradores (2006). Como se puede observar en la Figura 5, en la fracción FXIV se detectó la presencia del compuesto I y otros alcaloides minoritarios, por lo que se decidió estudiar esta fracción.

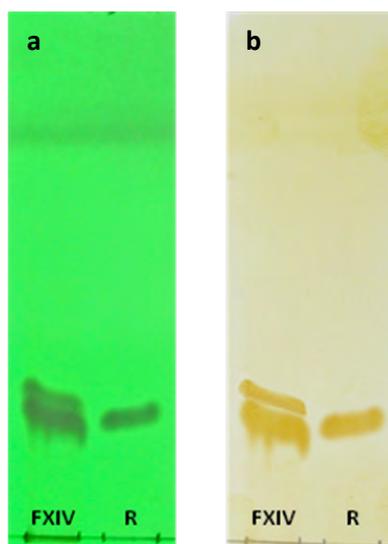


Figura 5. Cromatograma de la fracción FXIV obtenida a partir del extracto orgánico de *M. aurantiaca* vista bajo luz UV (a) a una longitud de 254nm y revelada con reactivo de Dragendorff (b). Sistema de elución CH_2Cl_2 :MeOH (97:3). R) Malbranqueamida (I).

A continuación, la fracción FXIV se analizó por CLAR con la finalidad de establecer las condiciones cromatográficas apropiadas para la separación de los metabolitos minoritarios deseados. Se ensayaron diferentes condiciones (fase reversa y normal, composición de la fase móvil y flujo) encontrándose que las mejores son las que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas analíticas en las que se obtiene la mejor resolución de los compuestos presentes en la FXIV.

Fase Estacionaria	Fase Reversa Columna Symmetry™ C18 5 µm (Waters®)
Fase Móvil	ACN
Flujo	0.5 mL/min

La aplicación de las condiciones indicadas en la Tabla 2 permitió la obtención del cromatograma que se indica en la Figura 6, en el cual se puede observar la presencia de dos compuestos (picos) mayoritarios, incluyendo la malbranqueamida (**I**, pico dos) y la subfracción dos, (pico uno). El escalamiento de estas condiciones a nivel semipreparativo (flujo de 2.0 mL/min y columna Symmetry C18 7µm, 7.8 mm x 300 mm) permitió la obtención de 93.4 mg de **I** y 47.6 mg de la subfracción dos.

Los estudios de RMN y espectrometría de masas revelaron que el pico uno (Figura 6) correspondía a una mezcla de dos compuestos. Con la finalidad de separar los componentes de esta subfracción, se optó por un segundo proceso de CLAR.

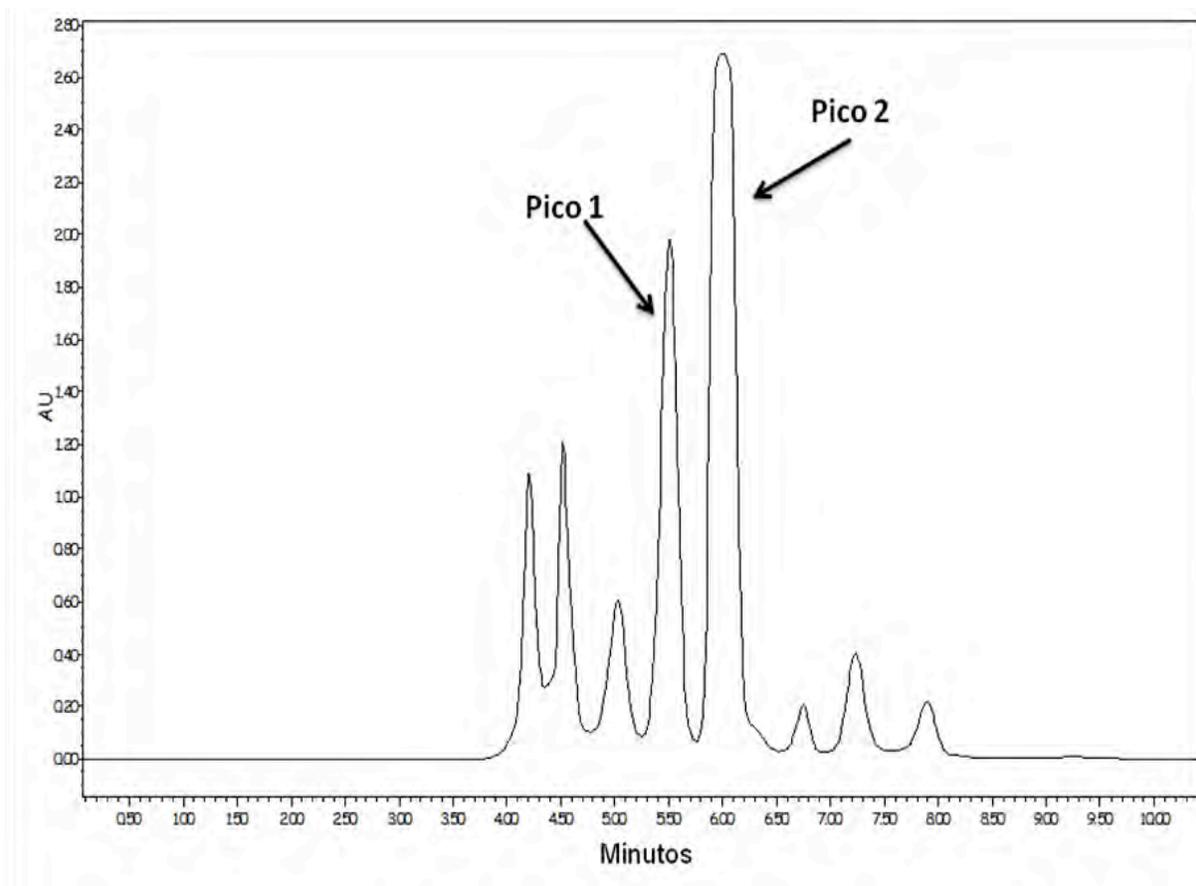


Figura 6. Cromatograma de la fracción primaria FXIV. Condiciones cromatográficas: detector UV (235 nm); sistema de elución: ACN; flujo: 2.0 mL/min; concentración: 4 mg/mL; pico uno (T_R : 5.2 min); pico dos (T_R : 6.2 min).

De la misma manera, se ensayaron diferentes condiciones para lograr la resolución de los compuestos presentes en la subfracción correspondiente al pico uno. Las condiciones finales se indican en la Tabla 3 y el cromatograma resultante en la Figura 7.

El proceso de separación se escaló a nivel semipreparativo (flujo 3.5 mL/min, columna Nucleosil C18 5 μ m, 10 mm x 250 mm), para obtener así los compuestos **II** (30 mg) y **VIII** (5 mg).

Tabla 3. Condiciones cromatográficas analíticas para la separación de la subfracción correspondiente al pico uno de la fracción FXIV.

Fase Estacionaria	Fase Reversa Columna Nucleosil® C18 5 µm (Phenomenex®)
Fase Móvil	MeOH
Flujo	0.3 mL/min

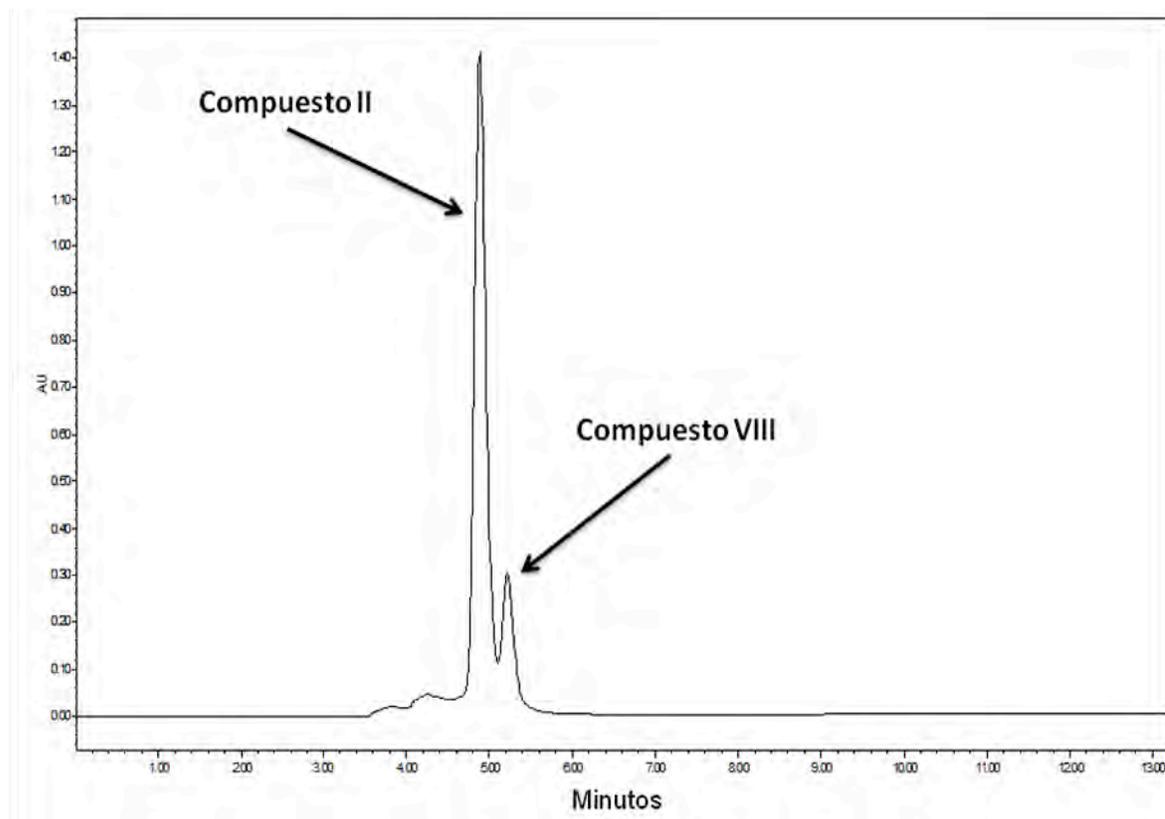


Figura 7. Cromatograma de la fracción secundaria, obtenida a partir de la fracción FXIV. Condiciones cromatográficas: detector UV (235 nm); sistema de elución: MeOH; flujo: 3.5 mL/min; concentración: 5 mg/mL; compuesto **II** (T_R : 4.9 min); compuesto **VIII** (T_R : 5.3 min).

Por medio de diferentes estudios espectroscópicos y espectrométricos, se logró elucidar las estructuras de ambos compuestos. El producto con menor tiempo de retención se

caracterizó como la malbranqueamida B (**II**) por comparación con una muestra auténtica (Figuroa *et al.*, 2008). El producto minoritario fue novedoso y se designó con el nombre trivial de malbranqueamida C (**VIII**; Figura 8).

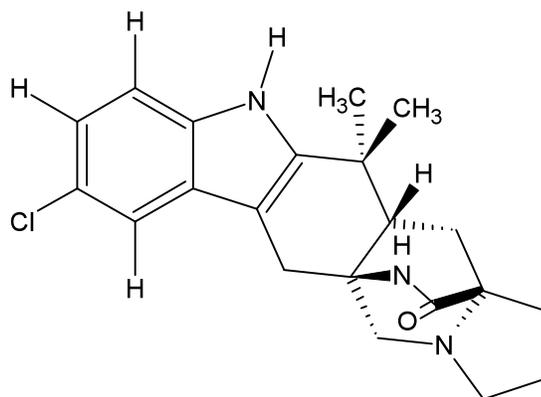


Figura 8. Estructura de la malbranqueamida C (**VIII**).

4.1 Caracterización de la malbranqueamida C (**VIII**).

El compuesto **VIII** se obtuvo como un sólido vítreo, soluble en CH_2Cl_2 y MeOH. El producto reaccionó positivamente frente al reactivo de Dragendorff. Su fórmula molecular se estableció por EM tipo FAB^+ como $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ON}_3\text{Cl}$, que permite un índice de deficiencia de hidrógenos de 11. La presencia de un átomo de cloro en la molécula, fue consistente con la abundancia relativa del pico $[(\text{M}+1)+2]$ (Silverstein *et al.*, 1991) con respecto al ión cuasimolecular $[\text{M} + 1]^+$ en el espectro de masas. La intensidad de los picos fue aproximadamente 2/3 de la intensidad del pico del ión cuasimolecular. Cabe destacar que la fórmula y peso molecular del producto fueron idénticos a los del compuesto **II** sugiriendo *a priori* que **VIII** es un isómero de este.

En el espectro en el IR (Tabla 4) del producto natural, se observa la presencia de bandas típicas para un grupo lactama a 3299 y 1659 cm^{-1} , en tanto que en el UV se aprecian bandas de absorción máxima a 235 y 285 nm . Estas evidencias espectroscópicas, así como la

reacción positiva frente al reactivo de Dragendorff, sugieren que **VIII** es también un alcaloide de naturaleza indólica (Macabeo *et al.*, 2005; Shoeb *et al.*, 2005).

Tabla 4. Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto **VIII**.

Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₄ ON ₃ Cl
Peso molecular	369.1608
UV(MeOH) λ_{máx}	230, 285 nm
IR (ν_{máx})	3296, 2954, 2920, 1737, 1657, 1460, 1313, 1240 cm ⁻¹
EM FAB⁺ m/z	371 (2.00), 369 (7.5), 365 (6.5), 325 (100), 311 (27.1), 228 (39.1), 206 (17.3), 163 (31.8), 164 (97.3), 135 (17.3), 120 (10), 96 (8.2)

Los espectros de RMN (Tablas 5 y 6, Figuras 9 y 10) fueron muy similares a los de la malbranqueamida B (**II**), difiriendo exclusivamente en las señales correspondientes a los hidrógenos y carbonos del anillo carbocíclico del grupo indol. Esta observación confirma que los compuestos **II** y **VIII** son isómeros.

En el espectro de ¹³C-RMN del compuesto **VIII** (Tabla 5 y Figura 9), al igual que en el caso de las malbranqueamidas aisladas anteriormente, se aprecian señales para 21 carbonos, los cuales, de acuerdo al análisis de espectro HSQC, corresponden a nueve carbonos cuaternarios, cuatro metinos, seis metilenos y dos metilos. De éstas, la que aparece en δ_C 173.0 (C-14) es atribuible a un carbonilo de lactama, en tanto que el conjunto de señales en el intervalo δ_C 143.4-103.4 son asignables al núcleo indol (Martínez-Luis *et al.*, 2006; Figueroa *et al.*, 2008), en congruencia con la reacción colorida de Dragendorff y los máximos de absorción observados en el espectro en el UV (Tabla 4). Las restantes señales del espectro de ¹³C-RMN fueron casi idénticas a las de la malbranqueamida (**I**) y malbranqueamida B (**II**).

Tabla 5. Datos de ^{13}C -RMN (MeOD, 100 MHz) de I, II y VIII.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm		
	I	II	VIII
1	28.1	28.5	26.6
2	23.6	22.4	22.51
3	55.3	55.2	53.9
5	59.4	59.5	58.6
5a	57.5	58.5	55.3
6	30.0	29.9	28.7
6a	104.8	103.7	103.4
6b	123.3	122.7	120.4
7	119.6	120.7	116.8
8	125.4	125.6	122.8
9	128.2	126.6	125.3
10	113.1	112.1	112.2
10a	137.3	135.4	134.9
11a	145.2	144.4	143.4
12	35.5	34.1	32.6
12a	48.5	46.9	47.3
13	32.5	33.9	31.2
13a	66.1	64.1	64.1
14	176.7	173.1	173.0
16	30.6	31.1	30.2
17	24.2	26.6	23.7

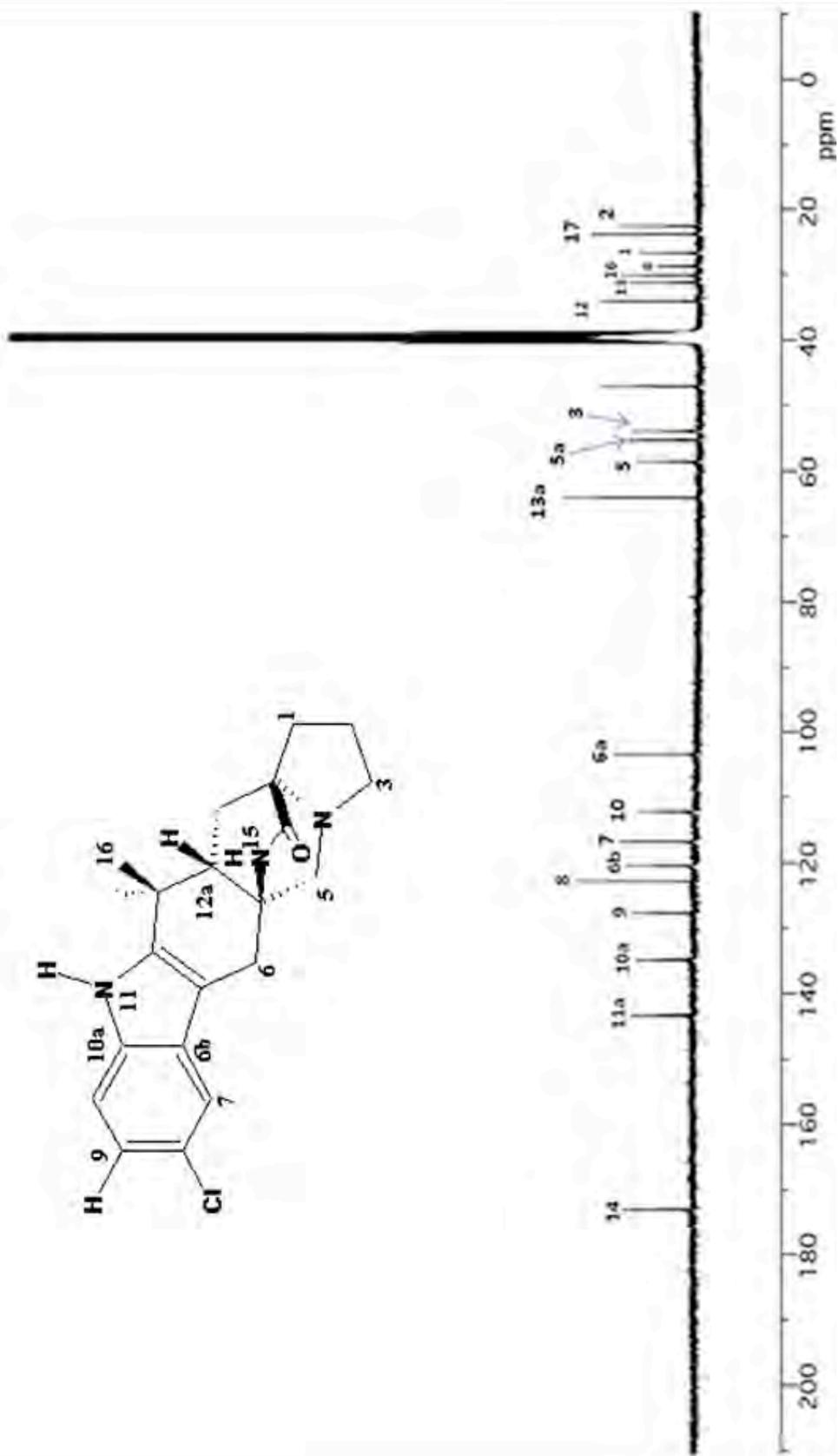


Figura 9. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto VIII.

Tabla 6. Datos de ^1H -RMN (MeOD, 400 MHz) de I, II y VIII.

Posición	δ ^1H ppm (J, Hz)		
	I	II	VIII
1	A 2.52 m B 1.46 m	A 2.42 m B 1.34 m	A 2.51 m B 1.46 m
2	1.87 m	1.72 m	1.86 m
3	A 3.05 m B 2.15 q (2, 5)	A 2.93 m B 2.41 q (2,5)	A 3.05 m B 2.15 q (2,5)
5	A 2.25 dd (2, 10) B 3.42 d (10)	A 2.13 dd (2,9) B 3.25 d (9.9)	A 2.26 dd (2,10) B 3.42 d (10)
5a			
6	A 2.86 m B 2.85 m	A 2.79 m B 2.72 m	A 2.86 m B 2.85 m
6a			
6b			
7	7.47 s	7.31 d (8.7)	7.32 d (2)
8		6.94 dd (1.8, 8.4)	
9			6.99 dd (2, 8.6)
10	7.39 s	7.26 d (1.7)	7.22 d (8.8)
10a			
11a			
12			
12a	2.14 m	2.07 m	2.14 m
13	A 1.99 m B 1.94 m	A 1.98 m B 1.91 m	A 1.99 m B 1.94 m
13a			
14			
16	1.32 s	1.26 s	1.32 s
17	1.42 s	1.31 s	1.42 s

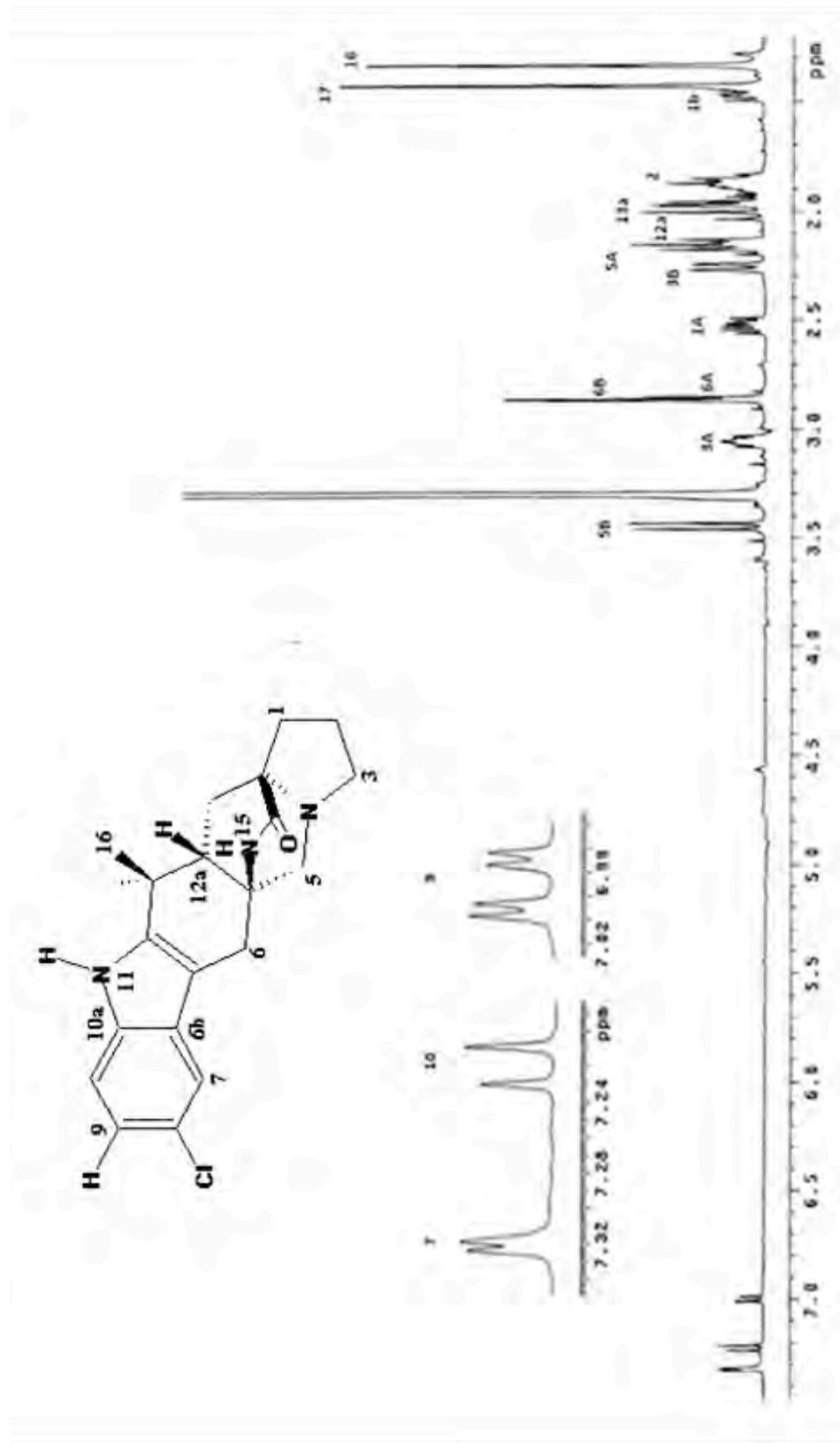


Figura 10. Espectro de ¹H-RMN del compuesto VIII.

El espectro de ^1H -RMN del alcaloide **VIII** contiene un sistema ABX asociado a un anillo aromático trisustituido. Este sistema es muy similar al observado para el compuesto **II**, aunque los desplazamientos químicos de los tres hidrógenos aromáticos son diferentes (Tabla 6 y Figura 10). En el caso del producto **VIII** las señales del sistema ABX se observan como un doblete en δ_{H} 7.32 (d, $J= 2$ Hz, H-7), un doblete en 7.22 (d, $J= 8.8$ Hz, H-10) y un doble de dobles en 6.99 (dd, $J= 8.6, 2$ Hz, H-9); en tanto que en el caso de la malbranqueamida B (**II**) se aprecia un doblete en δ_{H} 7.31 (d, $J= 8.7$ Hz, H-7), 7.26 (d, $J= 1.7$ Hz, H-10) y 6.94 (dd, $J= 8.4, 1.8$ Hz, H-8). Estas diferencias sugieren que el átomo de cloro está en la posición C-8 en el compuesto **VIII**. Las señales restantes del espectro de ^1H -RMN (Tabla 6) fueron iguales a las de las otras malbranqueamidas (Martínez-Luis *et al*, 2006; Figueroa *et al*, 2008).

La configuración de los centros quirales se asume similar a la de los compuestos **I** y **II** con base en consideraciones biogénicas.

La malbranqueamida C (**VIII**) es un nuevo miembro de la familia de indoles prenilados constituida por las brevianamidas, las paraherquamidas, las marcfortinas, las esclerotamidas, las asperparalinas, las aspergamidas, las avrainvilamidas, las estefacidinas y el metabolito VM55999 (Stocking *et al* 2001). Al igual que otros 25 alcaloides, el producto **VIII** contiene un núcleo bicíclico [2.2.2] diazaoctano.

El hallazgo del compuesto **VIII** como producto natural, podría indicar que tanto éste compuesto, así como **II**, pueden servir de precursores de **I**. Por otro lado, cabe destacar que el producto natural tiene las mismas propiedades espectroscópicas de RMN que el producto sintetizado por Williams y colaboradores durante el proceso de síntesis **I** y **II**. Los autores en colaboración con nuestro grupo de trabajo, decidieron sintetizar ambos isómeros con la finalidad de establecer inequívocamente la estructura del producto **II** (Miller *et al.*, 2008).

4.2 Evaluación de la fitotoxicidad del compuesto VIII.

De acuerdo a la metodología propuesta en la parte experimental (Inciso 3.8.1), se determinó el potencial fitotóxico de los compuestos aislados. Estas evaluaciones consistieron en determinar el efecto de los compuestos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus*. Los resultados obtenidos en esta evaluación se muestran en la Tabla 7, y como se desprende de los mismos, el producto VIII fue menos activo que I, sugiriendo que la presencia de los dos cloros es importante para una mejor actividad fitotóxica.

Tabla 7. Efecto de los compuestos I y VIII sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)
Malbranqueamida (I)	0.37
Malbranqueamida C (VIII)	49.6
Tricolorina	0.36

4.3 Evaluación de las propiedades inhibitorias del compuesto VIII sobre la proteína CaM.

La CaM como blanco de acción molecular de nuevos agentes con un potencial herbicida, es importante ya que en las plantas superiores esta proteína es fundamental en la vía de transducción de señales del Ca²⁺ durante su crecimiento y desarrollo vegetal. Es bien conocido que cerca de 50 enzimas y diversos canales iónicos son regulados por CaM en plantas, algunas de las cuales son muy importantes para su desarrollo, además de ser algunas exclusivas de estos organismos vegetales. Otras proteínas que no son exclusivas de plantas, son reguladas por CaM únicamente en éstas. Un tercer grupo de proteínas presentes en todo tipo de organismos son regulados también por CaM (Bouche *et al.*, 2005). En los primeros dos casos, estas enzimas podrían ser blancos específicos de agentes herbicidas.

Además, algunos herbicidas potenciales como la ofiobolina A, ejercen su efecto fitotóxico mediante su interacción con CaM, inhibiendo su habilidad de activar a sus enzimas efectoras (Au *et al.*, 2000; Evidente *et al.*, 2006). Tomando en cuenta esta información, la proteína CaM y sus isoformas constituyen blancos de acción importantes y específicos de compuestos fitotóxicos (Martínez-Luis, 2007).

En este estudio, el efecto de los compuestos fitotóxicos activos sobre la proteína CaM se determinó mediante un método enzimático *in vitro*; como enzima monitora se utilizó la PDE1 de cerebro de bovino. La actividad de la PDE1 en presencia de CaM se analizó de acuerdo con la metodología descrita por Sharma y Wang (1979), que se encuentra descrita también en la parte experimental.

Como se aprecia en la Tabla 8, el compuesto **VIII** inhibe la actividad del complejo PDE1-CaM-Ca²⁺, al igual **I** y el control positivo, la CHL, un antagonista muy bien caracterizado de la CaM. El efecto fue dependiente de la concentración (Figura 11).

Tabla 8. Efecto de los compuestos **I**, **II**, **VIII** y la CHL sobre la actividad del complejo Ca²⁺-CaM-PDE1.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	Potencia relativa
I	13.52 ± 1.40	1.6
II	24.67 ± 5.62	0.9
VIII	36.51 ± 8.10	0.6
CHL	21.98 ± 1.94	1.0

Los valores representan el promedio de seis réplicas independientes ± EE; p < 0.05

La potencia relativa se calculó con la fórmula: CI₅₀ (μM) clorpromazina/ CI₅₀ (μM) compuesto.

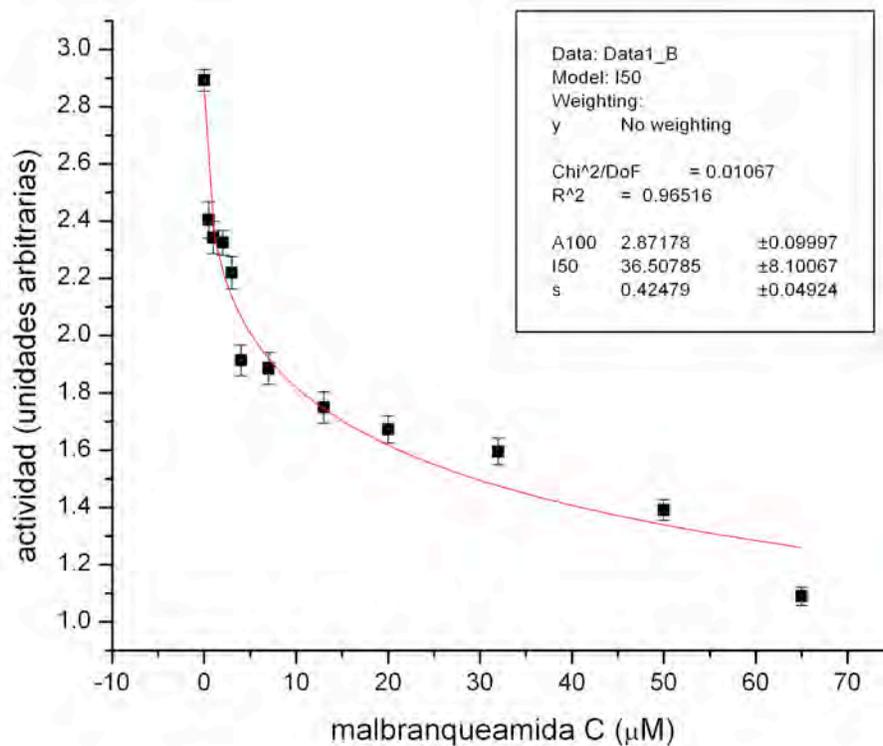


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones del compuesto **VIII** sobre la actividad del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1.

Como se puede observar en la Tabla 8, el compuesto **VIII** presentó actividad en contra de la CaM, sin embargo, ésta no es superior en magnitud con la presentada por el compuesto **I**. Estos resultados, indican que el posible blanco de acción de este tipo de compuestos pueda estar relacionado con la proteína CaM.

Los resultados del presente trabajo indican que la presencia de los dos cloros en la molécula de la malbranqueamida (**I**) es importante para un efecto inhibitor de la CaM mayor, ya que los dos análogos monoclorinados fueron menos potentes.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- La reinvestigación química de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca*, cultivada durante 30 días a temperatura ambiente en PDB y en condiciones de agitación, permitió el aislamiento y caracterización de la malbranqueamida C, un compuesto fitotóxico novedoso, análogo de la malbranqueamida y malbranqueamida B.
- La malbranqueamida C y sus análogos, pertenecen a un tipo raro de alcaloides indólicos que poseen una unidad estructural de tipo biciclo [2.2.2] diazaoctano. Este producto natural puede actuar como precursor biogenético de la malbranqueamida.
- La malbranqueamida C inhibió de manera moderada la germinación y el crecimiento radicular en semillas de *Amaranthus hypochondriacus*. El efecto fue menor al de la malbranqueamida, lo que permite inferir *a priori* que los dos átomos de cloro confieren a la malbranqueamida una mayor actividad fitotóxica.
- El efecto del compuesto **VIII** sobre la PDE1 fue similar al de la malbranqueamida, lo que sugiere que el posible blanco de acción de este tipo de compuestos está relacionado con la proteína CaM.
- El presente trabajo constituye una aportación adicional al conocimiento de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca*, al esclarecimiento del posible modo de acción de la fitotoxina malbranqueamida y sus análogos, así como al campo de los productos naturales con propiedades fitotóxicas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anaya A.L., Calera M.R., Mata, R., Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology* **7**, 2145-2152.
- Au, T.K., Chick, W.S.H., Leung, P.C. (2000). The biology of ophiobolins. *Life Sciences* **67**, 733-742
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W.A., Fromm, H. (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 435-466.
- Chiung, Y.M., Fujita, T., Nakagawa, M., Nozaki, H., Chen, G.Y., Chen, Z.C., Nakayama, M. (1993). A novel quinine antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54. *Journal of Antibiotics* **46**, 1819-1826.
- Duke, S.O., Dayan F.E., Rimando A.M., Schradler K.K., Aliotta G., Oliva A., Romagni J.G. (2000). Chemicals from nature weed management *Weed Science* **50**, 138-151.
- Duke, S.O., Dayan, F. E., Romagni, J.G., Rimando, A. M. (2001). Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research* **40**, 99-111.
- Duke, S.O., Romagni, J.G., Dayan, F.E. (2002). Natural products as sources of new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection* **19** (8-10), 583-589.
- Duke, S.O., Dayan, F.E., Baerson, S.R., Romagni, J.G., Agarwal, A., Olivia, A. (2003). Natural phytotoxins with potential for development in weed management strategies. *Chemistry and crop protection*. Wiley VHC. Germany, pp 143-154.

- Duke, S.O., Dayan, F.E., Kagan, I.A., Baerson, S.R. (2005). New herbicide target sites from natural compounds. ACS Symposium Series 892 (New discoveries in Agrochemicals), 151-150.
- Duke, S.O., Rimando, A.M., Scramer, K.K., Cantrell, C., Meepagala, K.M., Wedge, D.E., Tabanca, N., Dayan, F.E. (2008). Natural Products for pest management. EN: Selected topics in the chemistry of natural products. Ikan, R., *World Scientific Publishing*, Singapore. pp 236-243.
- Evidente, A., Andolfi, A., Cimmino, A., Vurro, M., Fracchiolla, M., Charudattan, R. (2006). Herbicidal Potential of Ophiobolins Produced by *Drechslera gigantean*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1779-1783.
- Figueroa, M., González, M.C., Mata, R. (2008). Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Natural Product Research* **22** 709-714.
- Graefe U., Haenel, F., Munder, T., Schlegel, B. (2004). An antiviral metabolite produced by *Malbranchea cinnamomea*, *Journal of Antibiotics*. **57**, 755-759.
- Hosoe, T., Izuka, T., Komai, S-I., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., Fukushima, K., Kawai, K-I (2005). 4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilatador isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry* **66**, 2776-2779.
- Macabeo, A.P.G., Krohn, K., Gehle, D., Read, R.W., Brophy, J.J., Cordell, G.A., Franzblau, S.G., Aguinaldo, A.M. (2005). Indole alkaloids from the leaves of Philippine *Alstonia scholaris*. *Phytochemistry* **66**, 1158-1162
- Macías, F., Castellano, D., Molinillo, J. (2000). Search for a standard phytotoxic bioassays for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2512-2521.

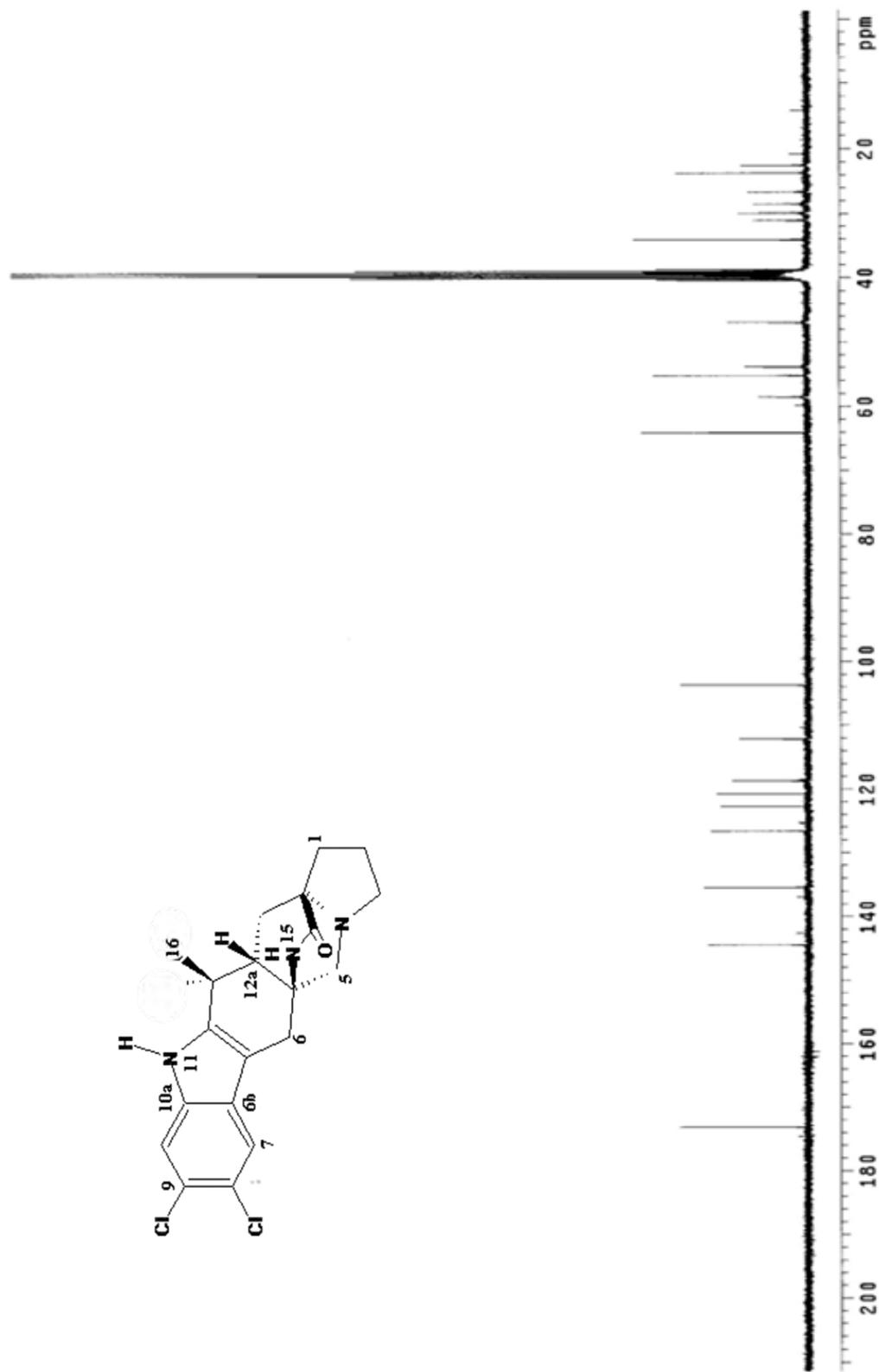
- Macías, M., Gamboa, A., Ulloa, M., Toscano, R.A., Mata, R. (2001). Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry* **58**, 751-758.
- Macías, M., Hernández, B.E., Jiménez, M., González, M., Gleen, A., Hanlin, R., Hernández, S., Saucedo, A., Muria, J., Anaya, A. (2008). Naphtoquinone spiroketal with allelochemical activity from the new discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* **69**, 1185-1196.
- Martínez-Luis, S., González, M.C., Ulloa, M., Mata, R. (2005). Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry* **66**, 1012-1016.
- Martínez-Luis, S., Pérez-Vásquez, A., Mata, R. (2007). Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry* **68**, 1882-1903.
- Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M.C., Lira-Rocha, A., Mata, R. (2006). Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca* *Tetrahedron* **62**, 1817-1822.
- Martínez-Luis, S. *Malbranchea Aurantiaca* Sigler & Carmich, una fuente novedosa de fitotoxinas antagonistas de la proteína calmodulina. (2007). Tesis Doctorado, Facultad de Química, UNAM.
- Mata, R., Gamboa, A., Macías, M., Santillan, S., Ulloa, M., Gonzalez, M.C. (2003). Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulin-dependent activity of the enzymes *cAMP* phosphodiesterase and NAD-kinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4559-4562.
- Miller, K.A., Welch, T.R., Greshock, T.J., Ding, Y., Sherman, D.H., Williams, R.M. (2008). Biomimetic total synthesis of Malbrancheamide and Malbrancheamide B. *Journal of Organic Chemistry* **73**, 3116-3119.
- Rivero-Cruz, J.F., García-Aguirre, G., Cerda-Rojas, C.M., Mata, R. (2000). Conformation behavior and absolute stereostructure of two phytotoxic nonenolides from the fungus *Phoma herbarum*. *Tetrahedron* **56**, 5337-5344.

- Saito, M., Matura, I., Okazaki, H. (1979). Tf-26Vx, an antibiotic produced by a thermophilic fungus. *The Journal of Antibiotics* **11**, 1210-1212.
- Sanz-Cervera, J.F., Williams, R. M., Marco, J.A., López-Sánchez, J.M., González, F., Martínez, M.E., Sancenón, F. (2000). A synthetic model for the [4+2] cycloaddition in the biosynthesis of the brevianamides, paraherquamides, and related compounds. *Tetrahedron* **56**, 6345-6358.
- Schlegel, B., Haenel, F., Gollmick, F.A., Saluz, H.P., Graefe, U. (2003) New quinones and hydroquinones from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286 and HKI 296 and interaction with Tax/CREB expression system in yeast. *Journal of Antibiotics*, **56**(11), 917-922.
- Schlegel, B.; Haertl, A.; Gollmick, F.A.; Graefe, U. (2003). 7-Methoxy-2,3-dimethylbenzofuran-5-ol, a new antioxidant from *Malbranchea cinnamomea* HKI 0286., *Journal of Antibiotics*, **56** (9).
- Sharma, B., Deo, S.K., Bachas, L.G., Daunert, S. (2005). Competitive binding assay using fluorescence resonance energy transfer for the identification of calmodulin antagonists. *Bioconjugate Chemistry* **16**, 1257-1263.
- Sharma, R.K., Wang, J.H. (1979). Preparation and assay of the Ca²⁺ dependent modulator protein. *Advances in cyclic nucleotide research*. Raven Press, New York, pp 187-198.
- Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., MacManus, S.M., Nahar, L., Thoo-Lin P.K., Sarker, S.D. (2005). Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*. *Tetrahedron* **61**, 9001–9006.
- Sigler, L., Carmichel, J.W. (1976). Taxonomy of *Malbranchea* and some other Hyphomycetes with arthroconidia. *Micotaxon* **4**, 349-488.

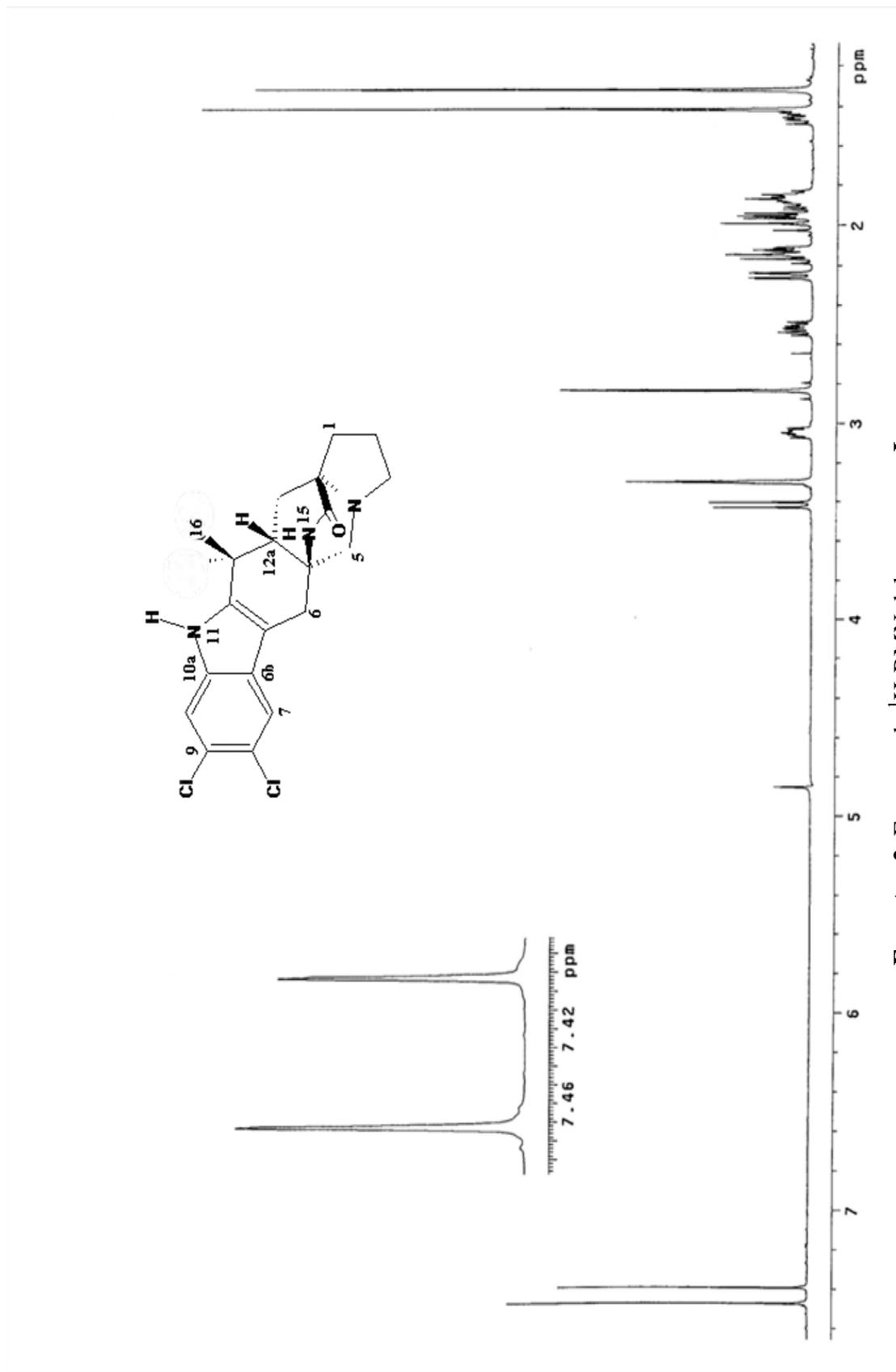
- Silverstein, R.M., Clayton, B.G., Morrill, C.T. (1991). Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons, New York Inc., pp. 36.
- Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography. Academic Press Inc., p. 478.
- Stocking C., Williams R.W. (2003). Chemistry and biology of biosynthetic Diels-Alder reactions. *Angewandte Chemie, International Edition in English* **42**, 3078-3115.
- Stocking, E.M., Sanz-Cervera, J. F., Unkefer, C.J., Williams, R.M. (2001). Studies on the biosynthesis of paraherquamide. Construction of the amino acid framework. *Tetrahedron* **57**, 5303-5320.
- Stocking, E.M.; Sanz-Cervera, J. F.; Williams, R.M. (2008). Total Synthesis of VM55599. Utilization of an Intramolecular Diels-Alder Cycloaddition of Potential Biogenetic Relevance. *Journal of American Chemical Society*. **122**, 1675-1683.
- Wilson, B.J., Yang, D.T., Harris, T.M. (1973). Production, isolation, and preliminary toxicity studies of Brevianamide A from cultures of *Penicillium viridicatum*. *Applied microbiology* **26**, 633-635.

Apéndice

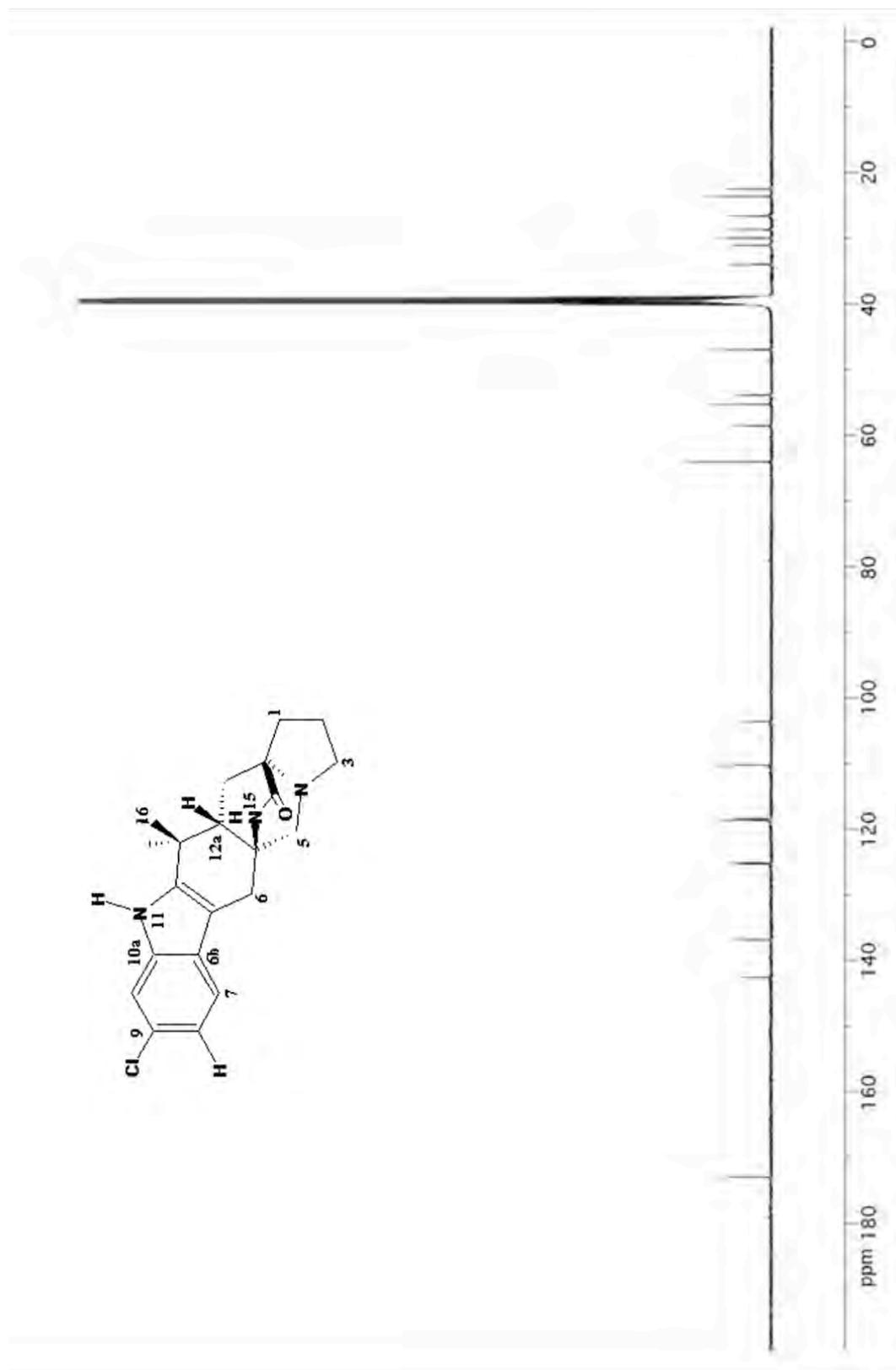
Espectros



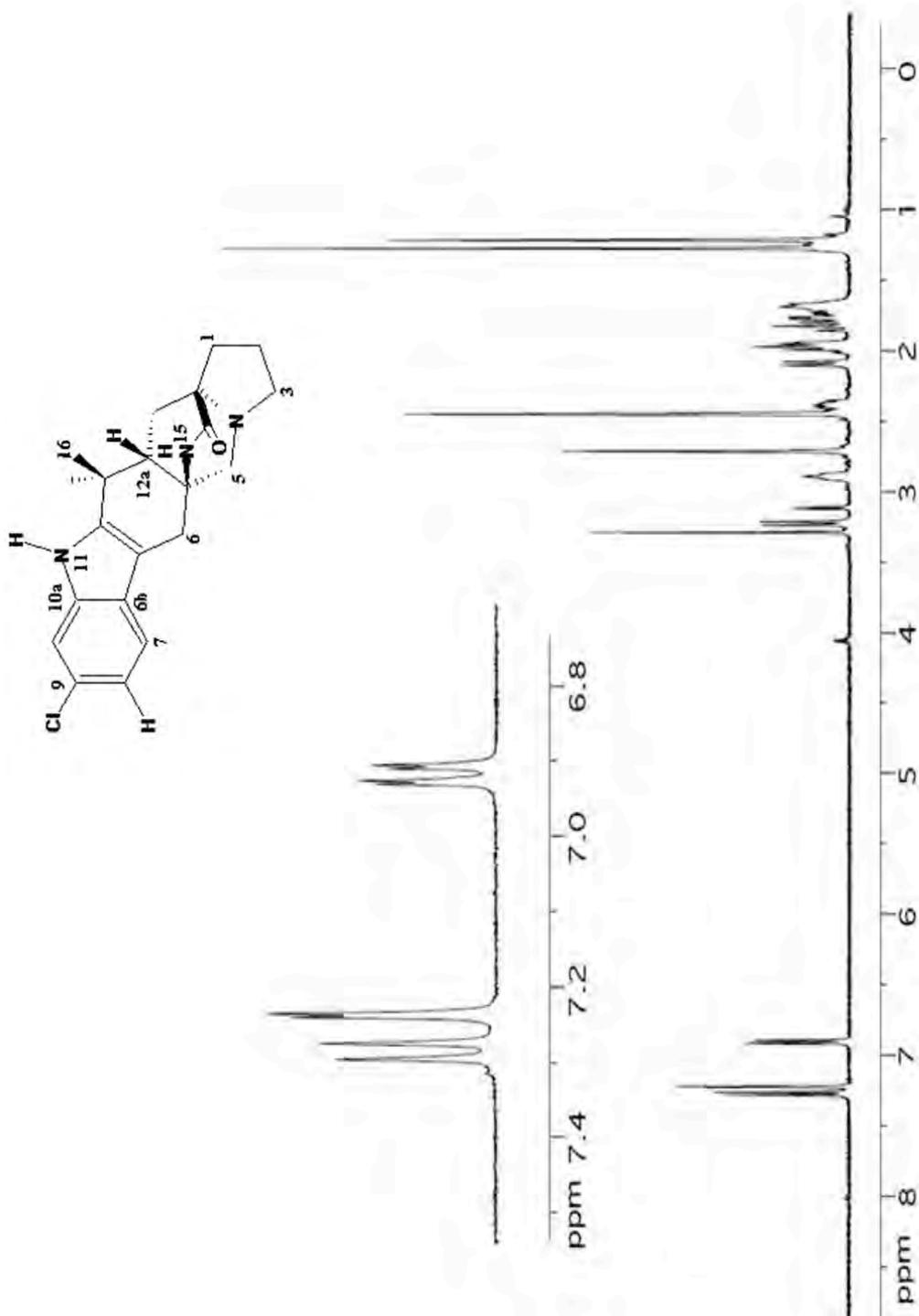
Espectro 1. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto I.



Espectro 2. Espectro de ¹H-RMN del compuesto I.



Espectro 3. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **II**.



Espectro 4. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **II**.